

Université de Montréal

Rôle de la voie de signalisation Hippo dans les organes stéroïdiens

par Adrien Levasseur

Centre de recherche en reproduction et fertilité (CRRF)

Département de biomédecine vétérinaire

Faculté de médecine vétérinaire

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

Avril 2018

© Adrien Levasseur, 2018

Résumé

La voie de signalisation Hippo est impliquée dans de nombreux processus au cours du développement embryonnaire ainsi que chez l'adulte afin d'assurer, entre autres, la prolifération et la différenciation cellulaire, et le maintien de l'homéostasie tissulaire. Les principaux effecteurs qui agissent en aval de cette voie de signalisation sont les cofacteurs transcriptionnels YAP (Yes associated protein) et TAZ (Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif). La voie Hippo a été étudiée dans de nombreux tissus pour son rôle dans la physiologie et certaines pathologies, cependant très peu d'études ont été menées sur le rôle de cette voie dans le testicule et la glande surrénale.

L'hypothèse émise est que cette voie de signalisation pourrait jouer un rôle important dans le développement (déterminisme sexuel mâle) et la fonction (synthèse de testostérone) des testicules ainsi que dans la physiologie surrénalienne. L'objectif de ce travail de doctorat est d'élucider le rôle des effecteurs de la voie Hippo, YAP et TAZ, dans le développement et la fonction des cellules de Sertoli, des cellules de Leydig, ainsi que dans les cellules du cortex surrénalien.

Nos travaux ont mis en évidence le rôle de YAP/TAZ dans le maintien de l'identité des cellules de Sertoli. Nous avons constaté que l'inactivation de *Yap/Taz* dans un modèle de culture primaire de cellules immatures de Sertoli entraîne une diminution de l'expression des gènes impliqués dans le déterminisme sexuel mâle au profit des gènes de différenciation femelle. Nous avons ensuite procédé à la création d'un modèle murin permettant l'inactivation conditionnelle de *Yap/Taz* dans les cellules de Sertoli (*Yap*^(flox/flox);*Taz*^(flox/flox);*Amh*^(cre/+)). Malgré une légère modification de l'expression de certains gènes associés au déterminisme sexuel, l'inactivation de *Yap/Taz* n'entraînait pas de changement de sexe chez les adultes.

Afin d'évaluer le rôle de la voie Hippo dans le développement des gonades (et des glandes surrénales) nous avons créé un modèle de souris permettant l'inactivation de *Yap/Taz* dans les précurseurs des cellules de Sertoli, des cellules de Leydig et des cellules de l'adrénocortex au niveau du primordium adrenogonadique (*Yap*^(flox/flox);*Taz*^(flox/flox);*Nr5a1*^(cre/+)). Si la recombinaison dans les cellules de Sertoli et de Leydig n'a pas été efficace,

la recombinaison au niveau du cortex surrénalien a été hautement efficace. La caractérisation du modèle de souris *Yap*^(flox/flox); *Taz*^(flox/flox); *Nr5a1*^(cre/+) nous a donc permis de définir un rôle pour YAP/TAZ dans le maintien de la glande surrénale adulte.

Enfin, afin de déterminer le rôle de la voie Hippo dans les cellules de Leydig, nous avons évalué le rôle de YAP dans les cellules de Leydig MLTC-1. Par l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique de YAP et des ARNs interférants (siARNs) dirigés contre *Yap*, nous avons démontré que YAP régula la stéroïdogénèse de manière négative dans ces modèles de cellules de Leydig. Nous avons aussi démontré que YAP pouvait interagir avec le promoteur proximal de *Star* (Steroidogenic acute regulatory protein) et que cette liaison était perturbée par la voie PKA (Protéine kinase A) qui entraîne la phosphorylation de YAP suggérant un mécanisme d'action par lequel YAP régule la stéroïdogénèse.

En résumé, à l'aide d'approches *in vitro* et *in vivo*, nous avons mis en évidence pour la première fois le rôle de la voie Hippo dans le maintien de l'identité « mâle » des cellules de Sertoli, dans la régulation de la stéroïdogénèse dans les cellules de Leydig dans des cellules immortalisées ainsi que dans le maintien de l'homéostasie du cortex surrénalien.

Mots-clés : YAP, TAZ, cellules de Sertoli, cellules de Leydig, cortex surrénalien, développement, homéostasie, stéroïdogénèse

Abstract

Hippo is an evolutionary conserved signaling pathway with well-established roles in cell fate determination, differentiation, and proliferation during embryonic and postnatal development, as well as tissue homeostasis throughout adulthood. The main effectors of the Hippo pathway are the transcriptional coregulators YAP (Yes associated protein) and TAZ (Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif). The Hippo pathway has been studied in many tissues for its diverse roles in physiology and pathology, however few studies have been done to elucidate its role in the testis and the adrenal gland.

We hypothesized that the Hippo pathway could play a major role in testicular development (male sexual determination) and function (testosterone production) as well as adrenal gland physiology. The objectives of the present thesis are to elucidate the function of the Hippo effectors YAP and TAZ in the development and function of the Sertoli and Leydig cells, as well as in adrenocortical cells.

The results of this thesis highlighted the role of YAP/TAZ for the maintenance of the male identity of the Sertoli cells. We found that *Yap/Taz* inactivation in primary cultured immature Sertoli cells leads to a downregulation of male sex determination genes and an upregulation of genes involved in female differentiation. Then, we generated a mouse model in which *Yap* and *Taz* were conditionally deleted in Sertoli cells (*Yap*^(flox/flox);*Taz*^(flox/flox);*Amh*^(cre/+)). Despite slight modifications in the expression of genes associated with sex determination, *Yap/Taz* inactivation didn't cause sex reversal in adults.

In order to evaluate the role of Hippo in gonadal (and adrenal gland) development, we generated a new mouse model to direct *Yap/Taz* inactivation in Sertoli, Leydig and adrenocortical progenitors cells (*Yap*^(flox/flox);*Taz*^(flox/flox);*Nr5a1*^(cre/+)). Recombination wasn't efficient in Sertoli and Leydig cells but was highly efficient in the adrenocortical cells. Characterization of *Yap*^(flox/flox);*Taz*^(flox/flox);*Nr5a1*^(cre/+) the mouse model allowed us to define a role for YAP/TAZ in adult adrenal gland maintenance.

Finally, to determine the role of the Hippo pathway in Leydig cells, we evaluated the YAP's role in the Leydig cell lines MLTC-1. Using a pharmacological inhibitor of YAP and

siRNAs targeting *Yap*, we showed that YAP negatively regulates steroidogenesis in these Leydig cell line models. We also demonstrated that YAP can recruit the proximal promoter of *Star*, and that this recruitment decreases following PKA-dependent YAP phosphorylation, suggesting a mechanism of action whereby YAP regulates steroidogenesis.

To resume, combining *in vitro* and *in vivo* approaches, we elucidated for the first time a role of the Hippo signaling pathway in Sertoli cell differentiation, in steroidogenesis regulation in Leydig cells, as well as in adrenocortical homeostasis.

Keywords : YAP, TAZ, Sertoli cells, Leydig cells, adrenocortical cells, development, homeostasis, steroidogenesis

Table des matières

Résumé	i
Abstract	iii
Table des matières	v
Liste des tableaux	xi
Liste des figures	xii
Liste des abréviations	xv
Remerciements	xxv
Avant propos	xxvi
Chapitre 1 : Introduction	1
A. Le testicule et la glande surrénale : développement et fonctions	1
1. Introduction générale	1
2. Le primordium adrénogonadique : entre gonade et surrénale	2
3. Développement et fonction des cellules somatiques du testicule	4
3.1. Développement et fonction des cellules de Sertoli	4
3.1.1. Développement et fonctions des cellules de Sertoli fœtales	4
3.1.2. Développement et fonctions des cellules de Sertoli postnatales.....	8
3.2. Développement des cellules de Leydig.....	11
3.2.1. Les cellules de Leydig fœtales et adultes.....	11
3.2.2. Les cellules de Leydig fœtales	12
3.2.2.1. Origine des FLCs	12
3.2.2.2. Différenciation des FLCs.....	13
3.2.2.3. Fonctions des FLCs	16
3.2.2.4. Devenir des FLCs	17
3.2.3. Les cellules de Leydig adultes (ALCs).....	18
3.2.3.1. Origine des ALCs	18
3.2.3.2. Différenciation des ALCs	19
3.2.3.3. Régulation de la différenciation des ALCs	21
3.2.3.4. Fonctions des ALCs.....	23
3.2.3.5. Devenir des ALCs.....	24

4. La glande surrénale : développement et fonction	25
4.1. Développement embryonnaire précoce de la glande surrénale.....	25
4.2. Développement embryonnaire tardif et postnatale : formation du cortex adulte et zonation.....	27
4.2.1. Origine de l'adrénocortex adulte	27
4.2.2. Modèle de migration « centripète »	29
4.2.3. Zonation du cortex	29
4.2.3.1. Zonation de la zone glomérulée.....	31
4.2.3.2. Zonation de la zone fasciculée.....	32
4.2.4. La zone X.....	33
4.3. Maintien et renouvellement du cortex	33
B. Stéroïdogénèse surrénalienne et testiculaire.....	39
1. Le cholestérol, précurseur de la stéroïdogénèse	39
1.1. Le cholestérol comme substrat.....	39
1.2. Transfert du cholestérol à la mitochondrie	40
2. Synthèse des stéroïdes surrénaliens et testiculaires	42
2.1. Voie commune	42
2.2. Spécificité des cellules de Leydig.....	42
2.3. Spécificité de la glande surrénale	43
3. Régulation de la production des stéroïdes	46
3.1. Au niveau central	46
3.1.1. L'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique	46
3.1.2. L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien	47
3.2. Voies de signalisation activées par la LH et L'ACTH	47
3.2.1. Voie AMPc/PKA	47
3.2.2. Voie du calcium	50
3.2.3. Autres voies de signalisation	52
3.3. Régulation de l'expression de <i>Star</i>	53
4. Contribution des cellules de Sertoli à la stéroïdogénèse.....	55
C . La voie de signalisation Hippo	56
1. Hippo : Voie de signalisation canonique	56

1.1. Découverte et signalisation Hippo chez la drosophile.....	56
1.2. La signalisation Hippo chez les mammifères	57
2. Les effecteurs de la voie Hippo	58
2.1. YAP.....	58
2.2. TAZ.....	62
3. Régulation de la voie Hippo	62
3.1. En amont de la voie.....	62
3.1.1. Polarité cellulaire et localisation des composants de la voie Hippo	63
3.1.2. Mécaanotransduction : intégrer les contacts physiques	64
3.1.3. Récepteurs couplés aux protéines G et diffusion du signal	65
3.2. En aval de la voie.....	66
3.2.1. Régulation transcriptionnelle	66
3.3. Interactions avec d'autres voies de signalisation	67
3.3.1. Hippo et la voie des WNT	67
3.3.2. Hippo et la voie Hedgehog	69
3.3.3. Hippo dans la voie de l'apoptose	70
3.3.4. Hippo et les autres voies de signalisation	71
4. La voie Hippo dans le testicule.....	72
5. La voie Hippo dans la glande surrénale.....	73
6. Contribution de la voie Hippo à la stéroïdogénèse	73
Chapitre 2 : Hypothèses et objectifs.....	75
Chapitre 3 : 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.....	77
1. Abstract.....	79
2. Introduction.....	79
3. Materials and methods	80
3.1. Ethics.....	80
3.2. Histopathology and immunohistochemistry	81
3.3. Sertoli cell culture and adenoviral infection	81
3.4. Transgenic mouse strains.....	82

3.5. Reverse transcription-quantitative PCR.....	82
3.6. Immunoblot and immunofluorescence analyses.....	83
3.7. Sertoli cell counts and seminiferous tubule diameter measurement.....	83
3.8. Intratesticular testosterone measurement.....	84
3.9. Epididymal sperm counts.....	84
3.10. BrdU incorporation assay.....	84
3.11. Apoptosis evaluation.....	85
3.12. Statistical analyses.....	85
4. Results.....	85
4.1. Expression of YAP and WWTR1 in the mouse testis.....	85
4.2. YAP and WWTR1 regulate Sertoli cell differentiation <i>in vitro</i>	86
4.3. CTNNB1 is not involved in the abnormal Sertoli cell differentiation caused by the deletion of <i>Yap</i> and <i>Wwtr1</i>	87
4.4. YAP and WWTR1 expression is reduced in the Sertoli cells of <i>Yap</i> ^{flox/flox} ; <i>Wwtr1</i> ^{flox/flox} ; <i>Amh</i> ^{cre/+} mice.....	88
4.5. YAP and WWTR1 loss does not induce sex reversal in <i>Yap</i> ^{flox/flox} ; <i>Wwtr1</i> ^{flox/flox} ; <i>Amh</i> ^{cre/+} mice.....	89
4.6. Decreased testis weights and Sertoli cells numbers in <i>Yap</i> ^{flox/flox} ; <i>Wwtr1</i> ^{flox/flox} ; <i>Amh</i> ^{cre/+} mice.....	89
5. Discussion.....	91
6. Acknowledgments.....	94
7. References.....	94
8. Figures.....	101
9. Tables.....	108
10. Supplementary data.....	109
10.1. Supplementary figures.....	109
10.2. Supplementary tables.....	118
Chapitre 4 : Targeted disruption of YAP and TAZ impairs the maintenance of the adrenal cortex.....	121
1. Abstract.....	123
2. Introduction.....	123

3. Materials and methods	125
3.1. Ethics.....	125
3.2. Transgenic mouse strains.....	125
3.3. Histopathology and immunohistochemistry	125
3.4. Hormone measurements.....	126
3.5. Oil red O staining.....	127
3.6. Reverse transcription-quantitative PCR.....	127
3.7. BrdU incorporation assay	128
3.8. Dexamethasone treatment.....	128
3.9. Statistical analyses	128
4. Results.....	128
4.1. YAP and TAZ are expressed in the zG and zF of the adrenal cortex	128
4.2. Degeneration of the adrenal cortex in male <i>Yap</i> ^{flox/flox} ; <i>Taz</i> ^{flox/flox} ; <i>Nr5a1</i> ^{cre/+} mice ..	129
4.3. Adrenocortical steroidogenesis is deficient in male <i>Yap</i> ^{flox/flox} ; <i>Taz</i> ^{flox/flox} ; <i>Nr5a1</i> ^{cre/+} mice.....	132
4.4. Adrenal gland progenitor cell defects in male <i>Yap</i> ^{flox/flox} ; <i>Taz</i> ^{flox/flox} ; <i>Nr5a1</i> ^{cre/+} mice	133
5. Discussion.....	134
6. Acknowledgments.....	138
7. References.....	138
8. Figures.....	144
9. Tables.....	154
10. Supplementary data.....	155
10.1. Supplementary figures	155
10.2. Supplementary table.....	165
Chapitre 5 : YAP regulates steroidogenesis in the Leydig cell line MLTC-1.....	166
1. Abstract.....	168
2. Introduction.....	168
3. Materials and methods	170
3.1. Immunohistochemistry	170
3.2. Cell culture and treatments	170
3.3. Immunoblotting.....	171

3.4. Reverse transcription-quantitative PCR.....	171
3.5. Hormone measurements.....	172
3.6. Small interfering RNAs	172
3.7. Chromatin immunoprecipitation-qPCR.....	172
3.8. Statistical analyses	173
4. Results.....	173
4.1. Hippo signaling is active in Leydig cells.....	173
4.2. cAMP/PKA signaling regulates Hippo signaling in the MLTC-1 Leydig cell line.	174
4.3. Hippo signaling regulates steroidogenesis in MLTC-1 Leydig cell line	174
4.4. YAP is recruited to the proximal promoter of Star.....	176
5. Discussion.....	177
6. Acknowledgments.....	181
7. References.....	181
8. Figures.....	188
9. Tables.....	195
Chapitre 6 : Discussion générale et conclusion	196
1. Discussion générale	196
1.1. Rôle de YAP et TAZ dans les cellules de Sertoli	196
1.2. Rôle de YAP dans les cellules de Leydig	199
1.3. Rôle de YAP et TAZ dans l'adrénocortex surrénalien	203
1.4. Extrapolation des résultats obtenus dans les cellules de Leydig aux cellules adrénocorticales	208
1.5. Perspectives.....	209
2. Conclusion	211
Bibliographie	213

Liste des tableaux

Chapitre 3 : 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.....	77
Table 3.1 : Mating trials.....	108
Table S3.1 : List of antibodies	118
Table S3.2 : Genotyping primer sequences	119
Table S3.3 : Quantitative RT-PCR primer sequences	120
Chapitre 4 : Targeted disruption of YAP and TAZ impairs the maintenance of the adrenal cortex.....	121
Table 4.1 : Lists of Antibodies	154
Table S4.1 : Quantitative RT-qPCR primer sequences	165
Chapitre 5 : YAP regulates steroidogenesis in the Leydig cell line MLTC-1.....	166
Table 5.1 : Primer sequences	195

Liste des figures

Chapitre 1 : Introduction	1
Figure 1.1. Développement de la glande surrénale et des gonades chez la souris à partir du primordium adrénogonadique	5
Figure 1.2. Traçage cellulaire des cellules de Leydig et de Sertoli.	9
Figure 1.3. Développement embryonnaire de la glande surrénale chez la souris à partir du primordium adrénocortical.....	30
Figure 1.4. Maintien de l'homéostasie du cortex surrénalien chez l'adulte.	37
Figure 1.5. Stéroïdogénèse dans les cellules de Leydig et du cortex surrénalien.....	45
Figure 1.6. Voie de signalisation Hippo chez la drosophile et les mammifères.....	59
Figure 1.7. Domaines structuraux de YAP et TAZ	61
Chapitre 3 : 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	77
Figure 3.1 : Localization of YAP and WWTR1 in the testes of immature mice.....	101
Figure 3.2 : Localization of YAP and WWTR1 in the testes of mature mice.	102
Figure 3.3 : YAP and WWTR1 regulate Sertoli cell differentiation in a primary Sertoli cell culture model.	103
Figure 3.4 : YAP and WWTR1 do not regulate Sertoli cell differentiation through CTNNB1.	104
Figure 3.5 : Yap and Wwtr1 knockdown efficiency in the <i>Yap</i> ^{flx/flx} , <i>Wwtr1</i> ^{flx/flx} , <i>Amh</i> ^{cre/+} model.....	105
Figure 3.6 : Evaluation of the expression of genes involved in sex differentiation in the testes of <i>Yap</i> ^{flx/flx} , <i>Wwtr1</i> ^{flx/flx} , <i>Amh</i> ^{cre/+} mice.....	106
Figure 3.7 : Seminiferous tubules in <i>Yap</i> ^{flx/flx} , <i>Wwtr1</i> ^{flx/flx} , <i>Amh</i> ^{cre/+} mice.....	107
Figure 3.8 : Proliferation and apoptosis in the seminiferous tubules of 5dpp <i>Yap</i> ^{flx/flx} , <i>Wwtr1</i> ^{flx/flx} , <i>Amh</i> ^{cre/+} mice.	108
Figure S3.1 : <i>Yap</i> and <i>Wwtr1</i> knockdown efficiency in a primary Sertoli cell culture model.	109

Figure S3.2 : YAP and WWTR1 have redundant functions in Sertoli cell differentiation. ...	110
Figure S3.3 : YAP and WWTR1 expression in testes from immature <i>Yap</i> ^{flox/flox} ; <i>Wwtr1</i> ^{flox/flox} ; <i>Amh</i> ^{cre/+} mice at high magnification.	111
Figure S3.4 : YAP and phospho-YAP expression in testes from mature <i>Yap</i> ^{flox/flox} ; <i>Wwtr1</i> ^{flox/flox} ; <i>Amh</i> ^{cre/+} mice.	112
Figure S3.5 : WWTR1 expression in testes from mature <i>Yap</i> ^{flox/flox} ; <i>Wwtr1</i> ^{flox/flox} ; <i>Amh</i> ^{cre/+} mice.	113
Figure S3.6 : SOX9 expression in testes from <i>Yap</i> ^{flox/flox} ; <i>Wwtr1</i> ^{flox/flox} ; <i>Amh</i> ^{cre/+} mice.	114
Figure S3.7 : Analyses of spermatogenesis <i>Yap</i> ^{flox/flox} ; <i>Wwtr1</i> ^{flox/flox} ; <i>Amh</i> ^{cre/+} mice.	115
Figure S3.8 : Leydig cell function is normal in mature <i>Yap</i> ^{flox/flox} ; <i>Wwtr1</i> ^{flox/flox} ; <i>Amh</i> ^{cre/+} mice.	116
Figure S3.9 : BrdU incorporation and cleaved caspase-3 expression in testes from <i>Yap</i> ^{flox/flox} ; <i>Wwtr1</i> ^{flox/flox} ; <i>Amh</i> ^{cre/+} mice.	117
Chapitre 4 : Targeted disruption of YAP and TAZ impairs the maintenance of the adrenal cortex.....	121
Figure 4.1 : Localization of YAP and TAZ in the adrenal gland of mice.	144
Figure 4.2 : <i>Yap</i> and <i>Taz</i> knockdown efficiency in male <i>Yap</i> ^{flox/flox} ; <i>Taz</i> ^{flox/flox} ; <i>Nr5a1</i> ^{cre/+} mice.	145
Figure 4.3 : YAP and TAZ are required for the maintenance of the adrenal cortex.	146
Figure 4.4 : Progressive adrenal cortex degeneration in male <i>Yap</i> ^{flox/flox} ; <i>Taz</i> ^{flox/flox} ; <i>Nr5a1</i> ^{cre/+} mice.	147
Figure 4.5 : Zonation in <i>Yap</i> ^{flox/flox} ; <i>Taz</i> ^{flox/flox} ; <i>Nr5a1</i> ^{cre/+} mice.	148
Figure 4.6 : Adrenal gland degeneration in the <i>Yap</i> ^{flox/flox} ; <i>Taz</i> ^{flox/flox} ; <i>Nr5a1</i> ^{cre/+} model is associated with apoptosis.	149
Figure 4.7 : Circulating hormone levels in male <i>Yap</i> ^{flox/flox} ; <i>Taz</i> ^{flox/flox} ; <i>Nr5a1</i> ^{cre/+} mice.	150
Figure 4.8 : Lipid accumulation and expression of steroidogenic genes are altered in the adrenal glands of male <i>Yap</i> ^{flox/flox} ; <i>Taz</i> ^{flox/flox} ; <i>Nr5a1</i> ^{cre/+} mice.	151
Figure 4.9 : Regeneration of the zF following dexamethasone treatment is impaired in male <i>Yap</i> ^{flox/flox} ; <i>Taz</i> ^{flox/flox} ; <i>Nr5a1</i> ^{cre/+} mice.	152

Figure 4.10 : Expression of genes involved in stem cell or progenitor cell maintenance in adrenal glands in male <i>Yap</i> ^{flx/flx} ; <i>Taz</i> ^{flx/flx} ; <i>Nr5a1</i> ^{cre/+} mice.....	153
Figure S4.1 : Adrenal glands appear normal in female <i>Yap</i> ^{flx/flx} ; <i>Taz</i> ^{flx/flx} ; <i>Nr5a1</i> ^{cre/+}	155
Figure S4.2 : <i>Yap</i> and <i>Taz</i> knockdown efficiency in female <i>Yap</i> ^{flx/flx} ; <i>Taz</i> ^{flx/flx} ; <i>Nr5a1</i> ^{cre/+} mice.....	156
Figure S4.3 : Adrenal cortex degeneration in <i>Yap</i> ^{flx/flx} ; <i>Taz</i> ^{flx/flx} ; <i>Nr5a1</i> ^{cre/+} males.	157
Figure S4.4 : Adrenal cell proliferation is not affected in male <i>Yap</i> ^{flx/flx} ; <i>Taz</i> ^{flx/flx} ; <i>Nr5a1</i> ^{cre/+} mice.....	158
Figure S4.5 : Hormone production by the testis and pituitary is normal in <i>Yap</i> ^{flx/flx} ; <i>Taz</i> ^{flx/flx} ; <i>Nr5a1</i> ^{cre/+} mice.....	159
Figure S4.6 : Circulating corticosterone levels are normal in female <i>Yap</i> ^{flx/flx} ; <i>Taz</i> ^{flx/flx} ; <i>Nr5a1</i> ^{cre/+} mice.....	160
Figure S4.7 : Expression of steroidogenic genes is altered in the adrenal glands of <i>Yap</i> ^{flx/flx} ; <i>Taz</i> ^{flx/flx} ; <i>Nr5a1</i> ^{cre/+} mice.....	161
Figure S4.8 : Effect of dexamethasone on steroidogenesis in the adrenal gland of male <i>Yap</i> ^{flx/flx} ; <i>Taz</i> ^{flx/flx} ; <i>Nr5a1</i> ^{cre/+} mice.....	163
Figure S4.9 : Adrenal cortex progenitor cell populations are potentially altered in female <i>Yap</i> ^{flx/flx} ; <i>Taz</i> ^{flx/flx} ; <i>Nr5a1</i> ^{cre/+} mice.....	164
Chapitre 5 : YAP regulates steroidogenesis in the Leydig cell line MLTC-1.....	166
Figure 5.1 : Localization of YAP and phospho-YAP in mouse Leydig cells.....	188
Figure 5.2. cAMP/PKA signaling upregulates YAP phosphorylation.	189
Figure 5.3. Inhibition of YAP activity regulates the expression of steroidogenic genes.....	190
Figure 5.4. Inhibition of YAP activity increases steroid secretion.	191
Figure 5.5. Efficiency of siRNA treatment targeting <i>Yap</i>	191
Figure 5.6. Depletion of <i>Yap</i> regulates the expression of steroidogenic genes.	192
Figure 5.7. Depletion of <i>Yap</i> increases steroid secretion.....	193
Figure 5.8. YAP interacts with the proximal <i>Star</i> promoter.....	194

Liste des abréviations

3 α HSD	3 α hydroxysteroid dehydrogenase ou AKR1C9
3 β HSD	3 β -hydroxysteroid dehydrogenase
ABP	Androgen binding protein
AC	Adénylate cyclase
ACE	Angiotensin converting enzyme
ACT	Adrenocortical cell tumor
ACTH	Adrenocorticotrophic hormone
AKAP	A-kinase anchoring protein
Akr1b7	Aldo keto reductase 1b7
AKT	Protéine kinase B
ALC	Cellules de Leydig adultes
AMH	Anti-Müllerian hormone
AMOT	Angiomotine
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AMPK	AMP-activated kinase
APC	Adenomatous polyposis coli
AR	Androgen receptor
ARR19	Androgen receptor corepressor-19 kDa
ARX	Aristaless related homeobox gene
AT1R	Angiotensin II type 1 receptor
ATP	Adénosine triphosphate
AVP	Arginine vasopressin
BCL9	B-cell lymphoma 9 protein

BHT	Barrière hémato-testiculaire
BIRC5	Baculoviral IAP repeat containing 5
BMP	Bone morphogenic protein,
β -TRCP	β -transducin repeat-containing protein
C/EBP β	CCAAT/enhancer binding protein β
Ca ²⁺	Calcium
c-ABL	ABL proto-oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase
CAM	Calmodulin
CAMK	Calmodulin kinase
CBP	CREB -binding protein
CC	Coiled coil
CDK1	Cyclin-dependent kinase 1
CGNP	Cerebellar granule neuron progenitors
CGP	Cellules germinales primordiales
ChIP	Immunoprécipitation de la chromatine
CITED	CBP/p300-interacting transactivator with ED-rich tail
CK1 δ/ϵ	casein kinase 1
COUP-TFII	Chicken olvabumin promoter transcription factor II, ou NR2F2
CRE	cAMP responsive element
CREB	cAMP responsive element binding protein
CRH	Corticotrophin-releasing hormone
CTGF	Connective tissue growth factor
CTNNB1	β -catenin
CYP	Cytochrome P450

Cyp11a1	CYP cholesterol side chain clivage, ou P450 SCC
Cyp11b1	CYP 11 β hydroxylase
Cyp11b2	CYP aldosterone synthase
Cyp17a1	CYP 17 α -hydroxylase/17,20-lyase
Cyp21a2	CYP 21-hydroxylase
Cyp26b1	CYP Family 26 subfamily B member 1
CYR61	Cysteine-rich, angiogenic inducer, 61
DAG	Diacylglycérol
Dax1	Dosage-sensitive sex reversal adrenal hypoplasia congenita (AHC) critical region on the X chromosome ou NR0B1
DBI	Diazepam-binding inhibitor
DHEA	Déhydroépiandrostérone
DHEAS	Déhydroépiandrostérone Sulfate
Dhh	Desert Hedgehog
DHT	Dihydrotestosterone
DLK1	Delta like homologue 1
Dmrt1	Doublesex and mab-3 related transcription factor 1
DVL	Dishevelled
E	Jour embryonnaire
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMT	Transition épithéliale à mésenchymale
Epac	Exchange protein activated by cAMP
ERK1/2	Extracellular signal regulated kinase 1 and 2
ERR γ	Estrogen-related receptors γ
ESR1	Estradiol receptor 1

Ex	Expanded
F-actine	Filaments d'actine
FAdE	Fetal adrenal enhancer
FERM	4.1, Ezrin, Radixin, Moesin
Fgf20	Fibroblast growth factor 20
FGF9	Fibroblast growth factor 9
FGFR2	FGF receptor 2
FLC	Cellules de Leydig fœtales
FOG2	Friend of GATA 2
Foxl2	Forkhead box L2
FOXO1	Forkhead box O1
FSH	Follicle-stimulating hormone
GATA-x	GATA binding protein-x (-1, -4 ou -6)
GDNF	Glial cell line-derived neurotrophic factor
GFP	Green fluorescent protein
GLI	Glioma-associated oncogene (isoform 1, 2 or 3)
GMP	Guanosine monophosphate
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
GnRH	Gonadotropin releasing hormone
GSK3 β	Glycogen synthase kinase 3 β
HDL	High density lipoprotein
HES1	Hairy and enhancer of split-1
HGF	Hepatocyte growth factor
HM	Motif hydrophobe

Hpo	Hippo
HRNPU	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins
HSD	Hydroxysteroid dehydrogenase
HSD*B*	Hydroxysteroid (*-β) dehydrogenase *
IGF1	Insulin-like growth factor 1
IGFR1	Insulin growth factor receptor 1
Ihh	Indian Hedgehog
ILC	Cellules de Leydig immatures
Inslr	Insulin Receptor
IP3	Inositol triphosphate
Insl3	Insulin-like hormone 3
KO	Knock-out
LATS1	Large tumor suppressor 1
LATS2	Large tumor suppressor 2
LDL	Low density lipoprotein
LH	Luteinizing hormone
LHCGR	LH Receptor
LIF	Leukemia inhibitor factor
LPA	Acide lysophosphatidique
LRH-1	Liver receptor homolog-1 ou NR5A2
LRP5/6	Low density lipoprotein receptor-related protein 5/6
MAP	Mitogen-activated protein
MAP4K	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase
MAPK	Mitogen-activated protein kinase

Mats	Mob as tumor suppressor
MB	Médulloblastome
Mc2r	Melanocortin type 2 receptor
MEC	Matrice extracellulaire
MEF2	Myocyte enhancer factor 2
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase ou MAPKK
Mer	Merlin
MKP	MAP kinase phosphatase
Mob1	Mps one binder 1
Mrap	MC2R accessory protein
MSK1	Mitogen- and stress-activated protein kinase 1
MST1	Mammalian sterile 20-like 1
MST2	Mammalian sterile 20-like 2
NFAT5	Nuclear factor of activated T-cell 5, tonicity-responsive
NOV	Nephroblastoma overexpressed
Nr0b1	Nuclear receptor subfamily 0, groupe B, member 1
Nr0b2	Nuclear receptor subfamily 0, groupe B, member 2
Nr4a1	Nuclear receptor subfamily 4, groupe A, member 1, ou Nur77
Nr4a2	Nuclear receptor subfamily 4, groupe A, member 2, ou Nurr1
Nr5a1	Nuclear receptor subfamily 5, groupe A, member 1, ou Sf1
Nr5a2	Nuclear receptor subfamily 5, groupe A, member 2, ou Lrh-1
PAG	Primordium adrénogonadique
Pbx	pre B cell leukemia homeobox 1
PDE	Phosphodiesterase

PDGF -A/-B	Platelet-derived growth factor A ou B
PDGFR -A/-B	PDGF receptor A ou B
PGD2	Prostaglandine D2
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PKG	Protéine kinase G
PLC	Cellules de Leydig progénitrices
PNMT	Phényléthanolamine N-méthyltransférase
Pod1	Transcription factor 21, Tcf21
POMC	Proopiomelanocortin
PP	Phosphatases
PPI	Phosphatases I
PPIIA	Phosphatases IIA
PPP1R13B	Protein phosphatase 1, regulatory subunit 13B
Prep	PBX/knotted 1 homeobox 1
Prkar1a	Protein kinase, cAMP dependent regulatory, type I, alpha
Ptch	Patched 1
Ptgds	Prostaglandin D2 synthase
RAF1	Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase
RAPGEF*	Rap guanine nucleotide exchange factor -3 ou 4
RASSF1A	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1
RCPG	Récepteurs couplés aux protéines G

ROCK-II	Rho-dependent protein kinase II
Rspo	R-spondin homolog
RUNX	Runt-related transcription factor
RyR	Ryanodine receptor
S1P	Sphingosine-1-phosphate
S6K1	p70 ribosomal protein S6 kinase
SARAH	Salvador–Ras association (RA) domain family (RASSF)–Hippo
Sav	Salvador
Sav1	Salvador family WW domain containing protein 1
Sf1	Steroidogenic factor 1, ou Nr5a1
SFRP3	Secreted frizzled-related protein 3
SGK1	Serum/glucocorticoid regulated kinase 1
Shh	Sonic Hedgehog
SHP	Small heterodimer partner ou NR0B2
SIAH2	Siah E3 ubiquitin protein ligase 2
siARN	ARN interférant
SIX*	Sine oculis-related homeobox - 1 ou 4
SLC	Cellules de Leydig souches
SMAD	SMAD family members
Smo	Smoothened
Sox9	Sry-related HMG box 9
SP1	Specificity protein 1
SR-B1	Scavenger receptor class B type 1
SRC	SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase

SRD5A1	5 α réductase
SREBP2	Sterol regulatory element binding transcription factor 2
Sry	Sex-determining region of Y chromosome
STAR	Steroidogenic acute regulatory protein
Sufu	Suppressor of fused
SULT2A1	Sulfotransferase family cytosolic 2A DHEA-preferring member 1
Taz	Transcriptional co-activator with PDZ-binding motif
TCF / LEF	T cell-specific / Lymphoid enhancer-binding factor
TEAD	TEA-domain
TESCO	Testis specific enhancer of <i>Sox9</i>
TGF- β	Transforming growth factor β
TH	Tyrosine hydroxylase
TP73	Tumor protein p73
TSPO	Translocator protein
VGLL	Vestigial-like
WNT	Wingless-type MMTV integration site family
Wt1	Wilms tumor 1
Wts	Warts
Yap	Yes-kinase associated protein
YES	YES proto-oncogene 1 tyrosine kinase
Yki	Yorkie
zF	Zone fasciculée
zG	Zone glomérulée
zR	Zone réticulée

*« Seul on va plus vite, ensemble on va plus loin! » Proverbe africain
À ceux qui m'ont accompagné.*

Remerciements

Dans un premier temps, je tiens à remercier chaleureusement mon directeur de thèse, Dr Alexandre Boyer, pour m'avoir permis de réaliser ce doctorat. Pour la confiance qu'il a su placer en moi et pour le soutien indéfectible qu'il a su et pu m'accorder durant tout mon parcours. Sans ton aide, je n'aurais pas pu en accomplir autant avec d'aussi bonnes conditions de travail. Encore merci pour tout Alex, nous avons fait une belle équipe !

Je remercie mon codirecteur de recherche, Dr Derek Boerboom, pour sa contribution matérielle et intellectuelle dans mes différents projets de recherche ainsi que pour sa disponibilité, son ouverture d'esprit et sa sympathie. Merci également d'avoir été un bon « modèle » pour les photomontages et pour la tenue du désormais célèbre BBQ d'été !

Un immense merci à tous les membres réguliers du laboratoire de Derek pour m'avoir permis de passer des moments riches en votre compagnie. Les barbus : Guillaume, Philippe, bon courage pour la suite de votre doc' ; les filles : Manue, profite bien de ton postdoc, Mayra, bon courage dans tes nouvelles aventures. Merci également aux étudiant.e.s de passage dans les laboratoires des Drs Boyer, Boerboom, Zamberlam et Paquet.

Merci également au Dre Marilène Paquet pour son expertise en histologie afin de mettre des mots pour définir le « Qu'est cé câ ?! » et pour ta sympathie. Merci au Dr Gustavo Zamberlam, pour l'exotisme et la joie de vivre que tu apportes à chaque instant.

Merci aux membres de mon jury, les Drs Kalidou Ndiaye, Jean Sirois et Jacques J. Tremblay, de me faire l'honneur d'évaluer le travail effectué lors de mon doctorat.

Un Merci à partager pour les différentes personnes du CRRF, du personnel administratif de la FMV et de FANI pour offrir un environnement de travail agréable. Ainsi qu'à mes amis du Québec et de France, avec une pensée particulière pour Kévin et Amaëlys.

Marjorie, je ne pourrais jamais assez te remercier pour tout ce que tu as fait et ce que nous avons vécu, alors simplement Merci. Ainsi qu'à Ikar pour la ronronthérapie!

Merci également à ma famille pour son soutien depuis mes premiers jours.

Avant propos

La voie de Hippo est une voie de signalisation conservée dans l'évolution qui joue un rôle dans la détermination du destin cellulaire, la différenciation et la prolifération durant le développement embryonnaire et le développement postnatal ainsi que dans l'homéostasie tissulaire au cours de la vie adulte. Elle est constituée d'une cascade de kinase menant ultimement à la phosphorylation et à la régulation de la fonction de ses principaux effecteurs YAP (Yes-kinase associated protein) et TAZ (Transcriptional co-activator with PDZ-binding motif, connu aussi sous le nom de WWTR1 : WW-containing transcription regulator 1). De plus, en parallèle à sa propre signalisation, la voie Hippo interagit avec de nombreuses voies de signalisation (WNT (Wingless-type MMTV integration site family), AMPc (Adénosine monophosphate cyclique) /PKA, etc.) importantes pour la prolifération, la différenciation et le maintien des cellules. YAP/TAZ dans la cellule jouent un rôle central dans la signalisation permettant aux cellules de prendre le contrôle de leur comportement en fonction de leur forme, leur localisation et leur environnement (Bernascone and Martin-Belmonte 2013; Piccolo, Dupont, and Cordenonsi 2014; Varelas 2014).

Le primordium adrénogonadique est une structure embryonnaire à partir de laquelle va se développer le primordium gonadique qui donnera les gonades (testicules ou ovaires) et le primordium adrénocortical qui donnera le cortex surrénalien chez l'adulte (Morohashi 1997). Au sein du primordium gonadique, les cellules de Sertoli vont être les premières cellules à se différencier et vont exprimer *Sry* (Sex determining region on Y chromosome) ce qui permet l'expression de *Sox9* (Sry-related HMG box 9). Ce mécanisme permet d'enclencher la différenciation sexuelle mâle (revue dans (Gardiner and Swain 2015)). Les cellules de Sertoli vont induire la différenciation subséquente des cellules de Leydig grâce à la sécrétion de différents facteurs paracrines. Au cours du développement embryonnaire, la population de cellules de Leydig est dite fœtale. Cette population perdure jusqu'à la naissance pour être remplacée progressivement par les cellules de Leydig adultes (revue dans (Shima and Morohashi 2017)). Les cellules de Leydig adultes deviennent matures suite à la prolifération et de la différenciation de leur population de cellules souches (revue dans (Ye et al. 2017)).

Le rôle principal des cellules de Leydig est d'assurer la production d'androgènes afin de contribuer, du développement embryonnaire jusqu'à l'âge adulte, à la différenciation et au maintien des caractéristiques mâles de l'individu (revue dans (Ye et al. 2017; Shima and Morohashi 2017)).

Aucune étude spécifique portant sur le rôle de la voie Hippo dans le testicule n'avait été effectuée au moment du début de ma thèse. Cependant, de rares études montraient une baisse de la fertilité chez des animaux mâles ayant une inactivation globale de *Lats1* (Large tumor suppressor homolog kinase 1) ou de *Taz* (Hossain et al. 2007; St John et al. 1999). Cependant, les causes de cette baisse de fertilité n'ont pas été rapportées. Des études effectuées dans d'autres types cellulaires ont montré que YAP peut réguler de façon positive ou négative l'expression de *Sox9* en fonction du type cellulaire (Song et al. 2014; Zhong et al. 2013). De plus, dans les cellules du cœur, YAP peut activer directement l'expression de *Wt1* (Wilms tumor 1), un autre gène clé dans le développement gonadique (Singh et al. 2016) suggérant un rôle potentiel pour YAP (et TAZ) dans le déterminisme sexuel. L'objectif initial de cette thèse était donc d'étudier le rôle de la voie Hippo dans le développement et la fonction des cellules somatiques du testicule.

Afin d'étudier le rôle de la voie Hippo dans la fonction des cellules somatiques du testicule au cours du développement, nous avons utilisé un modèle de culture de cellules de Sertoli primaires dans lequel *Yap* et *Taz* possèdent des séquences floxées. À l'aide d'un adénovirus recombinant, nous avons pu induire la recombinaison dans ces cellules et ainsi étudier le rôle de *Yap* et *Taz* dans les cellules de Sertoli immatures. Nous avons tenté par la suite, avec un modèle de souris transgénique où *Yap/Taz* sont éliminés spécifiquement dans les cellules de Sertoli (*Amh^{Cre}*), d'étudier l'effet de leur perte *in vivo*.

Désirant poursuivre notre étude de l'inactivation de *Yap/Taz* plus tôt dans le développement, nous avons utilisé un modèle de souris (*Nr5a1^{Cre}*) qui cible à la fois les progéniteurs des cellules de Leydig et de Sertoli. L'utilisation de ce modèle ne nous a malheureusement pas permis d'étudier l'effet de cette inactivation, car la recombinaison au niveau testiculaire n'était pas efficace. Cependant, *Nr5a1* (Nuclear receptor subfamily 5, groupe A, member 1) aussi connu sous le nom de *Sf1* (Steroidogenic factor 1) est également exprimé dans les cellules du cortex surrénalien dès le stade du primordium adrénogonadique

suggérant que ce modèle serait également utile afin d'étudier le développement de la glande surrénale.

Notre second objectif a donc été modifié afin d'évaluer le rôle de la voie Hippo dans le développement et le maintien de la glande surrénale. À la suite de la séparation du primordium adrénogonadique, le primordium adrénocortical poursuit son développement afin de former un cortex fœtal qui sera envahi par les cellules formant la médulla et qui sera par la suite remplacé par le cortex définitif adulte. La mise en place du cortex définitif et sa zonation est un mécanisme complexe et finement régulé qui permet d'avoir un cortex composé de différentes zones : zone glomérulée (zG), fasciculée (zF) et réticulée (zR) en fonction de l'espèce. La zonation est initialement assurée par la prolifération de cellules souches de la zone capsulaire qui acquièrent, selon un modèle de différenciation cellulaire centripète, les spécificités de chaque zone durant leur migration (Pignatti et al. 2017) permettant la production des gluco- et minéralo- corticoïdes indispensables au bon fonctionnement de l'organisme (Yates et al. 2013). Chez l'adulte, une population de cellules progénitrices sous-capsulaires est principalement responsable de l'homéostasie du cortex surrénalien. Tout comme pour le testicule, le rôle de la voie Hippo dans la physiologie de la glande surrénale n'a pas été étudié. À ce jour, une seule étude mentionne la présence de YAP dans la glande surrénale. Il s'agit d'une étude portant sur les tumeurs adrénocorticales chez l'enfant qui montre qu'une surexpression de YAP dans ces tumeurs est associée à un mauvais pronostic (Abdouch et al. 2016). L'étude de notre modèle *Yap*^{flox/flox}; *Taz*^{flox/flox}; *Nr5a1*^{Cre} nous a donc permis d'étudier le rôle de ces effecteurs de la voie Hippo dans le maintien de l'homéostasie de la glande surrénale.

Afin de revenir à notre objectif initial et poursuivre l'étude de la voie Hippo dans les cellules somatiques du testicule, nous avons décidé d'utiliser la lignée cellulaire MLTC-1 afin d'élucider le rôle de *Yap* dans les cellules de Leydig. Le dernier projet de mon doctorat a donc porté sur l'effet de l'inactivation pharmacologique de l'activité de YAP ou l'inactivation de l'expression de *Yap* par des siRNAs sur l'activité stéroïdogénique des cellules de Leydig.

Les résultats de ces projets de recherche seront présentés dans les chapitres suivants et constituent le corps de mes travaux de doctorat.

Chapitre 1 : Introduction

A. Le testicule et la glande surrénale : développement et fonctions

1. Introduction générale

Les testicules et les glandes surrénales sont deux organes qui se développent majoritairement à partir d'une structure commune au cours du développement embryonnaire : le primordium adrénogonadique (PAG) (revue dans (Morohashi 1997)). Le PAG se différencie pour donner le primordium gonadique et le primordium adrénocortical qui sont les ébauches des gonades indifférenciées et des glandes surrénales, respectivement. En fonction du sexe génétique (XY versus XX), la gonade se différenciera en testicule ou en ovaire.

Au cours du développement embryonnaire, les cellules progénitrices qui constitueront les testicules agissent en étroite collaboration grâce à la sécrétion de facteurs paracrines afin d'assurer leur développement (revue dans (O'Shaughnessy 2015)). Chez le mâle, les testicules adultes ont deux fonctions principales, i) la spermatogenèse qui assure la production des gamètes nécessaires à la transmission du patrimoine génétique entre les générations et, ii) la stéroïdogenèse qui permet la production d'hormones stéroïdiennes. C'est dans les tubules séminifères que se déroule la spermatogenèse. Ce processus repose sur les interactions fortes entre les cellules germinales et les cellules de Sertoli, ces dernières assurant un rôle architectural et nourricier aux cellules germinales afin qu'elles puissent se différencier pour donner les spermatozoïdes. Les cellules de Leydig, localisées dans l'interstitium entre les tubules séminifères, produisent des stéroïdes androgènes (principalement de la testostérone) qui participent au bon déroulement de la spermatogenèse et au maintien des caractéristiques mâles en réponse à une stimulation par la LH (Luteinizing hormone) (revue dans (Svingen and Koopman 2013)).

Les glandes surrénales sont des organes indispensables à la vie d'un individu comme il a pu être démontré par les nombreux modèles animaux, et ce, depuis le 19^{ème} siècle (Brown-

Sequard 1856). Le cortex surrénalien s'organise en zones qui ne sont pas séparées physiquement et où chaque zone est spécialisée dans la production d'hormones spécifiques. La zone glomérulée, située sous la capsule surrénalienne, produit l'aldostérone qui permet la régulation de la pression artérielle (Miller 1981; Yates et al. 2013). La zone fasciculée quant à elle représente plus de 70% du cortex et assure la production de glucocorticoïdes, principalement la corticostérone chez la souris et le cortisol chez l'Homme (Rainey and Nakamura 2008). Les glucocorticoïdes sont impliqués dans le métabolisme énergétique, l'inflammation, l'immunité et également dans la réponse au stress chez l'adulte (Sakaue and Hoffman 1991). La zone réticulée n'est pas présente chez la souris mais chez l'Homme cette zone permet la production des androgènes, notamment la déhydroépiandrostérone (DHEA) (Endoh et al. 1996). Il s'agit de la principale source d'androgènes chez les femmes (Lasley, Crawford, and McConnell 2011). Dans la médulla, au centre de la surrénale, les cellules chromaffines, d'origine distincte, produisent l'adrénaline et la noradrénaline qui entraînent une réponse rapide en cas de stress (Okuneva et al. 2009).

2. Le primordium adrénogonadique : entre gonade et surrénale

Au cours du développement embryonnaire, la formation du primordium adrénogonadique va permettre de générer à la fois le primordium adrénocortical qui donnera les différentes zones du cortex surrénalien, et le primordium gonadique non différencié qui donnera, en fonction du sexe génétique, les cellules somatiques des ovaires et des testicules (revue dans (Morohashi 1997)).

Les cellules composant le PAG proviennent de l'épaississement de l'épithélium cœlomique et du mésoderme intermédiaire au niveau de la crête urogénitale. Le PAG peut être identifié dès le jour embryonnaire 9 (E9) chez la souris et se caractérise par l'expression du facteur de transcription NR5A1, facteur essentiel au bon développement des gonades et des surrénales (Hatano et al. 1996; Luo, Ikeda, and Parker 1994) (Figure 1.1). Le rôle de NR5A1 lors de la formation du PAG a été confirmé par la création d'un modèle de souris transgénique inactivé pour le gène codant NR5A1 (souris *Nr5a1^{-/-}*) dans lequel les gonades et les glandes surrénales ne se développaient pas (Luo, Ikeda, and Parker 1994; Sadovsky et al. 1995). Chez

ces souris, l'épaississement de l'épithélium cœlomique se produit, mais les cellules du PAG entrent en apoptose à partir du jour embryonnaire (E) 11.5 et les ébauches surrénaliennes et gonadiques sont alors perdues au jour E12.5. L'agénésie surrénalienne entraîne une carence en glucocorticoïdes et ces animaux meurent peu de temps après la naissance (Luo, Ikeda, and Parker 1994). NR5A1 est donc indispensable au maintien du PAG. À ce stade, l'expression de *Nr5a1* est régulée par des facteurs de transcription dont le plus important est WT1, un facteur détecté dès le jour E9 dans le mésoderme intermédiaire. Il a été démontré que WT1 agissait en synergie avec le facteur de transcription CITED1 (CPB/p300-interacting transactivator with ED-rich tail 1) (Val, Martinez-Barbera, and Swain 2007) et possiblement SIX1 et SIX4 (sine oculis-related homeobox 1 et 4) (Fujimoto et al. 2013) afin de réguler l'expression de *Nr5a1* et son inactivation conduit à un phénotype similaire à celui observé chez les souris *Nr5a1*^{-/-} à savoir l'absence de surrénales et de gonades (Kreidberg et al. 1993; Wilhelm and Englert 2002) (Figure 1.1). Le mode d'action de WT1 et NR5A1 dans le PAG n'est pas encore bien élucidé, mais l'action de ces facteurs dans d'autres tissus suggère qu'ils pourraient être importants pour inhiber l'apoptose au niveau du PAG. Par exemple, dans les tumeurs adrénocorticales juvéniles, la surexpression de *Nr5a1* est associée à une diminution du facteur pro-apoptotique NOV (nephroblastoma overexpressed), suggérant une activité répressive de *Nr5a1* sur l'apoptose (Doghman et al. 2007). Comme pour le rein fœtal, WT1, en plus de réguler l'expression de *Nr5a1*, peut également inhiber l'apoptose en activant directement *Fgf20* (fibroblast growth factor 20) et en supprimant la signalisation BMP-pSMAD (bone morphogenic protein/phospho-SMAD family member) (Motamedi et al. 2014).

Outre NR5A1 et WT1, d'autres facteurs sont potentiellement importants dans le bon développement du PAG, tels que le couple Insulin Receptor (Inslr) / Insulin Growth Factor Receptor 1 (IGFR1) et les facteurs GATA4 et GATA6 (GATA Binding Protein-4 et-6). L'inactivation constitutive de Inslr/IGFR1 chez la souris entraîne la naissance d'animaux plus petits ayant une dysplasie gonadique avec une inversion de sexe chez le mâle ainsi que des défauts de développement de la surrénale allant de l'hypoplasie à l'agénésie (Pitetti et al. 2013). Il a aussi été démontré que l'absence de ces récepteurs entraînait une diminution de 40% du nombre de cellules progénitrices NR5A1+ dans le PAG au jour E11.5 suggérant que la perte de ces cellules était responsable du phénotype observé. L'inactivation concomitante de

GATA4 et GATA6 dans le PAG entraîne quant à elle l'agénésie de la glande surrénale avec de petits testicules contenant quelques tubules désorganisés, un nombre réduit de cellules de Leydig et la présence de nids de cellules adrénocorticales (Padua et al. 2015; Tevosian et al. 2015).

Le primordium va par la suite continuer à se développer et les cellules le composant vont se délaminer permettant de distinguer deux populations cellulaires différentes. Moins d'un jour après l'invasion du PAG par les cellules germinales, au jour E10.5 chez la souris, une partie de ces cellules vont migrer dorsolatéralement pour former le primordium gonadique tandis que les autres cellules, exprimant des niveaux plus élevés de NR5A1, migrent en direction de l'aorte dorsale pour former le primordium adrénocortical (Luo, Ikeda, and Parker 1994; Morohashi 1997) (Figure 1.1).

À ce stade, il n'y a pas de différence morphologique entre les primordia surrénaliens et gonadiques des embryons XX et XY (Figure 1.1).

3. Développement et fonction des cellules somatiques du testicule

3.1. Développement et fonction des cellules de Sertoli

3.1.1. Développement et fonctions des cellules de Sertoli fœtales

À partir du jour E10.5-11.5, la morphogenèse testiculaire est initiée chez les embryons mâles par l'expression du gène de *Sry*, présent sur le chromosome Y, dans les cellules à l'origine des cellules de Sertoli dans l'épithélium cœlomique. L'expression de *Sry* est l'évènement clé qui entrainera la différenciation mâle (Foster et al. 1994; Koopman et al. 1991; Vidal et al. 2001; Wagner et al. 1994). Il a été récemment démontré par des études de traçage que les cellules de Sertoli se développaient à partir de progéniteurs exprimant WT1, mais n'exprimant pas HES1 (Hairy and enhancer of split-1, HES1-) (Liu, Rodriguez, and Yao 2016) (Figure 1.2). Tout comme pour le développement initial du PAG, WT1 joue un rôle primordial pour l'activation de l'expression de *Sry* dans les cellules de Sertoli. Plus de 36

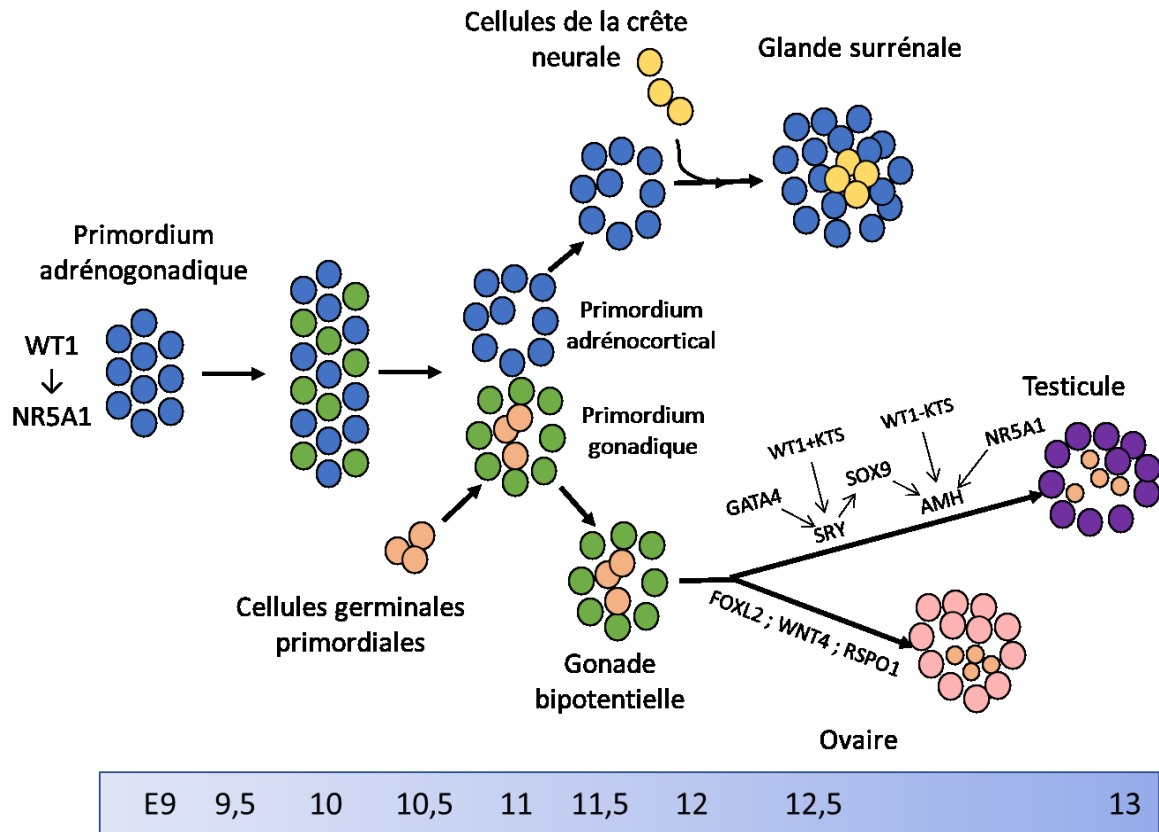


Figure 1.1. Développement de la glande surrénale et des gonades chez la souris à partir du primordium adrénogonadique

Représentation schématique du développement adrénogonadique. À la suite de l'épaississement de l'épithélium cœlomique au jour E9,75 (non représenté), le primordium adrénogonadique (PAG) apparaît et débute sa différenciation sous l'action de NR5A1, lui-même sous la dépendance de WT1. Au jour E10.5, à la suite de la colonisation du futur primordium gonadique par les cellules germinales primordiales (E10.5), les deux primordia s'individualisent afin de former le primordium adrénocortical et le primordium gonadique. L'ébauche surrénalienne est ensuite colonisée (E11.5) par les cellules de la crête neurale qui sont à l'origine de la médulla. En fonction du sexe génétique des animaux (XX ou XY), une série de gènes seront exprimés ou réprimés dans le primordium gonadique selon la différenciation sexuelle mâle ou femelle. Modifiée de (Val et al. 2003; Bandiera et al. 2015).

isoformes de WT1 ont été identifiées (Hastie 2001) et l'étude de deux de ces isoformes WT1(+KTS) et WT1(-KTS) a permis de mieux comprendre le rôle de WT1 pour initier l'expression de *Sry*. En effet, il a initialement été démontré que la réduction de l'expression de l'isoforme WT1(+KTS) menait au syndrome de Frasier chez l'humain, un syndrome entraînant une glomérulosclérose et une inversion de sexe XY associée à réduction de la quantité de SRY synthétisée par chaque cellule de Sertoli et une réduction du nombre total de cellules de Sertoli (Wilhelm and Englert 2002). Il a ensuite été démontré que la perte de l'isoforme WT1(+KTS) résultait également en une inversion de sexe chez la souris due à une diminution de l'expression de *Sry* empêchant l'augmentation subséquente de l'expression de SOX9 (Bradford et al. 2009). Finalement, il a été démontré que WT1 agit en synergie avec GATA4/FOG2 (Friend of GATA 2) afin d'activer la transcription de *Sry* et que cette synergie était plus efficace avec l'isoforme WT1(+KTS) (Miyamoto et al. 2008).

Sry, dont l'expression est transitoire chez la souris, agit ensuite en collaboration avec NR5A1 afin d'activer *Sox9* (Sekido and Lovell-Badge 2008), le véritable moteur de la différenciation des testicules. En effet, tout comme pour *Sry*, la délétion conditionnelle de *Sox9* chez la souris entraîne un développement ovarien chez les animaux XY (Vidal et al. 2001; Wagner et al. 1994). De plus, chez l'homme, une mutation dans la séquence codante pour *Sox9* peut provoquer une dysplasie campomélique qui se caractérise entre autres par des atteintes au niveau osseux et une réversion sexuelle femelle chez environ 75% des individus XY atteints (Houston et al. 1983). Comme mentionné, l'augmentation de l'expression de *Sox9* est initialement sous le contrôle de SRY et NR5A1 grâce à leur liaison sur la séquence TESCO (Testis specific enhancer of *Sox9*) sur le promoteur de *Sox9* (Sekido and Lovell-Badge 2008). L'expression de *Sox9* sera ensuite maintenue grâce à deux boucles de régulation positives faisant intervenir le couple FGF receptor 2 (FGFR2)/FGF9 et la prostaglandine D2 (PGD2) (Wilhelm, Yang, and Thomas 2013). Premièrement, SOX9 régule de manière positive l'expression de *Fgf9* permettant à FGF9 d'induire la signalisation via son récepteur FGF2R pour maintenir l'expression de *Sox9* (Kim et al. 2007). Puis, SOX9 régule également de la manière positive l'expression de *Ptgds* (prostaglandin D2 synthase) qui résulte en une augmentation de la synthèse de PGD2 menant par la suite à une translocation nucléaire de SOX9 où ce dernier s'autorégule en se liant sur son promoteur en collaboration avec NR5A1

(Moniot et al. 2009). Ces boucles de rétroactivation assurent donc le maintien de l'expression de *Sox9* même après l'arrêt de l'expression de *Sry*, vers le jour E12.5 chez la souris, et permettent non seulement l'activation et le maintien de l'expression de gènes impliqués dans la prolifération et la différenciation des cellules de Sertoli, mais également l'inhibition de gènes importants pour la différenciation des cellules de la granulosa tels que *Wnt4*, *Rspo1* (R-spondin homolog 1) et *Foxl2* (Forkhead box L2) (Georg et al. 2012; Jameson, Lin, and Capel 2012). En effet, FGF9 contribuera à la répression de l'expression de *Wnt4* et *Rspo1* (Jameson, Lin, and Capel 2012) alors que SOX9 inhibera directement l'expression de *Foxl2* (Georg et al. 2012). Les cellules de Sertoli sont les premières cellules du testicule à se différencier, et leur différenciation est également essentielle pour prévenir l'entrée en méiose des cellules germinales, la dégradation des canaux de Müller et la différenciation des précurseurs des cellules de Leydig.

Chez la souris, au jour E12.5, les cellules de Sertoli s'associent grâce à l'établissement de jonctions membranaires et forment les cordons testiculaires nécessaires à la restriction spatiale des gonocytes (Combes et al. 2009). Dans cet environnement, les gonocytes cesseront de proliférer vers le jour E14.5 et ne pourront poursuivre la méiose grâce à l'expression de CYP26B1 (Cytochrome P450 (CYP) 26B1) par les cellules de Sertoli qui clivent l'acide rétinoïque nécessaire à leur entrée en méiose (Li et al. 2009). Il est aussi important de mentionner que le nombre de cellules de Sertoli détermine aussi le nombre de cellules germinales qui peuvent être supportées afin d'assurer une spermatogenèse optimale chez l'adulte (Sharpe et al. 2003). Toujours autour des jours E12.5-E13.5, sous le contrôle positif de SOX9 et NR5A1, les cellules de Sertoli débutent la synthèse de l'AMH (anti-müllerian hormone) (Giuli, Shen, and Ingraham 1997) qui est nécessaire pour induire la dégradation des canaux de Müller (Behringer 1994). Enfin, les cellules de Sertoli vont commencer à exprimer et sécréter DHH (Desert hedgehog) qui induit la différenciation des précurseurs des cellules de Leydig afin de générer la population de cellules de Leydig fœtales (FLC) et la différenciation des cellules périvitubulaires myoïdes (Miyabayashi et al. 2013; Pierucci-Alves, Clark, and Russell 2001) (Figure 1.2).

3.1.2. Développement et fonctions des cellules de Sertoli postnatales

Après la naissance, les cellules de Sertoli sont immatures et subissent des changements afin de devenir matures et fonctionnelles. Chez les rongeurs, les cellules de Sertoli ont une activité proliférative importante à partir de la différenciation testiculaire jusqu'à 15 jours après la naissance (Wang, Wreford, and De Kretser 1989). La prolifération des cellules de Sertoli postnatales est favorisée par l'augmentation des niveaux de FSH (Follicle-stimulating hormone) et de son récepteur (FSHR) à la surface des cellules de Sertoli (Rannikki, Zhang, and Huhtaniemi 1995). L'arrêt de la prolifération des cellules de Sertoli est contrôlé entre autres par l'hormone triiodothyronine (T3), l'acide rétinoïque et la testostérone qui permettent l'expression de gènes associés avec la différenciation des cellules (Holsberger et al. 2003; Buzzard, Wreford, and Morrison 2003). Dans les cellules de Sertoli matures, l'expression de l'*Amh* est diminuée tandis l'expression des gènes codant pour GATA1, P27^{kip1} (impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire) et le récepteur nucléaire aux androgènes (AR) augmente (Sharpe et al. 2003). Les cellules matures expriment également des protéines impliquées dans les jonctions cellulaires (connexine 43, claudine 11) afin de constituer la barrière hématotesticulaire (BHT) (Sridharan et al. 2007; Mazaud-Guittot et al. 2010). La formation de la BHT chez les rongeurs se fait entre 15 et 19 jours après la naissance et est stimulée par la T3, l'acide rétinoïque et la testostérone (Chapin et al. 2001; Zhang et al. 2005).

Cette barrière se compose de nombreuses jonctions de différentes natures (jonctions serrées, adhérentes et communicantes) et permet de séparer les tubules séminifères en un compartiment basal et apical (Mruk and Cheng 2004). La BHT assure un rôle de défense immunitaire afin d'éviter le passage d'antigènes présents sur les cellules germinales post-méiotiques qui pourrait entraîner des réactions auto-immunes provoquant une stérilité (Francavilla et al. 2007). La BHT assure également un rôle structurel afin de compartimenter les tubules séminifères et permettre l'accès d'éléments nutritifs nécessaires à la spermatogenèse (Mruk and Cheng 2004). De cette façon, la sécrétion des différents facteurs (composantes de la matrice extracellulaire, substrats énergétiques, facteurs de croissance, hormones, etc.) produits par les cellules de Sertoli est polarisée. Une partie des sécrétions est libérée dans le compartiment basal où se trouvent les spermatogonies et l'autre partie est

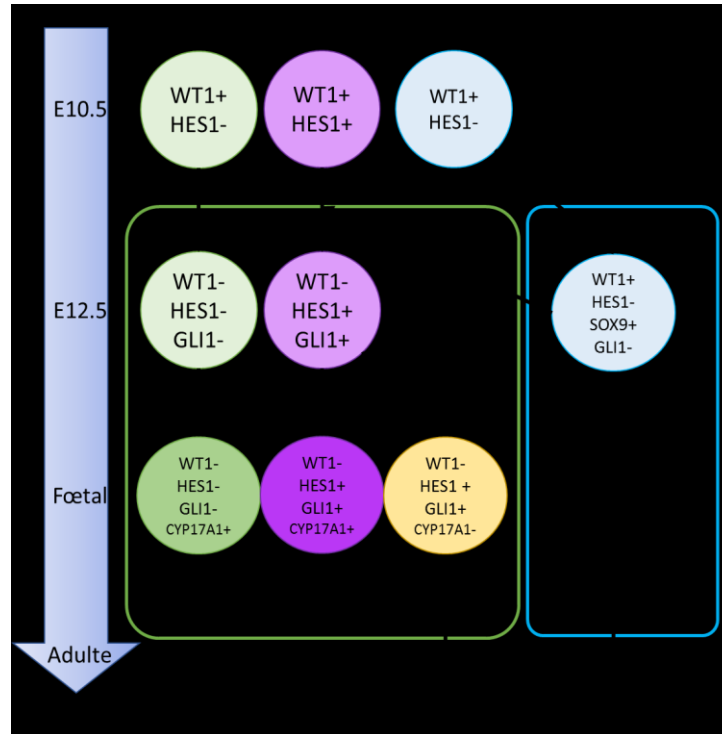


Figure 1.2. Traçage cellulaire des cellules de Leydig et de Sertoli.

Représentation schématique du traçage cellulaire menant à la formation des cellules de Leydig et de Sertoli chez la souris. Au jour E10.5, les cellules progénitrices provenant du primordium gonadique et/ou du mésonéphros expriment toutes WT1 et forment trois populations différentes : les cellules pré-Sertoli HES1-, et les précurseurs des cellules de Leydig (HES1- et HES1+). Entre le jour E10.5 et E12.5, les cellules de Sertoli, présentes dans les cordons testiculaires, expriment SOX9 ainsi que DHH qui induit la différenciation des précurseurs cellules de Leydig dans l'interstitium. Les cellules dans l'interstitium cesseront d'exprimer WT1 et une sous-population de cellules va répondre au signal DHH provenant des Sertoli et se mettre à exprimer GLI1. Ces cellules progénitrices GLI1+ peuvent donner deux lignées : une population CYP17A1+ qui forme la population de cellules de Leydig fœtales et une population CYP17A1- ne produisant pas d'hormones stéroïdiennes qui contribuera éventuellement à la formation des cellules de Leydig adultes. La population de l'interstitium GLI1- peut également se différencier en population CYP17A1+ et contribuer à la population de cellules de Leydig fœtales. Extrait de (Liu, Rodriguez, and Yao 2016)

déversée dans le compartiment apical dans le fluide séminifère (Rato et al. 2010). Le micro-environnement créé par la BHT et le maintien de son intégrité sont indispensables pour la fertilité des individus.

Les cellules de Sertoli ont une activité étroitement liée à la FSH. Des souris injectées avec de la FSH après la naissance ont un nombre de cellules de Sertoli doublé par rapport aux animaux non traités (Meachem et al. 1996). Et à l'inverse, des animaux déficients en FSH ou son récepteur présentent une diminution de 40% du nombre de cellules de Sertoli entraînant une diminution du nombre de cellules germinales (Johnston et al. 2004; Abel et al. 2000). La FSH participe à l'établissement du nombre de cellules de Sertoli dans le testicule adulte et par conséquent au nombre de cellules germinales que les tubules pourront comporter. La FSH augmente la transcription du gène codant pour le récepteur aux androgènes ce qui permet aux cellules de Sertoli de répondre à la testostérone (Verhoeven and Cailleau 1988; Blok et al. 1992). L'expression d'AR commence vers le 4^{ème} jour après la naissance chez la souris puis les niveaux d'expression d'AR augmentent au cours du développement prépubère jusqu'à l'âge adulte (Willems et al. 2010). Des modèles de souris invalidés pour AR dans les cellules de Sertoli (AR-KO (knock-out)) ne présentent pas de diminution du nombre total de cellules de Sertoli (Tan et al. 2005). Chez ces souris AR-KO, bien que le nombre de spermatogonies ne soit pas affecté, les spermatides sont très peu nombreux ou absents et la quantité de spermatocytes est légèrement diminuée. Ce déclin post-méiotique entraîne une infertilité chez ces animaux (Wang et al. 2009; Chang et al. 2004; De Gendt et al. 2004). Les résultats obtenus dans ces modèles de souris montrent l'importance de la signalisation régulée par les androgènes afin de maintenir la spermatogenèse en contrôlant les fonctions des cellules de Sertoli (intégrité de la BHT, fonctions sécrétrices, etc.) (Tan et al. 2005).

Même après la détermination du sexe durant l'embryogenèse, les cellules de Sertoli matures ont également un rôle important à jouer dans le maintien de leur identité sexuelle. De nombreux modèles de souris ayant une perte d'expression de gènes impliqués dans la différenciation mâle ou une augmentation de l'expression de gènes du déterminisme femelle présentent un phénotype plus ou moins prononcé de transdifférenciation (revue dans (Gardiner and Swain 2015)). L'inactivation de *Dmrt1* (Doublesex and mab-3 related transcription factor 1) par délétion inductible chez des souris mâles adultes (génétiquement XY) entraîne une

féminalisation des cellules somatiques et des cellules germinales dans les testicules. L'expression de *Sox9* est perdue chez ces animaux qui se mettent à exprimer *Foxl2* ainsi que des gènes impliqués dans la fonction ovarienne tels que *Rspo1*, *Wnt4*, *Follistatine*, et les récepteurs aux œstrogènes (ESR1 et ESR2) (Matson et al. 2011; Chaboissier et al. 2004). DMRT1 agit comme un répresseur en se liant à proximité des séquences codantes pour ces gènes impliqués dans la différenciation femelle (Matson et al. 2011). Dans ce nouvel environnement, des cellules de la thèque apparaissent et sont capables de produire des œstrogènes qui vont contribuer à inhiber l'expression de *Sox9* (Georges et al. 2014). Ce phénotype est similaire à celui observé avec la perte de *Sox9* dans les cellules de Sertoli au jour E14.0 où les animaux XY surexpriment des gènes spécifiques de l'ovaire conduisant à une stérilité à 5 mois après la naissance (Vidal et al. 2001; Wagner et al. 1994). DMRT1, de la même manière que SOX9 durant l'embryogenèse, permet de maintenir l'expression de gènes impliqués dans le destin mâle des cellules et réprimer les gènes de la différenciation femelle.

3.2. Développement des cellules de Leydig

3.2.1. Les cellules de Leydig fœtales et adultes

Il existe deux populations distinctes de cellules de Leydig. Les cellules de Leydig fœtales (FLC) se développent peu de temps après la différenciation des cellules de Sertoli et sont présentes durant la vie fœtale et néonatale, malgré le fait que certaines FLCs peuvent toujours être retrouvées chez l'adulte (Kerr and Knell 1988; Mendis-Handagama, Risbridger, and de Kretser 1987). Les cellules de Leydig adultes (ALC) se développent quant à elles à partir du 7^e jour après la naissance chez la souris et vont persister durant toute la vie de l'individu. La mise en évidence de ces deux populations a, dans un premier temps, été faite à partir d'études morphologiques et fonctionnelles de ces cellules puis par l'identification de marqueurs spécifiques à chacune de ces populations (Kaftanovskaya et al. 2015; Shima et al. 2015).

Les FLCs sont responsables de la production d'androgènes nécessaires au développement et à la différenciation du tractus génital mâle (différenciation des canaux de

Wolff) et pour la masculinisation du cerveau. La population de FLCs va diminuer peu de temps après la naissance ce qui va engendrer une baisse de la production de testostérone. À partir de cette période néonatale, la population de cellules précurseurs des ALCs va se développer progressivement et au cours de leur différenciation en ALCs, ces cellules acquièrent la capacité de produire de la testostérone (revue dans (Zirkin and Papadopoulos 2018)).

Chez la souris, les FLCs se distinguent des ALCs par leur indépendance à la LH afin d'exercer leurs fonctions. Les modèles de souris transgéniques présentant une délétion du gène codant pour la GnRH (Gonadotropin releasing hormone), le récepteur à la LH (LHCGR) ou bien la sous-unité β de la LH ont des niveaux de testostérone circulant à la naissance qui sont normaux, tout comme les caractères sexuels secondaires et la masculinisation du cerveau (Lei et al. 2001; Ma et al. 2004; Zhang et al. 2001). Ces données indiquent que la LH n'est pas nécessaire durant le développement fœtal murin afin d'assurer l'activité des FLCs. Comme il le sera présenté plus en détail dans la section #B.3.2 de cette revue de littérature, l'intégration du signal déclenché par la LH sur les ALCs est un processus important pour la production de testostérone chez l'adulte.

3.2.2. Les cellules de Leydig fœtales

3.2.2.1. Origine des FLCs

Les études s'accordent à dire que la population de progéniteurs des FLCs se trouve dans l'interstitium, qui s'est formé parallèlement à la formation des cordons testiculaires à la suite de l'expression de *Sox9* dans les cellules pré-Sertoli. Cependant, l'origine des progéniteurs des FLCs ne fait pas encore l'unanimité dans la communauté scientifique (Figure 1.2).

Les cellules mésenchymateuses du primordium adrénogonadique expriment *Nr5a1* et, en cas d'ablation de ce gène chez la souris durant le développement embryonnaire, les animaux sont dépourvus de glandes surrénales et de gonades (Luo, Ikeda, and Parker 1994). L'hypothèse du PAG comme origine des précurseurs des cellules de Leydig fœtales est

renforcée par l'expression de marqueurs communs entre ces cellules et les cellules de l'adrénocortex en développement comme *Cyp11b1* (CYP 11 β hydroxylase) (Wang et al. 2002; O'Shaughnessy et al. 2003). Une étude de traçage des cellules de l'épithélium coelomique met en évidence que cette population de cellules migre et contribue à la formation des cellules de l'interstitium (Karl and Capel 1998). Il a été également suggéré que les FLCs et les cellules périvitubulaires myoïdes trouvent leur origine dans le mésonéphros (Merchant-Larios and Moreno-Mendoza 1998; Merchant-Larios, Moreno-Mendoza, and Buehr 1993; Nishino et al. 2001). Des études de traçage plus récentes utilisant des marqueurs potentiels de précurseurs des FLCs (MAFB, c-MAF, VCAM1) suggèrent que ces cellules proviennent à la fois de l'épithélium coelomique et du mésonéphros (DeFalco, Takahashi, and Capel 2011). Enfin, il a été suggéré que les cellules de la crête neurale pouvaient également contribuer à la formation des FLCs; cependant, des études de traçage plus poussées doivent être réalisées afin de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse (Yamauchi et al. 1999; Brennan, Tilmann, and Capel 2003; Davidoff et al. 2009).

3.2.2.2. Différenciation des FLCs

La différenciation des FLCs entre le jour E12.5 et E13.5 chez la souris coïncide avec la formation des cordons testiculaires. Les cellules de Sertoli servent de centre de commande afin d'organiser le testicule en devenir et assurent la spécification des autres cellules somatiques en sécrétant divers facteurs. DHH et PDGFA (Platelet-derived growth factor A) sont produits par les cellules de Sertoli et jouent un rôle fondamental dans la différenciation des cellules de Leydig fœtales (Yao, Whoriskey, and Capel 2002; Brennan, Tilmann, and Capel 2003; Pierucci-Alves, Clark, and Russell 2001) (Figure 1.2).

Une étude récente publiée par le groupe d'Humphrey Yao a mis en évidence l'existence de différentes populations de FLCs (Liu, Rodriguez, and Yao 2016). Initialement, on retrouve dans le primordium gonadique des cellules WT1+/HES- et WT1+/HES+. Comme mentionné précédemment (section #A.3.1.1), une sous-population des cellules WT1+/HES- se différenciera en cellules de Sertoli. Une autre sous-population de cellules WT1+/HES- ainsi que les cellules WT1+/HES+ se différencieront en cellules WT1-. La population de cellules

WT1-/HES- n'exprimera pas GLI1 (Glioma-associated oncogene 1), mais exprimera malgré tout CYP17A1 (CYP 17 α -hydroxylase/17,20-lyase) et serait les progéniteurs d'une sous-population de FLCs. La population de cellules WT1-/HES1+ exprimera GLI1 à la suite de la réception du signal DHH. Ces cellules WT1-/HES+/GLI1+ seraient non seulement les progéniteurs d'une autre sous-population de FLCs exprimant CYP17A1, mais également les progéniteurs d'une sous-population de cellules n'exprimant pas CYP17A1 qui, éventuellement, se différencieront en ALCs (Liu, Rodriguez, and Yao 2016).

Chez les souris n'exprimant pas *Dhh*, le nombre de FLCs est fortement diminué et l'organisation des cordons testiculaires est perturbée (Yao, Whoriskey, and Capel 2002). Tandis que les souris mâles avec une augmentation de la sécrétion de DHH développent une hyperplasie des FLCs (Barsoum et al. 2013), l'expression ectopique de la voie Hedgehog dans l'ovaire fœtal conduit à l'apparition de FLCs fonctionnelles à partir des cellules somatiques ovariennes (Barsoum et al. 2009), soulignant l'importance du rôle de la signalisation DHH/PTCH1 dans la différenciation des FLCs. Un autre facteur de croissance sécrété par les cellules de Sertoli impliqué dans la différenciation des FLCs est PDGFA. L'inactivation de son récepteur chez la souris, PDGFRA, entraîne une absence de FLCs dans le testicule ainsi qu'une malformation des cordons testiculaires, signe d'une atteinte des cellules de Sertoli, et des défauts de vascularisation. (Brennan, Tilmann, and Capel 2003). Cela suggère des rôles divers de PDGFA dans l'organogenèse précoce du testicule. Le récepteur aux facteurs de croissance des hépatocytes (HGF) est exprimé tardivement dans le testicule fœtal mais joue également un rôle dans le développement du testicule. En effet, Le HGF va diminuer l'expression des gènes associés au maintien des FLCs au stade progéniteur permettant ainsi une augmentation du nombre de FLCs. De plus, il augmente la production de testostérone dans le testicule fœtal et stimule l'expression d'INSL3 (insulin-like hormone 3) qui est essentielle pour la phase initiale de descente intra-abdominale des testicules (cf. section #A.3.2.2.3), ce qui suggère un rôle de l'HGF comme facteur de différenciation des FLCs (Ricci et al. 2012).

La signalisation activatrice est contrebalancée par des facteurs réprimant la différenciation des FLCs. La voie Notch a un effet inhibiteur sur la différenciation des FLCs. L'inhibition pharmacologique de la voie Notch ou la délétion de *Notch2* dans les cellules NR5A1+ dans le testicule fœtal entraîne une augmentation du nombre de FLCs, ainsi qu'une

augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la stéroïdogénèse, signe de la différenciation des progéniteurs des FLCs. (Tang et al. 2008; Liu, Rodriguez, and Yao 2016). L'activation de la voie maintient les progéniteurs des FLCs dans un état non différencié et la testostérone va affecter cet état en utilisant la voie Notch (Defalco et al. 2013). Des microARNs exprimés dans les cellules de Sertoli ayant pour gènes cibles (établis de façon prédictive) des gènes codants pour des effecteurs de la voie Notch sont impliqués dans la différenciation des FLCs. En effet, des souris mâles inactivées pour *miR-140-3p/5p^{-/-}* (deux microARNs fortement exprimés dans les crêtes génitales dès le jour E12.5) présentent une augmentation du nombre de FLCs (Rakoczy et al. 2013). De plus, l'expression de *Lin28b*, codant pour une protéine de liaison à l'ARN impliquée dans le contrôle de la synthèse des microARNs, est retrouvée dans les FLCs, ce qui laisse suggérer que d'autres microARNs seraient impliqués dans la différenciation des FLCs (Gaytan et al. 2013).

De nombreux facteurs de transcription sont également impliqués dans la différenciation des FLCs. DAX1 (dosage-sensitive sex reversal adrenal hypoplasia congenita (AHC) critical region on the X chromosome, ou NR0B1), est exprimé dans la plupart des tissus où NR5A1 est exprimé et a une action opposée à celle de NR5A1 (Ikeda et al. 1996). Les souris *Nr0b1^{-Y}* présentent une désorganisation des cordons testiculaires, mais le nombre de cellules de Sertoli et de cellules germinales est normal, chaque type cellulaire exprimant leurs marqueurs spécifiques (Meeks et al. 2003). Cependant le nombre de FLCs et le nombre de cellules périvitubulaires myoïdes sont diminués.

Des mutations dans le gène codant pour ARX (Aristaless related homeobox gene) sont retrouvées chez les patients souffrant d'une maladie dans laquelle des anomalies génitales sont présentes (Uyanik et al. 2003; Kato et al. 2004). Le phénotype est reproduit chez des souris *Arx* KO et une étude a montré qu'une diminution du nombre de FLCs est responsable de ces anomalies génitales (Kitamura et al. 2002). Une étude plus récente a mis en évidence l'expression de *Arx* dans les progéniteurs des FLCs plutôt que dans les FLCs différenciées, dans lesquelles l'expression d'*Arx* est diminuée. *Arx* permettrait ainsi le maintien des progéniteurs des FLCs (Miyabayashi et al. 2013). Les facteurs de transcription POD1 (ou Transcription factor 21, TCF21) et GATA4 sont aussi impliqués dans le développement des FLCs. POD1 se lie au promoteur du gène *Nr5a1* afin d'inhiber sa transcription et la perte de

POD1 conduit à une augmentation de la différenciation des FLCs et une augmentation de l'expression de *Nr5a1* (Cui et al. 2004). GATA4 agit comme un régulateur de la différenciation des FLCs de façon directe et indirecte. L'action indirecte se fait via les cellules de Sertoli. L'interaction entre GATA4 et son cofacteur FOG2 stimule l'expression de *Sry* dans les cellules de Sertoli et assure l'expression des gènes spécifiques (*Sox9*, *Amh*, *Dhh*) qui vont permettre l'induction de la différenciation des progéniteurs des FLCs (Tevosian et al. 2002). D'une façon plus directe, il a été montré que des cellules embryonnaires souches déficientes en *Gata4* ne peuvent pas contribuer au développement des FLCs, et les souris inactivées pour *Gata4* dans les cellules NR5A1+ présentent une diminution de l'expression des marqueurs de FLCs au jour E15.5 (Bielinska et al. 2007; Manuylov et al. 2011).

À l'image de NR0B1, Chicken olvabumin promoter transcription factor II (COUP-TFII ou NR2F2) agit comme antagoniste de NR5A1 afin de réguler la différenciation des FLCs suite à la compétition entre NR2F2 et NR5A1 pour la liaison sur des séquences promotrices des gènes de la stéroïdogénèse (van den Driesche et al. 2012). NR2F2 joue un rôle important dans la formation des cellules progénitrices de Leydig ainsi que dans l'organogenèse du testicule étant donné que l'inactivation de *Nr2f2* au jour E18.5 ou à un stade prépubère chez la souris conduit à un échec de la formation des progéniteurs des cellules de Leydig adultes et de leur différenciation subséquente (Lin et al. 2011; Qin, Tsai, and Tsai 2008). Cependant, si l'inactivation de *Nr2f2* est faite dans les cellules de Leydig adultes différenciées, il n'y a pas d'effet rapporté sur la reproduction des mâles et dans la fonction des cellules de Leydig (Qin, Tsai, and Tsai 2008). NR2F2 est exprimée dans l'interstitium testiculaire à partir du jour E16.5 et parmi les cellules NR2F2+, des progéniteurs des FLCs sont présents (Kilcoyne et al. 2014).

3.2.2.3. Fonctions des FLCs

Les deux principales fonctions des cellules fœtales de Leydig sont de produire des androgènes et de l'INSL3 afin d'induire la morphogenèse mâle des tissus et la descente testiculaire.

Dans le développement fœtal, la principale source d'androgènes provient des FLCs. Les FLCs expriment toutes les enzymes de la stéroïdogénèse, à l'exception de HSD17B3 (Hydroxysteroid (17- β) dehydrogenase 3 [abréviation similaire pour les autres membres de la famille des hydroxystéroïdes déshydrogénase (HSD)]) qui permet de générer la testostérone (O'Shaughnessy et al. 2000; Shima et al. 2013). Ce sont les cellules de Sertoli qui réalisent cette opération. Les androgènes permettent la masculinisation de l'ensemble de l'organisme, à savoir la différenciation des canaux de Wolff afin de former l'épididyme, les canaux déférents et les vésicules séminales, le développement et la morphogenèse du tractus génital (interne et externe), la sexualisation du cerveau en lien avec le comportement sexuel ainsi que la formation des cellules de Leydig adultes (revue dans (Svingen and Koopman 2013)). L'appareil reproducteur externe se développe principalement grâce à la dihydrotestostérone (DHT) qui provient de la réduction de la testostérone, par la 5 α -réductase, dans les tissus périphériques tels que l'épididyme et la prostate qui expriment fortement cette enzyme.

L'INSL3 et les androgènes sont indispensables pour la descente trans-abdominale et inguino-scrotal des testicules. Ainsi, une déficience de ces hormones durant le développement embryonnaire est responsable d'une rétention des testicules dans la cavité abdominale causant une cryptorchidie (Anand-Ivell and Ivell 2014). Un autre rôle moins bien compris des FLCs est la régulation de l'activité proliférative des cellules de Sertoli fœtales par l'Activine A. La perturbation du gène codant la sous-unité β de l'Activine A dans les FLCs entraîne un échec de l'élongation et de l'expansion des cordons testiculaires lié à la diminution de la prolifération des cellules de Sertoli (Archambeault and Yao 2010).

3.2.2.4. Devenir des FLCs

Entre la naissance et la puberté, les FLCs seront remplacées par les ALCs. Entre les jours 3 et 5 après la naissance, les FLCs s'atrophient progressivement et l'expression de HSD17B3 dans les cellules de Sertoli va diminuer entraînant une baisse de la production d'androgène. Dans ce même temps, les cellules de Sertoli commencent à exprimer le récepteur aux androgènes et les progéniteurs des cellules de Leydig adultes commencent à se différencier (revue dans (O'Shaughnessy 2015)). Bien que la majorité des FLCs s'atrophient

progressivement, certaines FLCs sont retrouvées dans l'interstitium du testicule adulte (Kerr and Knell 1988; Mendis-Handagama, Risbridger, and de Kretser 1987). La présence de FLCs chez l'adulte a été mise en évidence dans un premier temps par des analyses morphométriques de ces différentes populations puis de façon plus précise par des études de traçage avec un marqueur fluorescent (Kaftanovskaya et al. 2015; Shima et al. 2015). Ces études montrent que les FLCs présentes chez l'adulte n'expriment pas HSD17B3 et HSD3B6, ne leur permettant pas de synthétiser de la testostérone.

3.2.3. Les cellules de Leydig adultes (ALCs)

Les cellules de Leydig adultes produisent la testostérone responsable du développement et du maintien de la fonction reproductive chez le mâle adulte tout au long de sa vie. Les ALCs ne dérivent pas des FLCs présentes dans l'espace interstitiel du testicule après la naissance. Ces cellules se développent à partir d'une population de cellules de Leydig souches (SLCs) présentes dans l'interstitium qui va se différencier pour générer les cellules de Leydig progénitrices (PLCs), puis les cellules de Leydig immatures (ILCs) avant de former les cellules de Leydig adultes matures (ALCs).

3.2.3.1. Origine des ALCs

L'existence d'une population de cellules progénitrices communes aux FLCs et ALCs fait débat depuis plusieurs années. Cependant, il est admis que les FLCs différenciées ne contribuent pas à la formation des ALCs (revue dans (Svingen and Koopman 2013)). L'étude de Barsoum et al. portant sur la population de cellules NR5A1+ dans l'interstitium suggère que cette population servirait de progéniteur commun aux FLCs et ALCs. En effet, l'activation forcée de la voie Hedgehog dans les cellules NR5A1+ induit une augmentation des FLCs, une baisse de la quantité de progéniteurs et une inhibition partielle de la différenciation des ALCs (Barsoum et al. 2013). Dernièrement, l'étude de traçage des progéniteurs somatiques WT1+ dans le primordium gonadique montre qu'une partie de la population de FLCs contribue à la formation des SLCs (Liu, Rodriguez, and Yao 2016). Chez la souris, au jour E12.5, une

population de progéniteurs de l'interstitium caractérisée par les marqueurs WT1-/HES1+/GLI1+ peut se différencier en deux sous-populations, l'une exprimant CYP17A1 qui donnera les FLCs et l'autre ne l'exprimant pas qui donnera les SLCs (Figure 1.2).

3.2.3.2. Différenciation des ALCs

Les SLCs de forme fusiforme sont principalement localisées dans la région périvitulaire du testicule. Les SLCs expriment des marqueurs de cellules souches (Nestin et PDGFRA), mais n'expriment pas les marqueurs de la lignée des cellules de Leydig (LHCGR, CYP11A1, HSD3B ou CYP17A1) (Ge et al. 2006). Il a été démontré que ces cellules, lorsque mises en culture, peuvent proliférer et conserver leur phénotype de départ jusqu'à 6 mois après le début de la culture (Ge et al. 2006). Il a été aussi démontré que les SLCs peuvent régénérer la population des ALCs à la suite d'un traitement à l'éthane diméthane sulfonate causant l'apoptose des ALCs (Sharpe, Maddocks, and Kerr 1990). Les SLCs vont par la suite se différencier en PLCs qui se différencieront en ILCs qui se différencieront à leur tour en ALCs. Conséquemment, la morphologie de la cellule et l'expression des gènes impliqués dans la stéroïdogenèse seront modifiées durant cette période de différenciation allant du jour postnatal P3 au jour P35 chez la souris (Hardy, Zirkin, and Ewing 1989; Ge et al. 2005).

Ainsi, les PLCs toujours localisées dans la région périvitulaire seront visibles à partir du jour P7 chez la souris (Siril Ariyaratne et al. 2000; Baker et al. 1996). La morphologie cellulaire des PLCs est sensiblement identique aux SLCs, cependant les PLCs expriment des marqueurs d'enzymes de la stéroïdogenèse tels que CYP11A1, HSD3B1 et CYP17A1 ainsi qu'une version tronquée (non fonctionnelle) du LHCGR (Haider, Passia, and Overmeyer 1986; Hardy et al. 1990; Tena-Sempere, Zhang, and Huhtaniemi 1994). Cette forme tronquée du LHCGR n'est pas impliquée dans la stéroïdogenèse des PLCs, comme l'a montré une étude d'inactivation du gène *Lhcgr* chez la souris (Zhang et al. 2004). Les PLCs n'expriment pas HSD17B3, mais présentent des niveaux élevés de 5 α réductase (SRD5A1) et 3 α -HSD (3 α Hydroxysteroid dehydrogenase ou AKR1C9) qui permettent de convertir l'androstènedione en androstanédione puis en androstérone (Ge and Hardy 1998). Au cours de leur développement, les PLCs vont changer de morphologie (taille plus importante et forme ovoïde), leur capacité à

se diviser va diminuer et leur localisation va être plus en position centrale dans l'interstitium (Mendis-Handagama and Ariyaratne 2001; Ge and Hardy 1997).

Par la suite, les PLCs se différencieront en ILCs. Cette transition se produit à partir du jour P16 chez la souris. À ce stade, les ILCs deviennent ovoïdes, le réticulum endoplasmique lisse devient plus abondant et de nombreuses grosses gouttelettes lipidiques se forment dans le cytoplasme ce qui augmente la capacité stéroïdogénique de la cellule (Hardy, Zirkin, and Ewing 1989). L'expression des enzymes HSD3B1, CYP11A1 et CYP17A1 est augmentée et les ILCs commencent à exprimer HSD17B3 ce qui leur permet de faire de la testostérone à partir de l'androstènedione (Ge and Hardy 1998; Shan et al. 1993). Cependant, les niveaux de SRD5A1 et AKR1C9 étant toujours élevés, la testostérone est convertie en DHT puis en androstanédiol (Shan et al. 1993; Viger and Robaire 1995). Les ILCs expriment également HSD11B1 qui permet de contrôler les niveaux de glucocorticoïdes au sein de la cellule en transformant le cortisol en un métabolite inactif, le cortisone (Phillips, Lakshmi, and Monder 1989). Les ILCs présentent une capacité proliférative plus faible que les PLCs car les différentes cyclines impliquées dans le cycle cellulaire sont diminuées, mais les ILCs sont quand même capables de se diviser au moins une fois avant de se différencier en ALCs matures (Ge et al. 2005; Stanley et al. 2011).

Les ALCs matures représentent la dernière étape de la différenciation de la population adulte des cellules de Leydig et sont apparentes vers le jour P35 chez la souris (Shan et al. 1993). La morphologie évolue à nouveau donnant des cellules plus volumineuses que les ILCs avec un nombre plus important de mitochondries et une expansion du réticulum endoplasmique lisse (Shan et al. 1993). Au niveau de la stéroïdogénèse, les gouttelettes lipidiques sont quasiment absentes des ALCs et l'expression des enzymes de la biosynthèse des androgènes est augmentée. L'augmentation de l'expression de HSD17B3 et la diminution de celle de SRD5A1 et AKR1C9 permet une production abondante de testostérone (Viger and Robaire 1995). Les changements au sein des organelles de la cellule et de l'expression des enzymes de la stéroïdogénèse permettent une production de testostérone par les ALCs matures 150 fois plus élevée que la quantité synthétisée par les PLCs et 5 fois plus élevée que celle synthétisée par les ILCs (Shan et al. 1993). Les ALCs continuent d'exprimer HSD11B1 afin d'inactiver les glucocorticoïdes dans le testicule (Mendis-Handagama and Ariyaratne 2001).

L'expression de LHCGR est augmentée permettant une meilleure sensibilité à la LH. Cela se traduit par une augmentation de la stéroïdogenèse en réponse à l'activation de la voie ainsi que par l'augmentation de la taille du réticulum endoplasmique (Shan and Hardy 1992; Ewing et al. 1983). Les ALCs ne prolifèrent plus (Keeney et al. 1988) mais, chez le rat, ces cellules sont capables d'être régénérées en cas d'élimination de la population d'ALCs de façon expérimentale à partir des SLCs qui vont entrer en différenciation progressive afin d'aboutir à une régénération de la population d'ALCs en 7 semaines (Kerr and Knell 1988; Chen, Huhtaniemi, and Zirkin 1996; Sharpe, Maddocks, and Kerr 1990). Cette capacité de régénération n'a pas encore été observée chez d'autres espèces.

3.2.3.3. Régulation de la différenciation des ALCs

La prolifération et la différenciation des cellules de Leydig sont régulées par de nombreux facteurs de croissance et hormones qui vont agir par différentes voies de signalisation afin de déterminer le devenir de la cellule (revue dans (Chen et al. 2017; Ye et al. 2017)).

Parmi les différents facteurs de transcription impliqués dans le développement des cellules de Leydig adultes, la surexpression de NR5A1, DMRT1 et GATA4 dans des fibroblastes en culture permet d'induire leur différenciation afin de générer des cellules de Leydig (Yang et al. 2017). Ces cellules de Leydig induites ont un profil d'expression génique similaire à celui des ALCs : elles expriment des gènes de la stéroïdogenèse et produisent des androgènes. GATA4 est exprimé dans les SLCs et agit comme un régulateur transcriptionnel positif des gènes de la stéroïdogenèse, notamment en induisant l'expression de *Nr5a1* (Hu, Okumura, and Page 2013). COUP-TFII joue un rôle important dans la maturation des PLCs car le KO conditionnel de COUP-TFII au 14^e jour postnatal empêche la formation de la population d'ALCs (Qin, Tsai, and Tsai 2008). Cette étude révèle l'importance de l'expression des gènes, dans ce cas *Nr2f2*, au sein d'une population de cellule afin d'établir une lignée de cellules.

DHH, sécrétée par les cellules de Sertoli, est non seulement nécessaire aux FLCs, mais également aux ALCs. DHH est requise pour la prolifération des SLCs, mais également pour la

différenciation des différentes populations de cellules de Leydig (Li et al. 2016). Le mode d'action précis reste à déterminer, mais celui-ci pourrait se faire par la stimulation de l'expression de NR5A1 (Barsoum et al. 2013; Yao, Whoriskey, and Capel 2002). Dans la famille des PDGF, les deux isoformes du récepteur (PDGFR-A/-B) stimulent la prolifération des SLCs (Li et al. 2016). Cependant, PDGFRA va permettre également d'induire la différenciation des SLCs tandis que PDGFRB va inhiber cette différenciation à la suite de la signalisation déclenchée par leur ligands respectifs, PDGFA et PDGFB (Odeh et al. 2014). IGF1 (Insulin-like growth factor 1) est également nécessaire dans la lignée de Leydig adulte. La délétion d'*Igf1* chez la souris mène à de faibles niveaux sériques de testostérone et une infertilité chez l'adulte, résultant d'une diminution du nombre de cellules de Leydig (Baker et al. 1996; Rouiller-Fabre et al. 1998). IGF1 est capable de stimuler la prolifération des PLCs et ILCs (Hu et al. 2010) ainsi que la différenciation des ILCs en ALCs (Wang et al. 2003).

La LH joue un rôle primordial dans l'activation de la stéroïdogénèse dans les cellules de Leydig à la suite de sa fixation sur son récepteur LHCGR. Chez la souris, la LH est importante pour le développement des ALCs contrairement aux FLCs. Les souris présentant une déficience en LH ont des testicules de plus petite taille avec très peu d'ALCs (Ma et al. 2004). De plus, les souris ne sécrétant pas de LH, la population de cellules de Leydig est diminuée de 90% et l'injection de LH chez ses souris permet de stimuler la prolifération des cellules de Leydig (Baker and O'Shaughnessy 2001; Dombrowicz et al. 1992). La signalisation liée à la LH permet à la fois d'induire la prolifération et la différenciation terminale des ILCs en ALCs.

Les androgènes produits par les cellules de Leydig fœtales et adultes se fixent sur leur récepteur nucléaire qui est présent dans différents types de cellules du testicule, dont les cellules de Leydig (aux différents stades de développement) et les cellules de Sertoli (Shan et al. 1995). Les souris AR-KO ont une population de FLCs comparable aux animaux contrôles tandis que le nombre d'ALCs est diminué de 60%, suggérant une déficience dans la différenciation des SLCs en ALCs (O'Shaughnessy et al. 2002; Murphy, Jeffcoate, and O'Shaughnessy 1994). L'utilisation d'un KO conditionnel d'AR dans les cellules de Sertoli a mis en évidence une réduction du nombre de cellules de Leydig adultes, mais pas de leur activité stéroïdogénique. L'effet de l'inactivation de l'AR dans les cellules de Sertoli serait lié

à la diminution de l'expression de PDGF-A dans celles-ci, menant à une baisse de la prolifération des SLCs et des PLCs (Chang et al. 2004). Les cellules de Sertoli sécrètent de nombreux facteurs permettant le développement adéquat des cellules de Leydig. C'est pourquoi la perte complète des cellules de Sertoli en période néonatale et adulte induit une réduction du nombre de PLCs et d'ALCs (Rebourcet et al. 2014).

De nombreux autres facteurs sont impliqués dans la régulation de la différenciation de la lignée des cellules de Leydig, tels que différents membres de la superfamille TGF β (Transforming Growth Factor β) qui ont un rôle positif (Activine) ou négatif (TGF β 1, AMH, Inhibine) ou des membres de la famille de l'Epidermal growth factor (EGF : EGF et EGFR, Transforming growth factor α , etc) qui ont un rôle essentiellement positif dans ce processus (revue dans (Ye et al. 2017)). Enfin, l'œstrogène en se fixant sur ses récepteurs (ESR1 et ESR2) présents sur les cellules de Leydig inhibe la prolifération des PLCs chez la souris à 14 jours. De plus, l'action de l'œstrogène sur son récepteur ESR1 entraîne également une régulation négative de la stéroïdogénèse ce qui conduit de façon directe et indirecte le devenir de la lignée des cellules de Leydig (Akingbemi et al. 2003; Oh et al. 2017)

3.2.3.4. Fonctions des ALCs

Après la naissance les niveaux de testostérone sérique sont faibles à la suite de la diminution du nombre de FLCs et ces niveaux vont augmenter progressivement jusqu'à atteindre un pic au moment de la puberté après l'établissement de la lignée des ALCs. La principale fonction des ALCs est de produire des androgènes afin de contrôler et maintenir les caractéristiques mâles de l'individu tout au long de sa vie.

Le principal androgène produit par les cellules de Leydig adulte est la testostérone. À la puberté, les niveaux de testostérone augmentent et permettent le développement des caractères sexuels secondaires (pilosité, augmentation de la masse musculaire, du pénis, croissance osseuse, comportement sexuel) et l'initiation de la spermatogénèse. Chez l'adulte, la testostérone permet de maintenir la spermatogénèse grâce à son interaction avec son récepteur AR. Chez les souris AR-KO mentionnées précédemment, le phénotype s'étend également aux cellules germinales avec leur apoptose et un arrêt de la spermatogénèse (Chang

et al. 2004). Les cellules de Leydig sont également capables de produire de l'œstradiol par aromatisation de la testostérone, cette production testiculaire représente environ 20% de l'œstradiol produit chez le mâle (revue dans (Hess and Cooke 2018)). Chez la souris mâle, l'œstradiol est requis à la fois dans la spermatogenèse (Robertson et al. 1999) et dans le contrôle local de la production d'androgènes (Lee et al. 2012) que dans le comportement sexuel (Robertson et al. 2001).

Au moment de la puberté, INSL3 est à nouveau sécrétée et ses niveaux augmentent avec l'âge, avant de diminuer chez les souris âgées, cependant son rôle est moins bien défini que lors du développement embryonnaire (Pusch, Balvers, and Ivell 1996). Le récepteur à l'INSL3 (RXFP2) est exprimé dans les cellules germinales, cependant, sa délétion dans les cellules germinales n'induit pas de défaut de fertilité chez le mâle suggérant un rôle non essentiel de INSL3 dans ces cellules (Huang et al. 2013). Un autre site d'action de INSL3 est l'os où RXFP2 est exprimé dans les ostéoblastes, aussi bien chez la souris que chez l'humain (Ferlin et al. 2008). Des mutations de RXFP2 sont associées à l'ostéoporose suggérant un rôle de l'INSL3 dans le métabolisme osseux chez l'adulte.

3.2.3.5. Devenir des ALCs

La production de testostérone diminue avec l'âge tant chez rongeurs que chez l'homme (Beattie et al. 2015). Cette baisse s'explique par la réduction de la production de testostérone par les ALCs qui sont vieillissantes et dont la capacité à répondre à la LH est plus faible (Bonavera et al. 1997; Grzywacz et al. 1998). Les dérivés réactifs de l'oxygène vont altérer l'équilibre d'oxydoréduction de l'environnement des cellules de Leydig vieillissantes. Ces changements causent des dommages au niveau de la membrane lipidique et protéique pouvant expliquer cette baisse de la réactivité à la LH (Chen, Ge, and Zirkin 2009). De plus, les enzymes de la stéroïdogénèse sont également diminuées (Luo, Chen, and Zirkin 2005) et il a été observé que la quantité de TSPO (Translocator protein) dans les cellules de Leydig âgées est diminuée de 50%, ce qui entraîne une diminution de l'entrée du cholestérol dans la cellule et donc de la stéroïdogénèse (Culty et al. 2002). L'importance et le rôle du cholestérol, de

TSPO et STAR dans la stéroïdogénèse seront développés dans la section #B « Stéroïdogénèse surrénalienne et testiculaire » de cette revue de la littérature.

4. La glande surrénale : développement et fonction

4.1. Développement embryonnaire précoce de la glande surrénale

Après le jour E10.5, le primordium adrénocortical poursuit son développement afin de donner une surrénale fonctionnelle. Comme mentionné précédemment (section #A.2), WT1 est exprimé dans le PAG. Une fois la séparation des deux primordia, son expression disparaîtra dans les cellules du cortex surrénalien (Nachtigal et al. 1998; Val, Martinez-Barbera, and Swain 2007). L'expression de *Nr5a1* doit donc être assurée par d'autres facteurs de transcription. Le Fetal Adrenal Enhancer (FAde) dans le quatrième intron du gène *Nr5a1* est un médiateur critique de l'expression de *Nr5a1* dans le primordium adrénocortical (Zubair et al. 2006). L'enhancer FAde contient des sites de liaison pour différents facteurs de transcription (Pbx (pre B cell leukemia homeobox 1)/Prep (PBX/knotted 1 homeobox 1), Pbx/Hox (Homeobox) et NR5A1). Les sites Pbx/Prep et Pbx/Hox initient la transcription puis NR5A1 va ensuite assurer sa propre transcription par une boucle d'autorégulation (Zubair et al. 2006). Le maintien de niveau élevé de NR5A1 durant le développement de la glande surrénale fœtale est particulièrement important alors qu'une diminution de la taille des glandes surrénales fœtales est observée dans les souris *Nr5a1*^{+/-} tandis que le développement des gonades est normal (Babu et al. 2002; Bland, Fowkes, and Ingraham 2004).

De nombreux autres facteurs de transcription jouent également un rôle dans le développement initial de la glande surrénale fœtale incluant entre autres CITED2, NR0B1 et le partenaire de facteurs de transcription CTNNB1 (β -catenin). *Cited2* est exprimé dans l'épithélium coelomique à partir du jour E10 et son expression reste élevée dans le cortex surrénalien tandis qu'elle est nettement plus faible dans les gonades (Val, Martinez-Barbera, and Swain 2007). La délétion de *Cited2* chez la souris entraîne une mort embryonnaire avec des embryons qui présentent dès le jour E12 un développement surrénalien réduit conduisant à une agénésie au jour E17.5 (Bamforth et al. 2001; Val, Martinez-Barbera, and Swain 2007).

Dans les souris *Cited2*^{-/-}, l'expression de *Nr5a1* est diminuée, suggérant un rôle pour *Cited2* dans le maintien de l'expression de *Nr5a1*. De plus, des analyses *in vitro* ont mis en évidence l'interaction entre *Cited2* et *Wtl* sur le promoteur de *Nr5a1* qui permet d'augmenter son niveau d'expression requis pour le développement de l'adrénoprimum (Val, Martinez-Barbera, and Swain 2007).

Un autre membre de la famille des récepteurs nucléaires orphelins est requis pour le bon développement de la surrénale et le maintien de ses fonctions physiologiques : *Dax1/Nr0b1*. *Nr0b1* est exprimé à partir du jour E10.5 et son expression perdue dans les ébauches surréaliennes et gonadiques, cependant son expression postnatale est sexuellement dimorphique aussi bien dans les surrénales que dans les gonades (Ikeda et al. 1996; Mukai et al. 2002). Au contraire de NR5A1, NR0B1 agit comme un corépresseur de l'activité de l'enhancer FAdE empêchant la transcription de *Nr5a1* (Zubair, Parker, and Morohashi 2008). La régulation de l'expression de *Nr5a1* dépend donc du ratio NR5A1/NR0B1, ce qui pourrait expliquer le phénotype hypoplasique des surrénales fœtales observé chez les souris *Nr5a1*^{+/-} (Bland, Fowkes, and Ingraham 2004). La voie de signalisation WNT/CTNNB1 joue également un rôle important dans le développement de la glande surrénale. Chez la souris, la forme activée de CTNNB1 est fortement détectée en périphérie de l'ébauche adrénocorticale au jour E12.5 alors que son expression est retrouvée dans les cellules sous-capsulaires au jour E14.5 (Kim et al. 2008). L'inactivation efficace de CTNNB1 dans les cellules *Nr5a1*⁺ chez la souris entraîne une diminution de la quantité de cellules exprimant *Nr5a1* et de la prolifération cellulaire affectant le développement de l'ébauche du cortex surréalien (Kim et al. 2008). Si l'inactivation efficace de la CTNNB1 affecte le développement du cortex surréalien, la recombinaison moins efficace de cette dernière dans les cellules *Nr5a1*⁺ entraîne plutôt la dégénérescence du cortex surréalien à partir de la 15^e semaine postnatale, suggérant que CTNNB1 est également importante pour le maintien postnatal de la glande surrénale (Kim et al. 2008).

Durant le développement fœtal précoce de la glande surrénale, une population de cellules provenant de la crête neurale colonisera l'adrénoprimum à partir du jour E12 chez la souris. Ces cellules acquièrent par la suite le phénotype de cellules chromaffines capables d'exprimer la TH ainsi que les enzymes permettant la production de catécholamines, formant

ainsi une médulla fonctionnelle au centre de la glande surrénale (Le Douarin and Teillet 1974).

Une des dernières étapes dans la constitution de la glande surrénale est son encapsulation qui va permettre de recouvrir le cortex en cours de développement. Chez la souris, cette étape est complétée vers le jour E14.5 et le développement du cortex définitif va pouvoir se faire entre la médulla et la capsule (Keegan and Hammer 2002). Des études de traçage ont montré que les cellules de la capsule avaient deux origines distinctes. Tout d'abord, des études utilisant un modèle de recombinaison Cre inducible sous le contrôle du promoteur de *Wt1* ont révélé qu'une sous-population de cellules GLI1+ composant la capsule proviennent des cellules du mésenchyme entourant la glande surrénale en formation (Bandiera et al. 2013). Ces auteurs ont cependant montré qu'une autre sous-population de cellules capsulaires GLI1+ n'exprimait pas *Wt1* (Bandiera et al. 2013). Une seconde étude a par la suite démontré que cette population de cellules GLI1+/WT1- provient plutôt des cellules du cortex fœtal qui n'expriment plus *Nr5a1* (Wood et al. 2013) (Figure 1.3).

4.2. Développement embryonnaire tardif et postnatale : formation du cortex adulte et zonation

4.2.1. Origine de l'adrénocortex adulte

Chez la souris, à la suite de l'encapsulation au jour E14.5 et avec l'avancement de la gestation, le cortex fœtal est remplacé par le cortex adulte définitif, composé de la zone glomérulée et fasciculée alors que le cortex fœtal va dégénérer et portera le nom de zone X jusqu'à sa disparition.

Des études de traçage cellulaires effectuées par le groupe de Morohashi ont permis d'émettre la première hypothèse sur le passage du cortex fœtal au cortex définitif. Pour ces études, les souris FAdE-Cre dans lesquelles la recombinaison Cre inducible par le tamoxifène est sous la dépendance du promoteur fœtal de *Nr5a1* (FAdE) ont été croisées avec des souris dont l'expression de LacZ est dépendante de la recombinaison par l'enzyme Cre (Zubair, Parker, and Morohashi 2008). Lorsque les femelles gestantes ont reçu une injection de tamoxifène au

jour E11.5, l'étude à 2 mois de ces souris révélait un marquage de toutes les cellules du cortex définitif, tandis que si l'injection était faite au jour E14.5, le cortex n'était pas marqué (Zubair, Parker, and Morohashi 2008). Cette étude concluait que les cellules du cortex fœtal se différenciaient en cellules du cortex définitif et que l'expression de *Nr5a1* dans les cellules du cortex définitif n'est plus sous la dépendance de l'enhancer FAdE mais d'un autre facteur qui reste à identifier (Zubair, Parker, and Morohashi 2008).

Une étude subséquente portant sur l'activateur en aval de la voie Hedgehog, le facteur de transcription GLI1, suggéra une origine différente pour les cellules du cortex définitif. En effet, les cellules GLI1+ sont exprimées spécifiquement par les cellules de la capsule dans des cellules qui n'expriment pas *Nr5a1*. Les expériences de traçage cellulaire effectuées par King et ses collaborateurs ont permis de montrer que les cellules GLI1+ peuvent se différencier en cellules exprimant *Nr5a1* et contribuent au développement de tout le cortex (King, Paul, and Laufer 2009; Huang et al. 2010). Ces résultats étaient cependant en contradiction avec ceux du groupe de Morohashi suggérant que les cellules du cortex définitif provenaient des cellules du cortex fœtal. Si l'hypothèse d'un modèle mixte a été initialement considérée, les études de traçage subséquentes effectuées par Wood avec les souris FAdE-Cre discutées préalablement ont montré que certaines cellules du cortex fœtal se différenciaient en cellules GLI1+ de la capsule et que ce sont ces descendantes des cellules du cortex fœtal qui contribuent au développement du cortex définitif (Wood et al. 2013).

D'autres études portant sur la voie de la signalisation Hedgehog ont permis d'approfondir les connaissances sur le développement du cortex surrénalien. SHH (Sonic hedgehog) est exprimée dans le primordium adrénocortical murin à partir du jour E11.5 puis au jour E12.5, SHH est localisée à la périphérie du cortex, juste sous la capsule (King, Paul, and Laufer 2009; Laufer et al. 2012). L'inactivation de *Shh* entraîne une hypoplasie importante de la surrénale, une diminution de la prolifération et un amincissement de la capsule. Les études de traçage ont démontré qu'une sous-population de cellules SHH+ était dérivée des cellules GLI1+ (Wood et al. 2013) alors que des études de traçage des cellules SHH+ ont également montré que ces cellules contribuent au développement du cortex définitif. Il a été aussi démontré que l'expression de SHH est maintenue dans une sous-population de cellules sous capsulaire durant la gestation et à l'âge adulte (King, Paul, and

Laufer 2009) et que ces cellules correspondent à une population de cellules progénitrices importantes pour le maintien de la glande surrénale (Ching and Vilain 2009; Huang et al. 2010).

4.2.2. Modèle de migration « centripète »

Les études de traçage ont permis d'établir un modèle potentiel pour la mise en place et la zonation du cortex surrénalien définitif : le modèle de migration centripète. Ce modèle indique que les cellules GLI1+ de la capsule migrent vers l'intérieur et se différencient sous l'influence de divers signaux en cellules de la zone glomérulée en développement puis continuent à migrer et se différencient en cellules de la zone fasciculée avant de mourir par apoptose près de la médulla (Figure 1.4) (Finco, Lerario, and Hammer 2018; Chang et al. 2013; Freedman et al. 2013). Si ce modèle est généralement accepté, il est important de mentionner qu'il a principalement été extrapolé de l'étude de la régénération du cortex surrénalien chez l'adulte (Greep and Deane 1949; Kim and Hammer 2007; Pignatti et al. 2017; Finco, Lerario, and Hammer 2018). Ces modèles de régénération ont aussi permis d'identifier une population de cellules progénitrices SHH+ qui sont principalement responsables du maintien et du renouvellement de l'adrénocortex chez l'adulte (Finco, Lerario, and Hammer 2018; King, Paul, and Laufer 2009; Laufer et al. 2012). Ces études seront présentées dans la section portant sur le maintien et le renouvellement du cortex (section #A.4.3).

4.2.3. Zonation du cortex

Comme mentionné précédemment, le cortex surrénalien adulte chez la souris se subdivise en deux zones bien distinctes : la zG, importante pour la synthèse de minéralocorticoïdes, et la zF, importante pour synthèse de glucocorticoïdes. Chez la souris, la zonation du cortex est déjà bien visible au jour E17.5 et ce, tant d'un point de vue histologique que moléculaire (Figure 1.3).

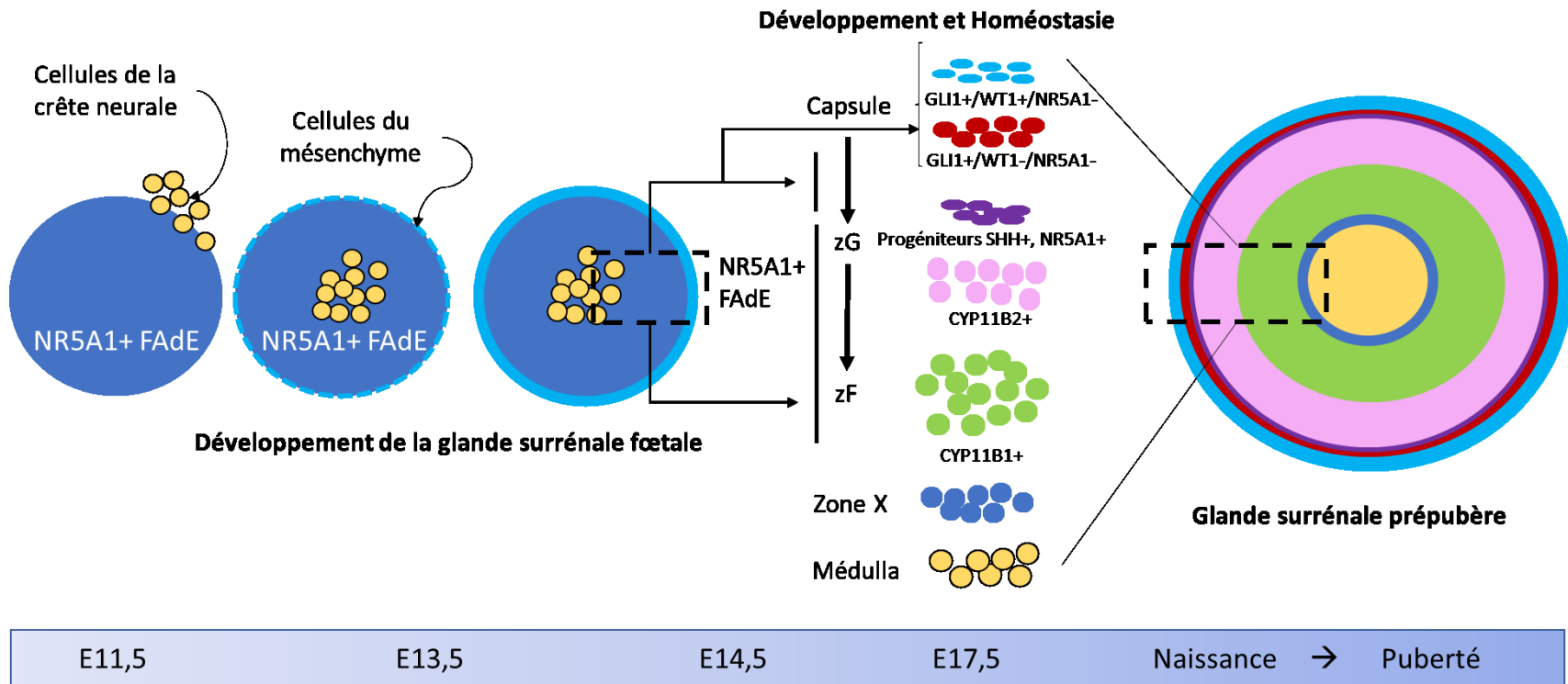


Figure 1.3. Développement embryonnaire de la glande surrénale chez la souris à partir du primordium adrénocortical
 Développement de la glande surrénale après la séparation du primordium adrénocortical et du primordium gonadique. Chez la souris, entre les jours E11.5 et E12.5, les cellules de la crête neurale colonisent le primordium adrénocortical et migrent en son centre afin de former la médulla. Durant les jours E13.5 et E14.5, les cellules mésenchymateuses GLI1+/WT1+ entourant le primordium se condensent pour former la capsule. Certaines cellules *Nr5a1*+ FAdE migrent également vers la capsule où elles forment une population de cellules GLI1+/NR5A1- qui se différencieront afin de générer à la fois des cellules progénitrices SHH+ et des cellules du cortex exprimant à nouveau NR5A1. La différenciation successive des cellules du cortex pendant leur migration centripète donne naissance aux cellules de la zone glomérulée (CYP11B2+) puis de la zone fasciculée (CYP11B1+). Les cellules composant la médulla évoluent en parallèle des cellules du cortex afin de devenir des cellules chromaffines exprimant des marqueurs spécifiques. Modifiée de (Bandiera et al. 2015; Xing et al. 2015)

4.2.3.1. Zonation de la zone glomérulée

La voie de signalisation WNT/CTNNB1 est une des voies les plus importantes pour la régulation de la prolifération des cellules de la zG ainsi que pour le maintien de son identité (Drelon et al. 2015; Berthon et al. 2010).

CTNNB1 et ses coactivateurs transcriptionnels *Tcf/Lef* (T cell-specific/lymphoid enhancer-binding factor) ont une activité qui est détectée dans la zG dans un grand nombre de cellules CYP11B2+ (CYP aldosterone synthase), mais également dans certaines cellules CYP11B2- (Walczak et al. 2014; Kim et al. 2008; Berthon et al. 2010). Au sein de la famille des WNTs, six ligands ont été détectés dans la glande surrénale (Drelon et al. 2015). WNT4 est retrouvée dans la zG chez l'adulte tandis que les autres WNTs détectées sont exprimées dans la surrénale fœtale au niveau de la zone capsulaire et sous capsulaire. L'inactivation de *Wnt4* entraîne une perte de l'expression de *Cyp11b2* (Heikkila et al. 2002). De plus, la protéine RSPO3, une protéine sécrétée impliquée dans l'activation de la voie WNT, est exprimée dans la capsule et agit sur ses cibles présentes dans la zG. Dans la surrénale, RSPO3 est impliquée dans la signalisation WNT/CTNNB1 et permet le maintien d'une bonne zonation tout au long de la vie adulte de l'individu (Vidal et al. 2016). Chez la souris, en cas de perte de *Rspo3*, qui conduit à une diminution de la voie WNT/CTNNB1, la prolifération cellulaire dans la zG est diminuée ce qui entraîne une diminution de la taille de la surrénale (Vidal et al. 2016). Au contraire, lorsque CTNNB1 est activée de façon constitutive dans le cortex, la prolifération cellulaire est stimulée (Berthon et al. 2010). De plus, dans ce modèle, une expression de *Cyp11b2* ectopique est détectée dans la zF et les souris présentent une hypersécrétion d'aldostérone (Berthon et al. 2010). L'activation de la voie WNT/CTNNB1 régule l'activité stéroïdogénique des cellules de la zG suite à la liaison de la CTNNB1 sur la séquence enhancer du récepteur à l'angiotensine II (AT1R : Angiotensin II receptor, type 1) afin d'induire son expression et indirectement activer la transcription de *Cyp11b2* grâce à l'interaction avec les régulateurs transcriptionnels NUR77 et NURR1 (respectivement NR4A1 et NR4A2 : Nuclear receptor subfamily 4, groupe A, member 1 ou 2) (Berthon et al. 2014). La voie WNT/CTNNB1 permet donc à la zG de développer son identité grâce à la régulation positive de la transcription de *Nr4a1* et *Nr4a2* qui sont exprimés spécifiquement dans la zG dans la glande surrénale. De plus, il a été rapporté que cette voie est capable d'agir également

comme un antagoniste de l'identité de la zF. Dans la lignée cellulaire ATC7-L (cellule tumorale adrénocorticale), reproduisant les cellules de la zone fasciculée, l'activation de CTNNB1 entraîne une réduction de la transcription de *Cyp11b1* et du récepteur *Mc2r* (Melanocortin Type 2 Receptor), deux marqueurs de la zF (Walczak et al. 2014). *In vivo*, dans le modèle murin d'activation constitutive de CTNNB1, la transcription de *Cyp11b1* est également diminuée, ainsi que celle d'un autre marqueur de la zF : *Akr1b7* (Aldo keto reductase 1b7) (Berthon et al. 2010).

Dans la zone glomérulée, la voie de signalisation canonique WNT/CTNNB1 joue un rôle essentiel dans la construction et la régulation de la stéroïdogénèse afin de maintenir l'identité de la zG et empêcher l'identité de la zone fasciculée de se mettre en place. Étant donné le renouvellement du cortex par migration centripète des cellules depuis la zG, un mécanisme d'inhibition de la voie WNT/CTNNB1 doit se mettre en place afin de promouvoir le renouvellement de la zone fasciculée.

Outre la voie WNT/CTNNB1, l'action de l'angiotensine II et la concentration de potassium plasmique (Gallo-Payet and Battista 2014) joue aussi un rôle pour la prolifération des cellules de la zG. En effet, il a été démontré que l'angiotensine II, en plus de réguler la transcription de *Cyp11b2* et la synthèse de l'aldostérone (Bollag 2014), augmentait la prolifération des cellules de la zG (Pawlikowski et al. 2001) alors qu'une diète faible en sodium ou riche en potassium avait le même effet (Shelton and Jones 1971; Deane, Shaw, and Greep 1948; Nishimoto et al. 2014; McEwan, Vinson, and Kenyon 1999).

4.2.3.2. Zonation de la zone fasciculée

Contrairement à ce qui est observé pour la zG, la stéroïdogénèse et la prolifération cellulaire dans la zone fasciculée sont plutôt sous la dépendance de la voie de signalisation ACTH/AMPC/PKA. L'expression du récepteur à l'ACTH, *Mc2r*, et des protéines accessoires MRAP (MC2R accessory protein) sont sous le contrôle de l'ACTH qui amorce la signalisation (Xing et al. 2010). L'enzyme CYP11B1 qui catalyse la dernière étape de biosynthèse de la corticostérone est exprimée spécifiquement dans la zone fasciculée et son expression est dépendante de l'ACTH (Freedman et al. 2013). De plus, l'aldo-kéto réductase AKR1B7 est

également spécifique à la zF et constitue aussi une cible de la signalisation ACTH/AMPC (Aigueperse et al. 1999; Sahut-Barnola et al. 2010). Chez la souris, l'inactivation de *Mc2r* entraîne une réduction de la taille des glandes surrénales avec notamment une forte atrophie de la zF tandis que la zG ne présente pas d'anomalie histologique (Chida et al. 2007). Les expériences de traitement des souris avec la dexaméthasone, qui bloque la libération d'ACTH au niveau hypophysaire, conduit également à l'atrophie de la zF (Freedman et al. 2013; Thomas et al. 2004). Chez l'humain, des mutations dans les gènes codants pour MC2R ou les MRAPs sont associées à une insuffisance en glucocorticoïdes avec une atrophie de la zF tandis que la zG reste fonctionnelle (Clark and Weber 1998). Une étude récente menée par le groupe de Martinez et Val a mis en évidence qu'au cours de la migration centripète des cellules provenant de la zG, ces dernières s'affranchissent de la signalisation des WNTs (Drelon et al. 2016). Ceci induit une diminution de l'activation de CTNNB1, majoritairement due à la répression de l'expression de *Wnt4*, conduisant à l'arrêt de l'expression de *Tcf/Lef* lorsque ces cellules atteignent la zF (Drelon et al. 2016). L'inhibition de l'expression de *Mc2r* par les WNTs est donc levée ce qui permet l'activation de la PKA en réponse à une stimulation par l'ACTH. Il existe donc une régulation fine entre les voies de signalisation WNT et PKA afin d'assurer une bonne zonation (expression de marqueurs spécifiques à chaque zone) et le maintien de l'homéostasie du cortex (Drelon et al. 2016).

4.2.4. La zone X

Chez la souris, entre la zone fasciculée et la médulla se trouve la zone X. Cette zone correspond à un vestige du cortex fœtal qui va régresser à la puberté chez le mâle, mais persistera jusqu'à la première gestation chez la femelle. La fonction physiologique de cette zone n'est cependant pas encore établie (Hershkovitz et al. 2007; Zubair et al. 2006).

4.3. Maintien et renouvellement du cortex

Le cortex surrénalien est un tissu dynamique capable de réagir en fonction des besoins physiologiques de l'organisme. Le cortex peut moduler la taille de la zone fasciculée et

glomérulée en réponse au système rénine-angiotensine et à l'axe hypothalamo-hypophysaire grâce à son remodelage. À la suite d'une atteinte profonde, la glande surrénale peut se régénérer. Ce sont les populations de cellules souches et de cellules progénitrices qui sont mobilisées afin d'assurer l'homéostasie, le renouvellement et la zonation au sein du cortex surrénalien.

Les premières expériences mettant en évidence l'existence de cellules souches dans la surrénale ont été faites par énucléation de la surrénale. Cette technique consiste à faire une incision de la capsule puis de comprimer la glande surrénale afin d'expulser l'intérieur de la glande surrénale et de ne laisser que la partie capsulaire et sous-capsulaire. Chez le rat, 30 jours après énucléation, la formation d'un néocortex fonctionnel a pu être observée chez ces animaux, suggérant la présence de cellules souches dans la partie capsulaire/sous-capsulaire (Bland, Desclozeaux, and Ingraham 2003; Greep and Deane 1949). C'est à la suite de cette étude que le modèle de migration centripète a été suggéré pour la première fois.

Chez la souris, les expériences de traçage ont mis en évidence que les cellules GLI1+ contribuent au renouvellement du cortex en se différenciant en cellules stéroïdogéniques de la zG et de la zF (King, Paul, and Laufer 2009). Cette population de cellules souches capsulaires GLI1+ peut former des progéniteurs SHH+ ainsi que des cellules corticales qui formeront la zG (cellules NR5A1+/CYP11B2+) et la zF (cellules NR5A1+/CYP11B1+) (King, Paul, and Laufer 2009). Toujours dans cette même étude, le groupe de Laufer démontra qu'il existe deux populations sous-capsulaires de cellules NR5A1+/SHH+ dans l'adrénocortex embryonnaire n'exprimant pas *Cyp11b2* ou *Cyp11b1*. Toujours par des études de traçage, ils ont montré que ces populations de cellules sont capables de migrer de façon centripète au sein du cortex et de se différencier en cellules NR5A1+/CYP11B2+ de la zG et en cellules NR5A1+/CYP11B1+ de la zF (King, Paul, and Laufer 2009). Plus récemment, il a été démontré dans un modèle murin que les cellules exprimant *Shh* n'ont pas une capacité proliférative plus importante que les autres types cellulaires du cortex, mais sont capables de se renouveler afin de maintenir une réserve de cellules progénitrices (Finco, Lerario, and Hammer 2018; Walczak et al. 2014). Une autre étude de traçage a confirmé la transition des cellules du zG en cellules du zF et le modèle de migration centripète. Pour cette étude, l'expression de la GFP (Green Fluorescent Protein) a été mise sous le contrôle du promoteur de *Cyp11b2* afin de suivre le devenir des

cellules de la zG (Freedman et al. 2013). De jeunes souris adultes ont été traitées avec de la dexaméthasone (un glucocorticoïde de synthèse qui va entraîner une atrophie de la zF) puis le suivi de la régénération de la zF a été effectué (Freedman et al. 2013). Cette étude démontra clairement que les cellules GFP+ colonisaient la zF et étaient responsables de sa régénération (Freedman et al. 2013). Cependant, ce même groupe a démontré lors de la même étude que l'inactivation spécifique de *Nr5a1* dans les cellules de la zG n'empêchait pas le développement et maintien de la zF malgré l'absence de la zG (Freedman et al. 2013). Les auteurs de cette étude ont proposé différentes hypothèses permettant d'expliquer la formation de la zF dans cette condition particulière d'absence de zG. Il a été proposé que si la migration centripète était normalement favorisée, il était possible qu'une population de cellules souches et/ou progénitrices pouvait se différencier directement en cellules de la zF sans passer par le stade de cellule de la zG. Il a été aussi proposé qu'il pouvait exister une population de cellules progénitrices dans la zone X et que cette population pourrait reformer une zF à la suite de la perte de la zG induite par la délétion spécifique de *Nr5a1* (Freedman et al. 2013). Chez des souris mâles adultes où une gonadectomie a été pratiquée (Hershkovitz et al. 2007) ou lors de la délétion spécifique dans le cortex du gène *Prkar1a* (Protein kinase, cAMP dependent regulatory, type I, alpha) (Sahut-Barnola et al. 2010), une prolifération des cellules de la zone X a été observée, suggérant la présence éventuelle de cellules progénitrices dans cette zone.

Malgré ces études, certains doutes persistaient sur la contribution réelle de la population de cellules progénitrices au maintien de la glande surrénale alors qu'il était possible que l'action des cellules SHH+ soit seulement indirecte via la perte du signal GLI+ dans les cellules souches. Une étude plus récente de traçage a permis de raffiner le modèle de zonation/maintien/renouvellement du cortex surrénalien et de confirmer le rôle des cellules progénitrices dans ce processus par l'utilisation de modèles de souris exprimant des gènes rapporteurs sous le contrôle de promoteurs inductibles de *Gli* et *Shh* (Finco, Lerario, and Hammer 2018). Cette étude a permis de démontrer que les cellules SHH+ étaient responsables du maintien de l'homéostasie de l'adrénocortex dans les glandes surrénales. Cependant, les cellules GLI+ jouent un rôle dans la régénération de l'adrénocortex à la suite d'un traitement à la dexaméthasone. En fait, les cellules GLI+ contribuent à la régénération précoce de la glande surrénale (mais les cellules dérivées de cette population de cellules ne sont pas maintenues à

plus long terme) tandis que les cellules SHH+ assurent le renouvellement à plus long terme de l'adrénocortex (Finco, Lerario, and Hammer 2018) (Figure 1.4).

La voie WNT/CTNNB1 est également importante dans le contrôle de la différenciation des progéniteurs surrenaliens. Dans la surrenale adulte, CTNNB1 est colocalisée avec SHH (Walczak et al. 2014). Comme vu précédemment, chez la souris présentant une perte partielle de CTNNB1 dans les cellules NR5A1+, une diminution de la taille du cortex est constatée, ce qui suggère un défaut dans le renouvellement du cortex (Kim et al. 2008). Le rôle de la voie des WNTs dans l'homéostasie du cortex a été montré par des études de traçage qui ont révélé que les cellules AXIN2+ (cellules répondant à la signalisation déclenchée par la voie des WNTs) de la zG peuvent donner des cellules différenciées CYP11B2+ de la zG. Ces cellules migrent ensuite de façon centripète pour intégrer les cellules de la zF et exprimer *Cyp11b1* (Finco, Lerario, and Hammer 2018). Tout comme les cellules SHH+, les cellules AXIN2+ contribuent également à la régénération de la zF à la suite d'un traitement à la dexaméthasone. De plus, l'inactivation de CTNNB1 dans les cellules AXIN2+ entraîne un dérèglement de la régénération et des défauts d'organisation à la fois dans la zG et la zF (Finco, Lerario, and Hammer 2018).

Il a été suggéré que d'autres facteurs incluant GATA6 et NR0B1 pouvaient être impliqués dans les processus de maintien et renouvellement de l'adrénocortex, mais aucune étude de traçage n'a été effectuée pour ces facteurs. Chez l'adulte, le facteur de transcription GATA6 est exprimé dans les cellules capsulaires et sous-capsulaires et a la capacité d'inhiber la transcription de *Shh* et *Gli1* dans le cortex (Pihlajoki et al. 2013). Dans un modèle murin de délétion conditionnelle de *Gata6* dans les cellules exprimant *Nr5a1*, les animaux développent de nombreux problèmes au niveau de la surrenale (cytomégalie, cellules chromaffines dans le cortex, amincissement du cortex, etc.) ainsi que l'expression de marqueurs gonadiques (Pihlajoki et al. 2013). De plus, les souris *Gata6*^{flox/flox}; *Nr5a1*^{cre} présentent une zonation adrénocorticale aberrante avec des femelles ne développant pas de zone X et des mâles ne développant pas de nouvelle zone X après orchidectomie (Pihlajoki et al. 2013). Quand *Gata4* et *Gata6* sont inactivés dans les cellules NR5A1+, une hypoplasie de la surrenale est observée chez le mâle comme chez la femelle. Cependant les femelles meurent avant l'âge du sevrage d'insuffisance surrenalienne tandis que les mâles survivent grâce à la production ectopique de

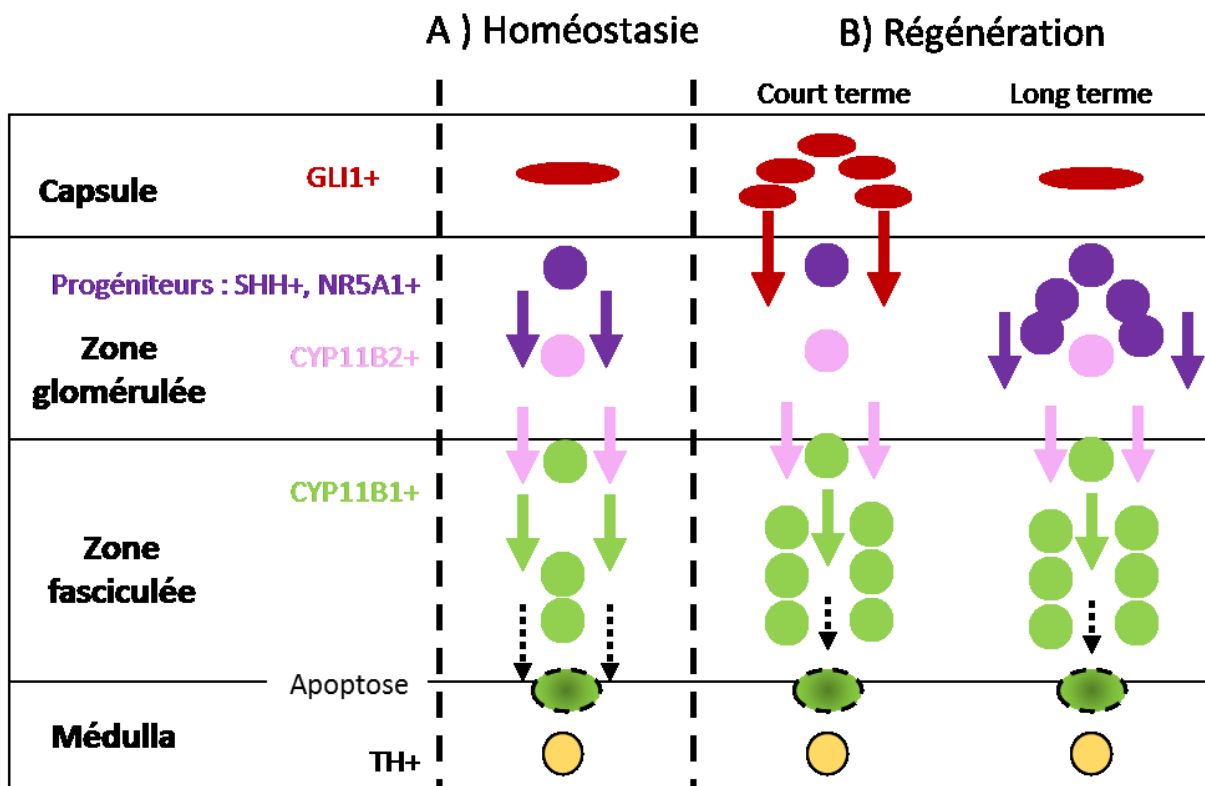


Figure 1.4. Maintien de l'homéostasie du cortex surrénalien chez l'adulte.

Modèle décrivant le développement des cellules du cortex afin de maintenir l'homéostasie du cortex chez l'adulte en condition physiologique (panneau A) et lors de la régénération (panneau B). En condition physiologique, ce sont les progéniteurs (SHH+/NR5A1+) situés dans la zone sous capsulaire qui migrent de façon centripète et se différencient progressivement afin de donner les cellules CYP11B2+ puis CYP11B1+ avant d'entrer en apoptose à la jonction zF/médulla. La régénération à court terme fait appel aux cellules souches de la zone capsulaire qui se différencient en cellules stéroïdogéniques qui ne seront cependant pas conservées pour une longue période. La régénération à long terme se fait principalement suite à la prolifération des cellules progénitrices et à leur migration/différenciation. Les flèches indiquent la migration centripète des cellules et la couleur fait référence à la cellule d'origine. Modifiée de (Finco, Lerario, and Hammer 2018).

glucocorticoïdes au niveau du testicule par des cellules s'étant différenciées et exprimant les marqueurs adrénocorticaux (Padua et al. 2014; Padua et al. 2015).

Enfin, NR0B1, tout comme les protéines décrites précédemment, est exprimée dans la région sous-capsulaire de l'adrénocortex (Kim and Hammer 2007). Son rôle dans le contrôle de l'expression de *Nr5a1* (Xing et al. 2017; Vilain et al. 1997) suggère également que NR0B1 pourrait être impliquée dans le recrutement des cellules souches ou le contrôle de la différenciation des cellules progénitrices. L'ACTH et les glucocorticoïdes pourraient également être impliqués dans ce processus puisque l'expression de *Nr0b1* est inhibée par l'ACTH et activée par les glucocorticoïdes (Gummow et al. 2006; Ragazzon et al. 2006). Enfin, une dégénérescence progressive de la glande surrénale est également observée chez les souris *Nr0b1*^{-Y} (Scheys, Heaton, and Hammer 2011).

B. Stéroïdogénèse surrénalienne et testiculaire

1. Le cholestérol, précurseur de la stéroïdogénèse

Les stéroïdes du cortex surrénalien et des cellules de Leydig sont issus d'un précurseur commun qui est le cholestérol. Le cholestérol sera transformé par différentes enzymes, dont certaines sont spécifiques à un type cellulaire, afin de générer des hormones stéroïdiennes.

1.1. Le cholestérol comme substrat

Le cholestérol utilisé dans la stéroïdogénèse surrénalienne est principalement issu des lipoprotéines, sous forme d'esters de cholestérol, tandis que dans les cellules de Leydig, la synthèse *de novo* du cholestérol au sein de la cellule sera privilégiée (Gwynne and Hess 1980; Gwynne et al. 1984; Gwynne and Strauss 1982; Rainey and Nakamura 2008; Brown and Goldstein 1986). En revanche, en cas de besoin accru en stéroïdes, il pourra y avoir synthèse *de novo* dans le cortex surrénalien à partir d'acétate qui va être converti en mévalonate puis en cholestérol après de nombreuses réactions enzymatiques (Rainey and Nakamura 2008; Toth et al. 1990). Dans les cellules de Leydig, les études menées dans les années 70-80 mettaient en avant que les gouttelettes lipidiques, contenant du cholestérol estérifié, sont la source de cholestérol en cas de besoin accru en stéroïdes (Aoki and Massa 1975; Gwynne and Strauss 1982; Hou, Collins, and Schleicher 1990). Cependant, des études plus récentes remettent en question leur implication étant donné la cinétique de ce processus qui fait intervenir des enzymes afin d'enlever le groupement ester sur le cholestérol (Porpaczy, Tomasek, and Freeman 1997; Venugopal et al. 2016). Ainsi, la source de cholestérol libre privilégiée qui est rapidement mobilisable pour répondre à un besoin accru dans la production de stéroïdes proviendrait de la membrane plasmique (Venugopal et al. 2016).

Dans le cortex surrénalien, le cholestérol provient des lipoprotéines à faible densité (LDL) ou à haute densité (HDL), qui permettent son transport dans le plasma, et dans lesquelles il est présent sous forme estérifiée (Gwynne and Strauss 1982). Les rongeurs utilisent les HDLs comme principale source de cholestérol tandis que chez l'humain, les LDLs sont privilégiés (Gwynne and Hess 1980; Liu et al. 2000). Les HDLs et LDLs sont captées au

niveau de la membrane plasmique des cellules. Les HDLs sont pris en charge par le récepteur SR-B1 (Scavenger receptor class B type 1) pour permettre l'incorporation du cholestérol dans la cellule (Acton et al. 1994). Ce récepteur a également la capacité d'interagir avec les LDLs dans les tissus stéroïdogéniques (Swarnakar et al. 1999). Le récepteur aux LDLs permet d'internaliser les LDLs par endocytose afin que le cholestérol estérifié soit stocké sous forme de gouttelettes lipidiques, ou bien hydrolysé dans des lysosomes puis libéré dans la cellule pour rejoindre la mitochondrie. Les récepteurs aux LDLs, seront quant à eux recyclés (Brown and Goldstein 1986; Paavola et al. 1985).

1.2. Transfert du cholestérol à la mitochondrie

Une fois le cholestérol libre dans la cellule, celui-ci va rejoindre la membrane externe de la mitochondrie puis être transféré dans la membrane interne afin d'être clivé et enclencher les étapes de la stéroïdogénèse. Ce transfert est assuré par un complexe protéique, le transduceosome, composé notamment par la protéine STAR et TSPO. L'entrée du cholestérol dans la mitochondrie constitue l'étape limitante de la stéroïdogénèse (Hauet et al. 2002). La protéine STAR va subir une série de maturations (clivages) avant de devenir mature. Par la suite, STAR sera phosphorylée par la PKA en réponse à une stimulation par les hormones trophiques (LH, ACTH). Ces deux événements permettent d'avoir une protéine mature et fonctionnelle sur la membrane externe de la mitochondrie afin d'assurer le transport du cholestérol (Arakane et al. 1997; Stocco 2001). L'utilisation de modèles murins d'inactivation de *Star* a mis en évidence l'importance de STAR dans la synthèse des stéroïdes. Ces animaux développent une déficience en glucocorticoïdes ainsi qu'une désorganisation de la surrénale accompagnée d'une accumulation de lipides et d'une réversion sexuelle chez les animaux génétiquement XY (Caron et al. 1997; Hasegawa et al. 2000). Un phénotype similaire est observé chez les patients souffrant d'hyperplasie congénitale lipoïde, dans laquelle des mutations du gène *STAR* sont fréquemment retrouvées (Bose et al. 1996).

TSPO est localisée dans la membrane mitochondriale externe et est exprimée dans les cellules stéroïdogéniques et est activée par son ligand DBI (Diazepam-binding inhibitor) qui permet de stimuler son activité dans le transduceosome. TSPO est capable d'interagir avec une

protéine associée à la sous unité régulatrice RI α de la PKA (Liu, Li, and Papadopoulos 2003). Ce rapprochement de TSPO avec la PKA entraine sa phosphorylation ainsi que celle de STAR (Hauet et al. 2002).

Dans un modèle *in vivo* d'inactivation de TSPO à l'aide d'un inhibiteur pharmacologique (GKB), il a été montré que les rats traités présentaient une baisse des niveaux circulants de glucocorticoïdes et de progestérone, mettant en évidence le rôle de TSPO dans la stéroïdogénèse (Papadopoulos et al. 1998). À l'aide de la technologie Cre/loxP, l'inactivation de *Tspo* dans les cellules de Leydig n'a cependant révélé aucun effet sur la production de testostérone et le développement testiculaire (Morohaku et al. 2014). Cependant, des chercheurs ayant voulu reproduire cette expérience avec ce même modèle des souris ne sont pas parvenus à reproduire ces résultats à la suite du décès des souris durant l'embryogenèse, mettant en avant le rôle de TSPO dans le développement (Fan et al. 2015). La création d'un modèle *Nr5a1^{cre}/Tspo^{flox/flox}* a cependant mis en évidence le rôle de TSPO dans la biosynthèse des stéroïdes surrénaliens en réponse à l'ACTH. Cependant, dans les cellules somatiques du testicule la délétion de *Tspo* n'a pas entraîné de changement phénotypique, sans doute lié à un mécanisme compensatoire permettant de maintenir la stéroïdogénèse (Fan et al. 2015). Des études récentes utilisant la technologie CRISPR/Cas9 afin d'inactiver *Tspo* dans la lignée de cellules de Leydig MA-10 a également conduit à des résultats inverses. L'étude du groupe de Selvaraj suggère que TSPO n'est pas nécessaire dans la stéroïdogénèse étant donné que les cellules produisent de la progestérone en réponse à une stimulation mimant l'action de la LH (Tu et al. 2015). Tandis que l'étude du groupe de Papadopoulos montre qu'en l'absence de TSPO, les cellules MA-10 produisent très peu de progestérone malgré une induction de la stéroïdogénèse, mettant ainsi en évidence l'importance de TSPO dans la biosynthèse des stéroïdes (Fan et al. 2018). Les études portant sur le rôle de TSPO sont contradictoires, d'où l'importance de continuer les recherches sur cet élément du transduceosome (revue dans (Papadopoulos, Fan, and Zirkin 2018)).

2. Synthèse des stéroïdes surrénaliens et testiculaires

2.1. Voie commune

Une fois au niveau de la membrane interne de la mitochondrie, le cholestérol est transformé en prégnénolone et isocaproaldéhyde par l'enzyme P450SCC (Cholesterol Side chain clivage, codée par le gène *Cyp11a1* (Cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1) (Miller and Auchus 2011). L'isocaproaldéhyde est un aldéhyde toxique pour la cellule et doit donc être inactivé afin de préserver l'intégrité de celle-ci. Les enzymes de la famille des aldoses réductases ou de la famille des aldéhydes déshydrogénases vont respectivement le convertir en un dérivé alcoolique ou acide afin de le rendre inoffensif (Lefrancois-Martinez et al. 1999; Matsuura et al. 1996). Dans la glande surrénale, différents membres de la famille des aldoses réductases sont présents, mais c'est principalement l'aldose réductase AKR1B7 (Aldo keto reductase 1b7), exprimée dans le cortex, qui réduit l'isocaproaldéhyde (Aigueperse et al. 1999; Pastel et al. 2016). Dans les cellules de Leydig, *Akr1b7* est également exprimée (Baron et al. 2003). Dans les deux cas, des études *in vitro* sur des lignées cellulaires murines, les cellules corticosurréaliennes (Y1) ou les cellules de Leydig (MA-10), ont montré que l'expression de *Akr1b7* est régulée par la voie AMPc/PKA après une stimulation l'ACTH ou la LH, respectivement (Baron et al. 2003; Aigueperse et al. 1999) (Figure 1.5).

Ces produits du cholestérol vont sortir de la mitochondrie de façon passive puis la prégnénolone va être convertie en progestérone par l'enzyme 3 β HSD (3 β -hydroxysteroid dehydrogenase) dans le réticulum endoplasmique. Par la suite, c'est l'expression enzymatique spécifique des cellules qui orientera une production stéroïdienne spécifique à l'organe.

2.2. Spécificité des cellules de Leydig

Au sein du réticulum endoplasmique des cellules de Leydig, la production de testostérone peut emprunter deux voies différentes. La voie Δ^4 , la plus utilisée chez les rongeurs, débute par la conversion de la prégnénolone en progestérone par 3 β HSD. La progestérone est ensuite métabolisée par CYP17A1 en 17 α -hydroxyprogestérone (activité

hydroxylase de l'enzyme), puis en androstènedione (activité lyase) puis l'enzyme HSD17B permet de générer de la testostérone. La deuxième voie Δ^5 , préférentiellement utilisée chez l'Homme, débute par la conversion de la prégnénolone en 17α -hydroxyprégnénolone grâce à l'activité hydroxylase de CYP17A1, puis son activité lyase permet la formation de DHEA. Le DHEA peut soit être transformé par la 3β HSD en androstènedione pour rejoindre la voie Δ^4 , ou bien sous l'action de la HSD17B former de l'androstènediol qui sera transformé en testostérone par la 3β HSD. C'est l'enzyme 3β HSD qui va permettre le passage de la voie Δ^4 à Δ^5 . La préférence pour l'une de ces voies varie en fonction des espèces du fait de la différence des niveaux d'expression de 3β HSD et de l'activité hydroxylase et lyase de CYP17A1 (Hammar and Petersson 1986; Labrie et al. 1997; Lachance et al. 1990) (Figure 1.5).

2.3. Spécificité de la glande surrénale

À la suite de la diffusion de la progestérone de la mitochondrie vers le réticulum endoplasmique, celle-ci est hydroxylée par l'enzyme CYP21A2 (P450 21-hydroxylase) pour former du désoxycorticostérone. Cette réaction est commune aux différentes zones du cortex surrénalien. Dans la zone glomérulée, l'aldostérone synthase/CYP11B2 permet la formation d'aldostérone et dans la zone fasciculée l'enzyme 11β hydroxylase/CYP11B1 forme la corticostérone (chez la souris) ou le cortisol (chez l'humain), à partir du désoxycorticostérone. La différence entre ces deux groupes vient de l'expression de CYP17A1 dans le cortex surrénalien chez l'humain contrairement à la souris (Keeney, Jenkins, and Waterman 1995). Cette enzyme possède deux activités : hydroxylase et lyase. Dans la zF c'est l'activité hydroxylase qui est requise pour la production de cortisol tandis que dans la zone réticulée, l'activité lyase est favorisée (grâce à l'action du cytochrome b5 exprimé dans la zR) afin de générer du DHEA à partir de 17 hydroxy-prégnénolone. Le DHEA peut ensuite être sulfaté par SULT2A1 (Sulfotransferase family cytosolic 2A DHEA-preferring member 1) pour générer du DHEA-S (Miller and Auchus 2011) (Figure 1.5).

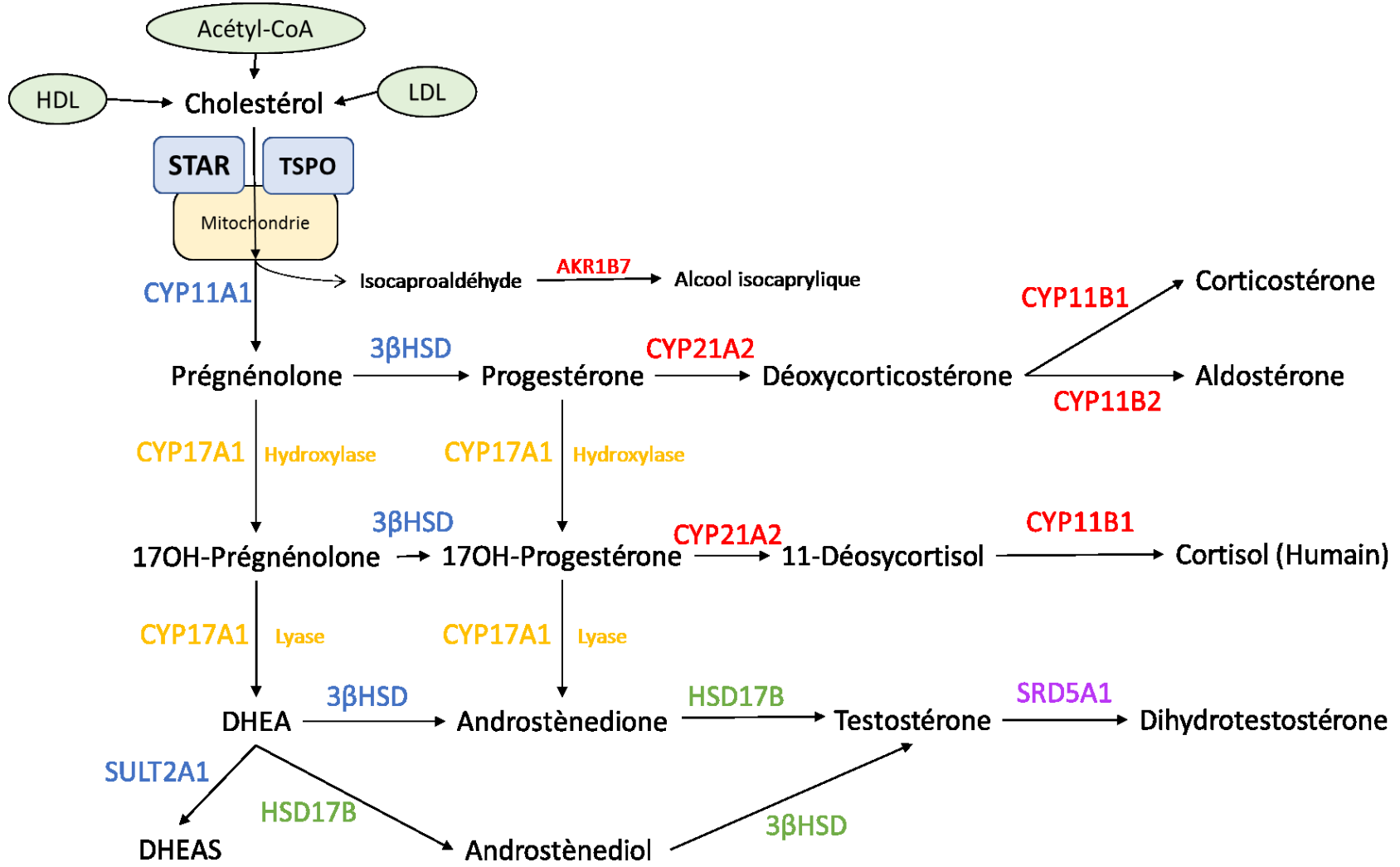


Figure 1.5. Stéroïdogénèse dans les cellules de Leydig et du cortex surrénalien

Production des hormones stéroïdiennes dans les cellules de Leydig et les cellules du cortex surrénalien à partir du cholestérol. Dans les cellules de Leydig, la formation *de novo* de cholestérol à partir de l'acétyl-CoA est privilégiée tandis que dans le cortex surrénalien, le cholestérol est apporté essentiellement par les lipoprotéines (HDL, LDL). Le cholestérol pénètre dans la mitochondrie grâce aux protéines STAR (et TSPO) pour y être clivé en prégnénolone par l'enzyme CYP11A1. La suite de la stéroïdogénèse va dépendre de la capacité des cellules à exprimer certaines enzymes ainsi que de leur niveau d'expression. Dans les cellules de Leydig, la finalité est la production de testostérone grâce à l'expression de HSD17B en forte quantité. La testostérone peut ensuite être transformée en dihydrotestostérone dans les tissus périphériques par SRD5A1. Dans les cellules de la zone glomérulée, le produit final de la stéroïdogénèse est l'aldostérone grâce à l'expression de CYP11B2. Dans les cellules de la zone fasciculée, l'expression de CYP11B1 permet de générer la corticostérone chez la souris ou le cortisol chez l'humain. Cette différence inter-espèce s'explique par l'absence de l'expression de CYP17A1 dans le cortex surrénalien chez la souris. Chez l'Homme, l'activité hydroxylase de CYP17A1 permet la synthèse de cortisol dans la zone fasciculée tandis que dans la zone réticulée, l'activité lyase de CYP17A1 permet la formation des androgènes. Les enzymes communes aux cellules de Leydig et aux cellules surrénaliennes sont écrites en bleu, celles qui sont plus spécifiques aux cellules de Leydig sont en vert et celles rattachées à la stéroïdogénèse surrénalienne sont en rouge. CYP17A1 (en orange) est commune aux cellules de Leydig et à la glande surrénale chez l'humain. En violet, SRD5A1, est exprimé dans les tissus périphériques (épididyme, prostate, etc.)

3. Régulation de la production des stéroïdes

3.1. Au niveau central

3.1.1. L'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique

L'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique permet le contrôle de la production hormonale chez le mâle et il est soumis à un rétrocontrôle hormonal par les androgènes testiculaires. L'hypothalamus sécrète de façon pulsatile la GnRH afin de stimuler la production de FSH et de LH dans l'adénohypophyse. (Shacham et al. 2001). Une fois libérées dans la circulation systémique, la LH se fixe sur son récepteur dans les cellules de Leydig afin de stimuler la production de testostérone (McFarland et al. 1989) et la FSH agit au niveau des cellules de Sertoli afin d'induire la sécrétion de protéines qui ont également un rôle dans la régulation de la stéroïdogénèse telles que l'inhibine, l'activine ou bien l'ABP (Androgen binding protein) (Smith and Walker 2015).

L'interaction de la LH avec son récepteur LHCGR conduit à l'activation de l'adénylate cyclase (AC) et induit la conversion de l'ATP (Adénosine triphosphate) en AMPc. L'AMPc permet l'activation de différentes kinases, telles que PKA, CAMK (Calmodulin kinase) et MAPK (Mitogen-activated protein kinase) dont les voies seront décrites dans les sections suivantes (Martin et al. 2009). La LH déclenche une réaction aiguë qui entraîne une augmentation de l'apport de cholestérol dans la cellule avec une augmentation de l'expression de *Star* et de sa phosphorylation par la PKA et la CAMK (Manna et al. 2002). La réponse chronique repose sur l'augmentation de la transcription des gènes codant les enzymes de la stéroïdogénèse grâce à l'activation de différents facteurs de transcription qui auront été nouvellement synthétisés, et notamment l'activation de la transcription de *Nr4a1* qui agit comme un puissant médiateur de la stéroïdogénèse (Martin et al. 2008; Keeney and Mason 1992; Payne 1990).

Un rétrocontrôle négatif de la sécrétion des hormones hypothalamo-hypophysaires s'opère par la testostérone et l'inhibine, tandis que l'activine stimule la synthèse de FSH (Shacham et al. 2001; Gregory and Kaiser 2004).

3.1.2. L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien

La stimulation de l'hypothalamus entraîne la sécrétion de CRH (Corticotrophin-Releasing Hormone) et d'AVP (Arginine vasopressin) dans la circulation porte-hypophysaire. La CRH, en synergie avec l'AVP, régule la sécrétion d'ACTH dans l'hypophyse (revue dans (Yates et al. 2013)). L'ACTH provient du clivage de la proopiomelanocortine (POMC) au niveau de l'hypophyse (Karpac, Kern, and Hochgeschwender 2007; Pritchard and White 2007) et l'interaction de l'ACTH sur son récepteur MC2R active la voie AMPc/PKA, ce qui entrainera la transcription des gènes impliqués dans la stéroïdogénèse, et notamment *Star* et *Cyp11a1* afin de générer de la corticostérone chez la souris ou du cortisol chez l'Homme (Sewer, Dammer, and Jagarlapudi 2007). Les glucocorticoïdes exercent un rétrocontrôle négatif sur leur propre production en inhibant la sécrétion de CRH et d'AVP au niveau hypothalamique et le clivage de POMC au niveau hypophysaire, ce qui induit une diminution de la production d'ACTH (de Kloet 1995). L'ACTH déclenche une réaction aiguë (Miller 1995; Olfe et al. 2010; Arakane et al. 1997) et chronique (Miller 1995) qui se traduit par des mécanismes similaires à ceux présentés dans le cas de la réponse induite par la LH.

3.2. Voies de signalisation activées par la LH et L'ACTH

3.2.1. Voie AMPc/PKA

L'AMPc est un second messager impliqué dans la régulation de nombreuses voies de signalisation qui est capable d'activer de nombreuses protéines. Étant donné la diversité d'action de l'AMPc, cette section se concentrera seulement sur la voie AMPc/PKA, qui représente la principale voie d'activation de la stéroïdogénèse dans les cellules de Leydig (revue dans (Smith and Walker 2015)). À titre d'exemple, d'autres protéines peuvent être activées par l'AMPc telles que EPAC (Exchange protein activated by cAMP) (revue dans (Roscioni, Elzinga, and Schmidt 2008)), PKG (Protéine kinase G) (VanSchouwen et al. 2015) ou bien CAMK (Gambaryan et al. 2006)

Dans les cellules de Leydig, la LH se fixe sur son récepteur LHCGR et dans les cellules du cortex surrénalien, l'ACTH va se fixer sur son récepteur MC2R. Ces récepteurs

appartiennent à la famille des RCPGs et la fixation de leur ligand respectif conduit à l'activation de la protéine G α s qui leur est associée afin d'activer l'adénylate cyclase (AC) et induire la conversion de l'ATP en AMPc. La fixation de l'AMPc sur les sous-unités régulatrices de la PKA entraîne un changement de la conformation de la PKA permettant la libération des sous-unités catalytiques qui ont la capacité de phosphoryler des protéines cibles sur leurs résidus sérine et/ou thréonine (Novoselova et al. 2013). La PKA est composée de deux sous-unités régulatrices et deux sous-unités catalytiques qui comprennent chacune quatre isoformes différentes (Tasken and Aandahl 2004). Les sous-unités régulatrices présentent des affinités différentes à l'AMPc, ce qui permet une régulation de la signalisation. De plus, les multiples combinaisons entre sous-unités régulatrices et catalytiques permettent une diversité et une spécificité d'action de la PKA dans les différents types cellulaires (Tasken and Aandahl 2004). La PKA phosphoryle et active différents facteurs de transcription tels GATA4 (Tremblay and Viger 2003) et CREB (Hansson, Skalhegg, and Tasken 2000) dans le but de stimuler la stéroïdogénèse. La phosphorylation de CREB sur sa sérine 133 entraîne son activation et permet sa fixation sur l'élément CRE pour ensuite recruter CBP (CREB (cAMP responsive element-binding protein) afin d'activer des gènes cibles impliqués dans la stéroïdogénèse (Manna et al. 2003). *Star* est une des cibles de CREB et au niveau du promoteur proximal de *Star*, de nombreux sites de liaison sont présents afin de répondre à différents facteurs de transcription (Manna et al. 2003). C'est le cas de NR5A1 qui peut se lier sur la région promotrice de *Star* et entraîner le recrutement de CREB. De plus, le facteur de transcription SP1 (Specificity Protein 1) peut interagir avec NR5A1 pour augmenter l'activité du promoteur de *Star* (Sugawara, Saito, and Fujimoto 2000). Dans la glande surrénale, il a été rapporté que SP1 participe également à la régulation de l'expression des gènes *Akr1b7* et *Cyp11a1*, en réponse à l'AMPc à la suite de sa fixation sur leur promoteur (Aigueperse et al. 2001; Guo, Tsai, and Chung 1994)

Différents systèmes de contrôle de la voie AMPc/PKA permettent de réguler la signalisation afin de ne pas avoir une surproduction d'hormones stéroïdiennes. Les phosphodiesterases (PDE) permettent d'inactiver l'action de l'AMPc directement au sein de la cellule. Les PDEs sont phosphorylées par des kinases dépendantes de l'AMPc, dont la PKA, ce qui induit leur activation. Une fois activées, les PDEs convertissent l'AMPc en AMP

permettant de diminuer la quantité d'AMPc disponible dans la cellule et ainsi d'inhiber la voie PKA et les autres voies activées par l'AMPc (Moorthy, Gao, and Anand 2011; Tasken and Aandahl 2004). Les PDEs sont présentes sous différentes isoformes dont certaines sont spécifiques à un type cellulaire tandis que d'autres, comme les PDE8, sont ubiquitaires dans les cellules stéroïdogéniques (Tsai and Beavo 2011). Dans un modèle de souris KO pour PDE8A, une augmentation de la production de testostérone associée à une hausse de l'expression de *Star* a été démontrée (Vasta, Shimizu-Albergine, and Beavo 2006). Le même groupe de chercheurs a montré que l'inactivation de PDE8B induit une augmentation de la production de corticostérone par les cellules de la zone fasciculée (Tsai, Shimizu-Albergine, and Beavo 2011). L'augmentation des niveaux d'AMP dans la cellule à la suite de l'action des PDEs entraîne l'activation de la kinase AMPK (AMP-activated kinase) (Revue dans (Hardie, Ross, and Hawley 2012). Cette kinase a la capacité d'induire une diminution de la stéroïdogénèse, à la fois en diminuant l'expression de *Star* et *Nr4a1* et en augmentant l'expression de *cFos* (FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog) et *Nr0b1* (Abdou, Bergeron, and Tremblay 2014). Des phosphatases (PP) permettent également de diminuer la signalisation en déphosphorylant les protéines activées par la PKA. La stimulation de la production de l'AMPc inhibe la PP-IIA, cependant l'activité de la PP-I ne sera pas modifiée (Poderoso et al. 2002). La PP-I pourra donc déphosphoryler CREB sur sa sérine 133, bloquant alors son activité pour engager la transcription de gènes impliqués dans la stéroïdogénèse (Hagiwara et al. 1992). De plus, les protéines d'ancrage AKAP (A-kinase anchoring protein) ont un double rôle dans le contrôle de l'activité de la voie PKA. Ces protéines peuvent interagir avec les sous-unités catalytiques de la PKA et modifier la localisation intracellulaire de la PKA la rendant ainsi moins disponible. Les AKAPs peuvent également interagir avec des PDEs ce qui entraîne l'inactivation des sous-unités régulatrices de la PKA (Tasken and Aandahl 2004; Wong and Scott 2004).

Dans les cellules de Leydig, il a été montré que d'une façon similaire à l'AMPc, la GMPc (Guanosine monophosphate (GMP) cyclique) joue également un rôle dans la stimulation de la stéroïdogénèse. La GMPc est une forme cyclique du GMP qui a été cyclisé à partir du GTP par la guanylate cyclase et son action serait principalement provoquée par une protéine kinase G afin d'assurer le contrôle basal de la stéroïdogénèse en régulant l'activation

de STAR (Andric et al. 2007; Middendorff et al. 2000). Les PDEs vont également permettre d'inactiver la GMPc afin d'arrêter la signalisation et diminuer la stéroïdogénèse (Andric et al. 2010).

Le récepteur MC2R est principalement exprimé dans les cellules du cortex surrénalien ainsi que dans le tissu adipeux chez la souris, bien que son expression soit négligeable par rapport à celle retrouvée dans la surrénale (Grunfeld et al. 1985). Au niveau des cellules du cortex surrénalien, la sécrétion des glucocorticoïdes est sous le contrôle de l'ACTH qui est capable, au moins *in vitro*, d'augmenter la transcription de *Mc2r* grâce au recrutement de NR5A1 (Cammass et al. 1997; Marchal et al. 1998). Comme vu précédemment dans la zonation de la zone fasciculée (Section #A.4.2.3.2), les protéines accessoires MRAP sont également importantes pour assurer la fonction du MC2R, notamment en permettant sa localisation à la membrane (Metherell et al. 2005)

3.2.2. Voie du calcium

La voie de signalisation utilisant le calcium comme second messenger est impliquée dans la stéroïdogénèse dans les cellules de Leydig ainsi que dans les cellules du cortex surrénalien. Dans les cellules de Leydig, c'est à nouveau la LH qui va induire la stimulation de cette voie afin de produire de la testostérone, tandis que dans les cellules de la zone glomérulée c'est la fixation de l'angiotensine II sur son récepteur AT1R qui va aboutir à la production d'aldostérone.

Dans la glande surrénale, la sécrétion d'aldostérone est régulée par l'angiotensine II et la concentration plasmatique de potassium, aussi bien pour la réponse à court terme qu'à long terme, tandis que l'ACTH n'est impliquée que dans la réponse à court terme (Hattangady et al. 2012). En réponse à une baisse de la pression artérielle, l'angiotensinogène synthétisée dans le foie est clivée par la rénine (produite par les cellules juxtaglomérulaires du rein) en angiotensine I au niveau rénal. L'angiotensine I est ensuite hydrolysée par l'enzyme ACE (Angiotensin converting enzyme), retrouvée à la surface de l'endothélium rénal et pulmonaire, en angiotensine II qui agit comme un vasoconstricteur des artérioles et entraîne également la stimulation de la production d'aldostérone afin de réguler la pression artérielle (Miller 1981;

Yates et al. 2013). C'est à la suite de la fixation de l'angiotensine II sur son récepteur AT1R présent dans la zG que la voie de signalisation est activée ce qui permet d'activer des facteurs de transcription régulant la transcription de *Cyp11b2*, permettant la conversion du désoxycorticostérone en aldostérone. Le récepteur AT1R est couplé à une protéine G de type Gq qui va activer la phospholipase C (PLC) permettant la transformation du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP2) en diacylglycérol (DAG) et inositol triphosphate (IP3). L'angiotensine II permet l'ouverture des canaux calciques et l'IP3 nouvellement synthétisé permet la libération du calcium stocké dans le réticulum endoplasmique à la suite de sa fixation sur son récepteur. Ces deux événements permettent l'augmentation des niveaux de calcium intracellulaire (Spat and Hunyady 2004). Le calcium sera capté par la calmoduline (CAM) permettant ainsi l'activation de kinases dépendantes des calmodulines (CAMK) dont le rôle sera de phosphoryler des facteurs de transcription, notamment CREB. Une fois phosphorylée, CREB pourra se fixer sur l'élément de réponse CRE et ainsi recruter son coactivateur CBP afin de mobiliser la machinerie transcriptionnelle dans le but d'augmenter la transcription de *Star* (Manna et al. 2003). En plus d'augmenter la transcription de *Star*, les CAMKs sont capables de phosphoryler STAR, assurant alors une augmentation de la stéroïdogénèse par l'apport de cholestérol afin de produire de l'aldostérone de façon rapide (Pezzi et al. 1996; Gambaryan et al. 2006). Les niveaux de potassium extracellulaire conduisent à une activation des canaux calciques permettant l'entrée du calcium dans la cellule et ainsi activer les partenaires vus ci-dessus (Clark et al. 1995). L'action rapide de l'ACTH dans ce mécanisme de régulation fait intervenir la signalisation AMPc/PKA à la suite de la fixation de l'ACTH sur son récepteur MC2R. Afin d'assurer une réponse sur le long terme, ce sont les gènes codants pour les enzymes de la stéroïdogénèse qui voient leur transcription augmentée. Notamment l'expression de *Cyp11b2* qui est spécifique de la zG et responsable de la production d'aldostérone. C'est grâce à l'activation des facteurs de transcription par les CAMKs, notamment *Nr4a1*, que ce processus pourra se mettre en place (Bassett et al. 2004; Spat and Hunyady 2004).

Dans les cellules de Leydig, ce sont les récepteurs à la ryanodine (RyR) qui sont utilisés afin de relayer la signalisation calcique bien que les cellules possèdent également le récepteur à l'IP3 (Abdou, Villeneuve, and Tremblay 2013; Costa, Varanda, and Franci 2010).

Les RyRs sont des canaux calciques qui permettent de libérer le Ca^{2+} présent dans le réticulum endoplasmique. Dans des cellules de Leydig MA-10, il a été montré que l'inhibition des RyRs entraîne une baisse de l'expression de *Star* à la suite d'une stimulation par la forskoline, notamment causée par la diminution de l'expression de *Nr4a1* (Abdou, Villeneuve, and Tremblay 2013). L'augmentation de la quantité de Ca^{2+} intracellulaire permet l'activation de la CAMKI, qui est spécifiquement exprimée dans les cellules de Leydig. CAMKI va coopérer avec NR4A1 afin de promouvoir l'activité du promoteur de *Star* en réponse à une stimulation par l'AMPc (Martin et al. 2008).

3.2.3. Autres voies de signalisation

La cellule est un environnement riche et restreint dans lequel les interactions entre les voies de signalisation sont nombreuses et permettent des régulations positives ou négatives entre chacune de ces voies afin de garantir la réponse optimale dans un contexte physiologique.

La liaison de la LH à son récepteur, en plus d'activer la PKA, active également la PKC (Protéine kinase C) (Manna, Huhtaniemi, and Stocco 2009). L'activation de la PKC conduit à la phosphorylation de CREB qui permet d'augmenter l'activité transcriptionnelle de *Star* en partenariat avec NR4A1 (Manna, Huhtaniemi, and Stocco 2009). Cette induction de la stéroïdogenèse s'opère suite à la phosphorylation de ERK1/2 (extracellular signal regulated kinase 1 and 2), deux membres de la famille des MAP (Mitogen-activated protein) kinase (MAPK), par la PKC (Manna, Huhtaniemi, and Stocco 2009).

Il existe différentes voies MAPK dans l'organisme qui se caractérisent par une cascade de phosphorylation de protéines kinases menant à l'activation de différentes protéines, dont des facteurs de transcription (Pimienta and Pascual 2007). Dans les cellules de Leydig, la voie MAPK fait intervenir les protéines ERK1/2. En plus d'être activée par la PKC, ERK1/2 est également activée par la PKA de façon indirecte. La PKA va induire la transactivation du récepteur EGFR (epidermal growth factor receptor) (Evaul and Hammes 2008), qui va permettre l'activation de la GTPase Ras, recrutant alors la kinase RAF, qui assure la phosphorylation d'une kinase de MAPK (MAPKK mitogen-activated protein kinase kinase ou

MEK). MEK activée pourra phosphoryler ERK1/2 et ainsi promouvoir l'activité de STAR. Cette cascade de kinases est régulée par les phosphatases MKP (MAP kinase phosphatase) afin d'atténuer la signalisation ERK1/2 (Brion et al. 2011).

3.3. Régulation de l'expression de *Star*

Dans la cellule, la protéine STAR est localisée à la surface externe de la mitochondrie. Quand une augmentation de la stéroïdogénèse est nécessaire et afin de jouer son rôle dans le transport du cholestérol de la membrane externe à la membrane interne de la mitochondrie, STAR s'intègre dans la matrice mitochondriale. Ainsi, la régulation de l'expression du gène codant pour STAR représente une étape critique dans le transport du cholestérol et un dérèglement de son expression (perte de fonction ou surexpression) sera responsable de désordres de santé (Manna et al. 2016). En plus de la régulation post-traductionnelle de STAR par la PKA, l'expression de *Star* est également régulée de façon positive ou négative en fonction du tissu, du stimulus et des facteurs de transcription présents.

L'activation de la transcription par l'AMPc permet l'activation du facteur de transcription CREB. Celui-ci va se fixer sur une séquence consensus présente sur le promoteur des gènes cibles (séquence CRE), ce qui permet le recrutement de son coactivateur CBP (CRE binding protein). *Star* est un des gènes cibles de CREB et possède une séquence CRE sur son promoteur proximal ainsi que de nombreuses autres séquences pour différents facteurs de transcription (Manna et al. 2002; Clem, Hudson, and Clark 2005). NR5A1 et GATA4 possèdent également des sites de liaison sur le promoteur de *Star* et jouent un rôle dans la formation de complexes entre les protéines et l'ADN afin de stabiliser les complexes formés (Wooton-Kee and Clark 2000; Tremblay and Viger 2001). NR5A1 participe également à la formation de complexes protéine-protéine avec le facteur de transcription SP1 permettant d'augmenter l'activité du promoteur de *Star* (Sugawara, Saito, and Fujimoto 2000). NR5A1 interagit également avec COUP-TFII afin d'induire l'activation de *Star* suite à sa fixation sur le promoteur de *Star* (Mendoza-Villarroel et al. 2014). L'inactivation du gène codant pour COUP-TFII chez la souris entraîne une baisse de la production de testostérone, mettant en évidence son rôle dans la stimulation de la stéroïdogénèse (Qin, Tsai, and Tsai 2008). Le

promoteur proximal de *Star* possède également des séquences reconnues par le facteur C/EBP β (CCAAT/enhancer binding protein β) qui sont impliquées dans la régulation transcriptionnelle de *Star*. Les séquences reconnues par C/EBP β jouent un rôle important dans le développement ainsi que dans la régulation de la stéroïdogénèse en réponse à une stimulation hormonale (Reinhart et al. 1999). cJUN (jun proto oncogene) et cFOS sont des membres de la famille AP-1 qui se fixent sur leur séquence consensus AP-1 sur le promoteur de *Star* et peuvent également se lier à la séquence CRE (Manna, Eubank, and Stocco 2004). La juxtaposition des domaines de liaison GATA et AP-1 permet l'interaction de ces facteurs avec les facteurs GATAs afin de stimuler la transcription de *Star* (Manna, Eubank, and Stocco 2004). De plus, cJUN et cFOS interagissent également avec NR5A1 et C/EBP β (Martin et al. 2012; Manna, Eubank, and Stocco 2004; Manna and Stocco 2007). NR4A1 est un autre facteur de transcription appartenant à la famille des récepteurs nucléaires orphelins. Celui-ci est nouvellement synthétisé en réponse à l'activation de la signalisation relayée par l'AMPc ou par la voie du calcium (Abdou, Villeneuve, and Tremblay 2013; Martin et al. 2008). L'activation du promoteur de *Nr4a1* requiert des facteurs de transcription, tels que CREB et MEF2 (Myocyte enhancer factor 2), qui viennent d'être activés (Abdou, Robert, and Tremblay 2016). L'augmentation de l'expression de *Nr4a1* précède légèrement l'augmentation de l'expression de *Star* (Martin et al. 2008). NR4A1 peut se fixer sur la région proximale du promoteur (élément de réponse NBRE/NR5A1) de *Star* et régule de manière positive l'expression de *Star* pour répondre au besoin de production de stéroïdes (Martin et al. 2008). La coopération entre différents facteurs de transcription contribue donc à la potentialisation du signal afin d'activer les processus cellulaires menant à une stéroïdogénèse optimale en réponse à une stimulation hormonale (Tremblay 2015).

Si divers facteurs de transcription exercent un rôle positif sur la régulation de l'expression de *Star*, peu de facteurs sont actuellement connus pour exercer un rôle négatif. NR0B1 et SHP (Small heterodimer partner, ou NR0B2) régulent de façon négative la stéroïdogénèse en interagissant directement avec NR5A1, NR4A1 et LRH-1 (Liver receptor homolog 1 ou NR5A2) afin d'empêcher leur action sur le promoteur de *Star* (Zazopoulos et al. 1997; Crawford et al. 1998; Volle et al. 2007; Song et al. 2004; Suzuki et al. 2003). SHP réprime également la transcription des gènes *Cyp11a1* et *Hsd3b1* en empêchant la fixation de

NR5A2 sur leur promoteur respectif (Volle et al. 2007). Plus récemment, ARR19 (Androgen receptor corepressor-19 kDa) a également été caractérisé comme un inhibiteur de la transactivation de NR4A1. ARR19 empêche l'expression de gènes de la stéroïdogénèse, tels que *Star* ou *Hsd3b1*, induite par NR4A1 (Qamar et al. 2010). Dans les cellules de Leydig, son expression est diminuée en réponse à la voie LH/AMPC, suggérant un rôle d'ARR19 dans le contrôle de l'expression basale de *Star* (Qamar et al. 2010; Qamar et al. 2009).

4. Contribution des cellules de Sertoli à la stéroïdogénèse

Si les cellules de Leydig sont principalement responsables de la synthèse de la testostérone, les cellules de Sertoli contribuent également à cette synthèse. En effet, durant le développement embryonnaire, les cellules de Leydig fœtales murines synthétisent de l'androstènedione, mais ne peuvent pas produire de la testostérone, car elles n'expriment pas l'enzyme *Hsd17b3*. À ce stade-là, ce sont les cellules de Sertoli qui assurent la conversion de l'androstènedione en testostérone (O'Shaughnessy et al. 2000; Shima et al. 2013). De plus, une étude récente réalisée chez la souris a montré que l'isoforme HSD17B1 est fortement exprimée dans les cellules de Sertoli fœtales et de nouveau-nés et que les animaux HSD17B1 KO présentaient une perturbation de la spermatogénèse. Il a aussi démontré que la perte de HSD17B1 dans les cellules de Sertoli entraînait une augmentation de l'expression de HSD17B3 dans les cellules de Leydig suggérant que HSD17B1 contribue à la synthèse des stéroïdes (Hakkarainen et al. 2018).

C . La voie de signalisation Hippo

1. Hippo : Voie de signalisation canonique

La voie de Hippo est une voie de signalisation conservée dans l'évolution qui joue un rôle dans la détermination du destin cellulaire, la différenciation et la prolifération durant le développement embryonnaire et le développement postnatal ainsi que dans l'homéostasie tissulaire au cours de la vie adulte.

1.1. Découverte et signalisation Hippo chez la drosophile

Historiquement, la voie de signalisation Hippo a été identifiée chez la drosophile, *Drosophila melanogaster*, lors de criblages génétiques effectués afin d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans la suppression de tumeurs. En 1995, le premier composant de la voie identifié a été la kinase Warts (Wts); un gène important pour la prolifération cellulaire, le contrôle de la quantité de cellules présentes dans les organes et dans la morphogenèse des organes. Les recherches subséquentes ont permis d'identifier une série d'autres gènes codant pour des protéines également impliquées dans ces processus qui se sont avérés être des composantes de la voie de signalisation Hippo (Justice et al. 1995; Xu et al. 1995). Ces nouveaux gènes identifiés incluaient : Salvador (Sav), Mob as tumor suppressor (Mats) et hippo (Hpo) qui donnera son nom à cette voie de signalisation (Kango-Singh et al. 2002; Tapon et al. 2002; Harvey, Pflieger, and Hariharan 2003; Udan et al. 2003; Wu et al. 2003; Lai et al. 2005). Enfin, le dernier composant de la voie, le coactivateur transcriptionnel Yorkie (Yki), a été identifié en 2005 lors d'une étude de criblage tentant d'identifier des protéines interagissant avec Wts (Huang et al. 2005). Des études ultérieures ont permis de bien définir la cascade de signalisation Hippo. À la suite de son activation et sa phosphorylation, Hpo, aidé par le cofacteur Sav1 phosphoryle Wts qui, aidé par le cofacteur Mats, phosphoryle à son tour Yki sur plusieurs résidus sérine. À la suite de sa phosphorylation, Yki se retrouve séquestré dans le cytoplasme après son interaction avec la protéine 14-3-3 (Dong et al. 2007; Oh and Irvine 2008). Lorsque la voie Hippo est inactive, Yki ne peut pas être phosphorylée et migre

dans le noyau où, ne possédant pas de site de liaison à l'ADN, il interagira avec le facteur de transcription Scalloped (Sd) afin de réguler l'expression de ses gènes cibles (Goulev et al. 2008; Wu et al. 2008) (Figure 1.6).

1.2. La signalisation Hippo chez les mammifères

Les principaux éléments de la voie de signalisation Hippo chez la drosophile sont conservés chez les mammifères. Les orthologues mammifères MST1/2 (mammalian sterile twenty-like 1 et 2) (Hpo), SAV1 (Salvador family WW domain containing protein 1) (Sav), LATS1/2 (Large tumor suppressor 1 et 2) (Wts), MOB1 (Mps one binder 1) (Mats) et YAP/TAZ (Yki) forment une cascade de kinases similaire à ce que l'on retrouve chez la drosophile. Lorsque la voie Hippo est activée, les protéines kinases MST1 et MST2 phosphorylées interagissent avec la protéine régulatrice SAV1, via le domaine SARAH (Salvador-Ras association (RA) domain family (RASSF)-Hippo) présent sur chacune de ces protéines, pour former un complexe protéique enzymatique actif (Callus, Verhagen, and Vaux 2006). Le complexe MST1/2 activé va directement phosphoryler les kinases homologues LATS1 et LATS2 sur leurs motifs hydrophobes (HM) (LATS1 T1079 et LATS2 T1041) (Chan et al. 2005). MOB1 est également phosphorylée par MST1/2 induisant alors son activation pour qu'elle puisse se lier sur le site auto-inhibiteur présent sur LATS1/2, ce qui va induire une boucle d'activation de phosphorylation de LATS 1 et 2 sur les sites S909 et S872, respectivement, et permettre d'augmenter l'interaction du complexe LATS1/2-MOB1 (Chan et al. 2005; Praskova, Xia, and Avruch 2008; Chow, Hao, and Yang 2010). LATS1/2 activées phosphorylent directement les coactivateurs transcriptionnels YAP et TAZ sur différents résidus, reconnus par la séquence consensus HxRxxS, grâce à l'interaction entre les domaines PPxY de LATS1/2 et le domaine WW de YAP/TAZ (Hao et al. 2008; Oka, Mazack, and Sudol 2008; Zhao, Li, Lei, et al. 2010). La phosphorylation de YAP/TAZ aboutit à leur inactivation. En fonction des sites de phosphorylation, YAP/TAZ pourront soit être exclues du noyau et séquestrées dans le cytoplasme par la protéine 14-3-3 ou bien être dégradées par la voie du protéasome (Liu et al. 2010; Zhao, Li, Tumaneng, et al. 2010; Zhao et al. 2007; Lei et al. 2008).

Quand la voie Hippo est inactive, YAP/TAZ ne sont pas phosphorylées et sont transloquées au noyau où ces protéines vont interagir avec des facteurs de transcription, être recrutées à l'ADN et réguler l'expression de gènes impliqués dans le développement, la prolifération cellulaire, l'apoptose ou encore l'homéostasie (Mauviel, Nallet-Staub, and Varelas 2012; Varelas 2014; Pflieger 2017). Comme pour leur orthologue Yki, elles ne peuvent se lier directement à l'ADN et doivent interagir avec des facteurs de transcription afin de réguler leurs activités. Ces interactions sont possibles grâce au domaine WW de YAP/TAZ (Hong and Yaffe 2006). Le groupe de facteurs de transcription avec lequel YAP/TAZ vont préférentiellement interagir sont les membres de la famille des TEA-domain (TEAD), qui sont au nombre de 4 chez les mammifères (Zhao et al. 2008; Zhang et al. 2009) (Figure 1.6).

2. Les effecteurs de la voie Hippo

2.1. YAP

YAP a été identifiée dans les années 1990 comme une protéine tyrosine kinase associée à YES (YES proto-oncogene 1 tyrosine kinase) et contenant un domaine WW (Sudol 1994; Sudol et al. 1995). Le gène *Yap1* va générer la protéine YAP constituée de 488 acides aminés. YAP est composée de deux domaines WW (Salah, Alian, and Aqeilan 2012). Comme mentionné précédemment, ces domaines sont reconnus par la séquence PPxY (proline/proline/acide-aminé/tyrosine) de LATS1/2 ce qui entraîne la phosphorylation de différents résidus sérine sur YAP : S61, S109, S127, S164, et S381 (Zhao, Li, Tumaneng, et al. 2010; Hao et al. 2008) (Figure 1.6).

Les deux sites de phosphorylation les plus importants et les plus étudiés dans la fonction de YAP sont les sites S127 et S381 (Figure 1.7). Le remplacement du résidu sérine par un résidu alanine sur les sites S61A, S109A et S164A n'induit pas de changement dans l'activité de YAP, suggérant que ces sites ne participent pas à son activité contrairement aux sites S127 et S381. En effet, en cas de mutation de S127A, les fibroblastes en culture ont une capacité proliférative augmentée (Zhao et al. 2009). Dans les cellules NIH-3T3 (fibroblastes

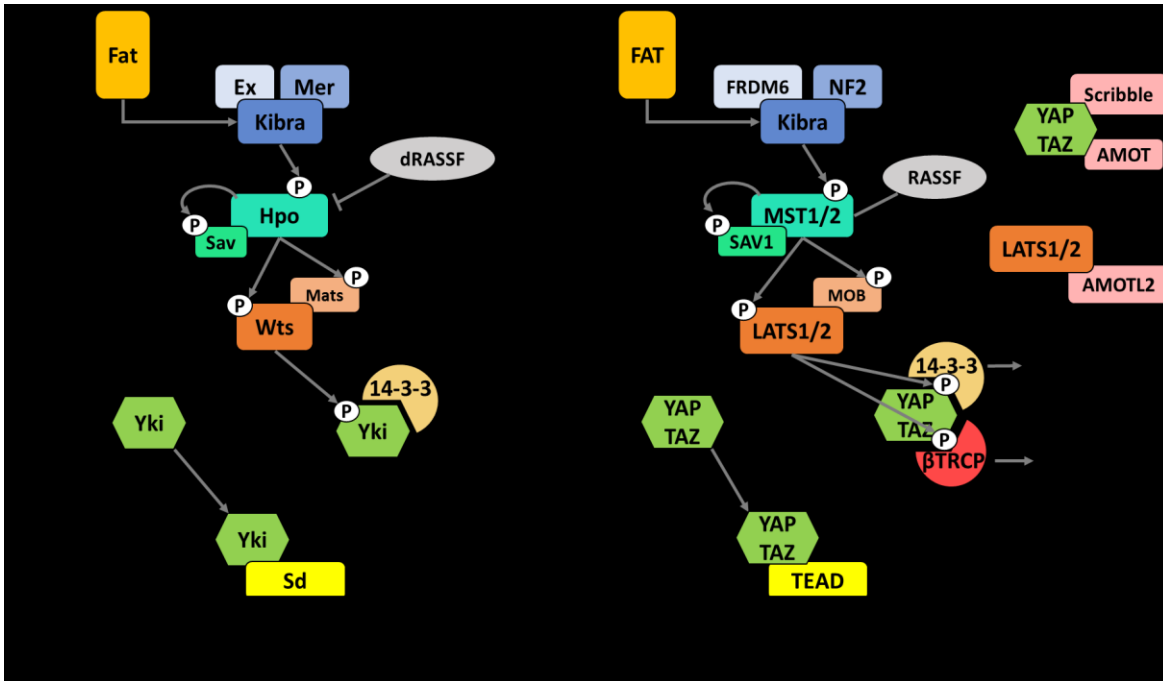


Figure 1.6. Voie de signalisation Hippo chez la drosophile et les mammifères

Représentation schématique de la voie de signalisation Hippo chez la drosophile (A) et les mammifères (B). **A)** Chez la drosophile, dans une cascade de protéines kinases, le complexe Hpo/Sav phosphoryle et active le complexe Wts/Mats qui en retour phosphoryle l'effecteur Yki. Cette phosphorylation entraîne le recrutement de la protéine 14-3-3 qui séquestre Yki dans le cytoplasme. Quand Yki n'est pas phosphorylé, il migre vers le noyau pour se fixer sur son facteur de transcription Sd afin de réguler l'expression de gènes. **B)** Chez les mammifères, les kinases MST1/2 associées à SAV1 forment un complexe qui, une fois phosphorylé, phosphoryle le complexe LATS1/2/MOB1 qui phosphoryle ensuite les coactivateurs transcriptionnels YAP et TAZ. En fonction du site de phosphorylation sur YAP/TAZ, ces derniers seront retenus dans le cytoplasme à la suite de l'interaction avec la protéine 14-3-3 ou dégradés par la voie du protéasome à la suite d'une interaction avec β TRCP. RASSF représente une famille de protéines possédant un domaine de liaison RASSF et dont l'action peut être activatrice ou inhibitrice de MST1/2. Les protéines en lien avec la membrane plasmique (Scribble, AMOT, AMOTL2) peuvent interagir avec YAP/TAZ ou LATS1/2 afin de réguler leur localisation cellulaire et ainsi réguler leur activité. Modifiée de (Piccolo, Dupont, and Cordenonsi 2014; Zhao, Li, Lei, et al. 2010).

embryonnaires), la double mutation de YAP (S127A / S381A) confère aux cellules la capacité de devenir oncogène (Zhao, Li, Tumaneng, et al. 2010). La phosphorylation de S127 induit la rétention cytoplasmique de YAP à la suite du recrutement de la protéine 14-3-3, rendant ainsi YAP inactive (Zhao et al. 2007). La phosphorylation de la sérine S381 permet la phosphorylation subséquente par la casein kinase 1 (CK1 δ/ϵ) de deux résidus sérines : S384 et S387. Ces phosphorylations permettent le recrutement de la β -transducin repeat-containing protein (β -TRCP), activant ainsi le motif de dégradation phosphorylation-dépendant : le phosphodétron. Une fois activé, ce phosphodétron va recruter l'ubiquitine ligase E3 SCF $^{\beta}$ -TRCP conduisant à la poly-ubiquitinylation et la dégradation de YAP (Zhao, Li, Tumaneng, et al. 2010) .

C'est dans l'extrémité N-terminale de YAP que l'on retrouve le domaine de liaison avec les facteurs de transcription TEAD (Figure 1.7). Des études ont montré que YAP ne pouvait plus interagir avec TEAD lorsque YAP S94 était mutée, ce qui conduisait à une diminution de la prolifération cellulaire (Li et al. 2010). Toujours dans la région N-terminale, YAP possède une région riche en proline. Cette région a été rapportée comme étant capable d'interagir avec la protéine HRNPU (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins), une protéine impliquée dans la régulation de la production d'ARN messenger (Howell, Borchers, and Milgram 2004). L'extrémité C-terminale de YAP constitue un domaine d'activation transcriptionnelle. La présence d'un domaine de liaison SH3 permet l'interaction avec des protéines telles que c-ABL (ABL proto-oncogene 1), SRC (SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase) ou YES (Sudol 1994) (Figure 1.7). Ces protéines vont ensuite avoir la capacité de phosphoryler le résidu tyrosine Y391 permettant ainsi une régulation de l'activité de YAP (Zaidi et al. 2004; Levy et al. 2008). Dans les derniers acides aminés de YAP se trouve un motif de liaison PDZ qui permet l'interaction avec le domaine PDZ qui est retrouvé dans différentes protéines dont beaucoup sont associées au cytosquelette (Ye and Zhang 2013). Il a donc été suggéré que ce domaine a une importance fonctionnelle dans la localisation de YAP (Oka and Sudol 2009) (Figure 1.7).

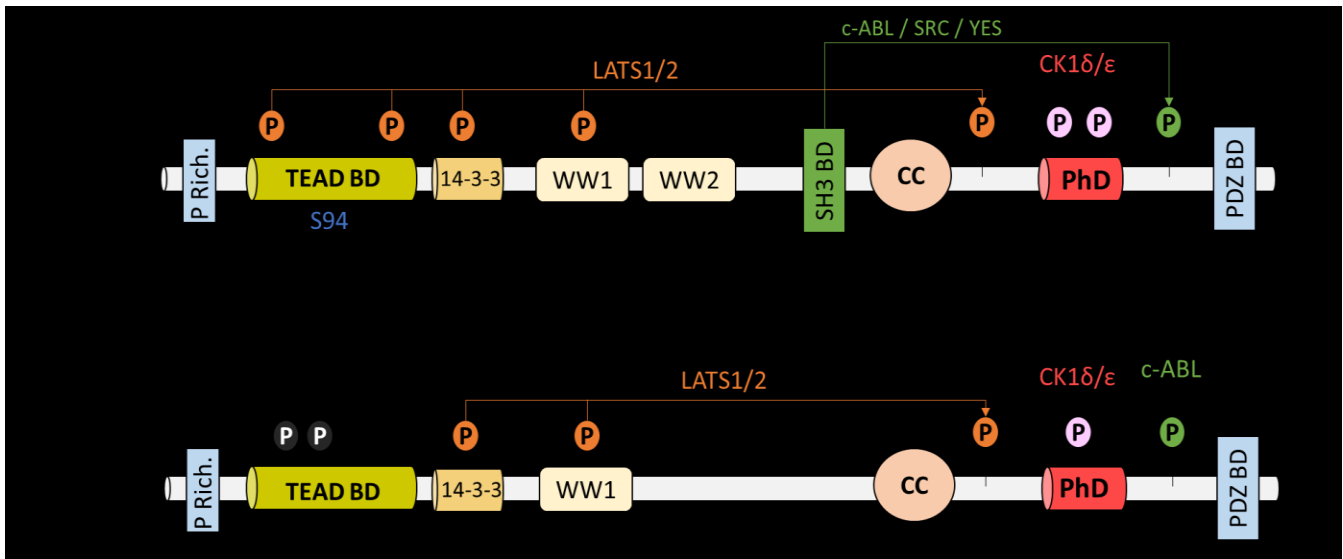


Figure 1.7. Domaines structuraux de YAP et TAZ

Représentation schématique des protéines YAP (A) et TAZ (B) incluant les domaines protéiques et les modifications régulant leur activité. Les structures de YAP et TAZ sont fortement similaires. YAP/TAZ contiennent tous deux une région riche en proline (P Rich.), un domaine de liaison à TEAD (TEAD BD), un domaine d'interaction avec la protéine 14-3-3 activé lorsque la sérine de cette région est phosphorylée, 1 ou 2 domaine WW, une structure en forme de superhélice (CC : coiled coil), un domaine d'interaction conduisant vers la dégradation suite à la phosphorylation par CK1δ/ε (PhD : Phosphodégron) ainsi qu'un domaine de liaison PDZ en position C-terminale pour interagir avec des protéines portant un domaine PDZ (PDZ BD). TAZ ne possède pas de domaine de liaison SH3 (SH3 BD), mais comme YAP, TAZ peut être phosphorylée par c-ABL. Les sérines phosphorylées par LATS1/2 sont représentées en orange. Sur YAP, la sérine 94 (en bleu) est cruciale pour l'interaction avec les membres de la famille des TEADs. Modifiée de (Piccolo, Dupont, and Cordenonsi 2014; Varelas 2014)

2.2. TAZ

TAZ a été caractérisée comme étant une protéine capable d'interagir avec la protéine 14-3-3 dans les années 2000 et comme étant le paralogue de YAP chez les vertébrés (Kanai et al., 2000). Le gène codant pour TAZ est *Wwtr1* (WW domain containing transcription regulator 1), et il va générer une protéine d'environ 452 acides aminés. TAZ possède des éléments structuraux similaires à YAP (Figure 1.7) mais possède qu'un seul domaine WW reconnu et phosphorylé par LATS1/2. La phosphorylation de la sérine S89 entraîne l'interaction avec la protéine 14-3-3 qui va également maintenir TAZ dans le cytoplasme (Kanai et al. 2000) tandis que la phosphorylation de S311 par les kinases LATS1/2 entrainera la phosphorylation du résidu S314 et l'activation du phosphodégron (Liu et al. 2010). Les autres caractéristiques similaires avec YAP incluent la présence d'un site de liaison à TEAD dans la portion N-terminale de la protéine et d'un site de liaison PDZ en position C-terminale (Chan et al. 2009; Remue et al. 2010) (Figure 1.7).

Contrairement à YAP, TAZ ne possède pas de site de liaison SH3 nécessaire à l'interaction de c-ABL, SRC et YES. Malgré l'absence de ce site, c-ABL peut phosphoryler la tyrosine Y316 en réponse à un stress hyperosmotique (Jang et al. 2012). D'autres sites de phosphorylation sont également impliqués dans la régulation de la stabilité de TAZ. Par exemple, les sites S58 et S62 peuvent être phosphorylés par la glycogène synthase kinase 3 β (GSK3 β), ce qui entraîne le recrutement de β -TRCP, conduisant TAZ vers la dégradation (Huang et al. 2012) (Figure 1.7).

3. Régulation de la voie Hippo

3.1. En amont de la voie

Contrairement à la plupart des voies de signalisation, la voie Hippo n'est pas activée par une famille de ligands se liant à leurs récepteurs. En effet, une diversité de facteurs tels les protéines transmembranaires, les protéines associées à la membrane cellulaire, aux jonctions cellulaires et au cytosquelette, le stress, et l'environnement cellulaire vont tous affecter

l'activation de la voie Hippo. En plus de ces facteurs, de nombreuses voies de signalisation peuvent également moduler l'activité de la voie Hippo.

3.1.1. Polarité cellulaire et localisation des composants de la voie Hippo

Les protéines appartenant à la famille des FERM (4.1, Ezrin, Radixin, Moesin) Merlin (Mer) et Expanded (Ex) (NF2 et FRDM6 chez les mammifères, respectivement) ont été identifiées comme des activateurs présents en amont de la cascade Hippo chez la drosophile (Hamaratoglu et al. 2006; Pellock et al. 2007). L'invalidation des gènes codant pour ces protéines conduit à un phénotype d'hyper-prolifération similaire à celui observé lors de l'invalidation des gènes codants pour Hpo, Sav et Wts. Merlin est préférentiellement localisé à proximité des jonctions serrées et adhérentes où il joue un rôle dans le maintien de l'intégrité des jonctions intercellulaires (Lallemand et al. 2003). Des études ont montré que Mer et Ex promouvaient le recrutement de Wts/LATS au niveau de la membrane ainsi que leur phosphorylation par Hpo/MST (Sun, Reddy, and Irvine 2015; Yin et al. 2013). De plus, chez la drosophile, Yki promouvait la transcription de *ex* et *mer* (Hamaratoglu et al. 2006) permettant un rétrocontrôle négatif de sa propre activité. Ce mécanisme est également conservé chez les mammifères avec YAP qui peut d'induire la transcription de *Mer/Nf2* et *Lats2* (Moroishi et al. 2015). Enfin, la protéine Kibra se lie avec Mer et Ex et forme un complexe capable d'activer Wts/LATS (Baumgartner et al. 2010; Genevet et al. 2010; Yu et al. 2010; Kim et al. 2011).

L'architecture de la cellule est un élément important afin que celle-ci puisse définir son orientation spatiale. La protéine Scribble est liée à la membrane plasmique dans les cellules épithéliales et son inactivation ou délocalisation est fréquente dans les cancers où les cellules effectuent une transition épithéliale à mésenchymale (EMT) (Hanahan and Weinberg 2011). Picolo et son équipe ont montré que l'EMT conduisait à l'inactivation de la voie Hippo à la suite de la délocalisation de Scribble dans des tumeurs cellulaires mammaires (Cordenonsi et al. 2011).

En plus de Scribble, d'autres protéines de polarité peuvent affecter les fonctions de YAP/TAZ. Les protéines de la famille des angiomotines (AMOT) interagissent avec de

nombreux composants des jonctions serrées et sont capables d'interagir avec YAP/TAZ (Chan et al. 2011; Wang, Huang, and Chen 2011; Zhao et al. 2011). Ces interactions ne sont pas dépendantes de l'état de phosphorylation de YAP/TAZ et se font plutôt par la reconnaissance des motifs PPxY des protéines AMOT avec les domaines WW de YAP/TAZ (Chan et al. 2011; Wang, Huang, and Chen 2011; Zhao et al. 2011). Les protéines AMOTs recrutent YAP/TAZ au niveau des jonctions serrées ou du cytosquelette d'actine ce qui a pour conséquence de maintenir YAP/TAZ dans le cytoplasme (Chan et al. 2011; Zhao et al. 2011). De plus, un des membres de la famille AMOT, AMOTL2, est capable de lier et d'activer directement LATS2, sans doute grâce à son rôle de protéine d'échafaudage qui lie à la fois MST2 et LATS2 au niveau des jonctions serrées (Paramasivam et al. 2011).

Enfi, des composants du cytosquelette régulent aussi la voie Hippo. Par exemple, l' α -caténine, qui fait le lien entre les cadhérines et le cytosquelette d'actine, est un puissant inhibiteur de l'activité de YAP dans les kératinocytes (Schlegelmilch et al. 2011; Silvis et al. 2011). La perturbation du complexe E-cadhérine/ α -caténine empêche également la phosphorylation et l'inactivation de YAP, favorisant ainsi son accumulation nucléaire et son activité transcriptionnelle (Kim et al. 2011).

3.1.2. Mécaanotransduction : intégrer les contacts physiques

L'architecture du tissu restreint physiquement la croissance et la prolifération cellulaire. Par exemple, lorsque la densité est forte, les contacts cellules-cellules induisent un mécanisme d'inhibition de contact dans lequel la voie Hippo est impliquée (Zhao et al. 2007; Ota and Sasaki 2008; Nishioka et al. 2009). Les kinases LATS sont activées quand la densité cellulaire est élevée tandis qu'elles sont inactives à des densités plus faibles. L'augmentation des différents types de jonctions entre les cellules lorsque celles-ci deviennent confluentes contribue à l'activation des LATS qui vont phosphoryler YAP/TAZ afin de les rendre inactifs (Zhao et al. 2007). Une des explications de ce mécanisme d'action serait l'action du système E-cadhérine/ α -caténine qui permet de recruter les LATS afin de phosphoryler YAP/TAZ (Aragona et al. 2013). Une autre explication formulée ne fait pas intervenir ce système, mais serait liée au remodelage du cytosquelette d'actine qui entrainerait l'inactivation de YAP/TAZ (Aragona et al. 2013).

La nature de la surface sur laquelle les cellules se développent régule également la voie Hippo. L'étude de Dupont et *al* en 2011 a montré que l'activité de YAP/TAZ était associée à la rigidité de la matrice extracellulaire (MEC). Sur une surface rigide, YAP est activée tandis que sur une surface souple YAP sera phosphorylée et cette régulation peut se faire de façon indépendante de LATS (Dupont et al. 2011). Une autre étude a mis en évidence que l'attachement ou le détachement des cellules pouvait respectivement réprimer ou induire l'activité de YAP/TAZ (Zhao et al. 2012). Ces études révèlent que le réarrangement du cytosquelette d'actine en réponse à des signaux mécaniques est associé à des changements dans l'activité de YAP et TAZ. En plus de ce réseau, les microtubules jouent un rôle dans la régulation de la voie étant donné que Mer/NF2 interagissent et stabilisent les microtubules. Ceci assure la bonne localisation dans la cellule de Mer/NF2 et ultimement la régulation de YAP (Hamaratoglu et al. 2006; Smole et al. 2014).

Les études tendent à converger sur le rôle important que joue le cytosquelette d'actine dans la régulation de la voie Hippo, mais il reste encore des points à démontrer. En effet, le rôle des filaments d'actine (F-actine) dans la régulation de la voie Hippo pourrait être indirect et il a été suggéré que la F-actine pourrait jouer le rôle de plateforme et faciliter la transmission du signal entre des régulateurs en amont, comme des protéines G et des Rho-GTPases, et les composants de la voie Hippo (Yu and Guan 2013).

3.1.3. Récepteurs couplés aux protéines G et diffusion du signal

Il a été récemment démontré que certains récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) pouvaient activer ou inactiver la voie Hippo. L'acide lysophosphatidique (LPA) et la sphingosine-1-phosphate (S1P) présente dans le sérum, activent et stabilisent YAP/TAZ grâce à leur fixation sur leur RCPG respectif : LPAR et S1PR. (Miller et al. 2012; Yu et al. 2012). D'un point de vue mécanistique, les protéines $G_{\alpha_{12/13}}$ et $G_{\alpha_{q/11}}$ couplées au RCPG activent les Rho-GTPases qui en retour inactivent LATS1/2 par un mécanisme dépendant de l'assemblage des filaments d'actine (Yu et al. 2012). À l'inverse de $G_{\alpha_{12/13}}$ et $G_{\alpha_{q/11}}$, les protéines G_{α_s} activeront la voie Hippo. En effet l'activation de protéine G_{α_s} par l'adrénaline ou bien le glucagon par exemple, va activer l'adénylate cyclase ce qui va entraîner l'accumulation d'AMPc et l'activation de la PKA. L'activation de la PKA entrainera à son tour l'inhibition

des Rho-GTPases ce qui va permettre d'augmenter l'activité de LATS1/2 et induire la phosphorylation de YAP/TAZ (Yu et al. 2013). Ainsi, en fonction du type de protéine G rattachée au RCPG, l'activité des kinases LATS1/2 sera régulée de façon positive ou négative.

3.2. En aval de la voie

3.2.1. Régulation transcriptionnelle

Le rôle de YAP/TAZ qui a été le plus largement étudié est celui de cofacteur transcriptionnel. YAP/TAZ ne contiennent pas de domaine de liaison à l'ADN et doivent alors interagir avec des facteurs de transcription afin de réguler l'expression de gènes. Une des principales familles de facteurs de transcription avec laquelle YAP/TAZ interagissent est la famille des TEADs (Zhao et al. 2008; Chan et al. 2009). Une fois au noyau, YAP/TAZ entrent en compétition avec les protéines Vestigial-like (VGLL-1 à 4), une autre famille de cofacteurs transcriptionnels qui interagissent avec TEAD via le même domaine d'interaction que YAP/TAZ (Jiao et al. 2014; Pobbati et al. 2012). La présence de YAP/TAZ dans le noyau entraîne la dissociation de VGLL4 afin de permettre leur interaction avec TEAD et la transcription de gènes (Zhang et al. 2014).

D'un point de vue fonctionnel, YAP/TAZ stimulent l'activité transcriptionnelle via TEAD en recrutant des protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine ou dans la méthylation des histones permettant la transcription de gènes cibles (Skibinski et al. 2014; Oh et al. 2013; Qing et al. 2014). En interagissant avec TEAD, YAP/TAZ peuvent également agir comme corépresseurs transcriptionnels en recrutant un complexe d'histone désacétylase et ainsi inhiber l'expression de gènes (Kim et al. 2015).

Des études génomiques effectuées sur les cibles transcriptionnelles de YAP/TAZ ont été faites par différents groupes, ce qui a permis d'identifier des gènes cibles de l'activité de YAP/TAZ tel que *Ctgf* (Connective tissue growth factor), *Cyr61* (Cysteine-rich, angiogenic inducer, 61), *Birc5* (Baculoviral IAP repeat containing 5), *Sgk1* (Serum/glucocorticoid regulated kinase 1), etc. (Yuen et al. 2013; Yoo et al. 2017; Dupont et al. 2011; Piccolo, Dupont, and Cordenonsi 2014). Les gènes exprimés ou inhibés par la voie Hippo constituent

des éléments permettant de comprendre le rôle de cette voie de signalisation dans les mécanismes physiologiques et pathologiques.

Bien que TEAD soit la famille de facteur de transcription la mieux caractérisée en tant que partenaire de YAP/TAZ, ceux-ci peuvent également interagir avec d'autres facteurs de transcriptions tels que les SMADs (SMAD family members), TP73 (tumor protein p73), RUNX (Runt-related transcription factor), permettant ainsi de diversifier leur activité transcriptionnelle (Varelas 2014; Hansen, Moroishi, and Guan 2015; Kim, Jang, and Bae 2018).

3.3. Interactions avec d'autres voies de signalisation

3.3.1. Hippo et la voie des WNT

La voie des WNTs, comme la voie Hippo, est impliquée dans la prolifération cellulaire, le développement des cellules souches, la régénération tissulaire et la carcinogenèse (revue dans (Clevers 2006; Niehrs and Acebron 2012)). La protéine CTNNB1 est l'élément majeur de la signalisation canonique des WNTs. En absence de liaison d'un ligand WNT canonique à son récepteur, la CTNNB1 est séquestrée au sein d'un complexe de destruction composé de deux protéines structurantes, Axin et APC (Adenomatous Polyposis Coli), qui facilitent la phosphorylation de CTNNB1 par CK1 α et GSK3 β (Liu et al. 2002). Lorsque la CTNNB1 est phosphorylée, elle est reconnue et ubiquitinylée par l'ubiquitine E3 ligase β -TrCP, puis dégradée par le protéasome (Aberle et al. 1997). Dans ces conditions, les facteurs de transcription TCF/LEF (T cell-specific / lymphoid enhancer-binding factor) présents sur les promoteurs des gènes cibles de la voie sont associés avec le répresseur Groucho, inhibant l'expression des gènes cibles de la voie WNT canonique (Cavallo et al. 1998). Lorsque la voie est activée par les ligands WNTs, ces derniers vont se fixer sur leur récepteur composé de Frizzled et LRP5/6 (low density lipoprotein receptor-related protein 5/6), ce qui entraîne la déstabilisation du complexe de destruction de la CTNNB1 et permet l'accumulation de CTNNB1 non-phosphorylée qui sera rapidement transloquée au noyau (Yang-Snyder et al. 1996). Au noyau, CTNNB1 agit comme corégulateur transcriptionnel en interagissant avec les protéines TCF/LEF. Cette interaction permet le recrutement des protéines BCL9 (B-cell

lymphoma 9 protein), CBP, ainsi que des activateurs transcriptionnels tissus-spécifique, dans le but d'activer la transcription des gènes en réponse à l'activation de la voie WNT/CTNNB1 (revue dans (Cadigan and Waterman 2012)).

Des études récentes ont montré une forte interaction entre YAP/TAZ et la voie des WNTs. YAP et TAZ font partie intégrante du complexe de destruction de CTNNB1 (Azzolin et al. 2014). Cette interaction résulte en la séquestration de YAP/TAZ dans le cytoplasme au sein du complexe de destruction ainsi qu'en l'interaction de YAP/TAZ avec l'Axin. Ceci permet de recruter la protéine β -TrCP, responsable de l'ubiquitylation de CTNNB1 qui aura préalablement été phosphorylée par GSK3 au sein du complexe. Ainsi, quand la voie des WNTs n'est pas activée, YAP/TAZ joue un rôle important dans la dégradation de CTNNB1. Quand la voie WNT est activée par un de ses ligands, le récepteur LRP5/6 va interagir avec l'Axin entraînant ainsi la dissociation de YAP/TAZ du complexe de destruction permettant à la CTNNB1 d'être libre dans le cytoplasme et d'être éventuellement transloquée au noyau. De plus, cet événement aura comme conséquence le non-recrutement de β -TrCP favorisant ainsi l'accumulation de CTNNB1 dans le cytoplasme (Azzolin et al. 2014). La CTNNB1 exerce également un rôle sur la voie Hippo, notamment en interagissant avec TAZ. Lorsque la voie des WNTs n'est pas activée, la CTNNB1 dans sa forme phosphorylée peut s'associer avec TAZ et entraîner le recrutement de β -TrCP, conduisant à la fois à sa propre dégradation ainsi qu'à celle de TAZ (Azzolin et al. 2012). En revanche, ce phénomène n'a pas été observé pour YAP. Sur le plan physiologique, ce modèle a été validé sur des souris TAZ-KO qui développent de multiples kystes au niveau des reins associés à une accumulation de CTNNB1 nucléaire (Varelas, Miller, et al. 2010) tandis que dans le tissu cardiaque, l'inactivation de *Sav1* est associée à une diminution de la phosphorylation de YAP/TAZ et une augmentation de CTNNB1 nucléaire entraînant une prolifération excessive des cardiomyocytes aboutissant à la formation d'un cœur surdéveloppé (Heallen et al. 2011). TAZ peut aussi jouer un rôle de régulateur négatif de la voie des WNTs en inhibant Dishevelled (DVL), un régulateur positif de cette voie, qui est phosphorylé lorsque la voie est activée. L'interaction de TAZ avec DVL inhibe la phosphorylation de DVL par CK1 δ/ϵ entraînant une inhibition de la signalisation WNT/CTNNB1 (Varelas, Miller, et al. 2010). YAP est également capable d'interagir avec DVL afin de réguler la voie WNT/CTNNB1 (Imajo et al. 2012). DVL a une action dans les

cellules souches intestinales au niveau nucléaire et son expression augmente la signalisation WNT dans ces cellules. Dans le cytoplasme, YAP a la capacité d'interagir avec DVL afin d'en restreindre la translocation nucléaire et ainsi éviter une suractivation de la prolifération cellulaire (Barry et al. 2013). YAP/TAZ ne sont pas les seules composantes de la voie Hippo interagissant avec CTNNB1. En effet, il a été aussi démontré que LATS2 nucléaire pouvait s'associer à CTNNB1 et bloquer l'interaction entre cette dernière et son cofacteur BCL9 et empêcher le développement tumoral et métastatique de cancers colorectaux humains (Li et al. 2013).

3.3.2. Hippo et la voie Hedgehog

La voie de signalisation Hedgehog a également été identifiée comme partenaire de la voie Hippo. Cette voie de signalisation se révèle être importante, entre autres, dans le développement et le fonctionnement de la glande surrénale et du testicule comme il a été développé dans les chapitres précédents (Section A). Quand la voie Hedgehog est inactive, le récepteur Patched 1 (PTCH1) est associé au RCPG Smoothened (SMO) et les protéines de la famille des GLIs (il existe 3 isoformes chez les vertébrés) forment un complexe avec l'inhibiteur de la voie Hedgehog, SUFU (Suppressor of fused), les empêchant d'être transloquées au noyau et d'exercer leur activité transcriptionnelle. L'association GLI/SUFU entraîne la phosphorylation des GLIs, conduisant à la dégradation de GLI2 tandis que GLI3 sera plutôt clivée, générant une forme tronquée capable de réprimer la transcription des gènes cibles de la voie Hedgehog. Quand la voie est activée par l'un de ses ligands (SHH, DHH et/ou IHH (Indian hedgehog)) sur le récepteur PTCH1, ce dernier change de conformation ce qui entrainera la libération de SMO. La phosphorylation de SMO permettra à son tour de libérer les GLIs en antagonisant SUFU. GLI2 et GLI3 ne seront alors pas dégradées et pourront activer leurs gènes cibles dans le noyau. L'autre membre de la famille des GLI, GLI1, est une cible de la voie Hedgehog qui agit comme un rétrocontrôle positif pour augmenter l'activité des GLIs (revue dans (Finco et al. 2015)).

La relation entre la voie Hippo et Hedgehog a principalement été étudiée d'un point de vue pathologique. Une activation aberrante de la voie Hedgehog, via SHH, est impliquée dans la progression des médulloblastomes (MB), des tumeurs malignes ayant pour origine une

population de progéniteurs de neurones, les CGNPs (Cerebellar Granule Neuron Progenitors). En parallèle de l'augmentation de l'expression de *Shh*, YAP est également surexprimée dans ce type de tumeurs (Fernandez et al. 2009). L'étude révèle que SHH induit à la fois l'expression de *Yap* dans les CGNPs ainsi que sa translocation au noyau ce qui conduit à une stimulation de la prolifération des CGNPs. Récemment, il a été démontré que la suppression de l'ARN non codant Nkx2-2as dans les MBs induit une potentialisation du développement tumoral médié par SHH (Zhang et al. 2018) alors que dans les cellules saines Nkx2-2as séquestrent une série de microARNs capable d'activer LATS1/2. La perte d'expression de cet ARN non codant entraîne donc l'inactivation de LATS1/2 et une augmentation de YAP dans les CGNPs menant au développement des médulloblastomes. Dans un autre type de cancer, l'ostéosarcome, il a été montré que l'activation constitutive de la voie Hedgehog dans les ostéoblastes de souris transgéniques entraîne le développement rapide d'ostéosarcome corrélé à une surexpression de YAP (Chan et al. 2014). De plus, l'inhibition de la voie Hedgehog conduit à une réduction de l'expression de *Yap* et l'inhibition de *Yap* empêche la prolifération des cellules tumorales provenant de ces mêmes animaux (Chan et al. 2014). Enfin, il a été suggéré que YAP/TAZ activaient indirectement l'activation de la voie hedgehog dans le mésenchyme gastro-intestinal (Cotton et al. 2017). Dans ce tissu, l'activité prononcée de YAP/TAZ permet l'expansion de la population de cellules progénitrices et inhibe l'expression de myocardine et la différenciation de ces cellules en cellules musculaires lisses. Au cours du développement du mésenchyme, YAP/TAZ sont phosphorylées par LATS1/2, permettant de lever l'inhibition de la transcription de la myocardine et permettant à la voie Hedgehog, via SMO, d'activer sa transcription et ainsi entraîner la différenciation en cellules musculaires lisses (Cotton et al. 2017). Malgré les études décrites ci-dessus, les mécanismes d'interaction entre la voie Hippo et Hedgehog restent en partie à élucider.

3.3.3. Hippo dans la voie de l'apoptose

Le proto-oncogène RAF1 (Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase) interagit avec MST2 afin d'empêcher son activation, cependant cette interaction peut être évitée en cas d'activation de l'apoptose régulée par RASSF1A (Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1) qui permettra l'activation de MST2. MST2 ainsi activée pourra

phosphoryler LATS1/2 qui va ensuite phosphoryler YAP qui interagira avec le facteur de transcription TP73 dans le noyau afin d'activer des gènes proapoptotiques (Matallanas et al. 2007). Cette situation est particulière, car il s'agit de YAP sous sa forme phosphorylée qui est transloquée et active au noyau, ce qui suggère l'existence de différents niveaux de régulation qui sont activés ou réprimés en fonction du contexte cellulaire. D'autres études portant sur la relation entre la voie Hippo et l'apoptose ont également mis en évidence la dualité de la voie Hippo dans ce processus. LATS1 et LATS2 ainsi que YAP et TAZ interagissent avec la protéine PPP1R13B (Protein phosphatase 1, regulatory subunit 13B), ce qui entrainera ultimement une inhibition ou activation de l'apoptose en fonction du contexte cellulaire (Aylon et al. 2010; Espanel and Sudol 2001; Liu et al. 2011; Vigneron, Ludwig, and Vousden 2010).

3.3.4. Hippo et les autres voies de signalisation

Comme nous avons pu le voir à la section #C.3.2.1 sur l'interaction de YAP/TAZ avec d'autres facteurs de transcription que TEAD, la voie Hippo interagit avec celle du TGF- β et BMP (Varelas et al. 2008; Varelas, Samavarchi-Tehrani, et al. 2010). La voie phosphatidylinositol 3-kinase/protéine kinase B (PI3K/AKT) interagit également avec la voie Hippo. Quand AKT est activée, MST1/2 et YAP pourront être phosphorylées par AKT et ainsi réguler leurs effets (Kim et al. 2010; Jang et al. 2007; Basu et al. 2003). Chez la drosophile, il a également été montré que la voie JAK/STAT et Notch (Polesello and Tapon 2007; Shaw et al. 2010) pouvaient interagir avec la voie Hippo, mais ces interactions n'ont pas été retrouvées chez les mammifères pour l'instant (Mauviel, Nallet-Staub, and Varelas 2012). La voie Hippo fait l'objet de plus en plus de recherches et de nouvelles interactions seront sans doute établies au cours des prochaines années.

4. La voie Hippo dans le testicule

Peu d'études ont jusqu'à présent évalué le rôle de la voie Hippo dans les testicules. Tout d'abord, les souris mâles *Lats1*^{-/-} présentent une baisse de la fertilité, mais l'analyse histopathologique du testicule n'a pas révélé d'anomalie structurale. Cette baisse de la fertilité n'a pas été investiguée, mais elle pourrait être due à une diminution de la sécrétion de LH, comme c'est le cas chez la femelle *Lats1*^{-/-} (St John et al. 1999). Les souris *Taz*^{-/-} ont un taux de mortalité à l'âge du sevrage entre 35-50% mais le reste des animaux atteignent l'âge adulte. Ces mâles sont fertiles (Hossain et al. 2007), mais donnent naissance à des petites portées. Aucune investigation n'a été menée pour établir la raison de cette baisse de la natalité chez les animaux *Taz*^{-/-}. Enfin, les souris *Yap*^{-/-} (Xin et al. 2011) et *Lats2*^{-/-} (Yabuta et al. 2007) meurent trop rapidement pour identifier un rôle au niveau du testicule.

À ce jour une seule étude a évalué le rôle de la voie Hippo dans le testicule. Cette étude portait sur le rôle de YAP dans la fonction des cellules de Sertoli chez le rat (Sen Sharma and Majumdar 2017). Dans cette étude, les chercheurs ont démontré la présence de YAP dans le noyau de cellules de Sertoli prépubères en culture. Il ont par la suite démontré que l'inhibition de YAP par l'inhibiteur pharmacologique vertéporfine (VP) entraîne une baisse de l'expression des gènes en réponse à la voie FSH/AMPC/PKA, suggérant un rôle pour YAP dans la régulation hormonale de l'expression des gènes impliqués dans la fonction des cellules de Sertoli et la spermatogenèse (Sen Sharma and Majumdar 2017).

Des évidences nous permettant de croire en l'importance de la voie Hippo dans la fonction du testicule ont été apportées par des études faites dans différents types cellulaires. *Sox9* et *Wtl* sont deux gènes ayant une grande importance dans le développement gonadique et surrénalien (Wilhelm and Englert 2002; Chaboissier et al. 2004), sont régulés par la voie Hippo. Dans des cellules de l'épicerde (Singh et al. 2016) et de l'œsophage (Song et al. 2014), YAP régule positivement l'expression de *Wtl* et *Sox9*, respectivement, grâce à la liaison du complexe YAP/TEAD sur les séquences TEAD présentes sur le promoteur de ces deux gènes. Cependant, dans les cellules chondrogéniques il a été rapporté que YAP inhibe la transcription de *Sox9* (Zhong et al. 2013).

5. La voie Hippo dans la glande surrénale

À ce jour, il existe une seule étude qui a mis en évidence l'implication de la voie Hippo, *via* YAP, dans les cas de tumeurs des cellules adrénocorticales (ACT) chez l'enfant (Abdouch et al. 2016). Dans le cadre de cette étude, les chercheurs ont mis en évidence une surexpression de YAP1 dans les ACTs et ont montré que cette augmentation de la quantité de YAP était également associée à un mauvais pronostic pour la survie du patient et à l'augmentation de la probabilité de développer des métastases. Cette association a déjà été montrée pour d'autres types de cancers (colon, ovaires, etc.) (revue dans (Moon, Yeon Park, and Woo Park 2018)). De plus, cette étude fait état de l'interaction entre la voie WNT/CTNNB1, voie la plus fréquemment affectée dans les ACTs (Assie et al. 2014), avec YAP alors que l'inhibition de la voie WNT/CTNNB1 induit une diminution de l'expression de YAP et de CTNNB1.

6. Contribution de la voie Hippo à la stéroïdogénèse

Quelques études ont évalué le rôle de la voie Hippo dans la stéroïdogénèse. Cependant ces études ont majoritairement été effectuées dans les cellules de la granulosa. Il a été tout d'abord démontré que YAP est activée par les stéroïdes sexuels dans les cellules de la granulosa des follicules au stade secondaire/préantral et pourrait contribuer à la croissance folliculaire avant d'être inactivée par la LH au moment de l'ovulation (Zhang et al. 2011). Dans un modèle de culture primaire de cellules de la granulosa, l'apport en excès de testostérone ou d'œstradiol induit un transfert rapide de YAP au noyau entraînant la prolifération des cellules (Ji et al. 2017). Dans une étude faite sur une lignée cellulaire cancéreuse de cellules de la granulosa, l'inhibition de YAP conduit à une diminution de la production d'aromatase (Fu et al. 2014). Il a aussi été démontré que YAP était impliquée dans syndrome des ovaires polykystiques (PCOS) chez la femme (Ji et al. 2017; Jiang et al. 2017; Li et al. 2012), suggérant que YAP pourrait être impliquée dans la synthèse d'androgènes dans ce tissu car il est admis que la surproduction d'androgènes est l'une des principales caractéristiques associées au PCOS chez la femme (Saito et al. 2016). Des études

supplémentaires sont cependant requises afin d'établir un lien entre l'augmentation de YAP et les dérèglements hormonaux associés au PCOS.

Enfin, il a été également démontré que l'expression de YAP était augmentée chez des patientes atteintes d'endométriose et que le complexe YAP/TEAD pouvait interagir sur le promoteur de *Star* et potentiellement stimuler la production d'œstrogènes (Lin et al. 2017). Il a été démontré dans cette étude que l'inactivation de YAP par la vertéporfine (VP) ou des siARNs dirigés contre *Yap* diminuait la prolifération cellulaire et la production d'œstrogènes par les cellules stromales ectopiques tant dans un modèle de culture primaire que dans un modèle murin d'endométriose (Lin et al. 2017). À ce jour, aucune étude n'a évalué le rôle de YAP dans la synthèse des stéroïdes par les cellules de Leydig et les cellules de l'adrénocortex.

Chapitre 2 : Hypothèses et objectifs

Les études récentes sur la voie Hippo ont révélé de nombreux rôles de cette voie de signalisation dans différents organes, cependant les recherches sur le testicule et la glande surrénale sont manquantes.

La voie Hippo est capable, dans divers tissus, de réguler l'expression de *Sox9* et *Wtl*, deux gènes clé dans la détermination du sexe au cours du développement. De plus, il a été démontré que la voie de la PKA, voie clé pour la synthèse des stéroïdes, pouvait activer la voie Hippo dans divers types cellulaires. En fonction de ces interactions, nos hypothèses de travail étaient que la voie de signalisation Hippo pourrait jouer un rôle important dans le développement (déterminisme sexuel mâle) et la fonction (synthèse de testostérone) des testicules.

L'objectif général de cette thèse était donc d'évaluer le rôle de la voie Hippo dans le développement et la fonction des cellules de Sertoli et de Leydig chez la souris.

Le premier objectif spécifique de ma thèse était d'évaluer l'effet de l'inactivation de YAP et TAZ dans les cellules de Sertoli à l'aide d'une approche *in vitro* (traitement de cellules de Sertoli immatures *Yap^{flox/flox};Taz^{flox/flox}* avec un adénovirus exprimant la recombinaise Cre) et *in vivo* (création d'un modèle de souris *Yap^{flox/flox};Taz^{flox/flox};Amh^{cre/+}*). Les résultats de ces travaux sont présentés au chapitre 3.

En fonction des résultats obtenus, à la suite de cette première étude nous avons décidé de créer un second modèle de souris transgéniques *Yap^{flox/flox};Taz^{flox/flox};Nr5a1^{cre/+}* dans le but d'identifier le rôle de la voie Hippo dans le développement des précurseurs des cellules de Sertoli et de Leydig. Dû à l'inefficacité de la recombinaison dans les gonades en formation cet objectif n'a pas pu être atteint. En revanche, la recombinaison de *Yap* et *Taz* s'est avérée très efficace dans la glande surrénale. En vertu de ce résultat un nouvel objectif a été ajouté à ma thèse soit celui d'élucider le rôle de YAP/TAZ dans le cortex surrénalien. Les résultats de ces travaux sont présentés au chapitre 4.

Enfin notre troisième objectif spécifique consistait à évaluer le rôle de la voie Hippo dans les cellules de Leydig. Le modèle *Yap^{flox/flox};Taz^{flox/flox};Nr5a1^{cre/+}* n'ayant pas permis

d'étudier le rôle de la voie Hippo dans les cellules de Leydig *in vivo* chez la souris, nous avons utilisé la lignée cellulaire MLTC-1 afin d'étudier le rôle de YAP dans la stéroïdogénèse. Les résultats de ces travaux sont présentés au chapitre 5.

Chapitre 3 : 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

Adrien Levasseur, Marilène Paquet, Derek Boerboom, Alexandre Boyer

Contributions des auteurs : Dans le cadre de cet article, j'ai élaboré le projet de recherche et écrit l'article en collaboration avec Alexandre Boyer et Derek Boerboom. J'ai réalisé toutes les expériences présentées dans cet article. Marilène Paquet a effectué l'analyse histologique des tissus.

Article publié dans la revue *Biology of Reproduction*, 2017 Jul 1;97(1):162-175

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[‡]

Adrien Levasseur, Marilène Paquet, Derek Boerboom, Alexandre Boyer*

Centre de Recherche en Reproduction et Fertilité, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Québec, Canada

Summary sentence: YAP and WWTR1 are required for the maintenance of Sertoli cell differentiation and the suppression of the female sex determination pathway.

Keywords: YAP, WWTR1, Cre-lox, Sertoli cells, sex differentiation.

***Correspondence** : 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. Tel: +1-450-773-8521, ex 8345; Fax: +450-778-8103; E-mail: alexandre.boyer.1@umontreal.ca

[‡] **Grant Support:** Supported by Discovery Grants from the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) (to A.B. and D.B.). 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 U54-HD28934.

Conference presentation: Presented in part at the 9th symposium of the Réseau Québécois en Reproduction (RQR), 8-9 November 2016, Quebec, QC, Canada.

1. Abstract

Yes-associated protein (YAP) and WW containing transcription regulator 1 (WWTR1) are two functionally redundant transcriptional regulators that are downstream effectors of the Hippo signaling pathway, and that act as major regulators of cell growth and differentiation. To elucidate their role in Sertoli cells, primary Sertoli cell culture from *Yap*^{flox/flox}; *Wwtr1*^{flox/flox} animals were infected with a Cre recombinase-expressing adenovirus. Concomitant inactivation of *Yap* and *Wwtr1* resulted in a decrease in the mRNA levels of the male sex differentiation genes *Dhh*, *Dmrt1*, *Sox9* and *Wtl*, whereas those of genes involved in female differentiation (*Wnt4*, *Rspo1* and *Foxl2*) were induced. SOX9, FOXL2 and WNT4 proteins were regulated in the same manner as their mRNAs in response to loss of YAP and WWTR1. To further characterize the role of YAP and WWTR1 in Sertoli cells, we generated a mouse model (*Yap*^{flox/flox}; *Wwtr1*^{flox/flox}; *Amh*^{cre/+}) in which *Yap* and *Wwtr1* were conditionally deleted in Sertoli cells. An increase in the number of apoptotic cells was observed in the seminiferous tubules of 4 dpp mutant mice, leading to a reduction in testis weights and a decrease in the number of Sertoli cells in adult animals. Gene expression analyses of testes from 4 dpp *Yap*^{flox/flox}; *Wwtr1*^{flox/flox}; *Amh*^{cre/+} mice showed that Sertoli cell differentiation is initially altered, as *Dhh*, *Dmrt1* and *Sox9* mRNA levels were downregulated, whereas *Wnt4* mRNA levels were increased. However, expression of these genes was not changed in older animals. Together, these results suggest a novel role of the Hippo signaling pathway in the mechanisms of sex differentiation.

2. Introduction

Hippo is an evolutionarily conserved signaling pathway with well-established roles in cell fate determination, differentiation and proliferation during embryonic and postnatal development, as well as in tissue homeostasis throughout adulthood [1-3]. The canonical Hippo pathway consists of a kinase cascade that ultimately serves to regulate the functionally redundant transcriptional co-regulators Yes-associated protein (YAP) and WW containing transcription regulator 1 (WWTR1, also known as TAZ). In response to extracellular signals

such as the establishment of cell-cell contacts, 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 phosphorylate YAP and WWTR1. Upon phosphorylation, YAP and WWTR1 are either retained in the cytoplasm via their association with 14-3-3 proteins, or they are degraded by the cellular proteosomal machinery. When the Hippo signaling cascade is inactive, unphosphorylated YAP and WWTR1 accumulate in the nucleus and form complexes with transcription factors to regulate the transcription of genes involved in cell growth, survival, and proliferation [1-3].

Very little is known about the role of Hippo signaling in the male reproductive system. *Yap*- and *Lats2*-null mice die *in utero* by 9.5 and 12.5 days post coitum (dpc), respectively [4, 5], and their functions in the testes have never been studied. *Lats1*-deficient male mice have decreased fertility, which was associated with a reduction in luteinizing hormone (LH) secretion [6]. Histopathological examination of the testes in these mice revealed no obvious structural abnormalities [6]. *Wwtr1*-null mice have reduced viability during postnatal development. Males that survive to adulthood are capable of mating but produce small litters [7], although the cause of this reduced fertility has not been reported. In this study, we aimed to elucidate the physiological roles of the key effectors of Hippo signaling YAP and WWTR1 by inactivating their expression in the Sertoli cells *in vitro* and *in vivo*.

3. Materials and methods

3.1. Ethics

All animal procedures were approved by the Comité d'Éthique de l'Utilisation des Animaux of the Université de Montréal (protocol numbers 14-Rech-1739 and 14-Rech-1743) and conformed to the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals as promulgated by the Society for the Study of Reproduction.

3.2. Histopathology and immunohistochemistry

Testes for light microscopy histopathologic analysis were weighed, fixed in Bouin's solution for 24h, rinsed and dehydrated in alcohol. Tissues were embedded in paraffin, sectioned, and stained with hematoxylin and eosin. Immunohistochemistry was done on 7 μ m 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 YAP (1:200, #4912, Cell Signaling), phospho-YAP (1:100 # 13008, Cell Signaling), WWTR1 (1:800, #4883, Cell Signaling), DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4 (DDX4) (1:200, AF2030, R&D Systems), SRY (sex determining region Y)-box 9 (SOX9) (1:500, #8260, Cell Signaling), cytochrome P450, family 17, subfamily A, polypeptide 1 (CYP17A1) (1:300, #sc-46081, Santa cruz), cleaved caspase 3 (Asp175) (1:100, #9661, Cell Signaling) and bromodeoxyuridine (BrdU) (1:100, M0744, Dako corp). Staining was done using the 3,3'-diaminobenzidine peroxidase substrate kit (Vector Laboratories). Antibodies used for immunohistochemistry are listed in Table S3.1.

3.3. Sertoli cell culture and adenoviral infection

Sertoli cells from 4 day-old *Yap*^{flox/flox}, *Wwtr1*^{flox/flox}, *Yap*^{flox/flox}, and *Wwtr1*^{flox/flox} mice were isolated as previously described [8]. After 24h of culture, cells were infected with adenoviruses to express either eGFP (Ad-eGFP) or Cre recombinase (Ad-Cre) in fresh culture medium (DMEM with 10% fetal calf serum) for 24h, and subsequently harvested for RNA or protein extraction as described below. Ad-Cre and Ad-eGFP viruses were obtained from the Baylor College of Medicine Vector Development Laboratory (Houston, Tx, USA). Preliminary experiments demonstrated that efficient infection could be obtained at an MOI of ~50 (as determined by analysis of fluorescent signal in Ad-eGFP-infected cells) and that complete Cre-mediated recombination of floxed alleles is obtained by 12h post-infection.

3.4. Transgenic mouse strains

FVB-Tg-*Amh*^{Cre8815Reb/J} mice (hereafter, *Amh*^{cre/+}) were obtained at the Jackson Laboratory and maintained crossing male heterozygotes with wild-type females (C57BL/6J). *Yap*^{flox/flox} [9] and *Wwtr1*^{flox/flox} [10] mice were obtained from Dr Eric N. Olson (UT Southwestern, Dallas, Tx) and selectively bred over several generations to obtain the *Yap*^{flox/flox}; *Wwtr1*^{flox/flox}; *Amh*^{cre/+} genotype. Genotype analyses were done on tail biopsies by PCR as previously described for YAP [9], WWTR1 [10] or Cre recombinase (Jackson laboratory Cre generic protocols). Primers used for genotype analyses are listed in Table S3.2. PCR products were analyzed by electrophoresis using a 2% agarose gel containing ethidium bromide and photographed under UV illumination.

3.5. Reverse transcription-quantitative PCR

Total RNA from cultured Sertoli cells, from testes and ovaries from 4 dpp animals and from testes from 120 dpp animals was extracted using the Total RNA Mini Kit (FroggaBio) according to the manufacturer's protocol. Total RNA (100 ng) was reverse transcribed using the SuperScriptVilo™ cDNA synthesis kit (Thermo Fisher scientific). Real-time PCR reactions were run on a CFX96 Touch instrument (Bio-Rad), using SsoAdvanced Universal SYBR Green PCR Master Mix (Bio-Rad). 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 nM) 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 ribosomal protein L19 (*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 or treated cells, and *Rpl19* was therefore deemed suitable as an internal reference gene. The specific primer sequences used are listed in Table S3.3.

3.6. Immunoblot and immunofluorescence analyses

Adenovirus-treated Sertoli cells were collected in Laemmli sample buffer containing beta-mercaptoethanol and stored at -80°C until electrophoresis. Protein extracts were resolved by one-dimensional SDS-PAGE (12% acrylamide) under reducing conditions and electrophoretically transferred to polyvinylidene difluoride membranes (GE Amersham). Membranes were probed with primary antibodies against Forkhead box L2 (FOXL2) (1:2500, F0805, Sigma), Wingless-type integration site, family member 4 (WNT4) (1:2500, AF475, R&D systems), SOX9, beta-catenin (CTNNB1), YAP and WWTR1 (all diluted 1:1000, #8260, #8480, #4912, #4883 respectively, Cell Signaling) or β -actin (ACTB) (1:10 000 dilution, sc-47778, Santa Cruz Biotechnology) diluted in Tris-buffered saline with 0.1% tween 20 containing 5% bovine serum albumin (Jackson ImmunoResearch Laboratories) or 5% dried milk. Following incubation with a horseradish peroxidase-conjugated secondary goat anti-rabbit (1:10000, WB401B, Promega) or rabbit anti-goat antibodies (1:1000, HAF017, R&D systems), protein bands were visualized by chemiluminescence, using Immobilon Western chemiluminescent horseradish peroxidase substrate (Millipore) and quantified with the ChemiDoc MP detection system and Image Lab software (Bio-Rad). For immunocytofluorescence analyses, Sertoli cells were cultured in chamber slides (Nunc™ Lab-Tek™ II; Thermo Fisher). Following adenovirus treatment, cells were fixed for 15min in 4% paraformaldehyde, incubated with a primary antibody against CTNNB1 (1:300, #8480, Cell Signaling) in PBS/0.3% Triton X-100 overnight at 4°C , and subsequently probed with a secondary Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-rabbit antibody (1:500; #A11012; Molecular Probes) for 1 h at room temperature. Slides were mounted using VectaShield with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Vector Labs).

3.7. Sertoli cell counts and seminiferous tubule diameter measurement

Sertoli cell counting and measurements of the diameter of the tubules were performed by blinded observers. Tubules that appeared either round or nearly round in transverse sections were selected randomly. SRY-box 9 (SOX9)-positive cells (i.e., Sertoli cells) were counted and the diameter of the tubules was measured at 400X magnification using ZEN software (Zen

2012 blue edition; Carl Zeiss Microscopy GmbH 2011). Data are from counts of 10 (4 days post partum, dpp) or 25 (14 dpp, 70 dpp) seminiferous tubules per testis, and 5 testes of each genotype were evaluated at each age.

3.8. Intratesticular testosterone measurement

Intratesticular testosterone levels from 70 dpp animals were determined in testicular homogenates by ELISA (IBL International). Homogenates were generated by mechanical homogenization of testes in PBS followed by sonication for 60 seconds. Homogenates were centrifuged at 10 000g for 5 minutes and the supernatants stored at -80 °C until use. Assays were performed by the Center for Research in Reproduction at the Ligand Assay and Analysis Core Laboratory of the University of Virginia.

3.9. Epididymal sperm counts

Sperm count analyses were done for 70 dpp animals as described in [11]. Briefly, cauda epididymides were placed in pre-warmed (37° C) MEM media containing BSA (3mg/ml) and epididymal ducts were opened to release their contents. The sperm suspension (500µl) was pipetted into a tube containing 2ml of PBS and placed in water bath for 1 min at 60° C to halt sperm motility, and then cooled to room temperature. After gentle mixing, 10µl of sperm suspension was loaded to each side of a hemocytometer and allowed 2 min for the spermatozoa to settle. Counting was done in duplicate and total sperm counts calculated according to guidelines described in [12].

3.10. BrdU incorporation assay

To evaluate proliferation, 4 day-old mice were injected intraperitoneally with BrdU (Sigma-Aldrich, 50 mg/kg body weight) and euthanized 4 hours after the injection. The BrdU-labeled DNA was detected by immunohistochemistry as described above. BrdU-positive cell

counting was performed by blinded observers. Tubules that appeared either round or nearly round in transverse sections were selected randomly. Data are from counts of 20 seminiferous tubules per testis, and 12 testes from *Yap*^{flox/flox};*Wwtr1*^{flox/flox};*Amh*^{cre/+} animals and 8 testes from *Yap*^{flox/flox};*Wwtr1*^{flox/flox} animals were evaluated.

3.11. Apoptosis evaluation

Cleaved caspase 3 was detected in 4 day-old mice by immunohistochemistry as described above. Cleaved caspase 3-positive cell counting was performed by blinded observers. Data are from counts of 5 different slides per testis, and 12 testes from *Yap*^{flox/flox};*Wwtr1*^{flox/flox};*Amh*^{cre/+} and 8 testes from *Yap*^{flox/flox};*Wwtr1*^{flox/flox} animals were evaluated.

3.12. Statistical analyses

All statistical analyses were performed with Prism software version 6.0d (GraphPad Software Inc.). Student's T-test was used to determine effects of genotype in the data shown in all Figs except for Figs 3A-C, for which two-way ANOVA was used to determine effects of time and genotype. All the data sets were subjected to the *F* test to determine the equality of variances prior to statistical testing. Means were considered significantly different when $P < 0.05$.

4. Results

4.1. Expression of YAP and WWTR1 in the mouse testis

In order to evaluate the expression pattern of YAP and WWTR1 in the testis, immunohistochemistry analyses were done on testes of immature (4 dpp) and young mature (70 dpp) mice. In testes of immature animals, both YAP and WWTR1 were strongly detected in the cytoplasm and the nucleus of Sertoli cells (Fig. 3.1A, B), as well as in the nucleus of the

peritubular cells and in the cytoplasm and nucleus of some interstitial cells (Fig.1A, B). YAP was also detected in prospermatogonia but its expression seemed to be limited to the nucleoli in these cells (Fig. 3.1A). Weak expression of WWTR1 was also detected in the cytoplasm and nucleus of some prospermatogonia (Fig. 3.1B). The identity of the cells expressing YAP and WWTR1 was confirmed by comparing their expression patterns to those of the Sertoli cell marker SOX9 (Fig. 3.1C), the germ cell marker DDX4 (Fig. 3.1D) and the Leydig cell marker CYP17A1 (Fig. 3.1E). In mature mice, YAP expression was strongly detected in the nucleus and the cytoplasm of the Sertoli cells and in the nucleus of the spermatogonia (Fig. 3.2A, B). YAP was also detected in the Leydig cells and in endothelial cells (Fig. 3.2A, B). WWTR1 expression was absent or barely detectable in Sertoli cells of mature animals (Fig. 3.2C, D), but was expressed in the Leydig cells, endothelial cells and in the perinuclear region of spermatocytes and round spermatids (Fig. 3.2C, D). The perinuclear pattern of WWTR1 expression was similar to that of the chromatoid body marker DDX4 (Fig. 3.2E, F), suggesting that WWTR1 localizes to the chromatoid bodies in spermatids. Immunohistochemistry for SOX9 (Fig. 3.2G) and CYP17A1 (Fig. 3.2H) were also done as markers for the Sertoli and Leydig cell populations. Together, these results indicate that YAP and WWTR1 could be involved in Sertoli cell proliferation and differentiation during postnatal development, and that YAP could also be of importance for Sertoli cell function in adulthood.

4.2. YAP and WWTR1 regulate Sertoli cell differentiation *in vitro*

YAP has been shown to regulate the transcription of *Sox9* [13-15] and Wilms tumor 1 (*Wt1*) [16], two genes that play critical roles in the maturation of Sertoli cells [17, 18], in non-testicular cell types. We therefore sought to determine if YAP and WWTR1 could affect Sertoli cell differentiation. To do this, we first isolated Sertoli cells from 4 dpp *Yap*^{flox/flox}; *Wwtr1*^{flox/flox} animals, an age at which we detected strong nuclear expression of YAP and WWTR1 (Fig. 3.1). Sertoli cells were put in culture and infected for 24h with adenoviruses to induce the expression of either Cre recombinase (Ad-Cre) or eGFP (Ad-eGFP, control).

A $\approx 80\%$ decrease in both *Yap* and *Wwtr1* mRNA levels (Fig. S3.1A) as well as a robust decrease in YAP (Fig. S3.1B) and WWTR1 (Fig. S3.1C) protein levels was obtained in the cells treated with Ad-Cre. We then evaluated the mRNA levels of *Sox9* and *Wt1*, along with the male differentiation-associated genes desert hedgehog (*Dhh*), doublesex and mab-3 related transcription factor 1 (*Dmrt1*), Fibroblast growth factor 9 (*Fgf9*) and glutathione S-transferase, mu 6 (*Gstm6*) and the female differentiation-associated genes *Foxl2*, R-spondin homolog (*Rspo1*) and *Wnt4*. *Dhh*, *Dmrt1*, *Sox9* and *Wt1* mRNA levels decreased in the Ad-Cre treated cells, while the expression levels of the female markers *Foxl2*, *Rspo1* and *Wnt4* increased (Fig. 3.3A). The expression of the SOX9 target genes *Fgf9* and *Gstm6* were unchanged despite decreased *Sox9* expression, suggesting either that a reduction of $\approx 50\%$ in its expression is not sufficient to affect the expression of these genes, or the occurrence of compensatory mechanisms. Immunoblot analyses of SOX9, FOXL2 and WNT4 expression following Ad-Cre treatment showed changes for each protein that mirrored those that occurred at the mRNA level (Fig. 3.3B-D). These results suggest that YAP and WWTR1 play a role in the differentiation of immature Sertoli cells.

To determine the relative contribution of YAP or WWTR1 loss to the Sertoli cell gene expression defects observed in Fig. 3.3, the experiment was repeated using Sertoli cells from *Yap*^{flox/flox} and *Wwtr1*^{flox/flox} mice. Whereas the targeting of *Yap* alone resulted in changes in *Sox9* and *Wnt4* expression (Fig. S3.2A) and the knockdown of *Wwtr1* expression resulted in changes in *Dmrt1*, *Sox9*, *Wt1* and *Wnt4* (Fig. S3.2B), in both cases the observed effects were generally more modest than when *Yap* and *Wwtr1* were targeted concomitantly (Fig. 3.3A). *Yap* and *Wwtr1* are therefore functionally redundant in the Sertoli cells of immature mice, as neither is capable of fully compensating for the loss of the other.

4.3. CTNNB1 is not involved in the abnormal Sertoli cell differentiation caused by the deletion of *Yap* and *Wwtr1*

CTNNB1 (β -catenin) is a key effector of the canonical WNT signaling pathway, and is thought to be involved in the process of female sex determination [19-21]. Notably, the expression of a stabilized form of CTNNB1 in Sertoli cells was shown to induce an increase in

Wnt4 levels and a decrease in *Sox9* and *Wtl* levels, leading to transdifferentiation [8]. As it was recently shown that YAP and WWTR1 can regulate canonical WNT signaling by promoting the degradation of CTNNB1 [22], we sought to determine if the loss of YAP and WWTR1 affected the differentiation of the Sertoli cells through stabilization of CTNNB1. CTNNB1 expression was examined in Ad-Cre infected *Yap*^{flox/flox};*Wwtr1*^{flox/flox} Sertoli cells by immunofluorescence and immunoblot. Unexpectedly, CTNNB1 expression was detected at the intercellular junctions, but was absent from the nucleus in both Ad-Cre and Ad-eGFP infected cells (Fig. 3.4A), and its overall expression was significantly decreased by Ad-Cre treatment (Fig. 3.4B). Likewise, the mRNA levels of the CTNNB1 target genes *Axin2* and follistatin (*Fst*) were not increased by Ad-Cre treatment, and in fact *Fst* levels decreased significantly (Fig. 3.4C). These results suggest that the changes observed in the expression of the sex determining genes following the loss of YAP/WWTR1 in Sertoli cells do not result from increased canonical WNT signaling.

4.4. YAP and WWTR1 expression is reduced in the Sertoli cells of

Yap^{flox/flox};*Wwtr1*^{flox/flox};*Amh*^{cre/+} mice

To determine if the loss of YAP and WWTR1 could also affect differentiation of the Sertoli cells *in vivo*, we generated a Sertoli cell-specific conditional knockout model of *Yap* and *Wwtr1* (*Yap*^{flox/flox};*Wwtr1*^{flox/flox};*Amh*^{cre/+}). To evaluate the efficiency of Cre-mediated recombination, testes from 4 dpp *Yap*^{flox/flox};*Wwtr1*^{flox/flox};*Amh*^{cre/+} and control *Yap*^{flox/flox};*Wwtr1*^{flox/flox} mice were isolated, and recombination of the floxed alleles was evaluated by PCR analysis of genomic DNA. A PCR product representing the Cre-recombined *Yap* and *Wwtr1* floxed alleles was detected in the samples from *Yap*^{flox/flox};*Wwtr1*^{flox/flox};*Amh*^{cre/+} mice (Fig. 3.5A). Consistent with this result, RT-qPCR analyses showed significant decreases in *Yap* and *Wwtr1* mRNA levels (73% and 69%, respectively) in the testes of 4 dpp animals (Fig. 3.5B). Finally, immunohistochemistry analyses of testes from 4 dpp *Yap*^{flox/flox};*Wwtr1*^{flox/flox};*Amh*^{cre/+} animals clearly showed the loss of YAP (Fig. 3.5C, D; Fig. S3.3A, B) and WWTR1 (Fig. 3.5E, F; Fig. S3.3C, D) expression in the majority of the Sertoli cells. Despite the loss of expression of YAP in the cytoplasm and

the nucleus of the Sertoli cells, YAP immunostaining was still visible in Sertoli cells nucleoli (Fig. 3.5D; Fig. S3.3B), suggesting that YAP nucleolar staining in the Sertoli cells (and possibly in the prospermatogonia, Fig. 3.1A, 3.5C, D) is artefactual. Downregulation of YAP (Fig. S3.4A-D) and phospho-YAP (Fig. S3.4E, F) expression in Sertoli cells was also observed by immunohistochemistry in testes from 70 dpp *Yap*^{flox/flox};*Wwtr1*^{flox/flox};*Amh*^{cre/+} animals. Expression of WWTR1 was essentially undetectable in Sertoli cells of both control and mutant animals at this age (Fig. S3.5A-D). Taken together, these results indicate that disruption of *Yap* and *Wwtr1* was obtained in the Sertoli cells of *Yap*^{flox/flox};*Wwtr1*^{flox/flox};*Amh*^{cre/+} mice.

4.5. YAP and WWTR1 loss does not induce sex reversal in

Yap^{flox/flox};*Wwtr1*^{flox/flox};*Amh*^{cre/+} mice

Expression of male- and female-related genes were evaluated by RT-qPCR in the testes of 4 dpp *Yap*^{flox/flox};*Wwtr1*^{flox/flox};*Amh*^{cre/+} mice. A statistically significant decrease in the mRNA levels of *Dhh*, *Dmrt1* and *Sox9* (Fig. 3.6A) and a significant increase in *Wnt4* mRNA levels (Fig. 3.6B) were observed in the mutant testes relative to controls, but the expression of *Fgf9*, *Gstm6*, *Wt1*, *Foxl2*, *Fst* and *Rspo1* was not affected (Fig. 3.6A, B). Although *Wnt4* mRNA levels increased in the testes of *Yap*^{flox/flox};*Wwtr1*^{flox/flox};*Amh*^{cre/+} mice, its expression nonetheless remained very low relative to its expression in the ovaries of 4 dpp animals (Fig. 3.6B). Sex-related gene expression levels were also evaluated in the testes of mature animals, but no differences were observed in the in mutant vs control groups (Fig. 3.6C). Taken together, these results suggest that the effects of YAP and WWTR1 loss *in vivo* are transient and less pronounced than those observed *in vitro*, and do not result in phenotypic sex reversal.

4.6. Decreased testis weights and Sertoli cells numbers in

Yap^{flox/flox};*Wwtr1*^{flox/flox};*Amh*^{cre/+} mice

To further characterize the *Yap*^{flox/flox};*Wwtr1*^{flox/flox};*Amh*^{cre/+} phenotype, numerous endpoints were evaluated including testis:body weight ratio, numbers of Sertoli cells/tubule,

the diameter of the seminiferous tubules and epididymal sperm counts. A statistically significant decrease in the testis:body weight ratio was observed in mutant animals at 14 and 70 dpp (Fig. 3.7A), which was accompanied by slight decreases in numbers of Sertoli cells (SOX9-positive cells) per tubule (Fig. 3.7B, Fig. S3.6) and in the diameter of the tubules (Fig. 3.7C). However, no morphological defects of the seminiferous tubules were observed in the mutant animals (Fig. S3.7A, B), and no statistically significant differences were observed in the epididymal sperm numbers (Fig. S3.7C) and sperm density (Fig. S3.7D). Finally, the breeding performance of the *Yap*^{flox/flox}; *Wwtr1*^{flox/flox}; *Amh*^{cre/+} males was also similar to that of controls in terms of pups/litter and numbers of litters produced over an 8 month period (Table 3.1).

As *Dhh* expression was downregulated in the 4 dpp mutant animals, we sought to determine if an alteration in the function of the Leydig cells might have caused the decrease in testicular weight. Intratesticular testosterone levels in 70 dpp mutant animals were comparable to controls (Fig. S3.8A), as were mRNA levels of the Leydig cells markers cytochrome P450, family 17, subfamily a, polypeptide 1 (*Cyp17a1*), steroidogenic acute regulatory protein (*Star*) and glioma-associated oncogene homolog 1 (*Gli1*) at 4 dpp (Fig. S3.8B) and 70 dpp (Fig. S3.8C). This suggested that Leydig cell function was normal in the *Yap*^{flox/flox}; *Wwtr1*^{flox/flox}; *Amh*^{cre/+} model.

To further determine if altered proliferation or apoptosis could underlie the decreased testicular weight in *Yap*^{flox/flox}; *Wwtr1*^{flox/flox}; *Amh*^{cre/+} mice, BrdU incorporation and cleaved caspase 3 immunohistochemistry analyses were performed on testes from 4 dpp mice. No difference in the numbers of proliferating Sertoli cells were found in *Yap*^{flox/flox}; *Wwtr1*^{flox/flox}; *Nr5a1*^{cre/+} mice relative to controls (Fig. 3.8A, Fig. S3.9A, B). However, a ≈ 3.5 -fold increase in cleaved caspase 3-positive cells was detected in the seminiferous tubules of *Yap*^{flox/flox}; *Wwtr1*^{flox/flox}; *Nr5a1*^{cre/+} mice (Fig. 3.8B, Fig. S3.9B, C), suggesting that the deletion of YAP and WWTR1 compromises the survival of some Sertoli cells, and that YAP and WWTR1 are required for the maintenance of a normal-sized Sertoli cell population during the early postnatal period.

5. Discussion

In mammals, progenitors of Sertoli and granulosa cells are bipotential and are capable of adopting either the male or female fate [23]. When the Y-linked mammalian sex-determining factor (SRY) is expressed in the gonad, it activates SOX9 expression which initiates male differentiation [24]. In absence of SRY, SOX9 expression is not established and the RSPO1/WNT4/CTNNB1 signaling pathway and FOXL2 are activated and cooperate to induce ovarian development [25]. Inactivation of these genes leads to sex reversal [17, 26-29]. Despite early commitment, sexual fate must be maintained throughout life, as deregulation of antagonistic factors SOX9/SOX8 vs RSPO1/WNT4/CTNNB1 and DMRT1 vs FOXL2 in postnatal Sertoli or granulosa cells leads to their transdifferentiation [8, 30-33]. Here, we report for the first time that YAP and WWTR1 contribute to the differentiation of the Sertoli cells, identifying Hippo signaling as a novel pathway able to modulate the expression of sex-related genes.

The deletion of *Yap* and *Wwtr1* in Sertoli cells in both our *in vitro* and *in vivo* models showed that YAP/WWTR1 are required for the proper expression of sex determining genes. Findings in other systems suggested that the association of YAP/WWTR1 with the CTNNB1 destruction complex is required for the degradation of CTNNB1 [22, 34], suggesting that YAP/WWTR1 loss could lead to increased expression of CTNNB1 in Sertoli cells. However, our preliminary investigation suggests that YAP/WWTR1-mediated destabilization of CTNNB1 is not a major mechanism of YAP/WWTR1 action in Sertoli cells. This result is in line with recent findings that demonstrate that YAP/WWTR1 and CTNNB1 are not necessarily codependent for their degradation [35]. Another mechanism by which YAP/WWTR1 could alter the expression of target genes is by binding transcription factors on their promoters and serving as transcriptional co-regulators. Importantly, both *Sox9* and *Wtl* are known direct transcriptional targets of YAP in non-gonadal cells. YAP is able to regulate the expression of *Sox9* in a negative [14] or a positive [13, 15] manner according to cell type. For instance, a TEA domain family member (TEAD) transcription factor binding site in the *Sox9* proximal promoter was shown to be necessary for YAP-mediated induction of *Sox9* expression in HEK293 cells [13], suggesting that YAP regulates *Sox9* expression at the transcriptional level by binding to TEADs [13]. YAP and WWTR1 control epicardial cell fate

by regulating *Wtl* expression [16], and YAP strongly activates *Wtl* promoter activity in HEK293 cells, also via TEAD binding sequences present in the first 2kb of the *Wtl* promoter [16]. Whether Hippo signaling regulates *Sox9* and *Wtl* in a similar fashion in Sertoli cells is certainly possible, but remains to be determined. Likewise, YAP and WWTR1 could also directly (or indirectly) suppress the transcription of genes involved in female sex differentiation, and their up-regulation observed in the *in vitro* model may be the consequence of the loss of this suppression.

Changes in the expression levels of sex-related genes were more pronounced in the *in vitro* model relative to the *in vivo* model. This could simply be due to greater efficiency of Cre-mediated recombination *in vitro*. We were not able to successfully double label for YAP and WWTR1 in the testes, and therefore the proportion of Sertoli cells in which both *Yap* and *Wwtr1* were deleted in the *Yap*^{flox/flox};*Wwtr1*^{flox/flox};*Amh*^{cre/+} model is not known. Another possibility is that paracrine signals from adjacent cells could have mitigated the effects of the loss of YAP and WWTR1 *in vivo*. The absence of such paracrine signals *in vitro* could explain why cultured Sertoli cells are more affected by the loss of *Yap* and *Wwtr1*. Further experiments will be required to test these hypotheses.

Although changes in sex-determining gene expression were observed in the testes of 4 dpp *Yap*^{flox/flox};*Wwtr1*^{flox/flox};*Amh*^{cre/+} mice, no such changes were observed in older animals. This discrepancy could be explained in two ways. First, the changes in the expression of sex-determining genes observed in the testes of 4 dpp mutants might not be sufficient to tip the differentiation of the Sertoli cells toward a granulosa cell fate and compensatory mechanisms (cell-autonomous and/or paracrine signals) may activate later in postnatal development in order to re-establish normal expression levels of sex-related genes. Second, Sertoli cells undergoing more extensive transdifferentiation might be lost by apoptosis throughout pre- and postnatal development. Loss of *Yap* and *Wwtr1* has previously been associated with apoptosis in other cell types [36-40]. Furthermore, an increase in apoptosis was observed in the seminiferous tubules of 4 dpp *Yap*^{flox/flox};*Wwtr1*^{flox/flox};*Amh*^{cre/+} mice. Sertoli cells in which *Yap/Wwtr1* were knocked out may therefore have been progressively lost in favor of Sertoli cells in which Cre-mediated recombination was inefficient. The increased apoptosis in the seminiferous tubules of 4 dpp mutant animals also provides a likely explanation for the

decrease in Sertoli cell numbers, testis weight and seminiferous tubule diameters observed in 14 dpp and 70 dpp *Yap*^{flox/flox}; *Wwtr1*^{flox/flox}; *Amh*^{cre/+} mice.

Beyond the Sertoli cells, our descriptive analyses of testicular YAP and WWTR1 expression detected both of these proteins in the Leydig and germ cells. Both YAP and WWTR1 were expressed in the nucleus of peritubular cells where presumptive adult Leydig stem cells reside in immature mice. YAP and WWTR1 were also detected in the Leydig cells of mature mice, suggesting that Hippo signaling may have a role throughout Leydig cell development. In germ cells, YAP was expressed in the spermatogonia in mature animals, whereas WWTR1 was expressed in prospermatogonia in immature animals and in spermatocytes, round spermatids and elongating spermatids in mature animals, again suggesting different roles for YAP and WWTR1 in germ cell maturation. Interestingly, WWTR1 expression was detected in the perinuclear region of the germ cells in a pattern similar to that of DDX4 (VASA), suggesting that WWTR1 is a component of the chromatoid bodies [41], which are highly specialized structures involved in RNA storage and in microRNA processing [42]. It has been shown that YAP and WWTR1 can regulate the chromatoid body component DICER1 [43, 44], as well as *Let7* [43], a microRNA that also regulates *Dicer1* levels [45]. The elucidation of the roles of YAP and WWTR1 in germ cell functions such as microRNA processing will require further studies.

In summary, this study reports a novel role for *Yap/Wwtr1* in Sertoli cell differentiation. In their absence, commitment of the Sertoli cells to the male pathway is compromised at the gene expression level, but not to an extent sufficient to cause transdifferentiation or sex reversal. Additional studies will be required to elucidate the mechanisms of YAP and WWTR1 action in Sertoli cells, and to define the roles of Hippo signaling in Leydig and germ cells.

6. Acknowledgments

We thank Dr Eric N. Olsen (UT Southwestern, Dallas, Texas) for generously providing the *Yap*^{flox/flox} and *Wwtr1*^{flox/flox} mice. We also thank Drs Mayra Tsoi and Philippe Godin for *Yap*^{flox/flox} and *Wwtr1*^{flox/flox} mouse colony management.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

7. References

1. Gomez M, Gomez V, Hergovich A. The Hippo pathway in disease and therapy: cancer and beyond. *Clin Transl Med* 2014; 3:22.
2. Varelas X. The Hippo pathway effectors TAZ and YAP in development, homeostasis and disease. *Development* 2014; 141:1614-1626.
3. Piccolo S, Dupont S, Cordenonsi M. The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond. *Physiol Rev* 2014; 94:1287-1312.
4. Morin-Kensicki EM, Boone BN, Howell M, Stonebraker JR, Teed J, Alb JG, Magnuson TR, O'Neal W, Milgram SL. Defects in yolk sac vasculogenesis, chorioallantoic fusion, and embryonic axis elongation in mice with targeted disruption of *Yap65*. *Mol Cell Biol* 2006; 26:77-87.
5. McPherson JP, Tamblyn L, Elia A, Migon E, Shehabeldin A, Matysiak-Zablocki E, Lemmers B, Salmena L, Hakem A, Fish J, Kassam F, Squire J, et al. *Lats2/Kpm* is required for embryonic development, proliferation control and genomic integrity. *Embo j* 2004; 23:3677-3688.

6. St John MA, Tao W, Fei X, Fukumoto R, Carcangiu ML, Brownstein DG, Parlow AF, McGrath J, Xu T. Mice deficient of Lats1 develop soft-tissue sarcomas, ovarian tumours and pituitary dysfunction. *Nat Genet* 1999; 21:182-186.
7. Hossain Z, Ali SM, Ko HL, Xu J, Ng CP, Guo K, Qi Z, Ponniah S, Hong W, Hunziker W. Glomerulocystic kidney disease in mice with a targeted inactivation of Wwtr1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104:1631-1636.
8. Boyer A, Yeh JR, Zhang X, Paquet M, Gaudin A, Nagano MC, Boerboom D. CTNNB1 signaling in sertoli cells downregulates spermatogonial stem cell activity via WNT4. *PLoS One* 2012; 7:e29764.
9. Xin M, Kim Y, Sutherland LB, Qi X, McAnally J, Schwartz RJ, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN. Regulation of insulin-like growth factor signaling by Yap governs cardiomyocyte proliferation and embryonic heart size. *Sci Signal* 2011; 4:ra70.
10. Xin M, Kim Y, Sutherland LB, Murakami M, Qi X, McAnally J, Porrello ER, Mahmoud AI, Tan W, Shelton JM, Richardson JA, Sadek HA, et al. Hippo pathway effector Yap promotes cardiac regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110:13839-13844.
11. Boyer A, Girard M, Thimmanahalli DS, Levasseur A, Celeste C, Paquet M, Duggavathi R, Boerboom D. mTOR Regulates Gap Junction Alpha-1 Protein Trafficking in Sertoli Cells and Is Required for the Maintenance of Spermatogenesis in Mice. *Biol Reprod* 2016; 95:13.
12. Wang Y. Epididymal sperm count. *Curr Protoc Toxicol* 2003; Chapter 16:Unit16.16.

13. Song S, Ajani JA, Honjo S, Maru DM, Chen Q, Scott AW, Heallen TR, Xiao L, Hofstetter WL, Weston B, Lee JH, Wadhwa R, et al. Hippo coactivator YAP1 upregulates SOX9 and endows esophageal cancer cells with stem-like properties. *Cancer Res* 2014; 74:4170-4182.
14. Zhong W, Li Y, Li L, Zhang W, Wang S, Zheng X. YAP-mediated regulation of the chondrogenic phenotype in response to matrix elasticity. *J Mol Histol* 2013; 44:587-595.
15. Chen Q, Song S, Wei S, Liu B, Honjo S, Scott A, Jin J, Ma L, Zhu H, Skinner HD, Johnson RL, Ajani JA. ABT-263 induces apoptosis and synergizes with chemotherapy by targeting stemness pathways in esophageal cancer. *Oncotarget* 2015; 6:25883-25896.
16. Singh A, Ramesh S, Cibi DM, Yun LS, Li J, Li L, Manderfield LJ, Olson EN, Epstein JA, Singh MK. Hippo Signaling Mediators Yap and Taz Are Required in the Epicardium for Coronary Vasculature Development. *Cell Rep* 2016; 15:1384-1393.
17. Barrionuevo F, Bagheri-Fam S, Klattig J, Kist R, Taketo MM, Englert C, Scherer G. Homozygous inactivation of Sox9 causes complete XY sex reversal in mice. *Biol Reprod* 2006; 74:195-201.
18. Gao F, Maiti S, Alam N, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, Lecureuil C, Guillou F, Huff V. The Wilms tumor gene, *Wt1*, is required for Sox9 expression and maintenance of tubular architecture in the developing testis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:11987-11992.

19. Chassot AA, Gillot I, Chaboissier MC. R-spondin1, WNT4, and the CTNNB1 signaling pathway: strict control over ovarian differentiation. *Reproduction* 2014; 148:R97-110.
20. Liu CF, Bingham N, Parker K, Yao HH. Sex-specific roles of beta-catenin in mouse gonadal development. *Hum Mol Genet* 2009; 18:405-417.
21. Maatouk DM, DiNapoli L, Alvers A, Parker KL, Taketo MM, Capel B. Stabilization of beta-catenin in XY gonads causes male-to-female sex-reversal. *Hum Mol Genet* 2008; 17:2949-2955.
22. Azzolin L, Panciera T, Soligo S, Enzo E, Bicciato S, Dupont S, Bresolin S, Frasson C, Basso G, Guzzardo V, Fassina A, Cordenonsi M, et al. YAP/TAZ incorporation in the beta-catenin destruction complex orchestrates the Wnt response. *Cell* 2014; 158:157-170.
23. Lin YT, Capel B. Cell fate commitment during mammalian sex determination. *Curr Opin Genet Dev* 2015; 32:144-152.
24. Sekido R, Bar I, Narvaez V, Penny G, Lovell-Badge R. SOX9 is up-regulated by the transient expression of SRY specifically in Sertoli cell precursors. *Dev Biol* 2004; 274:271-279.
25. Pannetier M, Chassot AA, Chaboissier MC, Pailhoux E. Involvement of FOXL2 and RSPO1 in Ovarian Determination, Development, and Maintenance in Mammals. *Sex Dev* 2016.
26. Chaboissier MC, Kobayashi A, Vidal VI, Lutzkendorf S, van de Kant HJ, Wegner M, de Rooij DG, Behringer RR, Schedl A. Functional analysis of Sox8 and Sox9 during sex determination in the mouse. *Development* 2004; 131:1891-1901.

27. Barrionuevo F, Georg I, Scherthan H, Lecureuil C, Guillou F, Wegner M, Scherer G. Testis cord differentiation after the sex determination stage is independent of Sox9 but fails in the combined absence of Sox9 and Sox8. *Dev Biol* 2009; 327:301-312.
28. Vainio S, Heikkila M, Kispert A, Chin N, McMahon AP. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* 1999; 397:405-409.
29. Parma P, Radi O, Vidal V, Chaboissier MC, Dellambra E, Valentini S, Guerra L, Schedl A, Camerino G. R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nat Genet* 2006; 38:1304-1309.
30. Barrionuevo FJ, Hurtado A, Kim GJ, Real FM, Bakkali M, Kopp JL, Sander M, Scherer G, Burgos M, Jimenez R. Sox9 and Sox8 protect the adult testis from male-to-female genetic reprogramming and complete degeneration. *Elife* 2016; 5.
31. Matson CK, Murphy MW, Sarver AL, Griswold MD, Bardwell VJ, Zarkower D. DMRT1 prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis. *Nature* 2011; 476:101-104.
32. Lindeman RE, Gearhart MD, Minkina A, Krentz AD, Bardwell VJ, Zarkower D. Sexual cell-fate reprogramming in the ovary by DMRT1. *Curr Biol* 2015; 25:764-771.
33. Uhlenhaut NH, Jakob S, Anlag K, Eisenberger T, Sekido R, Kress J, Treier AC, Klugmann C, Klasen C, Holter NI, Riethmacher D, Schutz G, et al. Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation. *Cell* 2009; 139:1130-1142.
34. Azzolin L, Zanconato F, Bresolin S, Forcato M, Basso G, Bicciato S, Cordenonsi M, Piccolo S. Role of TAZ as mediator of Wnt signaling. *Cell* 2012; 151:1443-1456.

35. Cai J, Maitra A, Anders RA, Taketo MM, Pan D. beta-Catenin destruction complex-independent regulation of Hippo-YAP signaling by APC in intestinal tumorigenesis. *Genes Dev* 2015; 29:1493-1506.
36. Wang S, Ma K, Chen L, Zhu H, Liang S, Liu M, Xu N. TAZ promotes cell growth and inhibits Celestrol-induced cell apoptosis. *Biosci Rep* 2016; 36.
37. Vigneron AM, Ludwig RL, Vousden KH. Cytoplasmic ASPP1 inhibits apoptosis through the control of YAP. *Genes Dev* 2010; 24:2430-2439.
38. Ikon N, Su B, Hsu FF, Forte TM, Ryan RO. Exogenous cardiolipin localizes to mitochondria and prevents TAZ knockdown-induced apoptosis in myeloid progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 464:580-585.
39. Deng Y, Matsui Y, Pan W, Li Q, Lai ZC. Yap1 plays a protective role in suppressing free fatty acid-induced apoptosis and promoting beta-cell survival. *Protein Cell* 2016; 7:362-372.
40. Cao JJ, Zhao XM, Wang DL, Chen KH, Sheng X, Li WB, Li MC, Liu WJ, He J. YAP is overexpressed in clear cell renal cell carcinoma and its knockdown reduces cell proliferation and induces cell cycle arrest and apoptosis. *Oncol Rep* 2014; 32:1594-1600.
41. Onohara Y, Fujiwara T, Yasukochi T, Himeno M, Yokota S. Localization of mouse vasa homolog protein in chromatoid body and related nuage structures of mammalian spermatogenic cells during spermatogenesis. *Histochem Cell Biol* 2010; 133:627-639.
42. Kotaja N, Sassone-Corsi P. The chromatoid body: a germ-cell-specific RNA-processing centre. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8:85-90.

43. Chaulk SG, Lattanzi VJ, Hiemer SE, Fahlman RP, Varelas X. The Hippo pathway effectors TAZ/YAP regulate dicer expression and microRNA biogenesis through Let-7. *J Biol Chem* 2014; 289:1886-1891.
44. Kotaja N, Bhattacharyya SN, Jaskiewicz L, Kimmins S, Parvinen M, Filipowicz W, Sassone-Corsi P. The chromatoid body of male germ cells: similarity with processing bodies and presence of Dicer and microRNA pathway components. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:2647-2652.
45. Tokumaru S, Suzuki M, Yamada H, Nagino M, Takahashi T. let-7 regulates Dicer expression and constitutes a negative feedback loop. *Carcinogenesis* 2008; 29:2073-2077.

8. Figures

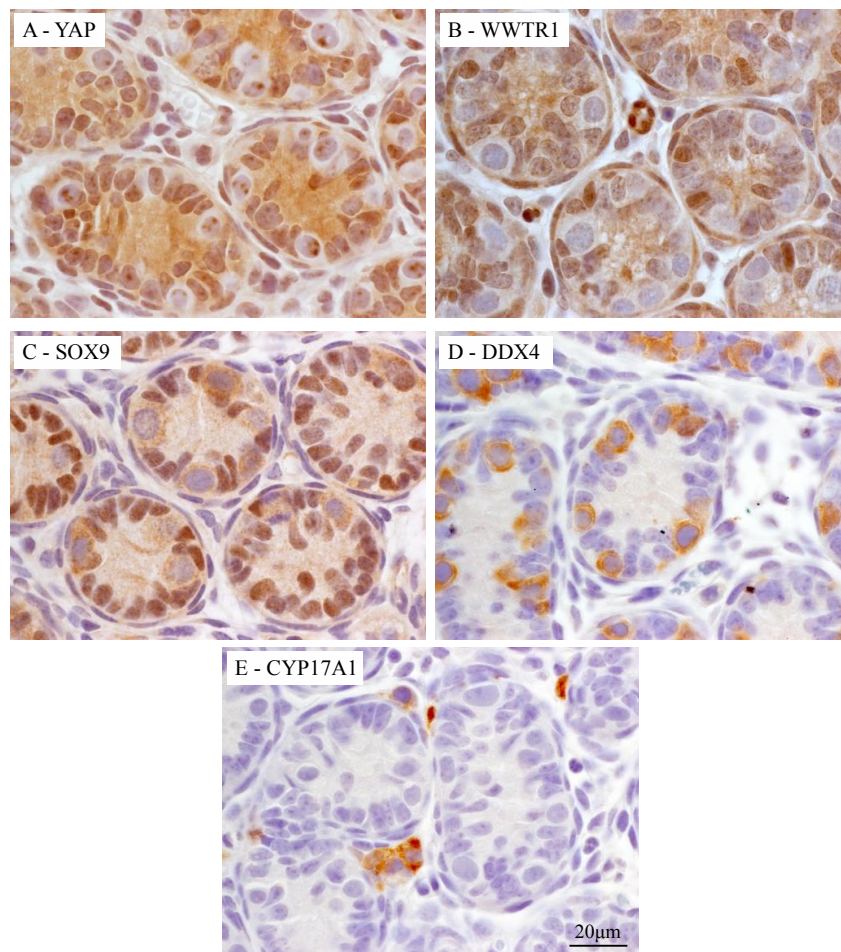


Figure 3.1 : Localization of YAP and WWTR1 in the testes of immature mice.

Immunohistochemical analysis of YAP (A) and WWTR1 (B) in testes from 4 dpp $Yap^{flox/flox}; Wwtr1^{flox/flox}$ mice. Immunohistochemical analysis of SOX9 (C), DDX4 (D) and CYP17A1 (E) in testes from 4 dpp mice (respectively used as markers of Sertoli cells, germ cells and Leydig cells) Scale bar in (E) is valid for all images.

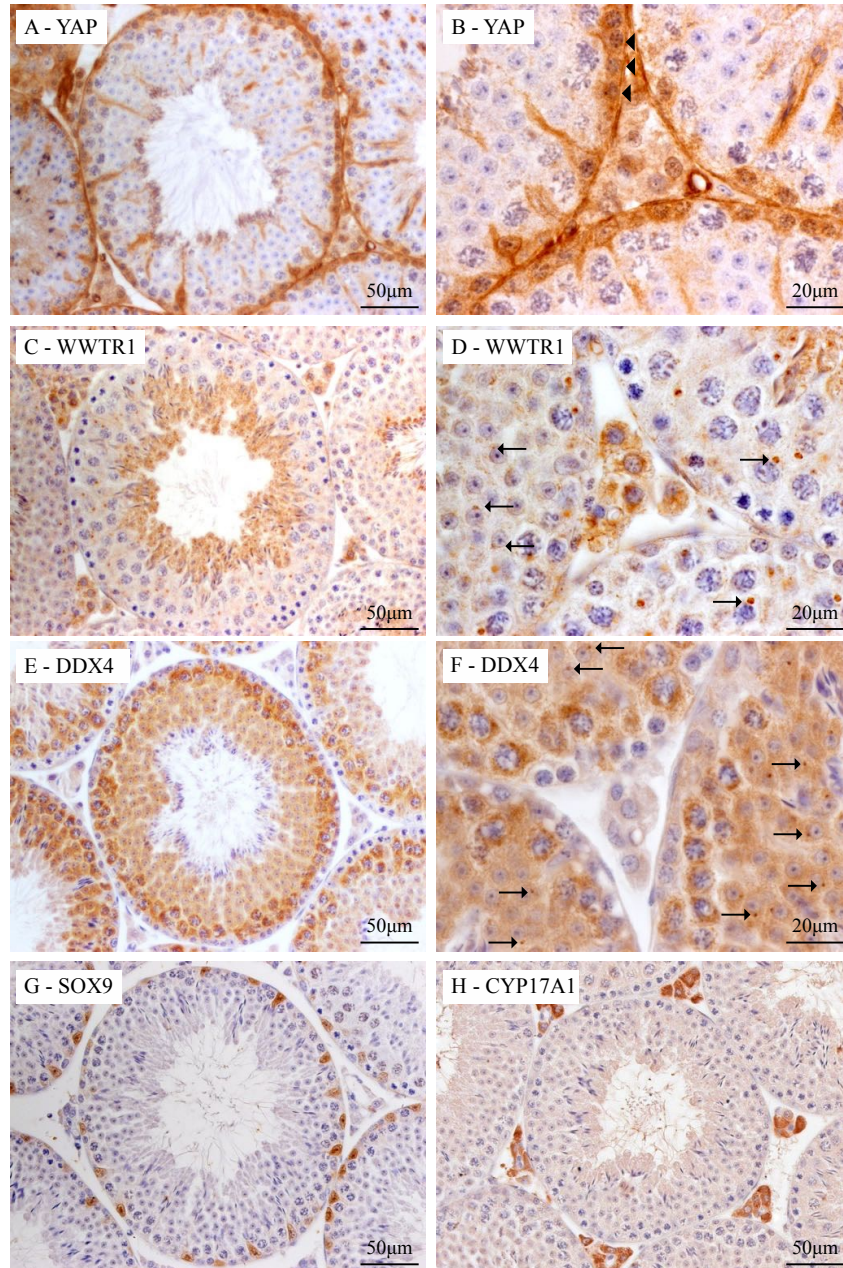


Figure 3.2 : Localization of YAP and WWTR1 in the testes of mature mice.

Immunohistochemical analysis of YAP (A, B) and WWTR1 (C, D) in testes from 70 dpp *Yap*^{flox/flox}; *Wwtr1*^{flox/flox} mice. Immunohistochemical analysis of DDX4 (E, F), SOX9 (G) and CYP17A1 (H) in testes from 70 dpp mice (respectively used as markers of germ cells/chromatoid bodies, Sertoli cells and Leydig cells). Arrows = chromatoid bodies. Arrowheads = spermatogonia.

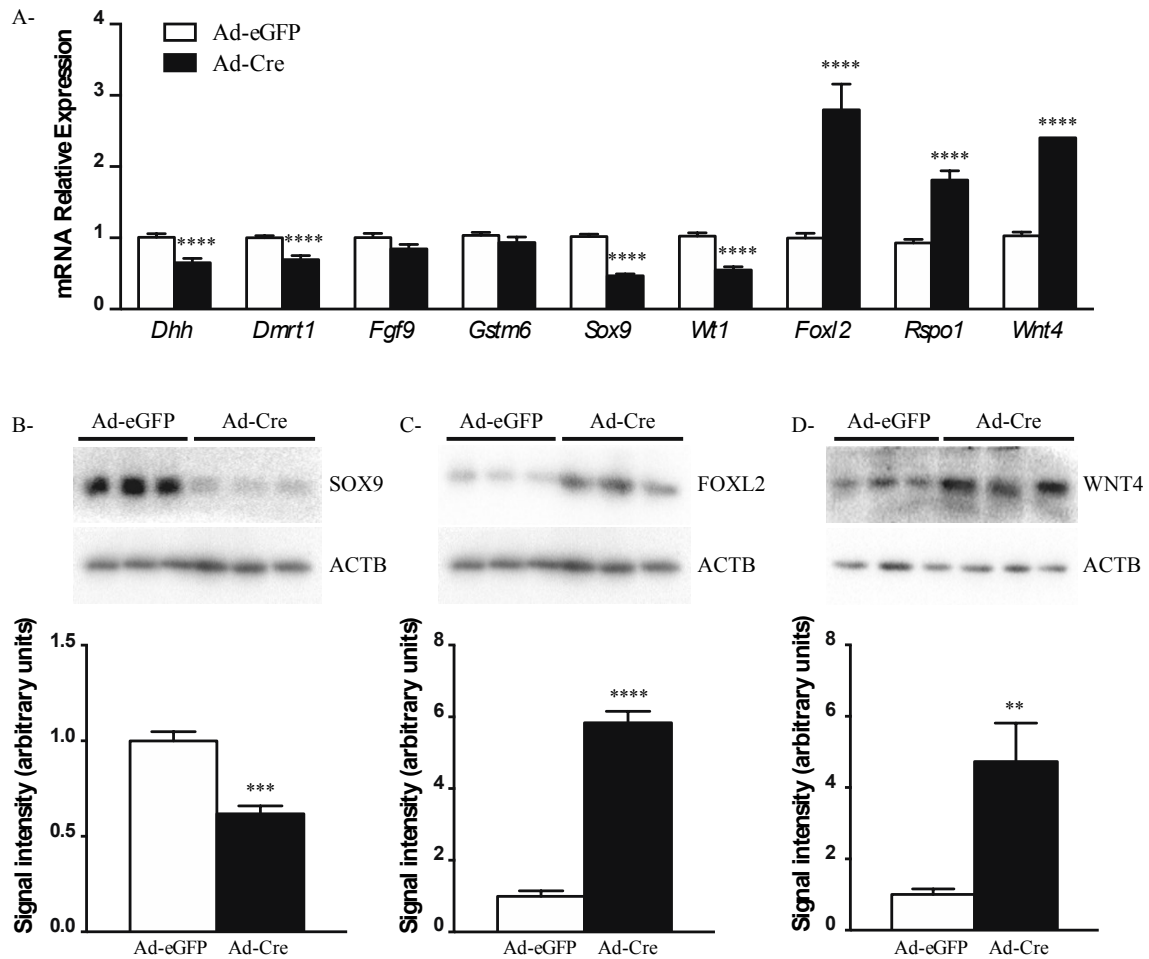


Figure 3.3 : YAP and WWTR1 regulate Sertoli cell differentiation in a primary Sertoli cell culture model.

A) RT-qPCR analysis of sex differentiation-related genes performed on cultured primary Sertoli cells isolated from 4 dpp *Yap*^{flx/flx}; *Wwtr1*^{flx/flx} mice treated with Ad-eGFP (control) or Ad-Cre adenovirus. n=5 samples/treatment, performed in triplicate. **B-D)** Representative immunoblot analysis of SOX9 (**B**), FOXL2 (**C**) and WNT4 (**D**) performed on *Yap*^{flx/flx}; *Wwtr1*^{flx/flx} Sertoli cells treated as in (**A**). n=3 samples/treatment, performed in triplicate. Data were normalized to the housekeeping gene *Rpl19* (RT-qPCR) or ACTB (immunoblot) and are expressed as mean (columns) ± SEM (error bars). Asterisks = Significantly different from control (** P < 0.01; *** P < 0.001; **** P < 0.0001).

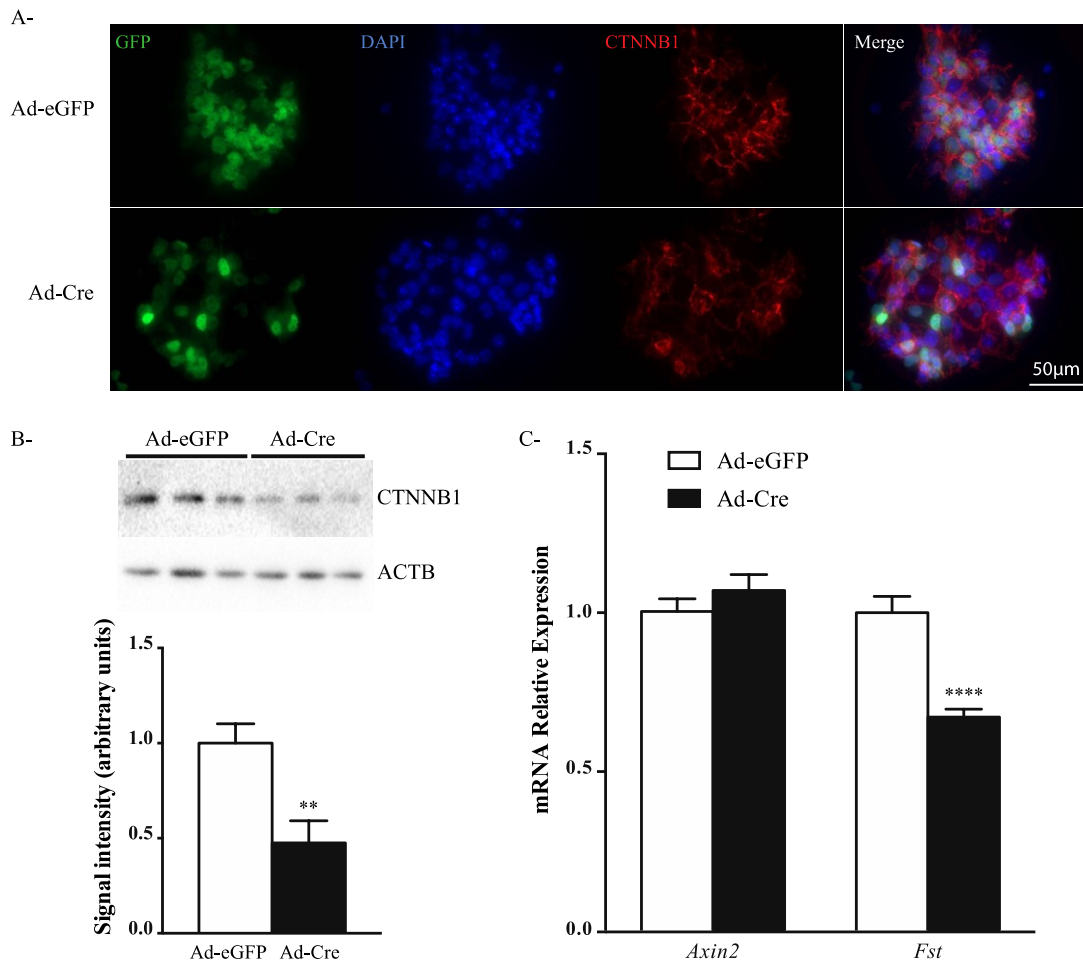


Figure 3.4 : YAP and WWTR1 do not regulate Sertoli cell differentiation through CTNNB1.

A) Immunocytofluorescence analysis of cultured primary Sertoli cell isolated from 4 dpp *Yap*^{fl^{ox}/fl^{ox}};*Wwtr1*^{fl^{ox}/fl^{ox}} mice treated with Ad-eGFP (control) or Ad-Cre adenovirus. Red = CTNNB1, blue = DAPI, green = adenovirus infection (GFP). Note that the Ad-Cre virus also drives GFP expression. **B)** Representative immunoblot analysis of CTNNB1 performed on *Yap*^{fl^{ox}/fl^{ox}};*Wwtr1*^{fl^{ox}/fl^{ox}} Sertoli cells treated as in (A). n=3 samples/treatment, performed in triplicate. **C)** RT-qPCR analysis of the CTNNB1 transcriptional *Axin2* and *Fst* performed on *Yap*^{fl^{ox}/fl^{ox}};*Wwtr1*^{fl^{ox}/fl^{ox}} Sertoli cells treated as in (A). n=5 samples/treatment, performed in triplicate. Data were normalized to the housekeeping gene *Rpl19* (RT-qPCR) or ACTB (immunoblot) and are expressed as mean (columns) ± SEM (error bars). Asterisks = Significantly different from control (** P < 0.01; **** P < 0.0001).

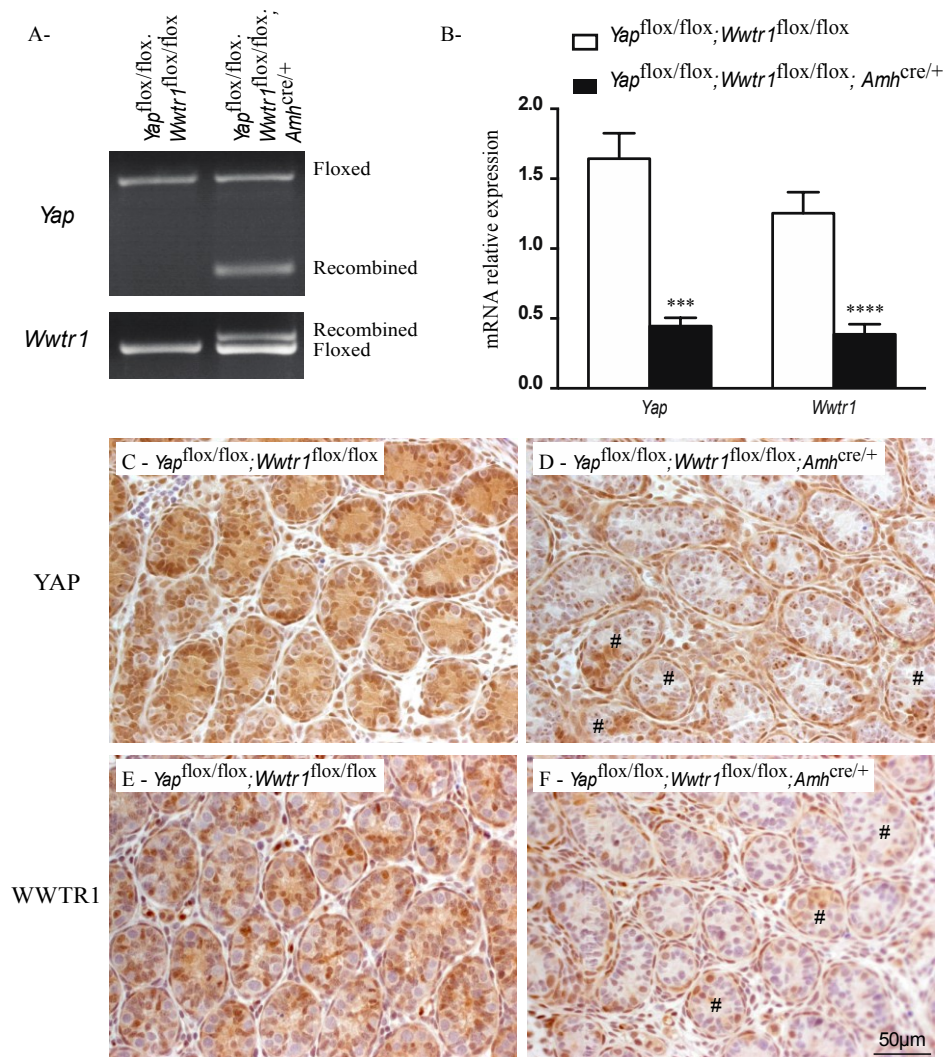


Figure 3.5 : Yap and Wwtr1 knockdown efficiency in the *Yap*^{flox/flox}; *Wwtr1*^{flox/flox}; *Amh*^{cre/+} model.

A) PCR genotype analyses for *Yap* and *Wwtr1* performed on whole testes from 4 dpp animals of the indicated genotypes. Bands corresponding to the floxed and Cre recombined alleles are indicated. **B)** RT-qPCR analysis of *Yap* and *Wwtr1* expression in the testes of 4dpp mice of the indicated genotypes (n = 8 animals/genotype). All data were normalized to the housekeeping gene *Rpl19* and are expressed as mean (columns) ± SEM (error bars). Asterisks = Significantly different from control (***) P < 0.001; **** P < 0.0001). **C, D)** Immunohistochemical analysis of YAP in testes from 4 dpp *Yap*^{flox/flox}; *Wwtr1*^{flox/flox} (**C**) control and *Yap*^{flox/flox}; *Wwtr1*^{flox/flox}; *Amh*^{cre/+} mice (**D**). **E, F)** Immunohistochemical analysis of WWTR1 in testes from 4 dpp *Yap*^{flox/flox}; *Wwtr1*^{flox/flox} (**E**) control and *Yap*^{flox/flox}; *Wwtr1*^{flox/flox}; *Amh*^{cre} mice (**F**). Hashtag (#) = tubules with incomplete recombination. Scale bar in (F) is valid for all images.

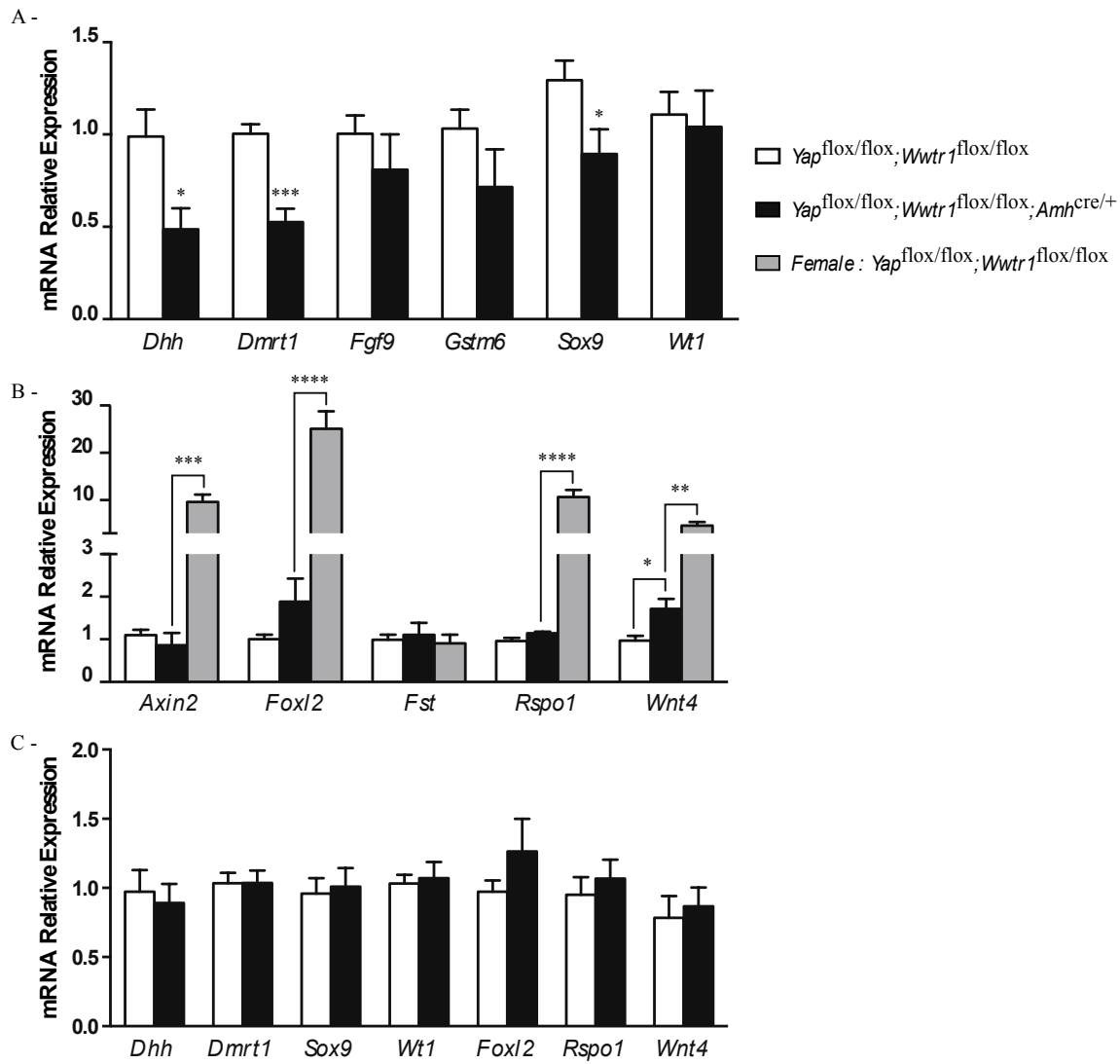


Figure 3.6 : Evaluation of the expression of genes involved in sex differentiation in the testes of *Yap*^{flox/flox}; *Wwtr1*^{flox/flox}; *Amh*^{cre/+} mice.

A, B RT-qPCR analysis of genes involved in male (**A**) or female (**B**) differentiation in testes from 4dpp *Yap*^{flox/flox}; *Wwtr1*^{flox/flox}; *Amh*^{cre/+}, *Yap*^{flox/flox}; *Wwtr1*^{flox/flox} mice (**A, B**) and ovaries from 4dpp *Yap*^{flox/flox}; *Wwtr1*^{flox/flox} mice (**B**) (n=6 animals/genotypes). **C** RT-qPCR analysis of genes involved in male or female differentiation in testes from 120dpp *Yap*^{flox/flox}; *Wwtr1*^{flox/flox}; *Amh*^{cre/+} and *Yap*^{flox/flox}; *Wwtr1*^{flox/flox} mice. (n=6 animals/genotypes). All data were normalized to the housekeeping gene *Rpl19* and are expressed as mean (columns) ± SEM (error bars). Asterisks = Significantly different from control (* P < 0.05; *** P < 0.001).

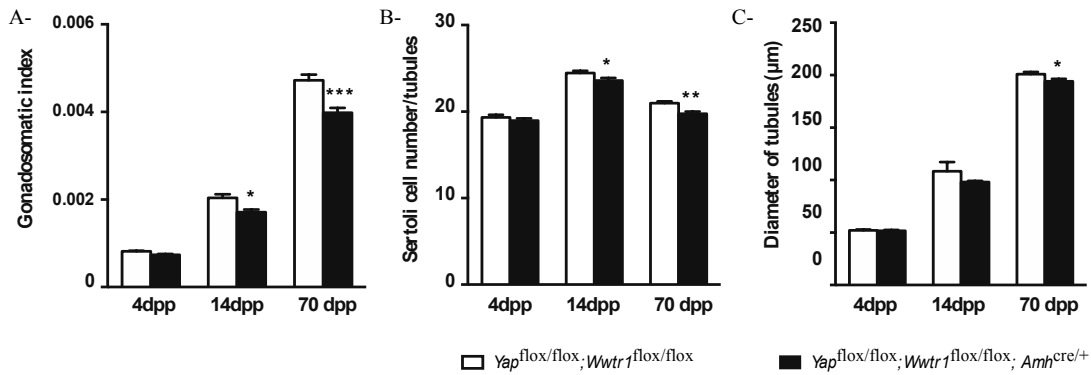


Figure 3.7 : Seminiferous tubules in *Yap*^{flox/flox};*Wwtr1*^{flox/flox};*Amh*^{cre/+} mice.

A) Time course analysis of gonadosomatic index (testicular weight/corporal weight) comparing *Yap*^{flox/flox};*Wwtr1*^{flox/flox};*Amh*^{cre/+} to *Yap*^{flox/flox};*Wwtr1*^{flox/flox} controls at the indicated ages. Sample numbers analyzed varied by age and genotype. Values for *Yap*^{flox/flox};*Wwtr1*^{flox/flox};*Amh*^{cre/+} are 4dpp : n=14; 14dpp : n=7; 70dpp : n=7; values for *Yap*^{flox/flox};*Wwtr1*^{flox/flox} are 4dpp : n=17; 14dpp : n=5; 70dpp : n=7. **B)** SOX9-positive Sertoli cell counts in *Yap*^{flox/flox};*Wwtr1*^{flox/flox};*Amh*^{cre/+} and *Yap*^{flox/flox};*Wwtr1*^{flox/flox} controls. Data are from blind counts of 10 (4 dpp) or 25 (14 dpp, 70 dpp) seminiferous tubules/testes of 5 testes/genotype at each time point. **C)** Measurement of the diameter of the tubules in *Yap*^{flox/flox};*Wwtr1*^{flox/flox};*Amh*^{cre/+} and *Yap*^{flox/flox};*Wwtr1*^{flox/flox} controls at 4, 14 and 70 dpp described in (B). All data are expressed as means (columns) ± SEM (error bars). Asterisks = Significantly different from control (** P < 0.01; *** P < 0.001).

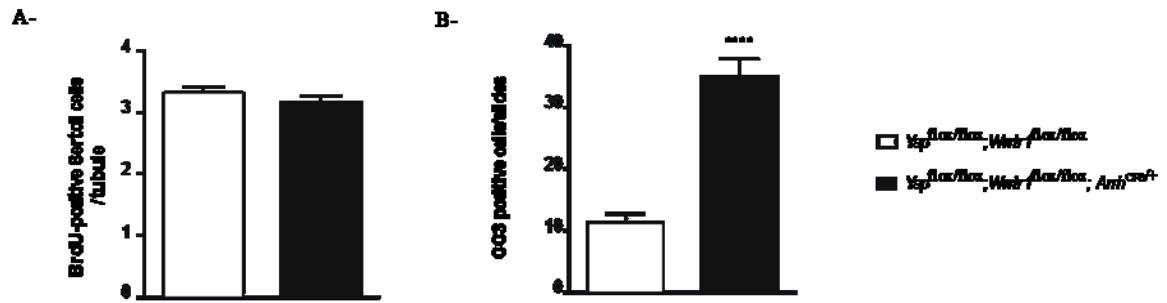


Figure 3.8 : Proliferation and apoptosis in the seminiferous tubules of 5dpp $Yap^{flox/flox}; Wwtr1^{flox/flox}; Amh^{cre/+}$ mice.

Analyses of the proliferation and apoptosis of cells in the seminiferous tubules of $Yap^{flox/flox}; Wwtr1^{flox/flox}; Amh^{cre/+}$ mice relative to $Yap^{flox/flox}; Wwtr1^{flox/flox}$ controls. **A)** BrdU-positive Sertoli cell counts in $Yap^{flox/flox}; Wwtr1^{flox/flox}; Amh^{cre/+}$ and $Yap^{flox/flox}; Wwtr1^{flox/flox}$ controls. Data for the evaluation of proliferation are from blind counts of 20 seminiferous tubules/testis. Twelve testes from $Yap^{flox/flox}; Wwtr1^{flox/flox}; Amh^{cre/+}$ animals and 8 testes from $Yap^{flox/flox}; Wwtr1^{flox/flox}$ animals were evaluated. **B)** Cleaved caspase 3-positive cell counts in the seminiferous tubules of $Yap^{flox/flox}; Wwtr1^{flox/flox}; Amh^{cre/+}$ and $Yap^{flox/flox}; Wwtr1^{flox/flox}$ mice. Data for the evaluation of the apoptosis are from blind counts of 5 different slides per testis. Twelve testes from $Yap^{flox/flox}; Wwtr1^{flox/flox}; Amh^{cre/+}$ animals and 8 testes from $Yap^{flox/flox}; Wwtr1^{flox/flox}$ animals were evaluated. All data are expressed as means (columns) \pm SEM (error bars). Asterisks = Significantly different from control (**** $P < 0.0001$).

9. Tables

Table 3.1 : Mating trials

Variable	$Yap^{flox/flox}; Wwtr1^{flox/flox}$	$Yap^{flox/flox}; Wwtr1^{flox/flox}; Amh^{cre/+}$
Males	4	4
Total litters	27	28
Total pups	215	219
Litter size	7.96 ± 0.31	7.82 ± 0.29

Litter size values are means \pm SEM

10. Supplementary data

10.1. Supplementary figures

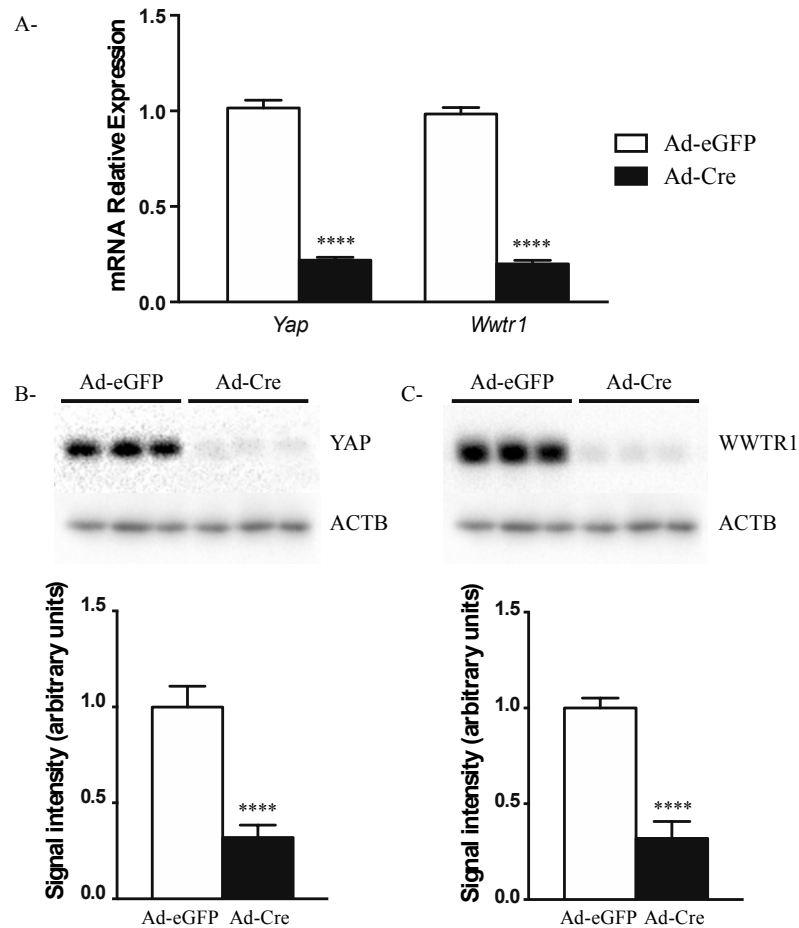


Figure S3.1 : *Yap* and *Wwtr1* knockdown efficiency in a primary Sertoli cell culture model.

A) RT-qPCR analysis of YAP and WWTR1 performed on cultured primary Sertoli cell isolated from 4 dpp *Yap*^{flox/flox};*Wwtr1*^{flox/flox} mice treated with Ad-eGFP (control) or Ad-Cre adenovirus. n=5 samples/treatment, performed in triplicate. **B,** **C)** Representative immunoblot analysis of YAP (**B**) and WWTR1 (**C**) performed on *Yap*^{flox/flox};*Wwtr1*^{flox/flox} Sertoli cells treated as in (**A**). n=3 samples/treatment, performed in triplicate. Data were normalized to the housekeeping gene *Rpl19* (RT-qPCR) or ACTB (immunoblot) and are expressed as mean (columns) ± SEM (error bars). Asterisks = Significantly different from control (**** P < 0.0001).

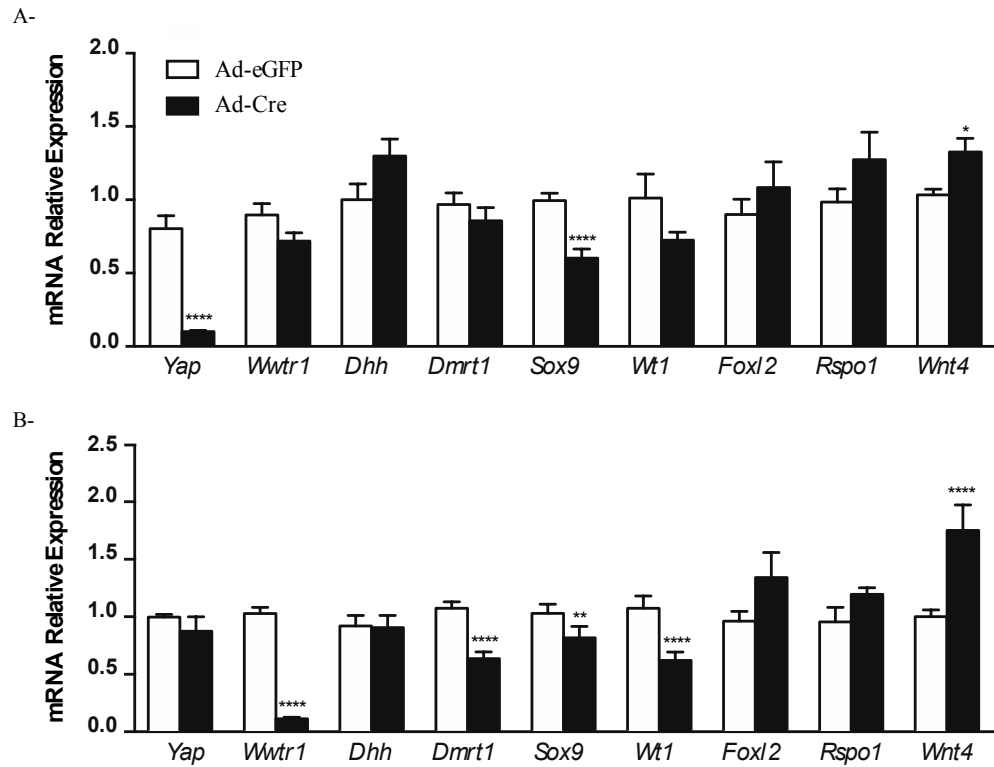


Figure S3.2 : YAP and WWTR1 have redundant functions in Sertoli cell differentiation.

A, B) RT-qPCR analysis of sex differentiation-related genes performed on primary cultures of Sertoli cells isolated from 4 dpp *Yap*^{flox/flox} (**A**) or *Wwtr1*^{flox/flox} (**B**) mice. Cells were treated with Ad-eGFP (control) or Ad-Cre adenovirus, n=3 samples/treatment, performed in triplicate. Data were normalized to the housekeeping gene *Rpl19* (RT-qPCR) and are expressed as mean (columns) \pm SEM (error bars). Asterisks = Significantly different from control (* P < 0.05; *** P < 0.001; **** P < 0.0001).

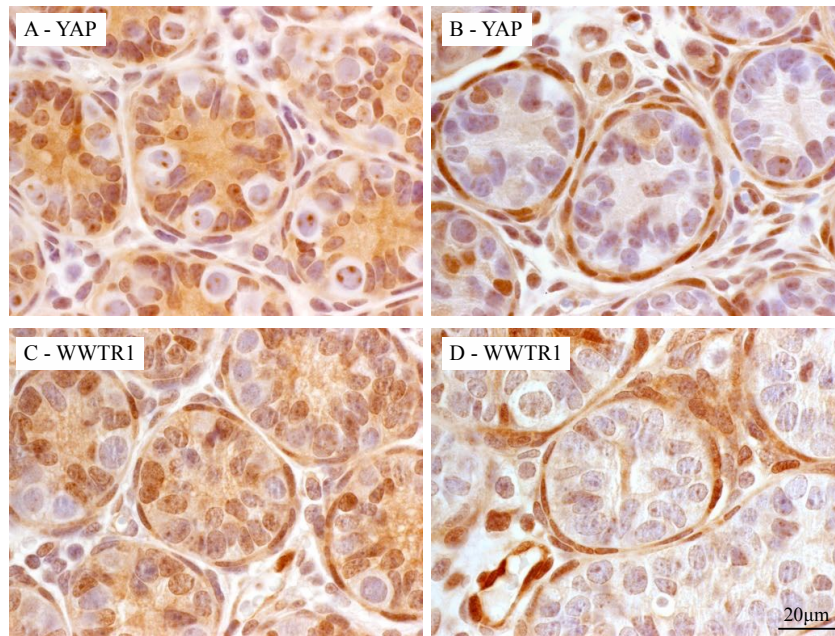


Figure S3.3 : YAP and WWTR1 expression in testes from immature $Yap^{flox/flox};Wwtr1^{flox/flox};Amh^{cre/+}$ mice at high magnification.

A, B) Immunohistochemical analysis of YAP in testes from 4 dpp $Yap^{flox/flox};Wwtr1^{flox/flox}$ (**A**) control and $Yap^{flox/flox};Wwtr1^{flox/flox};Amh^{cre/+}$ mice (**B**). **C, D)** Immunohistochemical analysis of WWTR1 in testes from 4 dpp $Yap^{flox/flox};Wwtr1^{flox/flox}$ (**C**) control and $Yap^{flox/flox};Wwtr1^{flox/flox};Amh^{cre}$ mice (**D**). Hashtag (#) = tubules with incomplete recombination. Scale bar in (**D**) is valid for all images.

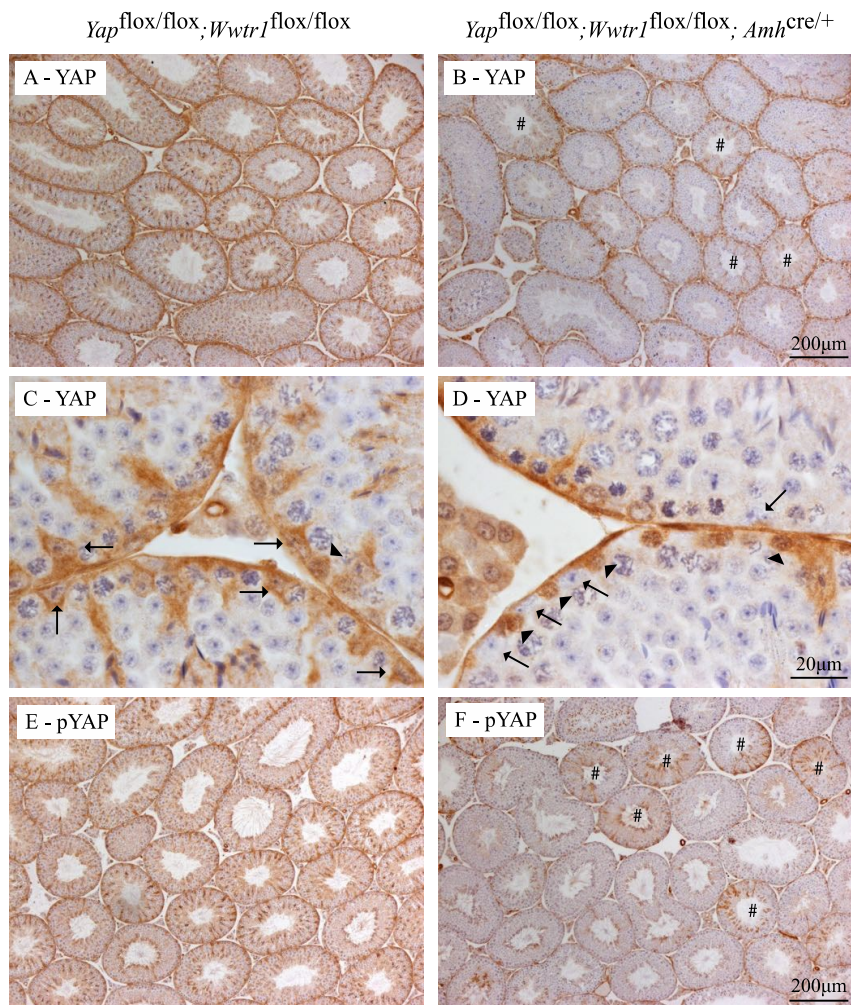


Figure S3.4 : YAP and phospho-YAP expression in testes from mature $Yap^{flox/flox};Wwtr1^{flox/flox};Amh^{cre/+}$ mice.

A-D) Immunohistochemical analysis of YAP expression in testes from 70 dpp $Yap^{flox/flox};Wwtr1^{flox/flox}$ control (**A, C**) and $Yap^{flox/flox};Wwtr1^{flox/flox};Amh^{cre/+}$ mice (**B, D**). **E-F)** Immunohistochemical analysis of phospho-YAP in testes from 70 dpp $Yap^{flox/flox};Wwtr1^{flox/flox}$ control (**E**) and $Yap^{flox/flox};Wwtr1^{flox/flox};Amh^{cre/+}$ mice (**F**). Arrows = Sertoli cells. Arrowheads = spermatogonia, hashtags (#) = tubules with incomplete recombination. Scale bar in (**B**) is valid for (**A**), scale bar in (**D**) is valid for (**C**) and scale bar for (**F**) is valid for (**E**).

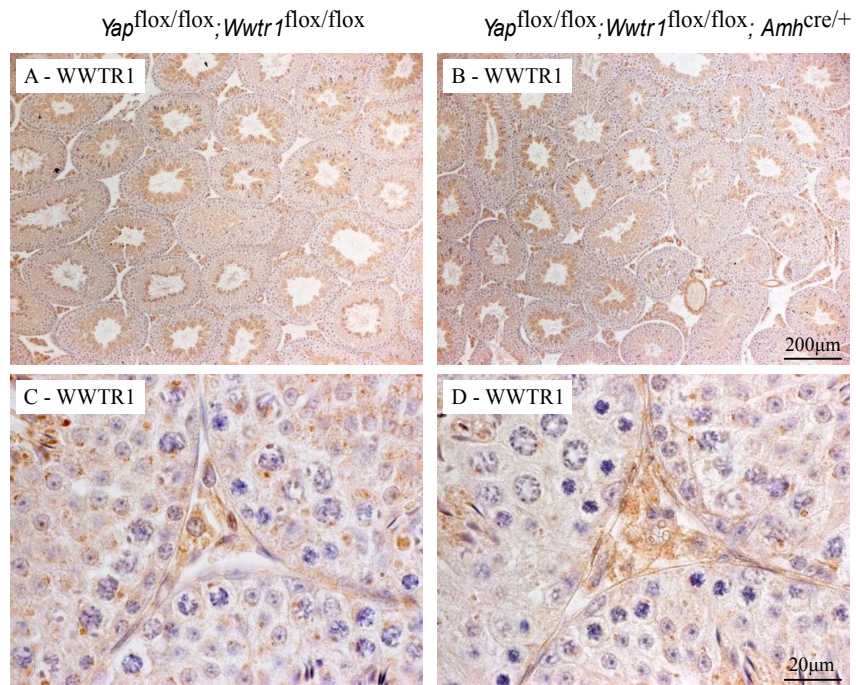


Figure S3.5 : WWTR1 expression in testes from mature $Yap^{flox/flox}; Wwtr1^{flox/flox}; Amh^{cre/+}$ mice.

A-D) Immunohistochemical analysis of WWTR1 in testes from 70 dpp $Yap^{flox/flox}; Wwtr1^{flox/flox}$ control (A, C) and $Yap^{flox/flox}; Wwtr1^{flox/flox}; Amh^{cre/+}$ mice (B, D). Scale bar in (B) is valid for (A) and scale bar in (D) is valid for (C).

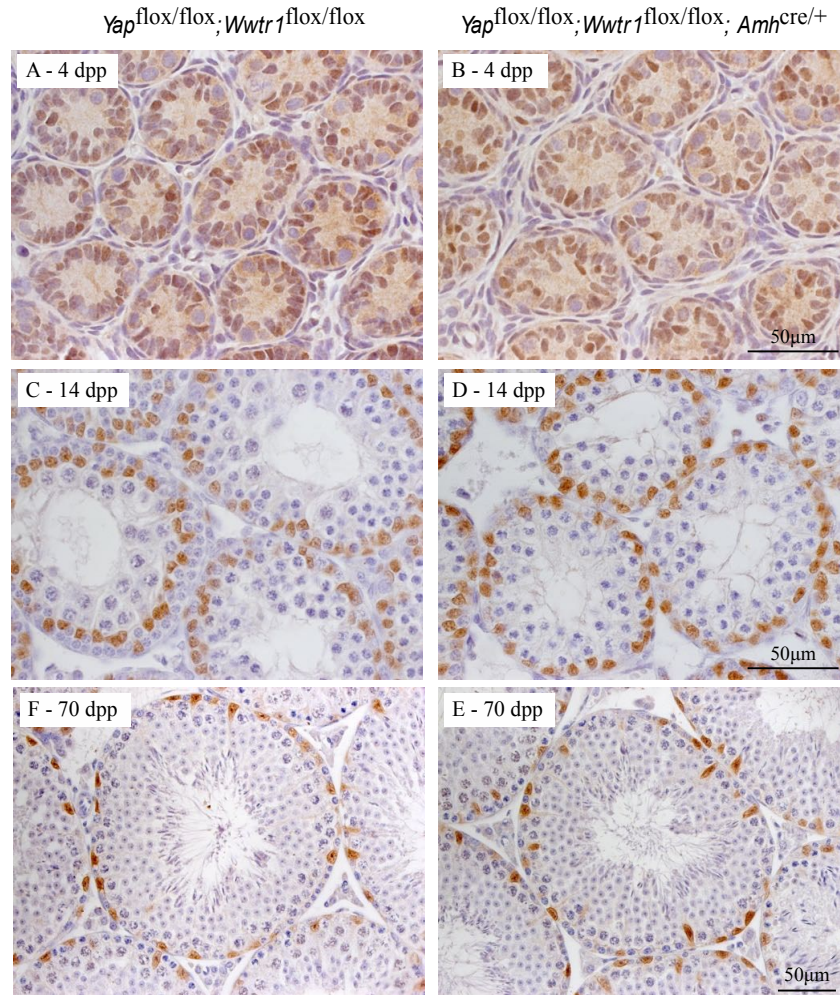


Figure S3.6 : SOX9 expression in testes from $Yap^{flox/flox}; Wwtr1^{flox/flox}; Amh^{cre/+}$ mice.

A, F Immunohistochemical analysis of SOX9 expression in testes from 4 dpp (**A, B**), 14 dpp (**C, D**) and 70dpp (**E, F**) $Yap^{flox/flox}; Wwtr1^{flox/flox}$ and $Yap^{flox/flox}; Wwtr1^{flox/flox}; Amh^{cre/+}$ mice. Scale bar in (**B**) is valid for (**A**), scale bar in (**D**) is valid for (**C**) and scale bar in (**F**) is valid for (**E**).

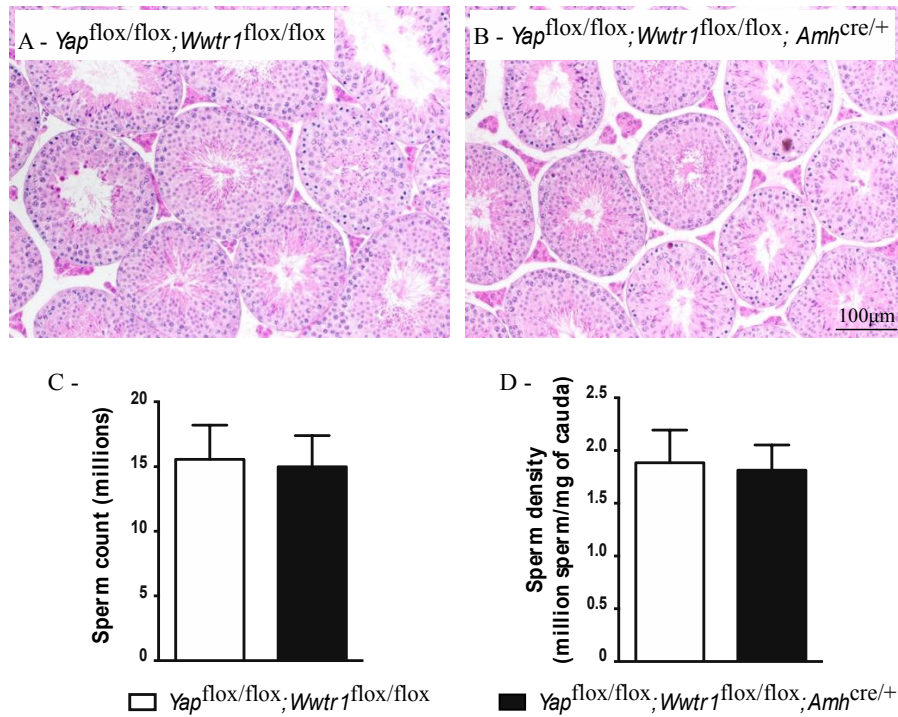


Figure S3.7 : Analyses of spermatogenesis $Yap^{flox/flox}; Wwtr1^{flox/flox}; Amh^{cre/+}$ mice.

A, B) Photomicrographs comparing testicular histology of $Yap^{flox/flox}; Wwtr1^{flox/flox}$ (**A**) and $Yap^{flox/flox}; Wwtr1^{flox/flox}; Amh^{cre/+}$ (**B**) 70 dpp testis. **C**) Cauda sperm counts in the epididymides of 70dpp $Yap^{flox/flox}; Wwtr1^{flox/flox}; Amh^{cre/+}$ mice compared to $Yap^{flox/flox}; Wwtr1^{flox/flox}$ control mice (n=9 for each genotype). **D**) Sperm density in millions of sperm/mg of epididymides cauda in the animals described in (C). All data are expressed as means (columns) \pm SEM (error bars).

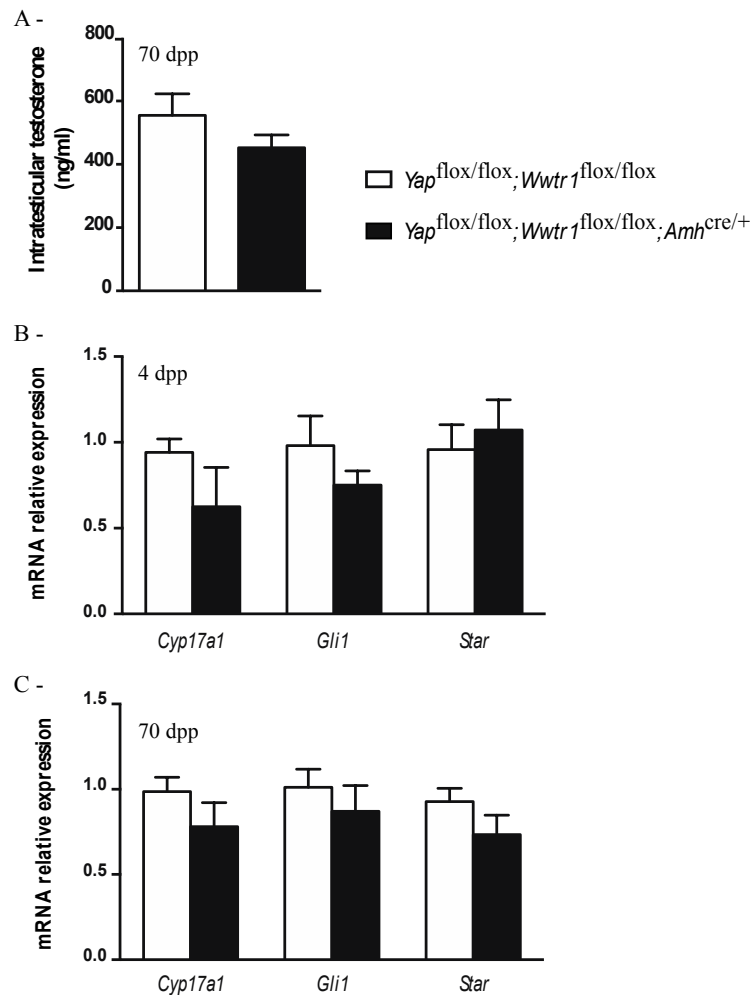


Figure S3.8 : Leydig cell function is normal in mature $Yap^{flox/flox}; Wwtr1^{flox/flox}; Amh^{cre/+}$ mice.

A) Intratesticular testosterone levels in the testis of 70 dpp $Yap^{flox/flox}; Wwtr1^{flox/flox}; Amh^{cre/+}$ mice relative to $Yap^{flox/flox}; Wwtr1^{flox/flox}$ controls (n=7 for each genotype). **B, C)** RT-qPCR analysis of Leydig cell markers in testes from 4 dpp (**B**) and (**C**) 70 dpp $Yap^{flox/flox}; Wwtr1^{flox/flox}; Amh^{cre/+}$ and $Yap^{flox/flox}; Wwtr1^{flox/flox}$ mice. (n=6 animals/genotype). All data were normalized to the housekeeping gene *Rpl19* and are expressed as mean (columns) ± SEM (error bars).

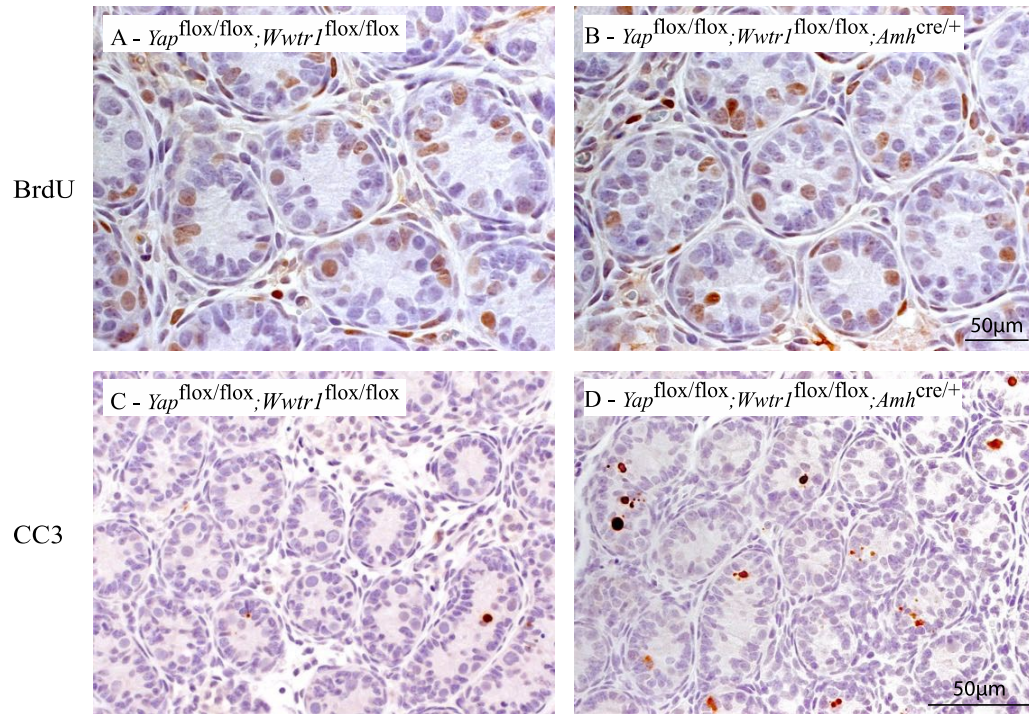


Figure S3.9 : BrdU incorporation and cleaved caspase-3 expression in testes from *Yap*^{flox/flox}; *Wwtr1*^{flox/flox}; *Amh*^{cre/+} mice.

A, B) Immunohistochemical analysis of BrdU incorporation in testes from 4 dpp *Yap*^{flox/flox}; *Wwtr1*^{flox/flox} and *Yap*^{flox/flox}; *Wwtr1*^{flox/flox}; *Amh*^{cre} mice. **C, D)** Immunohistochemical analysis of cleaved caspase-3 in testes from 4 dpp *Yap*^{flox/flox}; *Wwtr1*^{flox/flox} and *Yap*^{flox/flox}; *Wwtr1*^{flox/flox}; *Amh*^{cre} mice. Scale bar in (B) is valid for (A) and scale bar in (D) is valid for (C).

10.2. Supplementary tables

Table S3.1 : List of antibodies

Protein target	Manufacturer, catalog and lot number	Dilution used in Immunohistochemistry (IH) Immunoblot (IB) Immunofluorescence (IF)	RRID
ACTB	Santa cruz biotech, sc-47778 lot D1916	1 :10 000 (IB)	AB_626632
BrdU	Dako corp, M0744 lot 31732	1 :100 (IH)	AB_10013660
Cleaved caspase 3 (Asp175)	Cell Signaling, #9661 lot 38	1 :100 (IB)	AB_234188
CTNNB1	Cell Signaling, #8480 lot 5	1 :1000 (IB) 1 :300 (IF)	AB_11127855
CYP17A1	Santa cruz biotech, sc-46081 lot B1406	1 :300 (IH)	AB_2088659
DDX4	R&D Systems, AF2030 Lot KPX011605A	1 :200 (IH)	AB_2277369
FOXL2	Sigma-Aldrich, F0805 Lot SLBN9499V	1 :2500 (IB)	AB_1078904
SOX9	Cell Signaling, #82630	1:500 (IH) 1:1000 (IB)	AB_2665492
YAP	Cell Signaling, #4912 lot 5	1:200 (IH) 1:1000 (IB)	AB_2218911
Phospo-YAP (ser127)	Cell Signaling, #13008 lot 4	1:100 (IH)	AB_2650553
WNT4	R&D Systems, AF475 Lot: unkown	1 :2500 (IB)	AB_355382
WWTR1	Cell Signaling, #4883, lot 3	1:200 (IH) 1:800 (IB)	AB_1904158

Protein target	Manufacturer, catalog and lot number	Dilution used in Immunohistochemistry (IH) Immunoblot (IB) Immunofluorescence (IF)	RRID
horseradish peroxidase-conjugated secondary goat anti-rabbit	Promega, W401B (W4011) Lot: 0000236621	1:10 0000 (IB)	AB_430833
horseradish peroxidase-conjugated Anti-rabbit anti-goat antibodies	R&D Systems, HAF017 Lot: WVR2213101	1 :1000 (IB)	AB_562588
Alexa fluor goat anti-rabbit 594	Molecular probes, A11012 Lot : 1420898	1:500 (IF)	AB_141359

Table S3.2 : Genotyping primer sequences

Genotyping	Primers	
	Name	Sequence
<i>Cre recombinase (and internal control)</i>	IMR1084	GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC
	IMR1085	GTGAAACAGCATTGCTGTCACTT
	IMR7338	CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT
	IMR7339	GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC
<i>Wwtr1</i>	TF	GGCTTGTGACAAAGAACCTGGGGCTATCTGAG
	TR1	CCCACAGTTAAATGCTTCTCCAAGACTGGG
	TR2	AACTGCTAACGTCTCCTGCCCTGACCTCTC
<i>Yap</i>	YF	ACATGTAGGTCTGCATGCCAGAGGAGG
	YR1	AGGCTGAGACAGGAGGATCTCTGTGAG
	YR2	TGGTTGAGACAGCGTGC ACTATGGAGC

Table S3.3 : Quantitative RT-PCR primer sequences

Gene	Forward	Reverse
<i>Axin2</i>	GAGGTGGTACCTTGCCAAAA	TTCCTGTCCCTCTGCTGACT
<i>Cyp17a1</i>	GGTGGACATATTCCCCTGGTT	CTGGCCTTCCCCAGTGTTATT
<i>Dhh</i>	CGCCTGATGACAGAGCGTT	AGTGGAGTGAATCCTGTGCG
<i>Dmrt1</i>	TGGCAGATGAAGACCTCAGAGAG	CGAGAACACACTGGCTTTGGC
<i>Fgf9</i>	TAAAGGGGATTCTCAGGCGG	TTCCAGAATGCCGAAGCGG
<i>FoxL2</i>	ACAACACCGGAGAAACCAGAC	CGTAGAACGGGAACTTGGCTA
<i>Fst</i>	CAAAGTCCTGTGAAGATATCCAGT	TAGGAAAGTTGTAGTCCTGGTCT
<i>Gli1</i>	CCTGCCAGCTGAAGTCAGAG	AACAGGTGATCCTGTGTGCC
<i>Gstm6</i>	AGGTCATGGACACTCGAATTCAGA	GCATCCATGCATGGTCTTACTCA
<i>Rpl19</i>	CTGAAGGTCAAAGGGAATGTG	GGACAGAGTCTTGATGATCTC
<i>Rspo1</i>	ACACCACCTGCTCCGACACCA	TGCTCCAGTTCTGGAAAGTTCTCA
<i>Sox9</i>	TGCTGCTTCGACATCCACACGTG	GACGTGCAAGCTGGCAAAGTTGA
<i>Star</i>	GATTAAGGCACCAAGCTGTGCTG	CTGCTGGCTTTCCTTCTTCCAGC
<i>Wnt4</i>	AGCTGTCATCGGTGGGCAGCAT	ACTGTCCGGTCACAGCCCACT
<i>Wt1</i>	AGCTGTCCCACTTACAGATGCAT	GGATGCTGGACTGTCTCCGTGT
<i>Wwtr1</i>	ACTGGCCAGAGATACTTCCTTAATC	AGGCTGATTCATCACCTTCTG
<i>Yap</i>	GACGCTGATGAATTCTGCCTCA	CATGGCAAACGAGGGTCC

Chapitre 4 : Targeted disruption of YAP and TAZ impairs the maintenance of the adrenal cortex

Adrien Levasseur, Guillaume Saint-Jean, Marilène Paquet, Derek Boerboom, Alexandre Boyer

Contributions des auteurs : Dans le cadre de cet article, j'ai élaboré le projet de recherche et écrit l'article en collaboration avec Alexandre Boyer et Derek Boerboom. J'ai réalisé toutes les expériences présentées dans cet article et certaines immunohistochimies ont été faites par Guillaume Saint-Jean. Marilène Paquet a effectué l'analyse histologique des tissus.

Article publié dans la revue *Endocrinology*, November 2017, 158(11):3738–3753

Targeted disruption of YAP and TAZ impairs the maintenance of the adrenal cortex

Adrien Levasseur, Guillaume Saint-Jean, Marilène Paquet, Derek Boerboom, Alexandre Boyer*

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

Short title: Role of *Yap* and *Taz* in adrenal cortex maintenance

Keywords: YAP, TAZ, adrenocortical cells, progenitor cells

***Correspondence :** 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. Tel: +1-450-773-8521, ex 8345; Fax: +450-778-8103; E-mail: alexandre.boyer.1@umontreal.ca

Grant support: This work was supported by Discovery Grants RGPIN-2014-04358 (to AB) and RGPIN-2012-340902 (to DB) from the National Sciences and Engineering Research Council of Canada. 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 U54-HD28934.

Disclosure Statement: The authors have nothing to disclose

1. Abstract

Yes-associated protein (YAP) and transcriptional co-activator with PDZ-binding motif (TAZ) are functionally redundant transcriptional regulators that are downstream effectors of the Hippo signaling pathway. They act as major regulators of stem cell maintenance, cell growth and differentiation. To characterize their roles in the adrenal cortex, we generated a mouse model in which *Yap* and *Taz* were conditionally deleted in steroidogenic cells (*Yap*^{flox/flox};*Taz*^{flox/flox};*Nr5a1*^{cre/+}). Male *Yap*^{flox/flox};*Taz*^{flox/flox};*Nr5a1*^{cre/+} mice were characterized by an age-dependent degeneration of the adrenal cortex associated with an increase in apoptosis and a progressive reduction in the expression levels of steroidogenic genes. Evaluation of the expression levels of stem and progenitor cell population markers in the adrenal glands of *Yap*^{flox/flox};*Taz*^{flox/flox};*Nr5a1*^{cre/+} mice also showed the downregulation of sonic hedgehog (*Shh*), a marker of the subcapsular progenitor cell population. Gross degenerative changes were not observed in the adrenal glands of *Yap*^{flox/flox};*Taz*^{flox/flox};*Nr5a1*^{cre/+} females, although steroidogenic capacity and *Shh* expression were reduced, suggesting that mechanisms of adrenocortical maintenance are sex-specific. These results define a crucial role for YAP and TAZ in the maintenance of the postnatal adrenal cortex.

2. Introduction

In mice, the adrenal cortex is comprised of two concentric zones; the zona glomerulosa (zG) and the zona fasciculata (zF). The zG produces the mineralocorticoids that regulate blood volume and pressure, while the zF produces glucocorticoids that mediate the response to stress. The adrenal cortex is a dynamic organ in which newly differentiated cells replace senescent cells. The centripetal migration model is the most widely accepted explanation of postnatal adrenocortical zonation. In this model, stem cells in the capsule give rise to mineralocorticoid-producing zG cells, which subsequently migrate centripetally while undergoing lineage conversion into glucocorticoid-producing zF cells. The latter eventually reach the cortical-medullary boundary where they undergo apoptosis (reviewed in (1,2)).

Although tracing experiments have validated some aspects of this model (3,4), it was also shown that a functional zF still forms when the conversion of zG to zF cells is abrogated through the deletion of *Nr5a1* (3), suggesting that the regulation of zonation is more complex than previously thought. Likewise, it was also shown that capsular stem cells give rise to undifferentiated, nonsteroidogenic adrenocortical progenitor cells that can also differentiate into adrenocortical steroidogenic cells (5,6). Numerous transcription factors and paracrine signaling molecules including Wilms' tumor 1 (WT1) (7,8), nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1 (NR5A1) (8-11), nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1 (NR0B1) (9,12), sonic hedgehog (SHH) (5,6,13,14), beta-catenin (CTNNB1) (15,16) and transcription factor 21 (TCF21) (5) are critical for stem/progenitor cell and adrenal gland maintenance, and their loss in mice leads to adrenal insufficiency-related diseases.

Hippo is an evolutionarily conserved signaling pathway with well-established roles in cell fate determination, differentiation and proliferation during embryonic and postnatal development, as well as in tissue homeostasis throughout adulthood (reviewed in (17-19)). The canonical Hippo pathway consists of a kinase cascade that ultimately serves to regulate the functionally redundant transcriptional co-regulators Yes-associated protein (YAP) and transcriptional co-activator with PDZ-binding motif (TAZ). In response to extracellular signals such as the establishment of cell-cell contacts, 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 phosphorylate YAP and TAZ. Upon phosphorylation, YAP and TAZ are either retained in the cytoplasm via their association with 14-3-3 proteins, or they are degraded by the cellular proteosomal machinery. When the Hippo signaling cascade is inactive, unphosphorylated YAP and TAZ accumulate in the nucleus and form complexes with transcription factors to regulate the transcription of genes involved in cell growth, survival, and proliferation (17-19).

In the adrenal gland, it was shown that YAP expression was associated with poor outcome of adrenocortical tumors in pediatric patients (20). However, potential roles for the Hippo signaling pathway in adrenal gland function and/or homeostasis have never been evaluated. In this study, we aimed to elucidate the role of the key Hippo signaling effectors

YAP and TAZ in the adrenal cortex by inactivating their expression in the adrenocortical cells of a transgenic mouse model.

3. Materials and methods

3.1. Ethics

All animal procedures were approved by the Comité d'Éthique de l'Utilisation des Animaux of the Université de Montréal (protocol numbers 14-Rech-1739, 16-Rech-1830 and 16-Rech-1805) and conformed to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

3.2. 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). *Yap*^{flox/flox}; *Taz*^{flox/flox} (RRID:MGI:5446510 and RRID:MGI:5544300 (21,22)) mice were obtained from Dr Eric N. Olson (UT Southwestern, Dallas, Tx) and selectively bred over several generations to obtain the *Yap*^{flox/flox}; *Taz*^{flox/flox}; *Nr5a1*^{cre/+} genotype. *Yap*^{flox/flox}; *Nr5a1*^{cre/+} mice were generated by breeding *Yap*^{flox/+}; *Taz*^{flox/+}; *Nr5a1*^{cre/+} mice with *Yap*^{flox/flox} mice. Genotype analyses were done on tail biopsies by PCR as previously described for *Yap* (21), *Taz* (22) and *Cre* (23).

3.3. Histopathology and immunohistochemistry

Adrenal glands for light microscopy histopathologic analysis were weighed and fixed in formalin for 24 h. Tissues were embedded in paraffin, sectioned, and stained with hematoxylin, phloxine and saffron (HPS). Immunohistochemistry was done on formalin fixed, paraffin-embedded, 7 µm 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 YAP, TAZ, beta-catenin (CTNNB1), bromodeoxyuridine (BrdU) or cleaved apoptosis-related cysteine peptidase, D175 (CASP3). Staining was done using the 3,3'-diaminobenzidine peroxidase substrate kit (Vector Laboratories). Negative controls consisted of slides for which the primary antibody was omitted. Antibodies used are listed in Table 4.1.

3.4. Hormone measurements

Blood samples for serum collection were collected between 13:00 and 14:00 by cardiac puncture prior to euthanasia. Blood was allowed to clot at room temperature for 90 minutes and centrifuged at 2000g for 15 minutes at room temperature. Serum samples were transferred to polypropylene tubes and stored at -80 °C until use. To evaluate the response to acute stimulation with adrenocorticotrophic hormone (ACTH), some animals were treated with ACTH fragment 1-24 (Sigma-Aldrich)(500 ng/g body weight, SC) 1 hour prior to euthanasia. Corticosterone levels were then determined by RIA (MP Biomedical). FSH/LH levels in the serum were determined using the mouse/rat LH/FSH multiplex assay (EMD Millipore). Aldosterone levels were determined using the ab136933-Aldosterone ELISA Kit (Abcam). 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 use. ACTH levels in the serum were determined by immulite 2000 (Siemens Healthineers Global). Intratesticular testosterone levels were determined in testicular homogenates by ELISA (IBL International). Homogenates were generated by mechanical homogenization of testes in PBS followed by sonication for 60 seconds. Homogenates were centrifuged at 10 000g for 5 minutes and the supernatants stored at -80 °C until use. All assays except measurements of circulating aldosterone levels were performed by the Center for Research in Reproduction at the Ligand Assay and Analysis Core Laboratory of the University of Virginia.

3.5. Oil red O staining

Adrenal glands were snap frozen in OCT compound (Sakura Finetek, Torrance, CA) and stored at -80°C until further processing. Five micron-thick cryosections were fixed with 10% formalin for 2 min. After washing with running water, slides were transferred to 60% 2-propanol for 1 min. Lipids were then stained with Oil Red O (Sigma-Aldrich) for 10 min followed by immersion in 60% 2-propanol for 30 sec. After washing with running water, the tissues were counterstained with hematoxylin for 3 min.

3.6. Reverse transcription-quantitative PCR

Total RNA from adrenal glands of 10 and 20 week-old animals and total RNA from testes, ovaries and pituitary from 10 week-old animals were 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 SsoAdvanced SYBR Green PCR Master Mix (Bio-Rad). 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 $R = [E^{\text{Ct } Rpl19} / E^{\text{Ct target}}]$ 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 Table S4.1.

3.7. BrdU incorporation assay

10 week-old mice were injected intraperitoneally with 100 mg/kg body weight BrdU (Sigma-Aldrich) and euthanized 4 hours after the injection. The BrdU-labeled DNA was detected by immunohistochemistry as described above.

3.8. Dexamethasone treatment

Dexamethasone (2 mg/L) or vehicle (ethanol, 0.05% final concentration) was administered in drinking water (replaced every day) to 5 week-old mice for 2 weeks. Some mice were euthanized immediately following the end of the treatment, while other mice were euthanized 2 weeks following the end of the treatment to allow for the regeneration of the zF.

3.9. 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 when more than two groups were compared. In the latter cases, ANOVA (with Tukey's multiple comparisons post-test) was used. Means were considered significantly different when *P* value was <0.05. All data are presented as means ± SEM.

4. Results

4.1. YAP and TAZ are expressed in the zG and zF of the adrenal cortex

In order to determine the expression pattern of YAP and TAZ, immunohistochemistry analyses were performed on adrenal glands from mature mice. Abundant nuclear and cytoplasmic expression of YAP (Fig. 4.1A) was detected in the cells of the zG, and strong nuclear expression of YAP was detected in the zF (Fig. 4.1A). Nuclear expression of YAP was

also detected in the endothelial cells of the adrenal gland (Fig. 4.1A). Nuclear expression of TAZ was detected in the zG and in the zF (Fig. 4.1B), with some cytoplasmic expression in a few cells of the adrenal cortex near the medulla (Fig. 4.1B). Nuclear expression of TAZ was also detected in the endothelial cells and in the adrenal capsule (Fig. 4.1D). YAP and TAZ expression patterns in the adrenal glands of male and female mice were similar (Fig 1E, F), except that TAZ expression was also strongly detected in the cytoplasm of the adrenocortical cells near the medulla (X-zone) in females (Fig 1F). The pattern of expression of YAP and TAZ suggests that regulation of transcription by YAP and/or TAZ might be important for the functions and/or the maintenance of the adrenal cortex.

4.2. Degeneration of the adrenal cortex in male

Yap^{flox/flox};*Taz*^{flox/flox};*Nr5a1*^{cre/+} mice

To investigate the role of YAP and TAZ in the adrenal cortex, we generated compound *Yap* and *Taz* mutants by using floxed alleles for *Yap* and *Taz* (21,22) and the *Nr5a1*^{cre} strain, which was shown to drive Cre expression mainly in steroidogenic cells, including those of the adrenal cortex (23). Because YAP and TAZ are known to have a high degree of functional redundancy, we first decided to evaluate the adrenal glands from mature *Yap*^{flox/flox};*Taz*^{flox/flox};*Nr5a1*^{cre/+} animals. PCR analyses of adrenal gland genomic DNA confirmed that recombination of the floxed alleles occurred in *Yap*^{flox/flox};*Taz*^{flox/flox};*Nr5a1*^{cre/+} mice (Fig. 4.2A). Consistent with this result, RT-qPCR analysis showed 79% and 55% decreases in adrenal *Yap* and *Taz* mRNA levels, respectively (Fig. 4.2B). Finally, immunohistochemistry analyses of adrenal glands from *Yap*^{flox/flox};*Taz*^{flox/flox};*Nr5a1*^{cre/+} mice also confirmed the loss of YAP (Fig. 4.2C, D) and TAZ (Fig. 4.2E, F) in adrenocortical cells.

Histopathologic analyses of the adrenal glands of 20 week-old male mice revealed no anomalies in *Yap*^{flox/+};*Taz*^{flox/+};*Nr5a1*^{cre/+}, *Yap*^{flox/+};*Taz*^{flox/flox};*Nr5a1*^{cre/+} or *Yap*^{flox/flox};*Taz*^{flox/flox} (i.e., control) animals (Fig. 4.3A-C). Conversely, evidence of adrenal failure was observed in *Yap*^{flox/flox};*Taz*^{flox/+};*Nr5a1*^{cre/+} and *Yap*^{flox/flox};*Taz*^{flox/flox};*Nr5a1*^{cre/+} mice, as numerous vacuoles and large multinucleated lipoid structures were observed in the adrenal cortex (Fig. 4.3D-F). As *Yap*^{flox/flox};*Taz*^{flox/+};*Nr5a1*^{cre/+} and *Yap*^{flox/flox};*Taz*^{flox/flox};*Nr5a1*^{cre/+} mice had similar adrenal

phenotypes, we decided to verify if the loss of *Yap* alone is sufficient to compromise the maintenance of the adrenal gland. Unlike *Yap*^{flx/flx};*Taz*^{flx/+};*Nr5a1*^{cre/+} or *Yap*^{flx/flx};*Taz*^{flx/flx};*Nr5a1*^{cre/+} mice, only rare multinuclear lipoid structures were observed in the adrenal cortices of 20 week-old male *Yap*^{flx/flx};*Nr5a1*^{cre/+} animals (Fig. 4.3G, H). Contrary to what was observed in the males, no apparent atrophy of the adrenal glands or degeneration of the cortex was observed in *Yap*^{flx/flx};*Taz*^{flx/flx};*Nr5a1*^{cre/+} females as old as 8 months (Fig. S4.1A, B) despite a decrease in *Yap* (75%) and *Taz* (58%) mRNA levels comparable to that observed in males (Fig. S4.2A). Loss of YAP (Fig. S4.2B, C) and TAZ (Fig. S4.2D, E) expression in the adrenal glands of virgin *Yap*^{flx/flx};*Taz*^{flx/flx};*Nr5a1*^{cre/+} females was confirmed by immunohistochemistry, although TAZ expression remained in a few cells near the medulla (Fig. S4.2E). These results suggest that mechanisms of adrenocortical maintenance are sex-specific.

Together, these results indicate that, of the two regulators, *Yap* appears to play a preponderant role, as a single functional *Yap* (but not *Taz*) allele is sufficient to ensure normal adrenal function. Nonetheless, the loss of *Taz* accentuates the phenotype observed with the loss of *Yap*, indicating that YAP and TAZ play critical, functionally redundant roles in the maintenance of the adrenal cortex in male mice. It was therefore decided to utilize the *Yap*^{flx/flx};*Taz*^{flx/flx};*Nr5a1*^{cre/+} model for subsequent experiments.

To analyze the onset and evolution of the phenotype observed in male *Yap*^{flx/flx};*Taz*^{flx/flx};*Nr5a1*^{cre/+} mice, adrenal glands were evaluated between 2 weeks and 30 weeks of age. Evaluation of the adenosomatic index showed a progressive atrophy of the adrenal gland starting at 4 weeks of age (Fig. S4.3). Gross morphological assessment of the adrenal glands from 2 week-old and 4 week-old *Yap*^{flx/flx};*Taz*^{flx/flx};*Nr5a1*^{cre/+} males showed them to be indistinguishable from those of their *Yap*^{flx/flx};*Taz*^{flx/flx} counterparts (Fig. 4.4). By 10 weeks of age, a mild hypertrophy of the adrenocortical cells was observed in the adrenal cortex and some vacuoles were present in the zG of the adrenal cortex; with the majority of these vacuoles located near the junction between the zG and the zF (Fig. 4.4). At 20 weeks of age, as mentioned above, numerous vacuolar cells and large multinucleated lipoid structures were observed in the adrenal cortex and, by 30 weeks of age, the adrenal cortex was almost fully destroyed (Fig. 4.4).

To confirm that the observed vacuoles were present in the zF and not in the zG and to confirm the proper zonation of the adrenal gland, the expression of the zG marker CTNNB1 was analyzed by immunohistochemistry. As expected, CTNNB1 was detected in the zG, but not in the region where vacuoles were present in 20 week-old mice (Fig. 4.5A, B). CTNNB1 expression appeared to be absent in some region of the zG in the adrenal of 30 week-old mutant animals suggesting that zG might also be affected at this age (Fig. 4.5B, D). Of interest, CTNNB1 expression was also detected in the nucleus of some hypertrophic cells forming large foci in the zF of 30 week-old mutant animals (Fig. 4.5D, insert).

To further study the degeneration of the adrenal gland, adrenocortical cell proliferation and apoptosis was evaluated. BrdU incorporation assays showed no difference in the abundance of proliferating cells in the adrenal cortex of *Yap*^{fllox/fllox};*Taz*^{fllox/fllox};*Nr5a1*^{cre/+} males relative to controls (Fig. S4.4). Conversely, cleaved CAS3 was readily detected in the adrenal cortex of *Yap*^{fllox/fllox};*Taz*^{fllox/fllox};*Nr5a1*^{cre/+} mice, and was associated with the multinucleated, vacuolar cells (Fig. 4.6A, B). These results indicate that adrenal gland degeneration in the *Yap*^{fllox/fllox};*Taz*^{fllox/fllox};*Nr5a1*^{cre/+} model occurs due to apoptosis of adrenocortical cells and not to reduced proliferation.

Because the *Nr5a1*^{cre} allele drives Cre expression in Leydig cells and in pituitary gonadotropes (23), abnormal hormonal production in these cell types could have occurred in *Yap*^{fllox/fllox};*Taz*^{fllox/fllox};*Nr5a1*^{cre/+} mice, potentially affecting the adrenal gland and creating a confounding effect. To test this, we performed RT-qPCR analyses of *Yap* and *Taz* in the testes and pituitary gland, and measured intratesticular testosterone and circulating gonadotropin levels. Although small decreases in testicular *Yap* (Fig. S4.5A) and pituitary *Yap* and *Taz* (Fig. S4.5B) mRNA levels were observed, testosterone (Fig. S4.5C), FSH (Fig. S4.5D) and LH (Fig. S4.5E) production was similar in control and mutant males. These results suggest that the phenotype observed in the adrenal cortex of *Yap*^{fllox/fllox};*Taz*^{fllox/fllox};*Nr5a1*^{cre/+} animals was not indirectly affected by unintended targeting of *Yap* and *Taz* in other tissues.

4.3. Adrenocortical steroidogenesis is deficient in male

Yap^{flox/flox};*Taz*^{flox/flox};*Nr5a1*^{cre/+} mice

To examine the effects of YAP and TAZ deletion on adrenocortical steroidogenesis, basal and adrenocorticotrophic hormone (ACTH)-induced levels of circulating corticosterone were measured in 10 week-old mutant and control mice. A small but statistically significant reduction in ACTH-induced corticosterone levels was observed in *Yap*^{flox/flox};*Taz*^{flox/flox};*Nr5a1*^{cre/+} males (Fig. 4.7A), suggesting a minor role for YAP and TAZ in adrenal gland function. Similar results were obtained in mutant females (Fig. S4.6A). Circulating aldosterone (Fig. 4.7B) and ACTH (Fig. 4.7C) levels were measured in 20 week-old and 10 week-old animals, respectively, and no differences were observed between the control and mutant mice.

To determine if decreased adrenal steroidogenesis in male *Yap*^{flox/flox};*Taz*^{flox/flox};*Nr5a1*^{cre/+} mice had an effect on lipid accumulation, Oil Red O staining was performed on adrenal glands from 10 week-old mice. Results showed an increased accumulation of lipid droplets in the adrenal cortex of *Yap*^{flox/flox};*Taz*^{flox/flox};*Nr5a1*^{cre/+} animals (Fig. 4.8A, B), suggesting a decrease in lipid metabolism. To further delineate the changes in adrenal steroid production in *Yap*^{flox/flox};*Taz*^{flox/flox};*Nr5a1*^{cre/+} males, expression of steroidogenic genes was evaluated by RT-qPCR in 2 week-old, 10 week-old and 20 week-old males. Among the genes tested, no changes in mRNA levels were observed in the adrenal glands of 2 week-old animals (Fig. 4.8C), and only cytochrome P450 side chain cleavage enzyme 11a1 (*Cyp11a1*) was significantly downregulated in 10 week-old *Yap*^{flox/flox};*Taz*^{flox/flox};*Nr5a1*^{cre/+} mice (Fig. 4.8D). At the latter age, a small increase in melanocortin 2 receptor (*Mc2r*) mRNA levels were also observed. By 20 weeks of age, mRNA levels of *Cyp11a1*, cytochrome P450, family 11, subfamily b, polypeptide 1 (*Cyp11b1*), hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase (*Hsd3b*), *Mc2r* and *Nr5a1* were all reduced, whereas the expression of cytochrome P450, family 11, subfamily b, polypeptide 2 (*Cyp11b2*) and steroidogenic acute regulatory protein (*Star*) was not affected (Fig. 4.8E). *Cyp11a1* mRNA levels were also downregulated in the adrenal glands of 10 week-old mutant females, in addition to *Hsd3b* and *Nr5a1* in 20 week-old females (Fig. S4.7A, B). Taken together, these

results suggest that steroidogenesis is slightly altered in $Yap^{flox/flox};Taz^{flox/flox};Nr5a1^{cre/+}$ animals.

4.4. Adrenal gland progenitor cell defects in male

***Yap^{flox/flox};Taz^{flox/flox};Nr5a1^{cre/+}* mice**

The adrenal glands of $Yap^{flox/flox};Taz^{flox/flox};Nr5a1^{cre/+}$ males showed a progressive degeneration characteristic of adrenal failure, suggesting a potential defect in stem or progenitor cell populations. To determine if adrenal regeneration was affected in $Yap^{flox/flox};Taz^{flox/flox};Nr5a1^{cre/+}$ males, 5 week-old mutant and control males were treated with dexamethasone for 2 weeks to suppress the zF through negative feedback on the hypothalamus and pituitary gland, and then allowed to recover (or not) for two weeks. Dexamethasone treatment resulted in a $\approx 40\%$ reduction in adrenal weight (Fig. 4.9A) associated with degeneration of the zF (Fig. 4.9B, C) and a reduction in steroidogenic gene expression (Fig. S4.8A) in both mutant and control mice. The adrenal glands from control mice allowed to recover following dexamethasone treatment regained most of their lost weight (Fig. 4.9A, D) and steroidogenic gene expression levels increased (Fig. S4.8B), indicating regeneration of the zF. However, the adrenal glands from the $Yap^{flox/flox};Taz^{flox/flox};Nr5a1^{cre/+}$ mice failed to recover any weight (Fig. 4.9A). Despite the fact that the adrenal glands of the mutant mice failed to recover any weight, expression levels of steroidogenic genes increased following the recovery period (Fig. S4.8B). The zF also appears slightly larger (Fig. 4.9E) however, numerous large multinucleated structures reminiscent of the ones present in the adrenal cortex of 20 week-old $Yap^{flox/flox};Taz^{flox/flox};Nr5a1^{cre/+}$ animals were also present in the mutant mice following the recovery period (Fig. 4.9E). Surprisingly, circulating corticosterone levels did not decrease significantly in the mutant animals compared to the control animals (Fig. S4.8C) and no differences were observed in plasma ACTH levels (Fig. S4.8D). Taken together, these results suggest that some stem/progenitor cells are still present in the adrenal glands of $Yap^{flox/flox};Taz^{flox/flox};Nr5a1^{cre/+}$ mice, as they were able to partially recover following dexamethasone treatment. However, the acceleration of the degenerative process (Fig 9E) also suggests that the stem/progenitor cells might be affected.

To characterize the adrenal stem and progenitor cell populations in *Yap^{flox/flox};Taz^{flox/flox};Nr5a1^{cre/+}* mice, the expression levels of several genes known to be involved (or associated with signaling pathways known to be involved) in adrenocortical development, renewal or remodeling (5-16,24-30) were evaluated in newborn and 10 week-old *Yap^{flox/flox};Taz^{flox/flox};Nr5a1^{cre/+}* males (Fig. 4.10A, B). *Shh* and *Nr0b1* expression was downregulated in mutant animals at both ages. A statistically significant reduction in glioma-associated oncogene homolog (*Gli1*) expression was also observed in 10 week-old mutant animals, along with a statistically significant increase in Delta like 1 (*Dlk1*) levels. *Shh* levels also decreased while *Dlk1* levels increased in the mutant females (Fig. S4.9A), however, *Nr0b1* and *Gli1* levels were unchanged (Fig. S4.9A). Interestingly, *Nr0b1* levels were also 12 times higher in the adrenal glands of female mice relative to males (Fig. S4.9B). These results suggest that either the progenitor cell population is reduced or that they are among the cells affected in the *Yap^{flox/flox};Taz^{flox/flox};Nr5a1^{cre/+}* animals.

5. Discussion

In recent years, the Hippo signaling effectors YAP and TAZ have been identified as main contributors to adult stem cell maintenance and tissue homeostasis in several tissues (18), however, no study has evaluated their function(s) in the adrenal glands. Here, we report for the first time that the inactivation of *Yap* and *Taz* in the adrenocortical cells results in adrenal degeneration. This provides the first functional evidence of the importance of Hippo signaling in adrenocortical cells.

In the postnatal adrenal gland, pools of stem/progenitor cells maintain homeostasis by balancing their proliferation, migration and differentiation into steroidogenic cells. Differentiation and proliferation of these cells are also essential to repopulate or expand adrenocortical zones following insult (3). Adrenal atrophy and failure have been observed in numerous transgenic mouse models and have been associated with the loss of the stem/progenitor cells (5-7,9,10,12,13,15). The progressive atrophy of the adrenal gland observed in male *Yap^{flox/flox};Taz^{flox/flox};Nr5a1^{cre/+}* mice suggests that Hippo signaling is also involved in the maintenance of the adrenal gland. However, unlike most of the previously-

reported transgenic models (5-7,9-15), adrenal glands of *Yap*^{flox/flox};*Taz*^{flox/flox};*Nr5a1*^{cre/+} animals appear normal at birth and show proper zonation. Interestingly, efficient inactivation of *Ctnnb1* in adrenocortical cells leads to a dramatic decrease in proliferation and the disappearance of the adrenal gland by e18.5 (15), whereas inefficient inactivation of *Ctnnb1* leads to normal development of the adrenal gland followed by the degeneration of the adrenal cortex starting at 15 weeks of age (15). The *Nr5a1*^{cre} strain used in this study (23) is different from the *Nr5a1*^{cre} strains used in the *Ctnnb1* study (31), but inefficient recombination of

the *Yap* and *Taz* floxed alleles provides a likely explanation for the absence of an abnormal phenotype in the embryonic adrenal gland of *Yap*^{flox/flox};*Taz*^{flox/flox};*Nr5a1*^{cre/+} mice. If so, transgenic models with more efficient recombination would be needed to evaluate the function of YAP and TAZ during adrenal development.

Two main populations of stem/progenitor cells are known to be involved in the homeostasis of the adrenal gland; the stem cells located in the capsule and the subcapsular progenitor cells. As the *Nr5a1*^{cre} model does not drive Cre expression in the capsule (<https://frama.link/rxwMHTCG>), it would seem unlikely that the stem cells were directly affected in *Yap*^{flox/flox};*Taz*^{flox/flox};*Nr5a1*^{cre/+} mice. The subcapsular progenitor cells are known to strongly express SHH (6,13,14), which is essential for the development of the adrenal cortex, as *Shh*-null mice have smaller adrenal primordia, and conditional inactivation of *Shh* in *Nr5a1*-expressing cells causes hypoplastic adrenal glands (6,13,14). The robust downregulation of *Shh* expression observed in the adrenal glands from *Yap*^{flox/flox};*Taz*^{flox/flox};*Nr5a1*^{cre/+} mice suggests that the SHH⁺ progenitor cells were affected. However, the relationship between the loss of YAP/TAZ expression, the decrease in SHH expression and the adrenal degeneration phenotype observed in the *Yap*^{flox/flox};*Taz*^{flox/flox};*Nr5a1*^{cre/+} model remains unclear. One possibility is that the deletion of YAP/TAZ, which are known to be involved in cell survival (32-35), simply resulted in the death of adrenal cells, potentially including SHH⁺ progenitor cells. As adrenal *Shh* expression is downregulated in newborn *Yap*^{flox/flox};*Taz*^{flox/flox};*Nr5a1*^{cre/+} mice, the pool of progenitor cells may have been partly depleted during embryonic development, leading to inadequate maintenance of homeostasis in the adult. Another possibility is that progenitor cells could be rapidly recruited into the zF to compensate for the loss of adrenocortical cells, perhaps

resulting in enhanced differentiation of the progenitor cells. Finally, Hippo signaling might also directly influence the expression of *Shh* in progenitor cells, as hippo signaling has been shown to influence *Shh* expression in several tissues. For example, it has been shown that YAP can activate SHH signaling in P19 cells (36). Likewise, the overexpression of YAP inhibits neuronal differentiation in primary mouse cortical progenitors via a mechanism involving SHH (36). Loss of *Yap* function in the *Xenopus* tadpole also causes limb bud regeneration defects and the downregulation of *Shh* expression (37). Reporter gene marking of the progenitor cell population combined with cell lineage tracing experiments in the context of YAP/TAZ genetic manipulation would be required to test these hypotheses.

Aside from *Shh*, a small decrease in the expression levels of the *Shh* downstream target *Gli1* were observed in 10 week-old mutant animals. No differences in *Gli1* expression were observed in younger animals despite the marked decrease in *Shh* levels. This suggests that either the remaining SHH is sufficient to maintain *Gli* expression, or that other mechanisms can compensate for the downregulation of *Shh* to maintain *Gli1* expression. One potential factor that could compensate for SHH loss is delta like 1 homolog (DLK1), as it was shown in the rat that DLK1 can activate *Gli1* transcription in the stem cells located in the capsule (38). Compatible with this, we observed an increase in adrenal *Dlk1* expression in 10 week-old *Yap*^{flox/flox};*Taz*^{flox/flox};*Nr5a1*^{cre/+} mice. Aside from genes associated with SHH signaling, *Nr0b1* expression was also downregulated in the adrenal glands of male *Yap*^{flox/flox};*Taz*^{flox/flox};*Nr5a1*^{cre/+} mice. It was previously shown that loss-of-function mutations or deletion of *Nr0b1* cause the depletion of the subcapsular progenitor cells in both humans and mice (9,12). As for *Shh*, whether or not YAP/TAZ serve to directly regulate *Nr0b1* expression in adrenal progenitor cells remains to be determined.

Degeneration of the adrenal cortex was observed in *Yap*^{flox/flox};*Taz*^{flox/flox};*Nr5a1*^{cre/+} males but not in females, despite similar downregulation of *Yap*, *Taz* and *Shh* expression. Several aspects of adrenal physiology are well known to differ by sex, for instance the size of the adrenal gland and corticosterone and aldosterone secretion are all higher in females. The basis for these differences is not completely understood, although circulating sex hormone levels are known to play a role (39-41). To our knowledge, this study is the first to suggest that the signaling mechanisms underlying adrenal regeneration may also vary by sex. Our finding

that adrenal degeneration occurred only in male *Yap*^{flox/flox};*Taz*^{flox/flox};*Nr5a1*^{cre/+} mice despite a decrease in *Shh* occurring in both sex suggests either that SHH plays a more important role in male progenitor cells, or that other signaling pathways compensate for the partial loss of *Shh* expression in the female adrenal gland. If the latter is true, the transcription factor *Nr0b1* could be involved, as it is known to be important for adrenal gland maintenance (12), and is also known to be more expressed in the female adrenal gland (39,42).

Another feature of the female adrenal gland is the persistence of the X-zone in virgin animals (43), a zone with poorly defined functions (44). Strong ACTH-independent centrifugal expansion of corticosterone secreting cells originating from the X-zone were observed in the *Prkar1a* knockout mouse (27), suggesting that some stem/progenitor cells could arise from the X-zone in some experimental conditions. Despite persistence of a few TAZ expressing cells in the X-zone of *Yap*^{flox/flox};*Taz*^{flox/flox};*Nr5a1*^{cre/+} mice, it seems unlikely that this zone is responsible for the dimorphism observed between male and female, as the X-zone degenerates in parous females and no abnormal phenotype was observed in old parous females.

Features of impaired steroidogenesis including elevated levels of neutral lipids, decreased expression of steroidogenic genes and ACTH-stimulated corticosterone production were all observed in the adrenal glands of *Yap*^{flox/flox};*Taz*^{flox/flox};*Nr5a1*^{cre/+} mice. The overall decrease in steroidogenic gene expression levels was most likely mainly caused by the loss of adrenocortical cells. However, our analysis of steroidogenic gene expression in 10 week-old *Yap*^{flox/flox};*Taz*^{flox/flox};*Nr5a1*^{cre/+} mice suggests that a specific loss of *Cyp11a1* may also have contributed to the decrease in corticosterone production, and that the expression of *Cyp11a1* could be regulated by YAP/TAZ. Although it has been reported that YAP can regulate the expression of the steroidogenic enzyme *Cyp19a1* in the KGN granulosa tumor cell line (29), whether or not YAP/TAZ can regulate additional steroidogenic enzymes such as *Cyp11a1* will be grounds for further study. Interestingly, lipid accumulation was observed in the adrenal cortex of *Cyp11a1* knock-out mice (45), which die shortly after birth. This suggests that the downregulation of *Cyp11a1* could have contributed to the lipid accumulation observed in the adrenal glands of *Yap*^{flox/flox};*Taz*^{flox/flox};*Nr5a1*^{cre/+} males.

In summary, this study reports for the first time a role for YAP and TAZ in adrenal gland maintenance, and that inactivation of *Yap* and *Taz* in the adrenal gland leads to adrenal degeneration.

6. Acknowledgments

The authors thank Dr. Eric N. Olsen (University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX) for generously providing the *Yap*^{flox/flox}; *Wwtr1*^{flox/flox} mice.

7. References

1. Pihlajoki M, Dorner J, Cochran RS, Heikinheimo M, Wilson DB. Adrenocortical zonation, renewal, and remodeling. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2015; 6:27
2. Walczak EM, Hammer GD. Regulation of the adrenocortical stem cell niche: implications for disease. *Nat Rev Endocrinol* 2015; 11:14-28
3. Freedman BD, Kempna PB, Carlone DL, Shah MS, Guagliardo NA, Barrett PQ, Gomez-Sanchez CE, Majzoub JA, Breault DT. Adrenocortical zonation results from lineage conversion of differentiated zona glomerulosa cells. *Dev Cell* 2013; 26:666-673
4. Morley SD, Viard I, Chung BC, Ikeda Y, Parker KL, Mullins JJ. Variegated expression of a mouse steroid 21-hydroxylase/beta-galactosidase transgene suggests centripetal migration of adrenocortical cells. *Mol Endocrinol* 1996; 10:585-598
5. Wood MA, Acharya A, Finco I, Swonger JM, Elston MJ, Tallquist MD, Hammer GD. Fetal adrenal capsular cells serve as progenitor cells for steroidogenic and stromal adrenocortical cell lineages in *M. musculus*. *Development* 2013; 140:4522-4532
6. 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

7. Bandiera R, Vidal VP, Motamedi FJ, Clarkson M, Sahut-Barnola I, von Gise A, Pu WT, Hohenstein P, Martinez A, Schedl A. WT1 maintains adrenal-gonadal primordium identity and marks a population of AGP-like progenitors within the adrenal gland. *Dev Cell* 2013; 27:5-18
8. Val P, Martinez-Barbera JP, Swain A. Adrenal development is initiated by Cited2 and Wt1 through modulation of Sf-1 dosage. *Development* 2007; 134:2349-2358
9. Achermann JC, Meeks JJ, Jameson JL. Phenotypic spectrum of mutations in DAX-1 and SF-1. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 185:17-25
10. Wong M, Ikeda Y, Luo X, Caron KM, Weber TJ, Swain A, Schimmer BP, Parker KL. Steroidogenic factor 1 plays multiple roles in endocrine development and function. *Recent Prog Horm Res* 1997; 52:167-182; discussion 182-164
11. Zubair M, Oka S, Parker KL, Morohashi K. Transgenic expression of Ad4BP/SF-1 in fetal adrenal progenitor cells leads to ectopic adrenal formation. *Mol Endocrinol* 2009; 23:1657-1667
12. Scheys JO, Heaton JH, Hammer GD. Evidence of adrenal failure in aging Dax1-deficient mice. *Endocrinology* 2011; 152:3430-3439
13. 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; 151:1119-1128
14. Ching S, Vilain E. Targeted disruption of Sonic Hedgehog in the mouse adrenal leads to adrenocortical hypoplasia. *Genesis* 2009; 47:628-637
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; 135:2593-2602
16. 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; 361:165-171

17. Gomez M, Gomez V, Hergovich A. The Hippo pathway in disease and therapy: cancer and beyond. *Clin Transl Med* 2014; 3:22
18. Varelas X. The Hippo pathway effectors TAZ and YAP in development, homeostasis and disease. *Development* 2014; 141:1614-1626
19. Piccolo S, Dupont S, Cordenonsi M. The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond. *Physiol Rev* 2014; 94:1287-1312
20. Abduch RH, Bueno AC, Leal LF, Cavalcanti MM, Gomes DC, Brandalise SR, Masteralho 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;
21. Xin M, Kim Y, Sutherland LB, Qi X, McAnally J, Schwartz RJ, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN. Regulation of insulin-like growth factor signaling by Yap governs cardiomyocyte proliferation and embryonic heart size. *Sci Signal* 2011; 4:ra70
22. Xin M, Kim Y, Sutherland LB, Murakami M, Qi X, McAnally J, Porrello ER, Mahmoud AI, Tan W, Shelton JM, Richardson JA, Sadek HA, Bassel-Duby R, Olson EN. Hippo pathway effector Yap promotes cardiac regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110:13839-13844
23. Dhillon H, Zigman JM, Ye C, Lee CE, McGovern RA, Tang V, Kenny CD, Christiansen LM, White RD, Edelstein EA, Coppari R, Balthasar N, Cowley MA, Chua S, Jr., Elmquist JK, Lowell BB. Leptin directly activates SF1 neurons in the VMH, and this action by leptin is required for normal body-weight homeostasis. *Neuron* 2006; 49:191-203
24. Matzuk MM, Finegold MJ, Mather JP, Krummen L, Lu H, Bradley A. Development of cancer cachexia-like syndrome and adrenal tumors in inhibin-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:8817-8821
25. Heaton JH, Wood MA, Kim AC, Lima LO, Barlaskar FM, Almeida MQ, Frago MC, Kuick R, Lerario AM, Simon DP, Soares IC, Starnes E, Thomas DG, Latronico AC, Giordano TJ, Hammer GD. Progression to adrenocortical tumorigenesis in mice and

humans through insulin-like growth factor 2 and beta-catenin. *Am J Pathol* 2012; 181:1017-1033

26. Berthon A, Sahut-Barnola I, Lambert-Langlais S, de Jossineau C, Damon-Soubeyrand C, Louiset E, Taketo MM, Tissier F, Bertherat J, Lefrancois-Martinez AM, Martinez A, Val P. Constitutive beta-catenin activation induces adrenal hyperplasia and promotes adrenal cancer development. *Hum Mol Genet* 2010; 19:1561-1576

27. Sahut-Barnola I, de Jossineau C, Val P, Lambert-Langlais S, Damon C, Lefrancois-Martinez AM, Pointud JC, Marceau G, Sapin V, Tissier F, Ragazzon B, Bertherat J, Kirschner LS, Stratakis CA, Martinez A. Cushing's syndrome and fetal features resurgence in adrenal cortex-specific *Prkar1a* knockout mice. *PLoS Genet* 2010; 6:e1000980

28. Almeida MQ, Muchow M, Boikos S, Bauer AJ, Griffin KJ, Tsang KM, Cheadle C, Watkins T, Wen F, Starost MF, Bossis I, Nesterova M, Stratakis CA. Mouse *Prkar1a* haploinsufficiency leads to an increase in tumors in the *Trp53*^{+/-} or *Rb1*^{+/-} backgrounds and chemically induced skin papillomas by dysregulation of the cell cycle and Wnt signaling. *Hum Mol Genet* 2010; 19:1387-1398

29. Drelon C, Berthon A, Sahut-Barnola I, Mathieu M, Dumontet T, Rodriguez S, Batisse-Lignier M, Tabbal H, Tauveron I, Lefrancois-Martinez AM, Pointud JC, Gomez-Sanchez CE, Vainio S, Shan J, Sacco S, Schedl A, Stratakis CA, Martinez A, Val P. PKA inhibits WNT signalling in adrenal cortex zonation and prevents malignant tumour development. *Nat Commun* 2016; 7:12751

30. Doghman M, Karpova T, Rodrigues GA, Arhatte M, De Moura J, Cavalli LR, Virolle V, Barbry P, Zambetti GP, Figueiredo BC, Heckert LL, Lalli E. Increased steroidogenic factor-1 dosage triggers adrenocortical cell proliferation and cancer. *Mol Endocrinol* 2007; 21:2968-2987

31. Bingham NC, Verma-Kurvari S, Parada LF, Parker KL. Development of a steroidogenic factor 1/Cre transgenic mouse line. *Genesis* 2006; 44:419-424

32. Wang S, Ma K, Chen L, Zhu H, Liang S, Liu M, Xu N. TAZ promotes cell growth and inhibits Celastrol-induced cell apoptosis. *Biosci Rep* 2016; 36

- 33.** Vigneron AM, Ludwig RL, Vousden KH. Cytoplasmic ASPP1 inhibits apoptosis through the control of YAP. *Genes Dev* 2010; 24:2430-2439
- 34.** Deng Y, Matsui Y, Pan W, Li Q, Lai ZC. Yap1 plays a protective role in suppressing free fatty acid-induced apoptosis and promoting beta-cell survival. *Protein Cell* 2016; 7:362-372
- 35.** Cao JJ, Zhao XM, Wang DL, Chen KH, Sheng X, Li WB, Li MC, Liu WJ, He J. YAP is overexpressed in clear cell renal cell carcinoma and its knockdown reduces cell proliferation and induces cell cycle arrest and apoptosis. *Oncol Rep* 2014; 32:1594-1600
- 36.** Lin YT, Ding JY, Li MY, Yeh TS, Wang TW, Yu JY. YAP regulates neuronal differentiation through Sonic hedgehog signaling pathway. *Exp Cell Res* 2012; 318:1877-1888
- 37.** Hayashi S, Tamura K, Yokoyama H. Yap1, transcription regulator in the Hippo signaling pathway, is required for Xenopus limb bud regeneration. *Dev Biol* 2014; 388:57-67
- 38.** Guasti L, Cavlan D, Cogger K, Banu Z, Shakur A, Latif S, King PJ. Dlk1 up-regulates Gli1 expression in male rat adrenal capsule cells through the activation of beta1 integrin and ERK1/2. *Endocrinology* 2013; 154:4675-4684
- 39.** 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; 45:870-873
- 40.** Bastida CM, Cremades A, Castells MT, Lopez-Contreras AJ, Lopez-Garcia C, Sanchez-Mas J, Penafiel R. Sexual dimorphism of ornithine decarboxylase in the mouse adrenal: influence of polyamine deprivation on catecholamine and corticoid levels. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 292:E1010-1017
- 41.** Bielohuby M, Herbach N, Wanke R, Maser-Gluth C, Beuschlein F, Wolf E, Hoeflich A. Growth analysis of the mouse adrenal gland from weaning to adulthood: time- and sex-dependent alterations of cell size and number in the cortical compartment. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293:E139-146
- 42.** Mukai T, Kusaka M, Kawabe K, Goto K, Nawata H, Fujieda K, Morohashi K. Sexually dimorphic expression of Dax-1 in the adrenal cortex. *Genes Cells* 2002; 7:717-729

43. Sato T. The fine structure of the mouse adrenal X zone. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 1968; 87:315-329

44. 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; 148:976-988

45. Hu MC, Hsu NC, El Hadj NB, Pai CI, Chu HP, Wang CK, Chung BC. Steroid deficiency syndromes in mice with targeted disruption of Cyp11a1. *Mol Endocrinol* 2002; 16:1943-1950

8. Figures

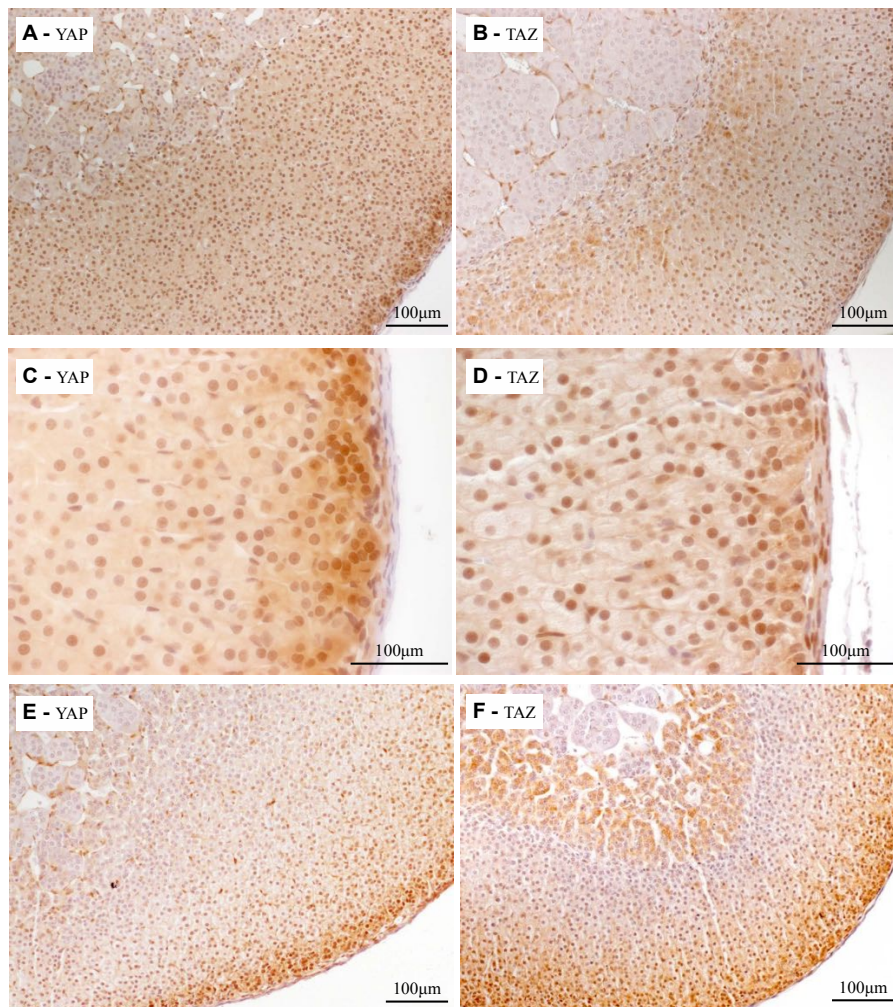


Figure 4.1 : Localization of YAP and TAZ in the adrenal gland of mice.

Immunohistochemical analysis of YAP (A) and TAZ (B) expression in adrenal glands from 10 week-old male mice. Immunohistochemical analysis of YAP (C) and TAZ (D) at higher magnification to illustrate expression in the capsule. Immunohistochemical analysis of YAP (E) and TAZ (F) expression in adrenal glands from a 10 week-old virgin female.

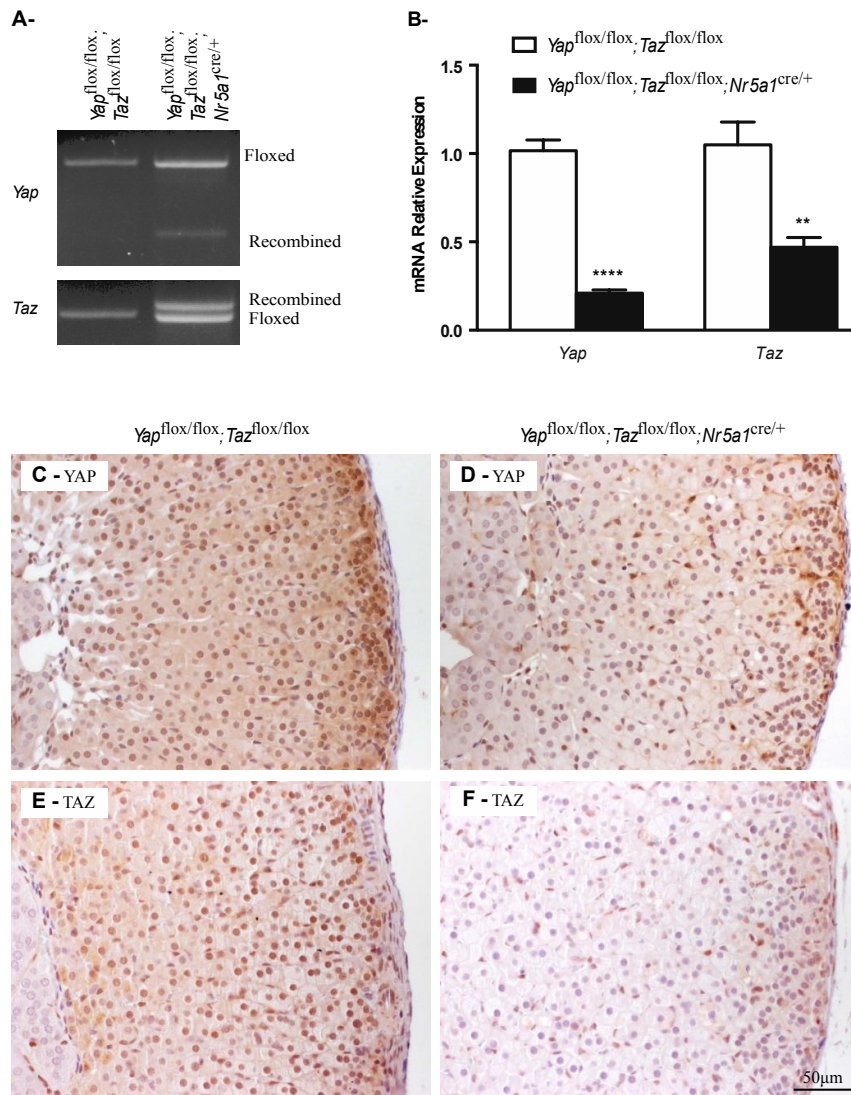


Figure 4.2 : *Yap* and *Taz* knockdown efficiency in male *Yap*^{flox/flox}; *Taz*^{flox/flox}; *Nr5a1*^{cre/+} mice.

A) PCR genotype analyses for *Yap* and *Taz* performed on adrenal glands from 10 week-old males of the indicated genotypes. Bands corresponding to the floxed and Cre-recombined alleles are indicated. **B)** RT-qPCR analysis of *Yap* and *Taz* mRNA levels in the adrenal glands of 10 week-old males of the indicated genotypes (n = 6 animals/genotype). All data were normalized to the housekeeping gene *Rpl19* and are expressed as mean (columns) ± SEM (error bars). Asterisks = significantly different from control (** P < 0.01; **** P < 0.0001). **C, D)** Immunohistochemical analysis of YAP expression in adrenal glands from 10 week-old male *Yap*^{flox/flox}; *Taz*^{flox/flox} (**C**) and *Yap*^{flox/flox}; *Taz*^{flox/flox}; *Nr5a1*^{cre/+} (**D**) mice. **E, F)** Immunohistochemical analysis of TAZ in adrenal glands from 10 week-old male *Yap*^{flox/flox}; *Taz*^{flox/flox} (**E**) and *Yap*^{flox/flox}; *Taz*^{flox/flox}; *Nr5a1*^{cre/+} (**F**) mice. Scale bar in (**F**) is valid for all images.

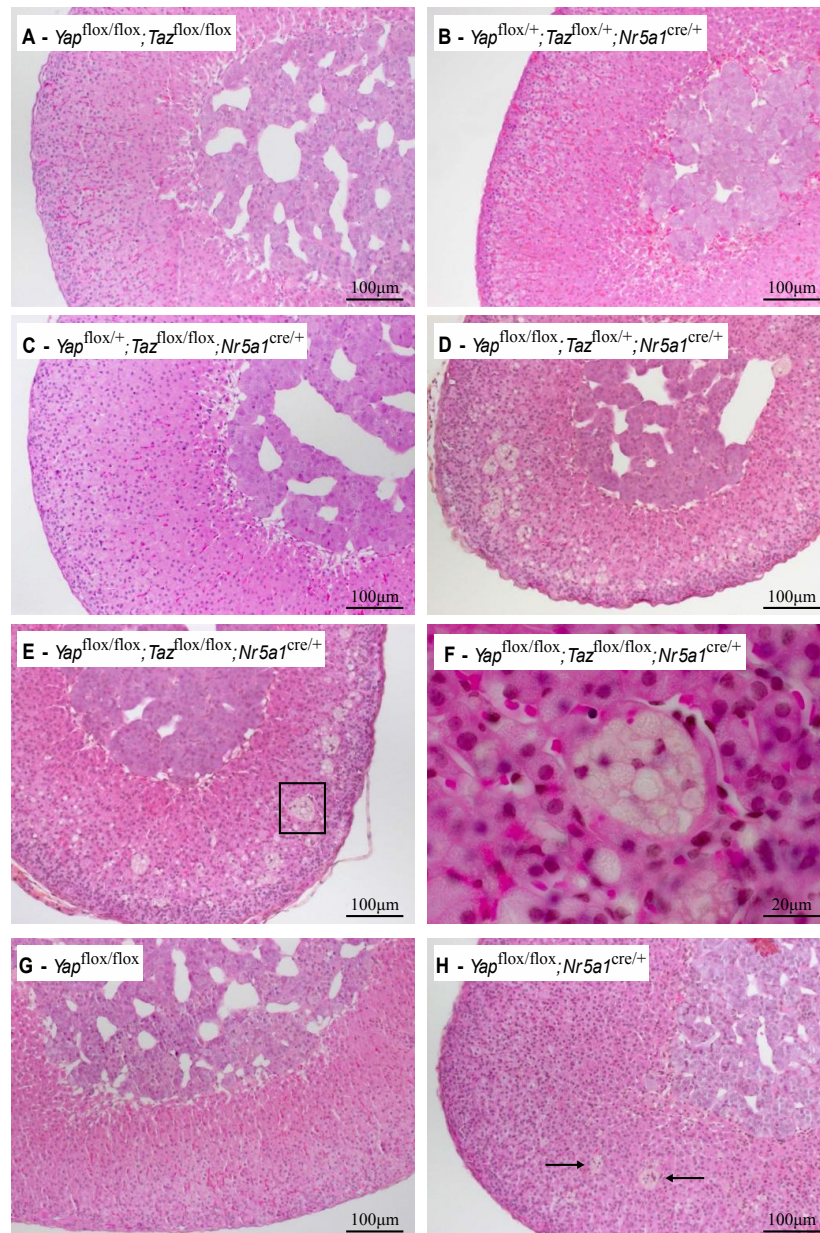


Figure 4.3 : YAP and TAZ are required for the maintenance of the adrenal cortex.

A-E) Photomicrographs comparing the adrenal glands of 20 week-old male $Yap^{flox/flox}, Taz^{flox/flox}$ (A), $Yap^{flox/+}, Taz^{flox/+}; Nr5a1^{cre/+}$ (B), $Yap^{flox/+}, Taz^{flox/flox}; Nr5a1^{cre/+}$ (C), $Yap^{flox/flox}, Taz^{flox/+}; Nr5a1^{cre/+}$ (D) and $Yap^{flox/flox}, Taz^{flox/flox}; Nr5a1^{cre/+}$ mice (E). **F)** Higher magnification of the boxed area in photomicrograph (E). **G, H)** Photomicrographs comparing the adrenal glands of 20 week-old male $Yap^{flox/flox}$ (G) and $Yap^{flox/flox}; Nr5a1^{cre/+}$ (H) mice. Arrows indicate multinuclear lipoid structures. Hematoxylin, phloxine and saffron (HPS) stain.

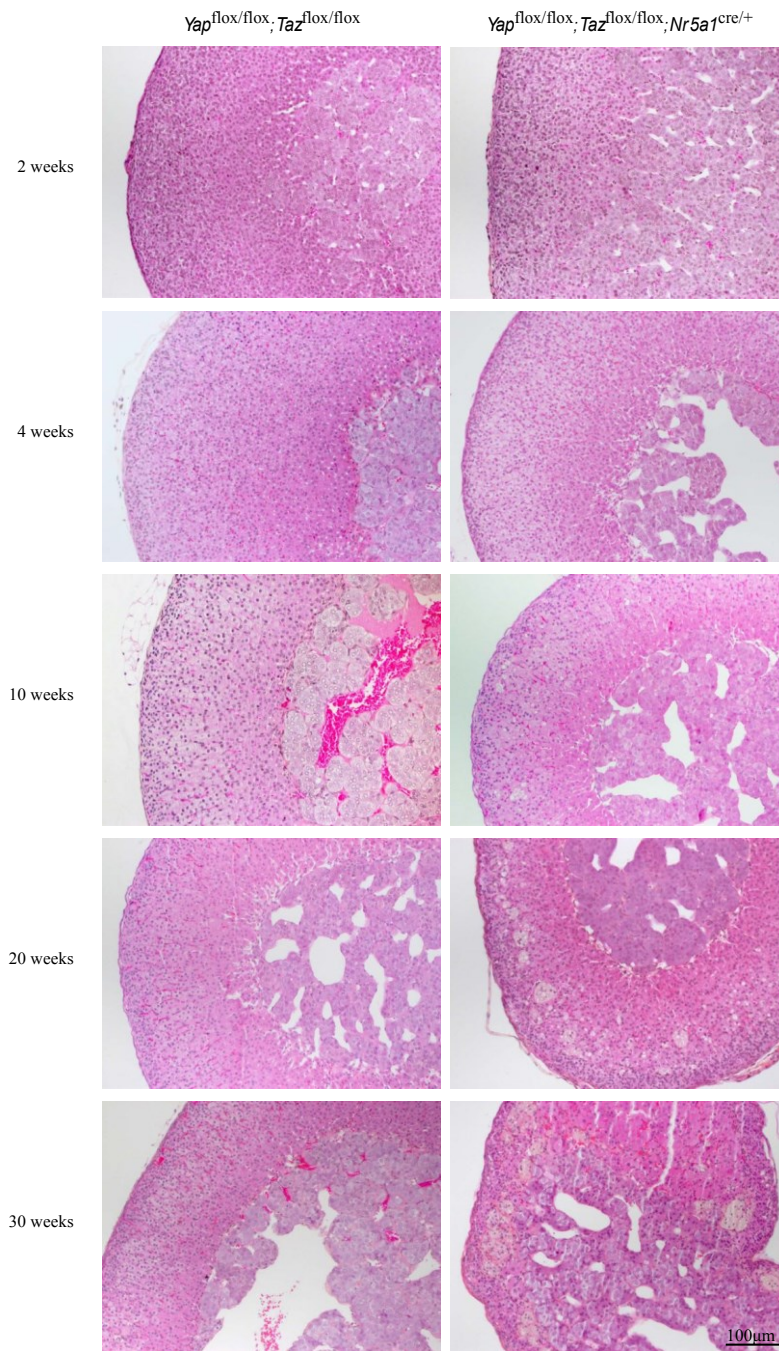


Figure 4.4 : Progressive adrenal cortex degeneration in male $Yap^{flox/flox}; Taz^{flox/flox}; Nr5a1^{cre/+}$ mice.

Photomicrographs comparing adrenal gland histology of $Yap^{flox/flox}; Taz^{flox/flox}; Nr5a1^{cre/+}$ to that of $Yap^{flox/flox}; Taz^{flox/flox}$ controls at the indicated ages. Scale bar (lower right) is valid for all images; hematoxylin, phloxine and saffron (HPS) stain.

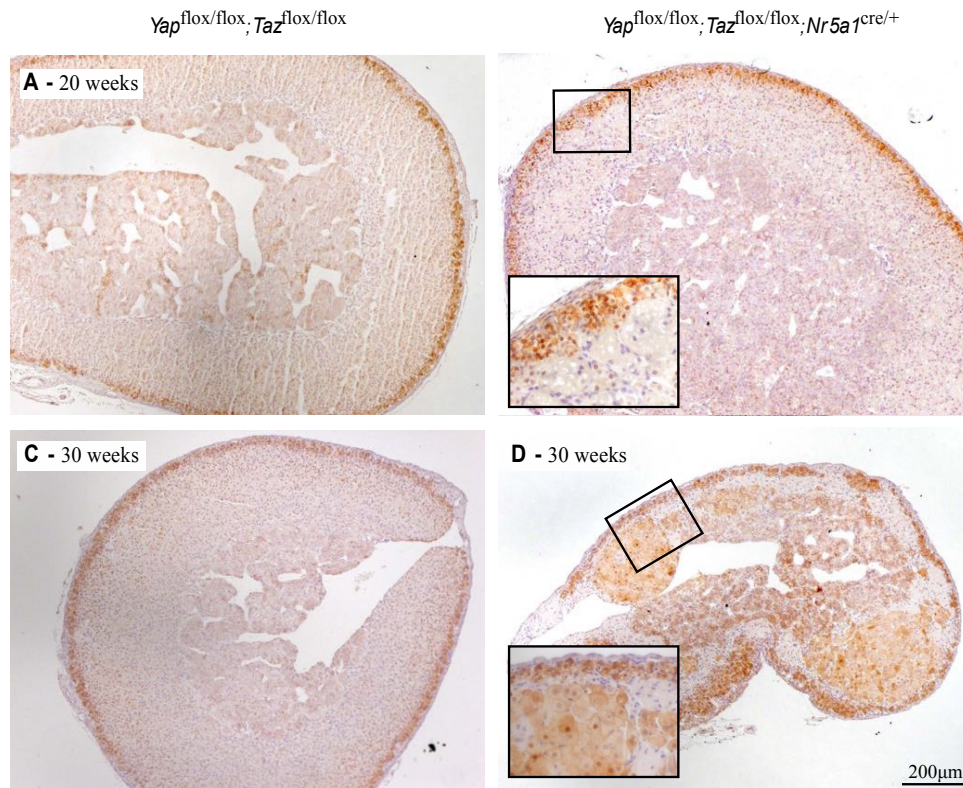


Figure 4.5 : Zonation in *Yap*^{flox/flox};*Taz*^{flox/flox};*Nr5a1*^{cre/+} mice.

A, D) Immunohistochemical analysis of CTNNB1 expression in adrenal glands from 20 week-old male *Yap*^{flox/flox};*Taz*^{flox/flox} (**A**) *Yap*^{flox/flox};*Taz*^{flox/flox};*Nr5a1*^{cre/+} (**B**) and 30 week-old male *Yap*^{flox/flox};*Taz*^{flox/flox} (**C**) and *Yap*^{flox/flox};*Taz*^{flox/flox};*Nr5a1*^{cre/+} (**D**) mice. Inserts in (**B**) and (**D**) show the expression of CTNNB1 in the zG at higher magnification. Insert in (**D**) also shows the expression of CTNNB1 in hypertrophic cells of the foci in the zF of mutant animals. Scale bar in (**D**) is valid for all images.

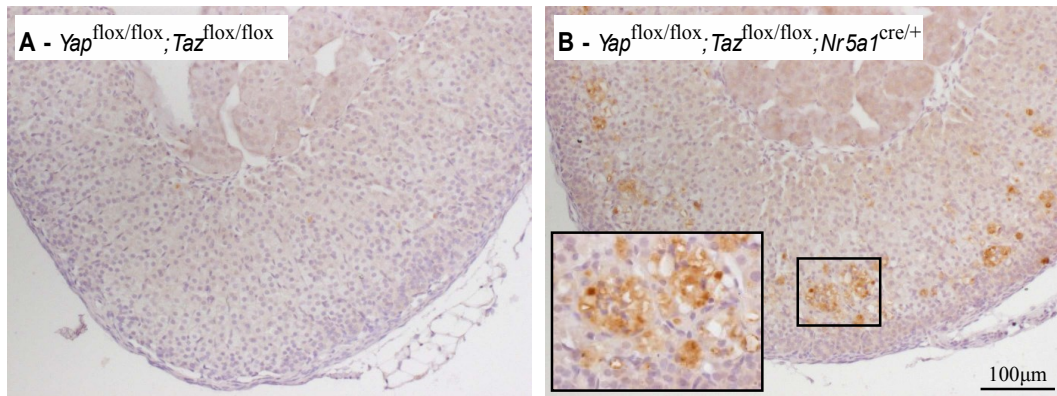


Figure 4.6 : Adrenal gland degeneration in the *Yap*^{flox/flox};*Taz*^{flox/flox};*Nr5a1*^{cre/+} model is associated with apoptosis.

A,B) Immunohistochemical analysis of cleaved caspase-3 in adrenal glands from 20 week-old male *Yap*^{flox/flox};*Taz*^{flox/flox} (**A**) and *Yap*^{flox/flox};*Taz*^{flox/flox};*Nr5a1*^{cre/+} (**B**) mice. Insert in (**B**) shows that cleaved caspase-3 expression is associated with the multinucleated, vacuolar cells. Scale bar in (**B**) is valid for both images.

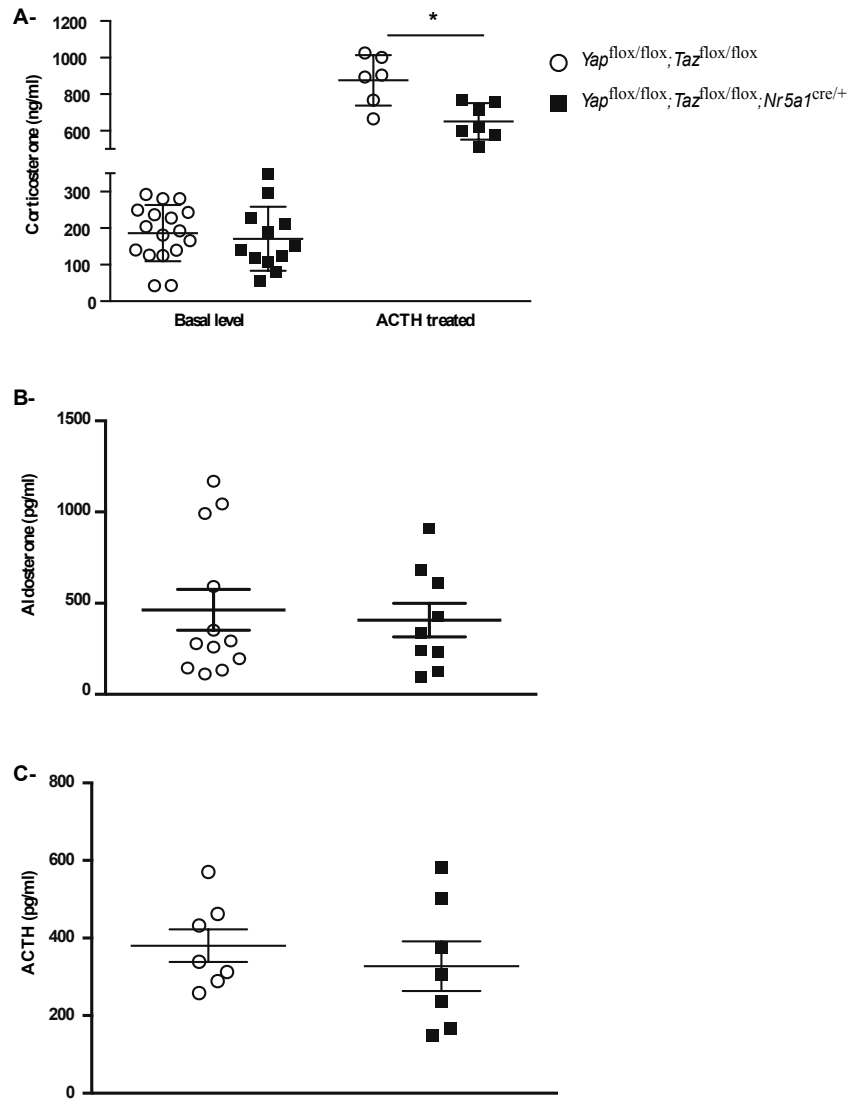


Figure 4.7 : Circulating hormone levels in male *Yap*^{flox/flox}; *Taz*^{flox/flox}; *Nr5a1*^{cre/+} mice.

A) Serum corticosterone levels from untreated and ACTH-treated 10 week-old male *Yap*^{flox/flox}; *Taz*^{flox/flox} and *Yap*^{flox/flox}; *Taz*^{flox/flox}; *Nr5a1*^{cre/+} mice. **B)** Serum aldosterone levels from 20 week-old male *Yap*^{flox/flox}; *Taz*^{flox/flox} and *Yap*^{flox/flox}; *Taz*^{flox/flox}; *Nr5a1*^{cre/+} mice. **C)** Plasma ACTH levels in 10 week-old male *Yap*^{flox/flox}; *Taz*^{flox/flox} and *Yap*^{flox/flox}; *Taz*^{flox/flox}; *Nr5a1*^{cre/+} mice. Sample numbers analyzed varied by hormonal test and genotype. Values for *Yap*^{flox/flox}; *Taz*^{flox/flox} were basal corticosterone: n = 17; ACTH induced corticosterone: n = 6; aldosterone: n = 12; ACTH: n= 7. Values for *Yap*^{flox/flox}; *Taz*^{flox/flox}; *Nr5a1*^{cre/+} were basal corticosterone: n = 12; ACTH induced corticosterone: n = 7; aldosterone: n = 9; ACTH: n= 7. Data are expressed as mean (columns) ± SEM (error bars). Asterisks = significantly different from control (* P < 0.05; ** P < 0.01).

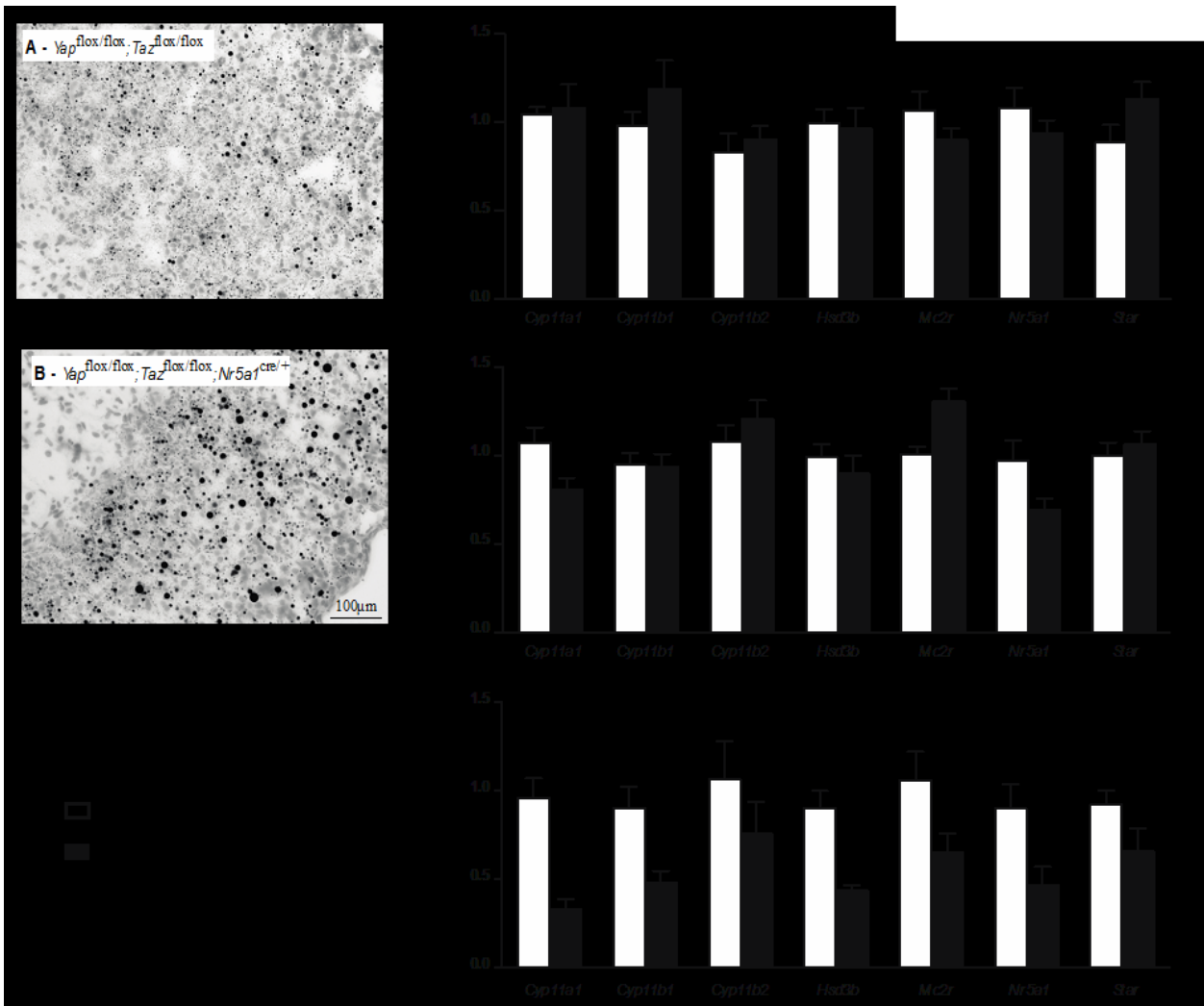


Figure 4.8 : Lipid accumulation and expression of steroidogenic genes are altered in the adrenal glands of male $Yap^{flx/flx}; Taz^{flx/flx}; Nr5a1^{cre/+}$ mice.

A, B) Oil Red O staining of adrenal glands of 10 week-old male $Yap^{flx/flx}; Taz^{flx/flx}$ (**A**) and $Yap^{flx/flx}; Taz^{flx/flx}; Nr5a1^{cre/+}$ (**B**) mice. **C-E**) RT-qPCR analysis of genes involved in steroidogenesis in adrenal gland from 2 week-old (**C**), 10 week-old (**D**) and 20 week-old (**E**) male mice of the indicated genotypes (n = 6 animals/genotype). All data were normalized to the housekeeping gene *Rpl19* and are expressed as mean (columns) \pm SEM (error bars). Asterisks = significantly different from control (* P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001).

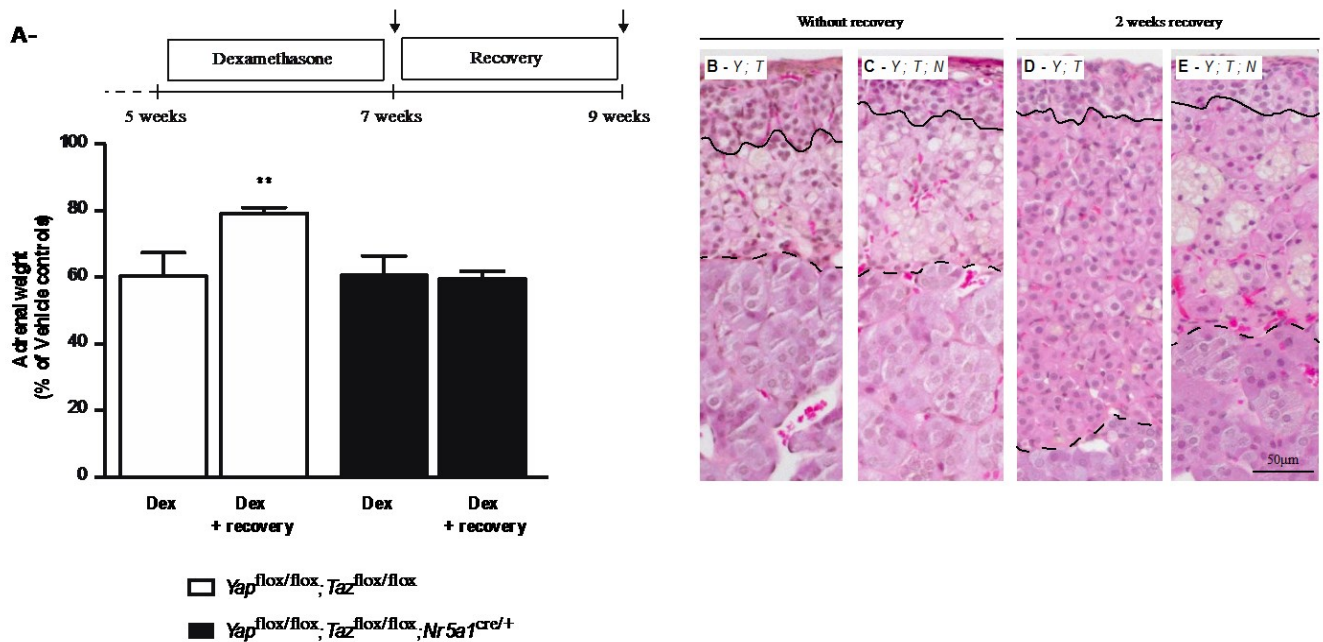


Figure 4.9 : Regeneration of the zF following dexamethasone treatment is impaired in male $Yap^{flox/flox}; Taz^{flox/flox}; Nr5a1^{cre/+}$

A) Comparison of adrenal weights of male $Yap^{flox/flox}; Taz^{flox/flox}$ and $Yap^{flox/flox}; Taz^{flox/flox}; Nr5a1^{cre/+}$ mice 2 weeks following dexamethasone treatment and 2 weeks following dexamethasone treatment with a 2 week recovery period (n = 8 animals/genotype, vehicle = 0,05% ethanol). Data are expressed as means (columns) \pm SEM (error bars) and are presented as % of vehicle controls. Asterisks = significantly different from control (** P < 0.01). B-E) Photomicrographs comparing the adrenal glands of $Yap^{flox/flox}; Taz^{flox/flox}$ (B) and $Yap^{flox/flox}; Taz^{flox/flox}; Nr5a1^{cre/+}$ (C) mice 2 weeks following dexamethasone treatment and $Yap^{flox/flox}; Taz^{flox/flox}$ (D) and $Yap^{flox/flox}; Taz^{flox/flox}; Nr5a1^{cre/+}$ (E) mice 2 weeks following dexamethasone treatment with a 2 week recovery period. Line indicates the border between the zG and the zF. Dashed line indicates the border between the zF and the medulla. Scale bar (lower right) is valid for all images; hematoxylin, phloxine and saffron (HPS) stain. Y;T = $Yap^{flox/flox}; Taz^{flox/flox}$ and Y;T;N = $Yap^{flox/flox}; Taz^{flox/flox}; Nr5a1^{cre/+}$.

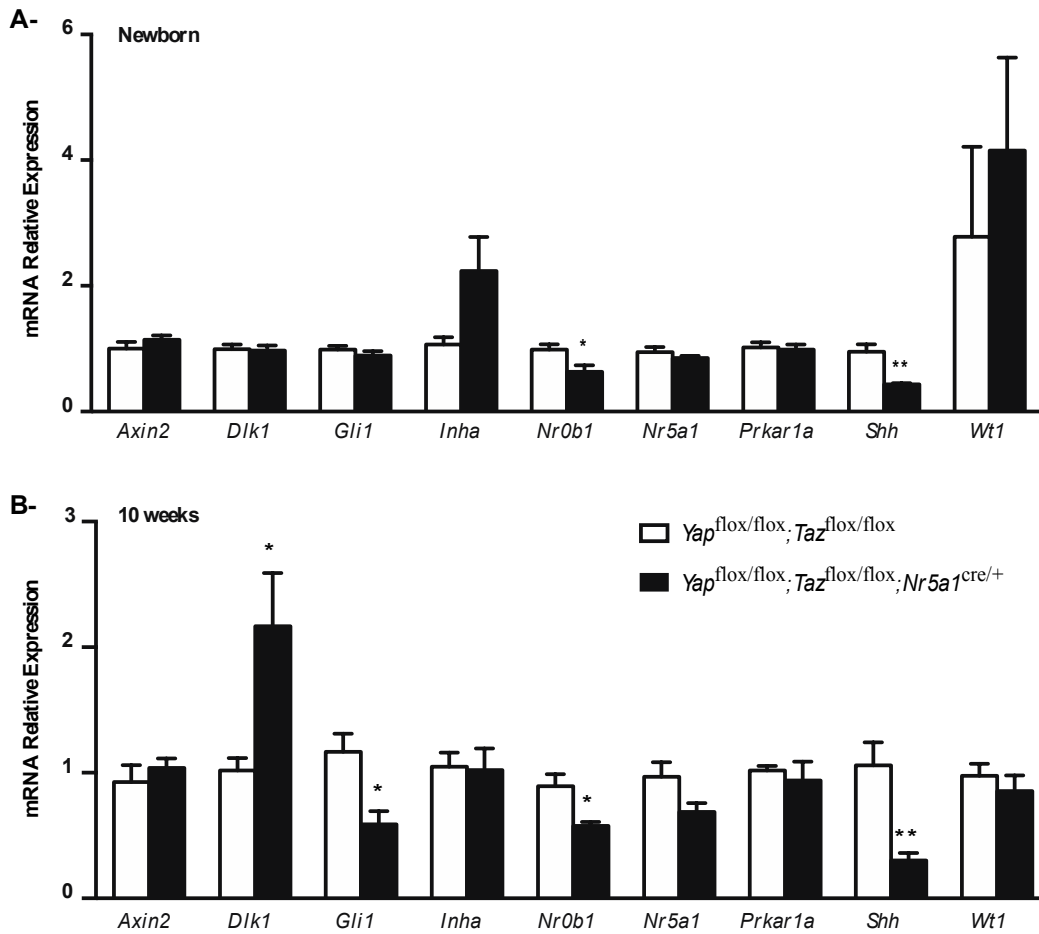


Figure 4.10 : Expression of genes involved in stem cell or progenitor cell maintenance in adrenal glands in male *Yap^{flox/flox}; Taz^{flox/flox}; Nr5a1^{cre/+}* mice.

A, B) RT-qPCR analysis of genes involved in stem cell or progenitor cell maintenance in adrenal glands from newborn (**A**) and 10 week-old (**B**) 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).

9. Tables

Table 4.1 : Lists of Antibodies

Peptide / Protein Target	Name of Antibody	Manufacturer, Catalog No., Lot Number	Species Raised / Monoclonal or Polyclonal	Dilution Used	RRID
BrdU	Monoclonal mouse antibromodeoxyuridine, Clone Bu20a	Dako Corp, M0744, lot 31732	Mouse; monoclonal	1:100	AB_10013660
Cleaved Caspase-3	Cleaved caspase-3 (Asp175) antibody #9661	Cell Signaling, 9661, lot 38	Rabbit; polyclonal	1:100	AB_234188
TAZ*	Anti-Wwtr1	Sigma-Aldrich, HPA007415, lot F104279	Rabbit; polyclonal	1:600	AB_1080602
YAP	YAP antibody #4912	Cell Signaling, 4912, lot 5	Rabbit; polyclonal	1:200	AB_2218911
CTNNB1	CTNNB1 antibody #8480	Cell Signaling, 8480, lot 5	Rabbit; polyclonal	1:100	AB_11127855

* **Antigen sequence for TAZ** : MNPKPSSWRKKILPESFFKEPDSGSHSRQSSTDSS
GGHPGPRLAGGAQHVRSHSSPASLQLGTGAGAAGSPAQQHAHLRQQSYDVTDELPLP
PGWEMTFTATGQRYFLNHIEKITTWQDPRKAMNQPLNHMNLHPAVSST

10. Supplementary data

10.1. Supplementary figures

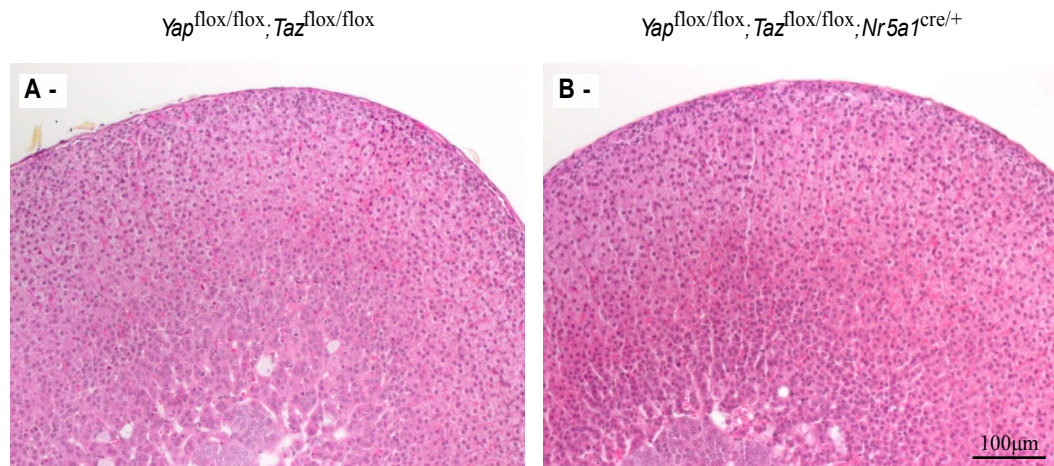


Figure S4.1 : Adrenal glands appear normal in female $Yap^{flox/flox}; Taz^{flox/flox}; Nr5a1^{cre/+}$

A, B) Photomicrographs comparing adrenal glands of parous female $Yap^{flox/flox}; Taz^{flox/flox}$ and $Yap^{flox/flox}; Taz^{flox/flox}; Nr5a1^{cre/+}$ mice at 8 months of age. Scale bar in (A) is valid for both images; hematoxylin, phloxine and saffron (HPS) stain.

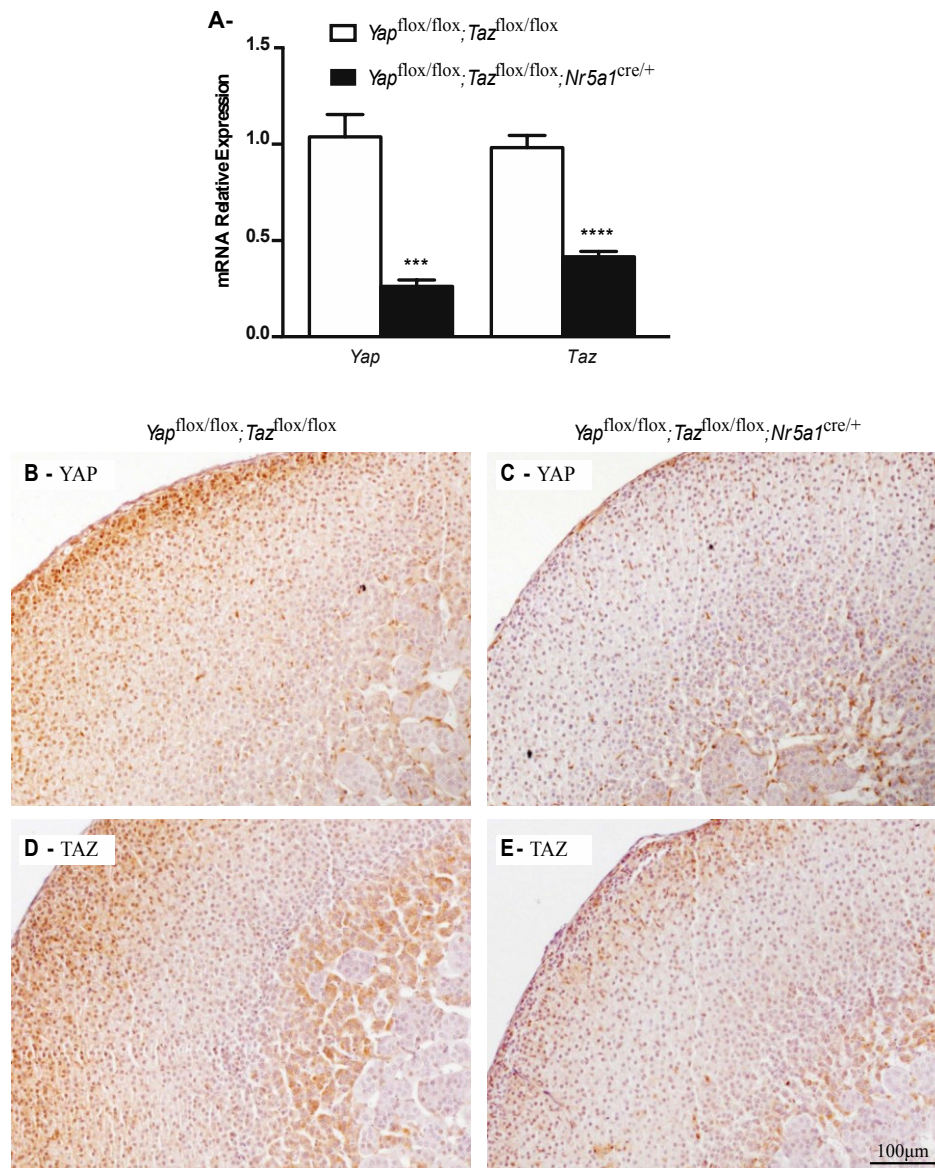


Figure S4.2 : *Yap* and *Taz* knockdown efficiency in female $Yap^{flox/flox}; Taz^{flox/flox}; Nr5a1^{cre/+}$ mice.

A) RT-qPCR analysis of *Yap* and *Taz* mRNA levels in the adrenal glands of 10 week-old virgin females 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 < 0.001; **** P < 0.0001). **B, C)** Immunohistochemical analysis of YAP expression in adrenal glands from 10 week-old virgin female $Yap^{flox/flox}; Taz^{flox/flox}$ (**B**) and $Yap^{flox/flox}; Taz^{flox/flox}; Nr5a1^{cre/+}$ (**C**) mice. **D, E)** Immunohistochemical analysis of TAZ in adrenal glands from 10 week-old female $Yap^{flox/flox}; Taz^{flox/flox}$ (**D**) and $Yap^{flox/flox}; Taz^{flox/flox}; Nr5a1^{cre/+}$ (**E**) mice. Scale bar in (**E**) is valid for all images.

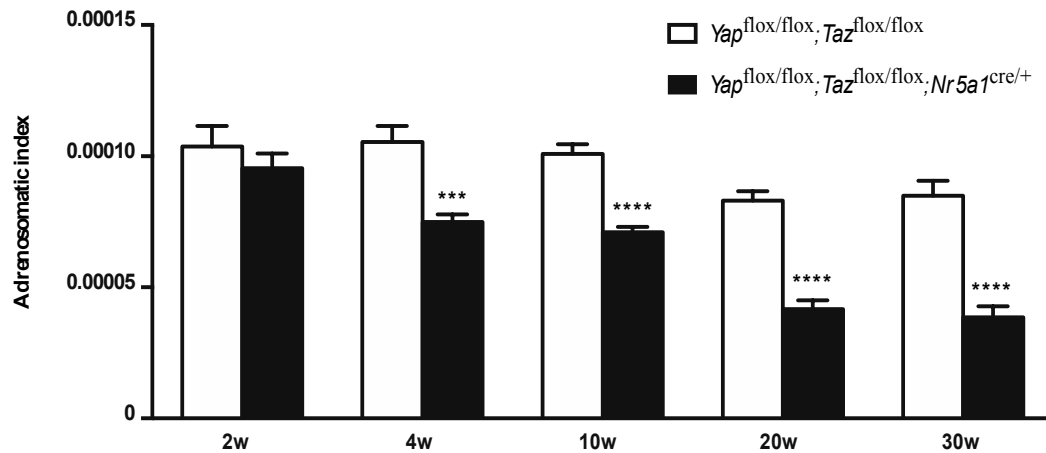


Figure S4.3 : Adrenal cortex degeneration in *Yap*^{flox/flox};*Taz*^{flox/flox};*Nr5a1*^{cre/+} males.

Time course analysis of the adrenosomatic index (adrenal gland weight/corporal weight) comparing male *Yap*^{flox/flox};*Taz*^{flox/flox} to *Yap*^{flox/flox};*Taz*^{flox/flox};*Nr5a1*^{cre/+} mice. Sample numbers analyzed varied by age and genotype. Values for *Yap*^{flox/flox};*Taz*^{flox/flox};*Nr5a1*^{cre/+} are 2w: n = 6; 4w: n = 12; 10w: n = 38; 20w: n = 8; 30w: n = 8; values for *Yap*^{flox/flox};*Taz*^{flox/flox} are 2w: n = 8; 4w: n = 4; 10w: n = 38; 20w: n = 12; 30w: n = 6. Data are expressed as means (columns) ± SEM (error bars). Asterisks = significantly different from control (*** P < 0.001; **** P < 0.0001).

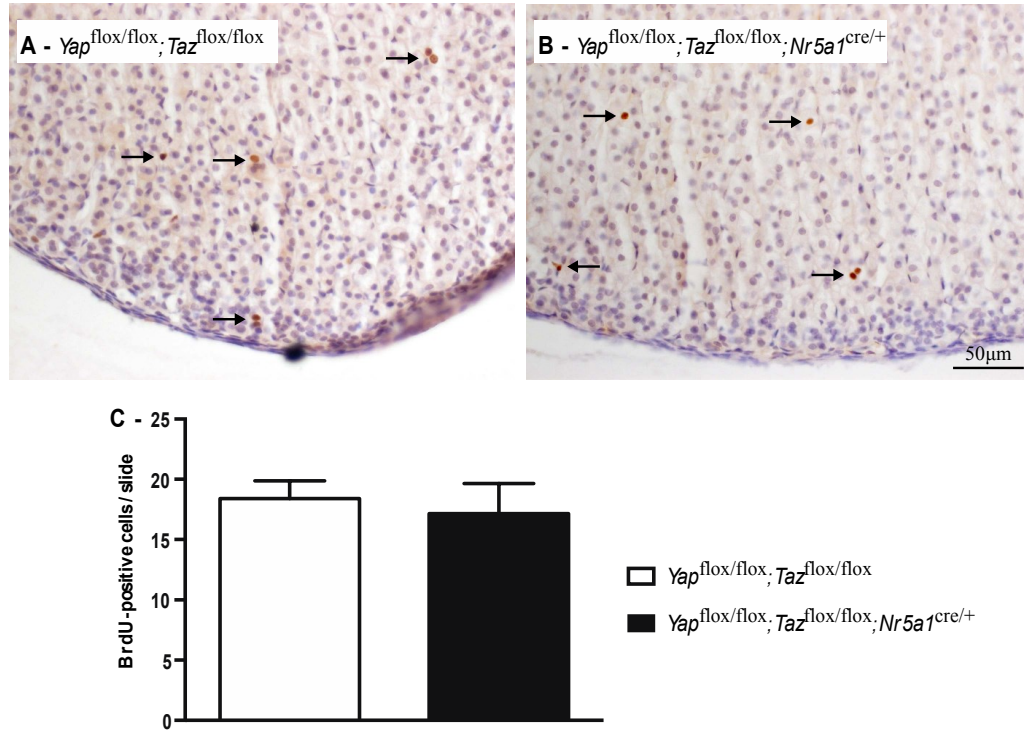


Figure S4.4 : Adrenal cell proliferation is not affected in male $Yap^{flox/flox}; Taz^{flox/flox}; Nr5a1^{cre/+}$ mice.

A, B) Immunohistochemical analysis of BrdU incorporation in adrenal glands from 10 week-old $Yap^{flox/flox}; Taz^{flox/flox}$ (**A**) and $Yap^{flox/flox}; Taz^{flox/flox}; Nr5a1^{cre/+}$ males (**B**). Arrows = BrdU-positive cells. Scale bar in (**B**) is valid for (**A**). **C)** BrdU-positive cell counts in $Yap^{flox/flox}; Taz^{flox/flox}; Nr5a1^{cre/+}$ and $Yap^{flox/flox}; Taz^{flox/flox}$ controls. Data for the evaluation of proliferation are from blind counts of 5 different slides per adrenal glands (n=3 animals/genotype). All data are expressed as means (columns) ± SEM (error bars).

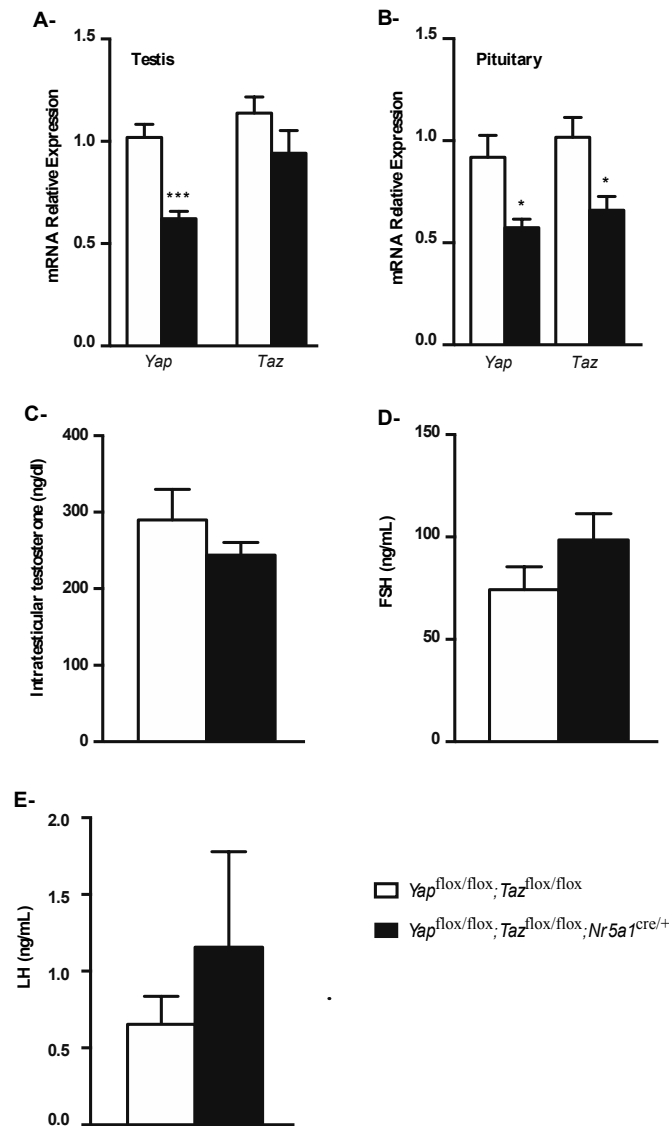


Figure S4.5 : Hormone production by the testis and pituitary is normal in $Yap^{flox/flox}; Taz^{flox/flox}; Nr5a1^{cre/+}$ mice.

A, B) RT-qPCR analysis of *Yap* and *Taz* mRNA levels in testes (**A**) and pituitary (**B**) of the indicated genotypes (n = 6 animals/genotype). **C)** Intratesticular testosterone levels in 10 week-old male mice of the indicated genotypes (n = 11 for $Yap^{flox/flox}; Taz^{flox/flox}$ and n = 8 for $Yap^{flox/flox}; Taz^{flox/flox}; Nr5a1^{cre/+}$). **D)** Serum FSH levels in 10 week-old male mice of the indicated genotypes (n = 11 for $Yap^{flox/flox}; Taz^{flox/flox}$ and n = 8 for $Yap^{flox/flox}; Taz^{flox/flox}; Nr5a1^{cre/+}$). **E)** Serum LH levels in 10 week-old males of the indicated genotypes (n = 11 for $Yap^{flox/flox}; Taz^{flox/flox}$ and n = 8 for $Yap^{flox/flox}; Taz^{flox/flox}; Nr5a1^{cre/+}$). RT-qPCR data were normalized to the housekeeping gene *Rpl19*. All data are expressed as mean (columns) \pm SEM (error bars). Asterisks = significantly different from control (* P < 0.05; *** P < 0.001).

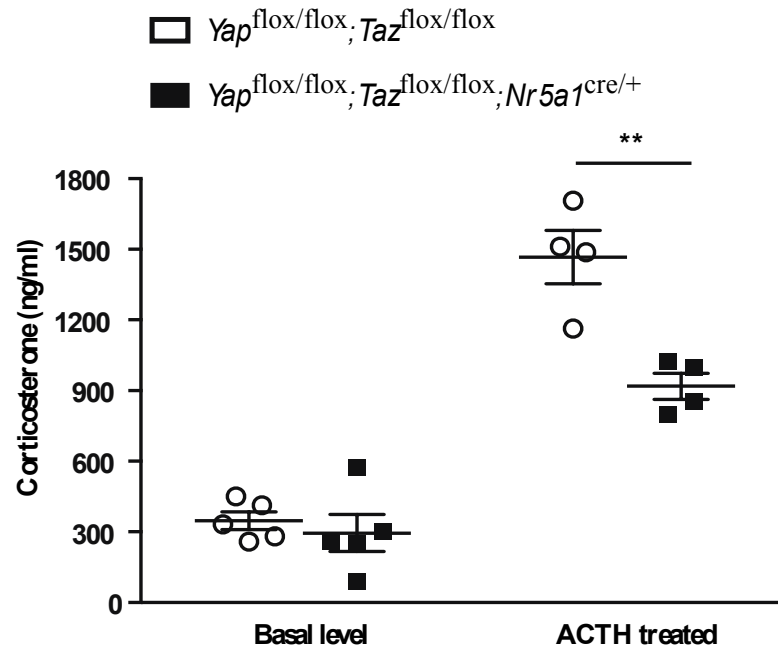


Figure S4.6 : Circulating corticosterone levels are normal in female $Yap^{flox/flox}; Taz^{flox/flox}; Nr5a1^{cre/+}$ mice.

Serum corticosterone levels in untreated (n=5 animals/genotype) and ACTH-treated (n=4 animals/genotype) 10 week-old female $Yap^{flox/flox}; Taz^{flox/flox}$ and $Yap^{flox/flox}; Taz^{flox/flox}; Nr5a1^{cre/+}$ mice. Data are expressed as means (columns) \pm SEM (error bars). Asterisks = significantly different from control (** P < 0.01).

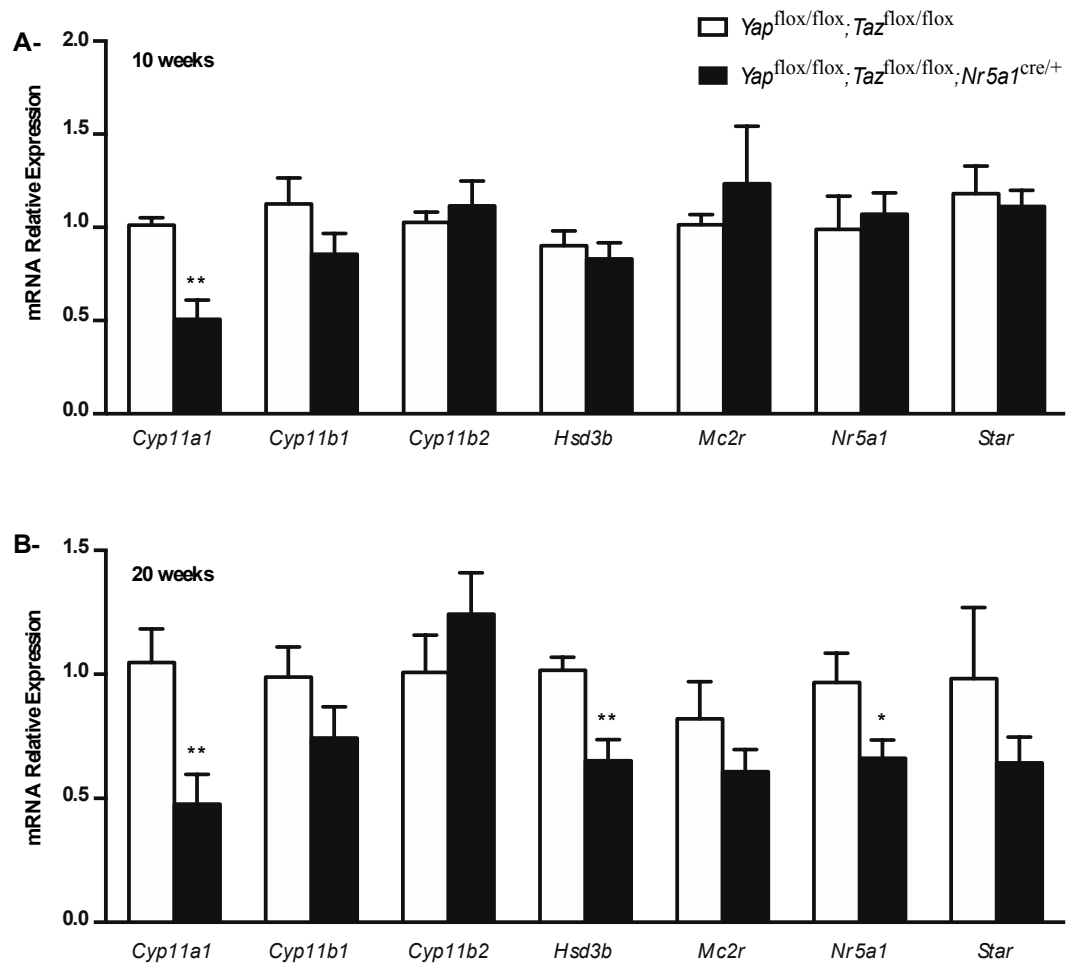


Figure S4.7 : Expression of steroidogenic genes is altered in the adrenal glands of *Yap*^{flox/flox}; *Taz*^{flox/flox}; *Nr5a1*^{cre/+} mice.

A, B RT-qPCR analysis of genes involved in steroidogenesis in adrenal glands from 10 week-old (**A**) and 20 week-old (**B**) female mice of the indicated phenotype (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).

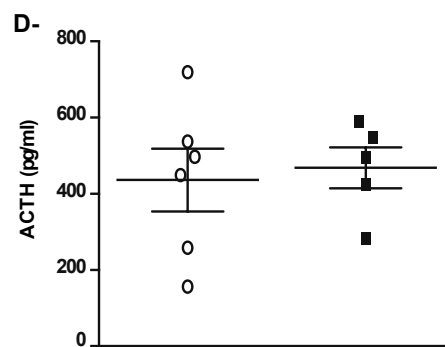
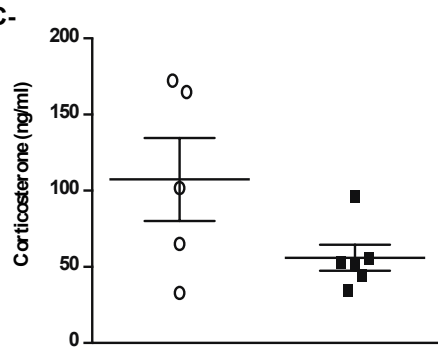
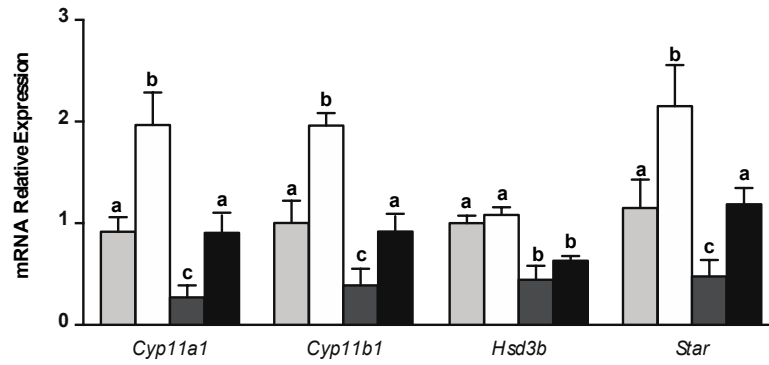
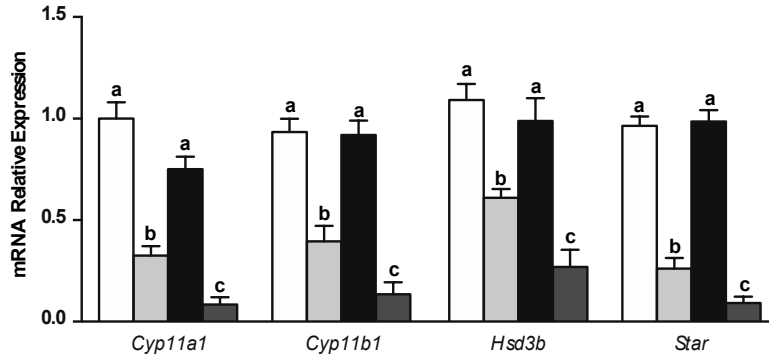


Figure S4.8 : Effect of dexamethasone on steroidogenesis in the adrenal gland of male *Yap*^{flox/flox};*Taz*^{flox/flox};*Nr5a1*^{cre/+} mice.

A) RT-qPCR analysis of genes involved in steroidogenesis in adrenal gland of treated mice of the indicated genotypes following dexamethasone treatment (n = 6 animals/genotype) **B)** RT-qPCR analysis of genes involved in steroidogenesis in adrenal gland of treated mice of the indicated genotypes following dexamethasone treatment and a 2 weeks recovery period (n = 6 animals/genotype). **C)** Serum corticosterone levels following dexamethasone treatment and a 2 weeks recovery period in mice of the indicated genotypes (n = 5 for *Yap*^{flox/flox};*Taz*^{flox/flox} and n = 6 for *Yap*^{flox/flox};*Taz*^{flox/flox};*Nr5a1*^{cre/+}). **D)** Plasma ACTH levels following dexamethasone treatment and a 2 weeks recovery period in mice of the indicated genotypes (n = 6 for *Yap*^{flox/flox};*Taz*^{flox/flox} and n = 5 for *Yap*^{flox/flox};*Taz*^{flox/flox};*Nr5a1*^{cre/+}). All data are expressed as means (columns) ± SEM (error bars), qPCR data were normalized to the housekeeping gene *Rpl19*. Different letters in (**A**, **B**) = significantly different (P < 0.05).

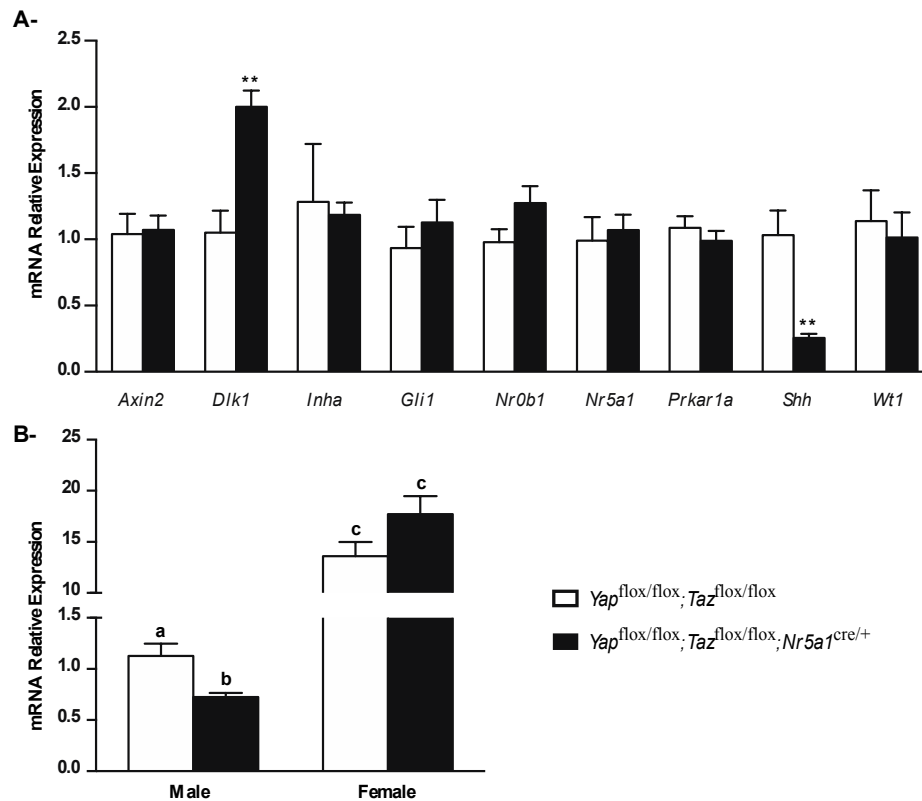


Figure S4.9 : Adrenal cortex progenitor cell populations are potentially altered in female *Yap*^{flox/flox};*Taz*^{flox/flox};*Nr5a1*^{cre/+} mice.

A) RT-qPCR analysis of genes involved in stem cell or progenitor cell maintenance in adrenal glands from 10 week-old female mice of the indicated genotypes (n = 6 animals/genotype). **B)** RT-qPCR analysis comparing *Nr0b1* expression levels in adrenals gland from 10 week-old male and female 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 in **(A)** = significantly different from control (** P < 0.001), different letters in **(B)** = significantly different (P < 0.05).

10.2. Supplementary table

Table S4.1 : Quantitative RT-qPCR primer sequences

Gene	Forward	Reverse
<i>Axin2</i>	GAGGTGGTACCTTGCCAAAA	TTCCTGTCCCTCTGCTGACT
<i>Cyp11a1</i>	GTGACCTTGCAGAGGTACACTGT	GTGACTCCAGCCTTCAGTTCACA
<i>Cyp11b1</i>	GCTTCACCATGTGCTGAAATCC	AGAAGAGAGGGCAATGTGTCA
<i>Cyp11b2</i>	GCACCAGGTGGAGAGTATGC	CCATTCTGGCCCATTTAGC
<i>Dlk1</i>	GCGAAATAGACGTTTCGGGCT	GGAGCATTCGTACTIONGGCCTT
<i>Gli1</i>	CCTGCCAGCTGAAGTCAGAG	AACAGGTGATCCTGTGTGCC
<i>Hsdb3</i>	AGCTGCAGACAAAGACCAAGGTGA	GAACACAGGCCTCCAATAGGTTCT
<i>Inha</i>	CCGTTGGGGGTTTCATGCAC	GTTGGGATGGCCGGAATACATA
<i>Mc2r</i>	TGAAAAGTTCTCAGCACCAC	TCTTTGTGTGGAAGGATCTGG
<i>Nr0b1</i>	TCCAGGCCATCAAGAGTTTC	ATCTGCTGGGTTCTCCACTG
<i>Nr5a1</i>	TCTCTAACCGCACCATCA	TCGACAATGGAGATAAAGGT
<i>Rpl19</i>	CTGAAGGTCAAAGGGAATGTG	GGACAGAGTCTTGATGATCTC
<i>Shh</i>	AGCGGCAGATATGAAGGGAAG	CTTGTCTTTGCACCTCTGAGT
<i>Star</i>	GATTAAGGCACCAAGCTGTGCTG	CTGCTGGCTTTCCTTCTTCCAGC
<i>Taz</i>	ACTGGCCAGAGATACTTCTTAATC	AGGCTGATTCATCACCTTCTG
<i>Wt1</i>	AGCTGTCCCACTTACAGATGCAT	GGATGCTGGACTGTCTCCGTGT
<i>Yap</i>	GACGCTGATGAATTCTGCCTCA	CATGGCAAACGAGGGTCC

Chapitre 5 : YAP regulates steroidogenesis in the Leydig cell line MLTC-1

Adrien Levasseur, Martin Morin, Nicolas Gévry, Derek Boerboom, Alexandre Boyer

Contributions des auteurs : Dans le cadre de cet article, j'ai élaboré le projet de recherche et écrit l'article en collaboration avec Alexandre Boyer et Derek Boerboom. J'ai réalisé toutes les expériences présentées dans cet article à l'exception du CHIP qui a été réalisé par Martin Morin et Nicolas Gévry

L'article est en révision dans la revue *Reproduction* (REP-18-0268).

YAP regulates steroidogenesis in the Leydig cell line MLTC-1

Adrien Levasseur¹, Martin Morin², Nicolas Gévry², Derek Boerboom¹, Alexandre Boyer^{1*}

¹ Centre de Recherche en Reproduction et Fertilité, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, Saint-Hyacinthe, QC, Canada, J2S 7C6

² Département de biologie, Faculté des sciences, Université de Sherbrooke, 2500 boul. de l'Université, Sherbrooke, QC, Canada, J1K 2R1

***Correspondence:** 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. Tel: +1-450-773-8521, ex 8345; Fax: +450-778-8103; E-mail: alexandre.boyer.1@umontreal.ca

Financial Support: This work was supported by the Discovery Grants RGPIN-2014-04358 (to AB) and RGPIN-03745 (to DB) from the National Sciences and Engineering Research Council of Canada. 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 U54-HD28934.

Disclosure Summary: The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

1. Abstract

Although the essential role of protein kinase A (PKA) in the induction of steroidogenesis in Leydig cells is well established, it remains unclear which signaling pathway(s) act downstream of PKA to exert its effects. One pathway that can be activated by PKA is Hippo, which plays critical roles in cell proliferation, differentiation and homeostasis via the regulation of the transcriptional regulator Yes-associated protein (YAP). To characterize Hippo signaling in Leydig cells, we treated MLTC-1 cells with forskolin (FSK), which resulted in a rapid phosphorylation of YAP that was prevented by the PKA inhibitor H-89. Inactivation of YAP using the inhibitor verteporfin (VP) resulted in a decrease in the mRNA levels of *Cyp17a1*, *Lhcgr*, *Nr5a1* and *Srd5a1*, along with increases in *Hsd17b3*, *Star* and *Nr4a1* expression and in testosterone secretion. To complement the results obtained with VP, inactivation of *Yap* was also performed using siRNAs. Similar to the effects of VP, knockdown of *Yap* resulted in an increase in *Hsd17b3*, *Star* and *Nr4a1* mRNA levels and in testosterone secretion, along with a decrease in *Hsd3b1*, *Lhcgr*, *Nr0b1*, *Nr5a1* and *Srd5a1* expression. Chromatin immunoprecipitation assays showed that YAP interact with the proximal promoter of *Star*, and that this recruitment decreased following FSK treatment, providing a novel mechanism whereby LH/PKA may regulate *Star* expression (and hence steroidogenesis) via suppression of YAP transcriptional co-regulatory activity. Together, these results suggest a novel role for YAP as a negative regulator of basal steroidogenesis in Leydig cells.

2. Introduction

Testosterone is critical for the development and function of the male reproductive system. Its production is mainly controlled by the binding of pituitary luteinizing hormone (LH) to its receptor (luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor, LHCGR) on the surface of testicular Leydig cells. LH binding to the G-protein-coupled LHCGR results in the activation of adenylate cyclase, which converts ATP to cAMP (Dufau *et al.* 1977), which in turn activates several kinases including protein kinase A (PKA)(Smith & Walker 2015). PKA

then activates signaling pathways and the expression or activation of transcription factors that regulate the expression of key steroidogenic genes, ultimately leading to testosterone synthesis (Smith & Walker 2015). Though some signaling pathways such as epidermal growth factor receptor (EGFR) (Evaul & Hammes 2008) and mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MAPK/ERK) (Shiraishi & Ascoli 2006, Evaul & Hammes 2008, Shiraishi & Ascoli 2008, Matzkin *et al.* 2013) are known to act downstream of PKA, additional signaling pathways are likely involved.

Hippo is a signaling pathway with well-established roles in cell fate determination, differentiation and proliferation during embryonic and postnatal development, as well as in tissue homeostasis throughout adulthood (Wang *et al.* 2017, Watt *et al.* 2017). The canonical Hippo pathway consists of a kinase cascade that ultimately regulates the transcriptional co-regulators Yes-associated protein (YAP) and transcriptional co-activator with PDZ-binding motif (TAZ). In response to 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 phosphorylate YAP and TAZ. Upon phosphorylation, YAP and TAZ are either retained in the cytoplasm or degraded by the cellular proteosomal machinery. When the Hippo signaling cascade is inactive, unphosphorylated YAP and TAZ accumulate in the nucleus and form complexes with transcription factors including those of the TEA domain (TEAD) family to regulate the transcription of their target genes (Wang *et al.* 2017, Watt *et al.* 2017). Interestingly, it was recently shown that PKA could increase YAP phosphorylation (Kim *et al.* 2013, Yu *et al.* 2013, Zhang *et al.* 2016) by directly phosphorylating and activating LATS1/2 (Kim *et al.* 2013, Yu *et al.* 2013), leading us to hypothesize that Hippo signaling could regulate steroidogenesis in Leydig cells.

Very little is known about Hippo signaling in the testis. It was recently suggested that Hippo signaling could be involved in the mechanisms of sex differentiation (Levasseur *et al.* 2017a) and in Follicle-stimulating hormone (FSH)/cAMP signaling in Sertoli cells (Sen Sharma & Majumdar 2017). It was also shown that YAP and TAZ are expressed in Leydig cells (Levasseur *et al.* 2017a). However, no functional studies of Hippo signaling in Leydig

cells have been reported. In this study, we aimed to elucidate the role of YAP, the main effector of Hippo signaling, in the MLTC-1 Leydig cell line.

3. Materials and methods

3.1. Immunohistochemistry

Testes for immunohistochemistry were fixed in Bouin's solution (Sigma, St-Louis, USA) for 24h, rinsed and dehydrated in alcohol. Immunohistochemistry was done on 7 μm tissue sections using VectaStain Elite avidin–biotin complex method kits (Vector Laboratories, Burlingame, USA) as directed by the manufacturer. Sections were probed with primary antibodies against YAP (1:200, #4912, Cell Signaling, Danvers, USA) and phospho-YAP (1:100 # 13008, Cell Signaling, Danvers, USA). Staining was done using the 3,3'-diaminobenzidine peroxidase substrate kit (Vector Laboratories, Burlingame, USA). Hematoxylin (Sigma, St-Louis, USA) was used to counterstain de slides. Negative controls consisted of slides for which the primary antibody was omitted. Photomicrographs were taken using a Carl Zeiss Axio Imager M1 microscope (Carl Zeiss Canada Ltd, Toronto, Canada) at 1000X magnification and using Zen 2012 blue edition software (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

3.2. Cell culture and treatments

Mouse MLTC-1 Leydig cells (ATCC, Manassas, USA) were grown in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 3.7 g/L HEPES, 10% fetal bovine serum (FBS), 5 U/ml penicillin, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin and 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fungizone (Wisent Inc, St-Bruno, Canada). Cells were maintained at 37°C in 5% CO₂/95% air. Eighteen hours prior to treatments, media were replaced with serum-free media. MLTC-1 cells were then treated with 10 μM forskolin (FSK) (Selleckchem, Houston, USA, #S2449) or vehicle (DMSO) on a time course prior to harvesting. For some experiments, cells were treated for 30 minutes with 50 μM H-89 (Tocris, Oakville, Canada, #2910) prior to the addition of 10 μM FSK in each wells.

For other experiments, cells were treated with 10 μ M forskolin (FSK), 5 μ M verteporfin (VP) (Sigma, St-Louis, USA, #SML0534), 10 μ M FSK + 5 μ M VP, or vehicle (DMSO) for 4 hours prior to harvesting.

3.3. Immunoblotting

MLTC-1 cells were collected in Laemmli buffer containing beta-mercaptoethanol and stored at -80°C until electrophoresis. Protein extracts were resolved by one-dimensional SDS-PAGE (12% acrylamide) under reducing conditions and electrophoretically transferred to polyvinylidene difluoride membranes (GE Amersham, Mississauga, Canada). Membranes were probed with primary antibodies against YAP, phospho-YAP (1:1000, Cell Signaling, Danvers, USA, #4912 and #13008, respectively) or beta-actin (ACTB) (1:10 000, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA, #sc-47778) diluted in Tris-buffered saline with 0.1% tween 20 containing 5% bovine serum albumin (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA) or 5% dried milk. Following incubation with a horseradish peroxidase-conjugated secondary goat anti-rabbit antibody, protein bands were visualized by chemiluminescence, using Immobilon Western chemiluminescent horseradish peroxidase substrate (Millipore, Etobicoke, Canada) and quantified with a ChemiDoc MP detection system and Image Lab software (Bio-Rad, Hercules, USA).

3.4. Reverse transcription-quantitative PCR

RNA was extracted using the Total RNA Mini Kit (FroggaBio, Toronto, Canada) according to the manufacturer's protocol and was reverse transcribed using the SuperScriptVilo™ cDNA synthesis kit (ThermoFisher scientific, Burlington, Canada) and 100ng of RNA/sample. Real-time PCR reactions were run on a CFX96 Touch instrument (Bio-Rad, Hercules, USA), using Supergreen Advanced qPCR MasterMix (Wisent, St-Bruno, Canada). Each PCR reaction consisted of 7.5 μ l of Supergreen Advanced qPCR MasterMix, 2.3 μ l of water, 4 μ l of cDNA sample and 0.6 μ l (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 ribosomal protein L19 (*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 samples, and *Rpl19* was therefore deemed suitable as an internal reference gene. The specific primer sequences used are listed in Table 5.1.

3.5. Hormone measurements

Following in vitro experiments, spent culture media were transferred to polypropylene tubes and stored at -80 °C until use. Testosterone and progesterone levels were measured by ELISA (IBL International) by the Center for Research in Reproduction at the Ligand Assay and Analysis Core Laboratory of the University of Virginia.

3.6. Small interfering RNAs

MLTC-1 cells (in serum-supplemented media) were transfected with 5 μM small interfering RNA (siRNA) 1 and 2 (SR415741-1, SR414741-2, OriGene, Rockville, USA) directed against *Yap* or a control scrambled siRNA (SR30004, OriGene, Rockville, USA) for 48 hours using the Transfection Reagent (siTRAN, TT300001, OriGene, Rockville, USA) according to the manufacturer's protocol. Less than 5% difference in *Yap* mRNA levels was observed between cells transfected with the scrambled siRNA relative to untransfected controls (data not shown). In some experiments, cells were treated with 10 μM FSK or vehicle (DMSO) for 4 hours prior to harvesting.

3.7. Chromatin immunoprecipitation-qPCR

Approximately 15 x10⁶ MLTC-1 cells (per replicate) were treated with 10 μM FSK or DMSO for 4 hours as described above. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments

were performed with magnetic dynabeads (ThermoFisher Scientific, Burlington, Canada, #10002D) as previously described (Svotelis et al. 2009), using 1 μ g of YAP antibody (Novus Biologicals, Littleton, USA, NB110-58358) or without antibody as background control. qPCRs were performed on immunoprecipitated DNA and quantified with a standard curve derived from input DNA; background levels were eliminated by subtracting the amplification levels of samples without antibody from the immunoprecipitated results. Specific primers used for the amplification of Star amplicons are listed in Table 5.1, including control regions to determine the YAP enrichment with the genomic environment.

3.8. Statistical analyses

Statistical analyses were done using Prism software version 6.0d (GraphPad Software Inc., RRID: SCR_002798). 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 when more than two groups were compared. In the latter cases, ANOVA (with Tukey's multiple comparisons post-hoc test) was used. Means were considered significantly different when P values were less than 0.05. All data are presented as means \pm SEM.

4. Results

4.1. Hippo signaling is active in Leydig cells

Although we previously reported that YAP is expressed in the Leydig cells (Levasseur et al. 2017a), whether or not its subcellular localization/degradation is regulated by the Hippo kinase cascade in this cell type is unknown. We therefore examined YAP phosphorylation at Ser127, where it is phosphorylated by LATS1/2. Immunohistochemistry analyses for YAP (Fig. 1A) and phospho-YAP (Fig. 1B) were done on testes of young adult mice. As previously determined, the expression of YAP was readily detected in the cytoplasm and the nucleus of Sertoli cells, in the nucleus of some spermatogonia and in the cytoplasm and in the nucleus of most Leydig cells (Levasseur et al. 2017a) (Fig. 5.1A), whereas phospho-YAP was detected in

the cytoplasm and in some nucleus of Sertoli cells and in the cytoplasm of Leydig cells (Fig 1B). This result indicates that Hippo signaling is active in the Leydig cells of adult mice, and presumably acts to regulate YAP activity.

4.2. cAMP/PKA signaling regulates Hippo signaling in the MLTC-1 Leydig cell line

As it was previously shown that cAMP/PKA can activate Hippo signaling in several cell types (Kim et al. 2013, Yu et al. 2013, Zhang et al. 2016), we sought to determine if this also occurs in Leydig cells. To this end, MLTC-1 cells were treated with FSK, a potent activator of adenylate cyclase, and YAP phosphorylation was assessed. A significant increase in phospho-YAP was observed within 5 minutes of FSK treatment, and attained maximal levels by 30 minutes (Fig. 5.2A). To confirm that PKA was responsible for the increase in YAP phosphorylation, MLTC-1 cells were pre-treated with the PKA inhibitor H-89. This pre-treatment prevented the FSK-induced increase in phospho-YAP (Fig. 5.2B), therefore confirming that PKA regulates Hippo signaling in MLTC-1 cells.

4.3. Hippo signaling regulates steroidogenesis in MLTC-1 Leydig cell line

To determine if Hippo signaling acts downstream of PKA to regulate steroidogenesis in Leydig cells, MLTC-1 cells were treated (or not) with FSK and/or verteporfin (VP), a pharmacological inhibitor of YAP, and the expression of steroidogenesis-related genes was evaluated by RT-qPCR. Among the genes tested, mRNA levels of *Lhcgr*, nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1 (*Nr5a1*) and steroid 5 alpha-reductase 1 (*Srd5a1*) decreased following VP treatment either in presence or in absence of FSK (Fig. 5.3) whereas mRNA levels of cytochrome P450, family 17, subfamily A, peptide 1 (*Cyp17a1*) only decreased following VP treatment in presence of FSK (Fig. 5.3). Interestingly, an increase in basal hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 3 (*Hsd17b3*) mRNA levels, and marked increases in nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1 (*Nr4a1*, 6.6-fold) and steroidogenic acute regulatory protein (*Star*, 3.7-fold) mRNA levels were observed following VP treatment. FSK-

stimulated *Nr4a1* and *Star* transcript levels were also increased following VP treatment, however, the fold stimulation by FSK was not significantly increased (Fig. 5.3). Cytochrome P450 side chain cleavage enzyme 11a1 (*Cyp11a1*), hydroxyl-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 1 (*Hsd3b1*) and nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1 (*Nr0b1*) mRNA levels did not change following either VP or FSK treatment (Fig. 5.3).

As STAR represents the rate-limiting step in the steroid biosynthetic pathway, we determined if altered *Star* expression affected testosterone and progesterone (Panesar *et al.* 2003) synthesis in VP/FSK-treated MLTC-1 cells. A 9-fold increase in testosterone concentrations was observed in the spent culture media from cells treated with VP relative to vehicle controls (Fig. 5.4A). A smaller (but nonetheless statistically significant) 1.3-fold increase was also observed in cells treated with VP and FSK relative to cells treated with FSK alone (Fig. 5.4A), however, comparably to what was seen with the *Star* mRNA expression, the fold stimulation by FSK was not significantly increased. Similarly to what is observed for testosterone, a 389 fold increase in progesterone concentration was observed in the spent culture media from cells treated with VP relative to vehicle controls (Fig. 5.4B) while a smaller 2.4 fold increase was also observed in cells treated with VP and FSK relative to cells treated with FSK alone, however, the fold stimulation by FSK was again not significantly increased (Fig. 5.4B).

Due to the intrinsic limitations of pharmacological inhibitors such as VP, we sought to validate our findings using siRNA to target *Yap* specifically. MLTC-1 cells were transfected with siRNAs directed against *Yap* or with a non-targeting siRNA, and knockdown efficiency was assessed by RT-qPCR and immunoblotting. A 90% decrease in *Yap* mRNA was observed in cells transfected with the *Yap*-directed siRNA relative to the control (Fig. 5.5A), and similar results were obtained for YAP protein (Fig. 5.5B). Having validated the siRNA approach, the expression of steroidogenesis-related genes was evaluated in MLTC-1 cells treated (or not) with siRNA and/or FSK. As observed in the VP experiment (Fig. 5.3), a statistically significant increase in *Nr4a1* and *Star* and a decrease in *Lhcgr* mRNA levels was observed in YAP-depleted cells, either in presence or in absence of FSK treatment (Fig. 5.6).

Similar to what was observed for the VP treatment, the fold stimulation by FSK was not significantly increased for *Star* however a slight increase was observed for *Nr4a1*. Also as observed in the VP-treated cells, a statistically significant increase in *Hsd17b3* mRNA levels was obtained in absence of FSK treatment (Fig. 5.6). In addition, loss of YAP resulted in decreased *Hsd3b1* mRNA levels either in presence or in absence of FSK treatment, as well as in decreased FSK-stimulated *Nr0b1*, *Nr5a1* and *Srd5a1* levels. Overall, the expression pattern of steroidogenesis-related genes was therefore similar following VP or siRNA treatment. Finally, as for the VP experiment, siRNA-mediated knockdown of YAP expression also resulted in increased testosterone and progesterone levels in spent culture media, although the effect was more modest (respectively a 1.31 and 1.35 fold increase) in untreated cells and no significant difference was observed in FSK-treated cells, Fig 7A, B). Taken together, these results suggest that YAP regulates basal steroidogenesis-related genes and steroid synthesis in MLTC-1 cells but is dispensable for hormonal responsiveness.

4.4. YAP is recruited to the proximal promoter of *Star*

Previous studies have characterized a highly conserved region in the first 200 base pairs of the proximal promoter of the *Star* gene that contains several critical regulatory elements required for its expression (Tremblay 2015). To determine if YAP could be recruited to this region on the *Star* promoter, a ChIP-qPCR experiment was done using MLTC-1 cells treated or not with FSK. Recruitment of YAP to the *Star* proximal promoter was readily detectable by ChIP-qPCR, but was negligible at more distal regions of the *Star* promoter as well as at regions downstream of the *Star* transcription start site (negative control) (Fig. 5.8A). Importantly, decreased recruitment of YAP to the *Star* proximal promoter was observed following FSK treatment (Fig. 5.8A). *In silico* analyses identified a putative binding site for the TEAD family of transcription factors located within the highly conserved region of the proximal *Star* promoter (Fig. 5.8B). As TEADs are the preferred binding partners of YAP (Vassilev *et al.* 2001), this suggests that YAP could interact with the *Star* proximal promoter via an interaction with TEAD. Together, these results suggest that PKA stimulates *Star*

expression in Leydig cells in part by alleviating the suppression of its transcriptional activity caused by the recruitment of YAP to its promoter.

5. Discussion

In recent years, YAP has been identified as a main contributor to homeostasis in steroidogenic tissues such as the adrenal gland (Levasseur *et al.* 2017b) and the ovary (Fu *et al.* 2014), and has also been associated with the development of hormonally influenced diseases such as endometriosis (Song *et al.* 2016, Lin *et al.* 2017) and polycystic ovary syndrome (Li *et al.* 2012, Ji *et al.* 2017, Jiang *et al.* 2017). Despite these advances and that YAP is known to be expressed in Leydig cells (Levasseur *et al.* 2017a), no study has evaluated the potential functions of YAP in this cell type. Here, we report for the first time that PKA-mediated suppression of YAP transcriptional coregulatory activity in the MLTC-1 Leydig cell line results in an increase in basal *Star* expression and testosterone secretion. This provides the first functional evidence that the Hippo pathway plays a role in mediating PKA action in Leydig cells, and may therefore represent an important mechanism whereby LH regulates testosterone synthesis.

LH/cAMP/PKA is arguably the most important signaling pathway for the regulation of steroidogenesis in Leydig cells. Our finding that YAP phosphorylation rapidly increased following FSK treatment indicates that YAP is regulated by the PKA pathway in MLTC-1 cells. This result is consistent with the increase in YAP phosphorylation observed in response to PKA signaling in the NIH3T3, MDA-MB-231, HT-29 and LOVO cell lines (Kim *et al.* 2013, Yu *et al.* 2013, Zhang *et al.* 2016), and suggested to us that YAP could act downstream of LH/cAMP/PKA signaling to regulate steroidogenesis. Using the pharmacological inhibitor VP and a siRNA-mediated knockdown approach, we then showed that YAP negatively regulates testosterone secretion, and modulates the expression of the key steroidogenesis-related genes *Star*, *Nr4a1*, *Lhcgr* and *Srd5a1*. Although gene expression was mostly affected in a similar fashion using either VP or siRNA, some discrepancies were observed between the two approaches. Notably, downregulation of *Nr5a1* and *Srd5a1* mRNA levels was FSK-dependent when the siRNA technique was used but occurred in both FSK-treated and

untreated cells when VP was used. Likewise, the increase in *Star* and *Nr4a1* mRNA levels and testosterone secretion were more modest when siRNA was used to knock down *Yap* expression than when VP was used. Several explanations can be proposed to explain these small differences. First, it was previously shown that VP can also inhibit the action of TAZ (Gibault *et al.* 2017), a homolog of YAP with redundant functions (Varelas 2014, Watt *et al.* 2017). It is therefore possible that TAZ partially compensated for the loss of YAP in the siRNA treated cells, resulting in more modest effects than in cells in which both YAP and TAZ were inhibited by VP. Second, VP can inhibit YAP both by interfering with YAP interacting with TEAD (Liu-Chittenden *et al.* 2012) as well as by up-regulation of 14-3-3 protein sigma expression, which leads to the cytoplasmic sequestration of YAP by 14-3-3 protein sigma (Wang *et al.* 2016). It was also shown that VP can increase 14-3-3 protein zeta/delta and 14-3-3 protein epsilon levels, indicating that VP can regulate the activity of multiple 14-3-3 family members (Wang *et al.* 2016). Both 14-3-3 protein gamma and 14-3-3 protein epsilon have been identified as negative regulators of steroidogenesis (Aghazadeh *et al.* 2012, Aghazadeh *et al.* 2014), 14-3-3 protein gamma being able to interact with STAR in the cytosol and limit its activity (Aghazadeh *et al.* 2012), whereas 14-3-3 protein epsilon interacts with voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1) thereby interfering with the interaction of VDAC1 with translocator protein 18-KD (TSPO) (Aghazadeh *et al.* 2014). VP may therefore exert non-specific effects by affecting additional 14-3-3 dependent signaling mechanisms, leading to broader effects than what we observed when *Yap* was targeted specifically by siRNA. Finally, differences between the two treatments could simply be explained by differences in the culture conditions, as the VP treatment lasted only 4 hours compared to 48 hours for the siRNA treatments. Additional studies will be required to distinguish between these possibilities.

Contrary to what we observed in Leydig cells, YAP has previously been found to positively regulate steroidogenesis in other cell types. For instance, in the KGN granulosa cell line, YAP knockdown reduced cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1 (CYP19A1) expression and estrogen production (Fu *et al.* 2014), whereas a knockdown of salvador family WW domain containing protein 1 (SAV1) (a scaffold protein required for LATS1 phosphorylation/activation) lead to an increase in the expression of *Star* and follicle

stimulating hormone receptor (*Fshr*) in hen ovarian follicles (Lyu *et al.* 2016). Likewise, a decrease in *Star* expression and estradiol secretion was also observed following either VP or *Yap*-targeted siRNA treatment in a mouse model of ectopic endometriotic stromal cells (Lin *et al.* 2017). Although the reason(s) why YAP exerts the opposite effect in Leydig cells are unclear, there are precedents in the literature of transcriptional regulatory molecules exerting contrary effects in Leydig cells relative to other cells types. For instance, the transcription factor nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2 (NR2F2) has been shown to inhibit *Star* expression in bovine glomerulosa cells (Buholzer *et al.* 2005), theca cells (Murayama *et al.* 2008) and endometriotic cells (Attar *et al.* 2009), but to increase *Star* expression in the MA-10 and MLTC-1 Leydig cell lines (Mendoza-Villarroel *et al.* 2014). Likewise, YAP has been shown to regulate the expression of non-steroidogenic genes both positively and negatively according to cell type. As an example, YAP positively regulates the expression of sex determining region Y-box 9 (*Sox9*) in Sertoli (Levasseur *et al.* 2017a) and oesophageal cancer cells (Song *et al.* 2014, Chen *et al.* 2015), but negatively in chondrocytes (Zhong *et al.* 2013). As YAP can interact with several co-factors and transcription factors other than TEADs (Zhao *et al.* 2010), perhaps it is the identity of the YAP interacting partner(s) expressed in a given cell type that confers either positive or negative regulatory effects on target gene expression and steroidogenesis.

The rate-limiting step in hormone-induced steroidogenesis is the transport of the cholesterol from the outer to the inner membrane of the mitochondria by a protein complex that includes STAR (Clark & Cochrum 2007, Stocco *et al.* 2017). In our study, *Star* expression was upregulated following YAP inhibition in MLTC-1 cells. The regulation of *Star* transcription has been mainly associated with a highly conserved region in its proximal promoter that contains several regulatory elements (Tremblay 2015). We identified the presence of a binding site for the TEAD family of transcription factors within this region. We also showed that YAP was able to interact with this region, and that this interaction was regulated by PKA signaling. Interaction of YAP to the *Star* promoter is consistent with results obtained in endometriotic stromal cells (Lin *et al.* 2017). Although our data suggest that YAP directly downregulates the transcription of *Star* through interaction with its promoter, they do not rule out the possibility that YAP also regulates *Star* expression indirectly. Indeed, the

knockdown of *Yap* also strongly upregulated the expression of *Nr4a1*, a transcription factor known to bind the *Star* promoter and increase its transcriptional activity (Martin *et al.* 2008). Transcription of *Star* has been thoroughly studied in Leydig cell lines, and many transcription factors [transcription factor AP-1 (AP1) (Manna *et al.* 2004, Manna & Stocco 2007, Martin *et al.* 2012), proto-oncogene c-Fos (cFOS) (Shea-Eaton *et al.* 2002), CAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBPB) (Reinhart *et al.* 1999), cyclic AMP-responsive element binding protein 1 (CREB1) (Manna *et al.* 2002, Clem *et al.* 2005), GATA binding protein 4 (GATA4) (Wootton-Kee & Clark 2000, Tremblay & Viger 2001), NR4A1 (Martin *et al.* 2008), NR5A1 (Sugawara *et al.* 1997, Sandhoff *et al.* 1998), NR2F2 (Mendoza-Villarroel *et al.* 2014), trans-acting transcription factor 1 (SP1) (Sugawara *et al.* 2000)] have been shown to positively regulate its expression. NR0B1 (Zazopoulos *et al.* 1997, Crawford *et al.* 1998, Song *et al.* 2004, Ahn *et al.* 2013), nuclear receptor subfamily 0, group B, member 2 (NR0B2) (Volle *et al.* 2007) and androgen receptor co-repressor-19Kda (ARR19) (Qamar *et al.* 2009, Qamar *et al.* 2010) are rare exceptions that decrease *Star* expression, and do so primarily by binding to transcriptional activators of *Star* such as NR4A1, NR5A1 and steroid receptor coactivator 1 (SRC1) and suppressing their activity (Crawford *et al.* 1998, Song *et al.* 2004, Volle *et al.* 2007, Qamar *et al.* 2010). Interestingly, the TEAD binding sites overlaps the binding sites for NR4A1/NR5A1 and NR2F2, so it is possible that YAP/TEAD might also interact with the latter transcription factors to suppress their activity. On the other hand, it is also possible that YAP/TEAD interferes with the binding of these transcription factors under basal conditions by occupying the overlapping NGF1-B response element (NBRE)-NR5A1/TEAD site. In this scenario, following PKA activation by LH, YAP would be phosphorylated and sequestered in the cytoplasm, thereby permitting NR4A1 to be recruited to the *Star* promoter at the overlapping NBRE-NR5A1/TEAD site (Martin *et al.* 2008, Mendoza-Villarroel *et al.* 2014). This scenario would also explain why YAP deletion/inhibition increased basal steroid production but does not (siRNAs) or barely (VP) increased steroid production following FSK treatment. Further studies will be needed to distinguish between these possibilities.

In summary, this study reports for the first time a role for YAP in steroidogenesis regulation in Leydig cells, as its inactivation leads to an increase in basal testosterone secretion potentially through the activation of *Star* expression. Additional studies will be

required to completely elucidate its mechanisms of action, and to further define the roles of Hippo signaling in Leydig cells.

6. Acknowledgments

The authors wish to thank Ms Meggie Girard for technical support.

7. References

Aghazadeh Y, Martinez-Arguelles DB, Fan J, Culty M & Papadopoulos V 2014 Induction of androgen formation in the male by a TAT-VDAC1 fusion peptide blocking 14-3-3varepsilon protein adaptor and mitochondrial VDAC1 interactions. *Mol Ther* 22 1779-1791.

Aghazadeh Y, Rone MB, Blonder J, Ye X, Veenstra TD, Hales DB, Culty M & Papadopoulos V 2012 Hormone-induced 14-3-3gamma adaptor protein regulates steroidogenic acute regulatory protein activity and steroid biosynthesis in MA-10 Leydig cells. *J Biol Chem* 287 15380-15394.

Ahn SW, Gang GT, Kim YD, Ahn RS, Harris RA, Lee CH & Choi HS 2013 Insulin directly regulates steroidogenesis via induction of the orphan nuclear receptor DAX-1 in testicular Leydig cells. *J Biol Chem* 288 15937-15946.

Attar E, Tokunaga H, Imir G, Yilmaz MB, Redwine D, Putman M, Gurates B, Attar R, Yaegashi N, Hales DB & Bulun SE 2009 Prostaglandin E2 via steroidogenic factor-1 coordinately regulates transcription of steroidogenic genes necessary for estrogen synthesis in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 94 623-631.

Buholzer CF, Arrighi JF, Abraham S, Piguet V, Capponi AM & Casal AJ 2005 Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor is a negative regulator of steroidogenesis in bovine adrenal glomerulosa cells. *Mol Endocrinol* 19 65-75.

Chen Q, Song S, Wei S, Liu B, Honjo S, Scott A, Jin J, Ma L, Zhu H, Skinner HD, Johnson RL & Ajani JA 2015 ABT-263 induces apoptosis and synergizes with chemotherapy by targeting stemness pathways in esophageal cancer. *Oncotarget* 6 25883-25896.

Clark BJ & Cochrum RK 2007 The steroidogenic acute regulatory protein as a target of endocrine disruption in male reproduction. *Drug Metab Rev* 39 353-370.

Clem BF, Hudson EA & Clark BJ 2005 Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP) enhances cAMP-responsive element binding (CREB) protein phosphorylation and phospho-CREB interaction with the mouse steroidogenic acute regulatory protein gene promoter. *Endocrinology* 146 1348-1356.

Crawford PA, Dorn C, Sadovsky Y & Milbrandt J 1998 Nuclear receptor DAX-1 recruits nuclear receptor corepressor N-CoR to steroidogenic factor 1. *Mol Cell Biol* 18 2949-2956.

Dufau ML, Tsuruhara T, Horner KA, Podesta E & Catt KJ 1977 Intermediate role of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate and protein kinase during gonadotropin-induced steroidogenesis in testicular interstitial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74 3419-3423.

Evaul K & Hammes SR 2008 Cross-talk between G protein-coupled and epidermal growth factor receptors regulates gonadotropin-mediated steroidogenesis in Leydig cells. *J Biol Chem* 283 27525-27533.

Fu D, Lv X, Hua G, He C, Dong J, Lele SM, Li DW, Zhai Q, Davis JS & Wang C 2014 YAP regulates cell proliferation, migration, and steroidogenesis in adult granulosa cell tumors. *Endocr Relat Cancer* 21 297-310.

Gibault F, Bailly F, Corvaisier M, Coevoet M, Huet G, Melnyk P & Cotellet P 2017 Molecular Features of the YAP Inhibitor Verteporfin: Synthesis of Hexasubstituted Dipyrins as Potential Inhibitors of YAP/TAZ, the Downstream Effectors of the Hippo Pathway. *ChemMedChem* 12 954-961.

Ji SY, Liu XM, Li BT, Zhang YL, Liu HB, Zhang YC, Chen ZJ, Liu J & Fan HY 2017 The polycystic ovary syndrome-associated gene *Yap1* is regulated by gonadotropins and sex

steroid hormones in hyperandrogenism-induced oligo-ovulation in mouse. *Mol Hum Reprod* 23 698-707.

Jiang LL, Xie JK, Cui JQ, Wei D, Yin BL, Zhang YN, Chen YH, Han X, Wang Q & Zhang CL 2017 Promoter methylation of yes-associated protein (YAP1) gene in polycystic ovary syndrome. *Medicine (Baltimore)* 96 e5768.

Kim M, Kim M, Lee S, Kuninaka S, Saya H, Lee H, Lee S & Lim DS 2013 cAMP/PKA signalling reinforces the LATS-YAP pathway to fully suppress YAP in response to actin cytoskeletal changes. *Embo j* 32 1543-1555.

Levasseur A, Paquet M, Boerboom D & Boyer A 2017a 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* 97 162-175.

Levasseur A, St-Jean G, Paquet M, Boerboom D & Boyer A 2017b Targeted Disruption of YAP and TAZ Impairs the Maintenance of the Adrenal Cortex. *Endocrinology* 158 3738-3753.

Li T, Zhao H, Zhao X, Zhang B, Cui L, Shi Y, Li G, Wang P & Chen ZJ 2012 Identification of YAP1 as a novel susceptibility gene for polycystic ovary syndrome. *J Med Genet* 49 254-257.

Lin SC, Lee HC, Hou PC, Fu JL, Wu MH & Tsai SJ 2017 Targeting hypoxia-mediated YAP1 nuclear translocation ameliorates pathogenesis of endometriosis without compromising maternal fertility. *J Pathol* 242 476-487.

Liu-Chittenden Y, Huang B, Shim JS, Chen Q, Lee SJ, Anders RA, Liu JO & Pan D 2012 Genetic and pharmacological disruption of the TEAD-YAP complex suppresses the oncogenic activity of YAP. *Genes Dev* 26 1300-1305.

Lyu Z, Qin N, Tyasi TL, Zhu H, Liu D, Yuan S & Xu R 2016 The Hippo/MST Pathway Member SAV1 Plays a Suppressive Role in Development of the Prehierarchical Follicles in Hen Ovary. *PLoS One* 11 e0160896.

Manna PR, Dyson MT, Eubank DW, Clark BJ, Lalli E, Sassone-Corsi P, Zeleznik AJ & Stocco DM 2002 Regulation of steroidogenesis and the steroidogenic acute regulatory

protein by a member of the cAMP response-element binding protein family. *Mol Endocrinol* 16 184-199.

Manna PR, Eubank DW & Stocco DM 2004 Assessment of the role of activator protein-1 on transcription of the mouse steroidogenic acute regulatory protein gene. *Mol Endocrinol* 18 558-573.

Manna PR & Stocco DM 2007 Crosstalk of CREB and Fos/Jun on a single cis-element: transcriptional repression of the steroidogenic acute regulatory protein gene. *J Mol Endocrinol* 39 261-277.

Martin LJ, Bergeron F, Viger RS & Tremblay JJ 2012 Functional cooperation between GATA factors and cJUN on the star promoter in MA-10 Leydig cells. *J Androl* 33 81-87.

Martin LJ, Boucher N, Brousseau C & Tremblay JJ 2008 The orphan nuclear receptor NUR77 regulates hormone-induced StAR transcription in Leydig cells through cooperation with Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I. *Mol Endocrinol* 22 2021-2037.

Matzkin ME, Yamashita S & Ascoli M 2013 The ERK1/2 pathway regulates testosterone synthesis by coordinately regulating the expression of steroidogenic genes in Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol* 370 130-137.

Mendoza-Villarroel RE, Robert NM, Martin LJ, Brousseau C & Tremblay JJ 2014 The nuclear receptor NR2F2 activates star expression and steroidogenesis in mouse MA-10 and MLTC-1 Leydig cells. *Biol Reprod* 91 26.

Murayama C, Miyazaki H, Miyamoto A & Shimizu T 2008 Involvement of Ad4BP/SF-1, DAX-1, and COUP-TFII transcription factor on steroid production and luteinization in ovarian theca cells. *Mol Cell Biochem* 314 51-58.

Panesar NS, Chan KW & Ho CS 2003 Mouse Leydig tumor cells produce C-19 steroids, including testosterone. *Steroids* 68 245-251.

Qamar I, Gong EY, Kim Y, Song CH, Lee HJ, Chun SY & Lee K 2010 Anti-steroidogenic factor ARR19 inhibits testicular steroidogenesis through the suppression of Nur77 transactivation. *J Biol Chem* 285 22360-22369.

Qamar I, Park E, Gong EY, Lee HJ & Lee K 2009 ARR19 (androgen receptor corepressor of 19 kDa), an antisteroidogenic factor, is regulated by GATA-1 in testicular Leydig cells. *J Biol Chem* 284 18021-18032.

Reinhart AJ, Williams SC, Clark BJ & Stocco DM 1999 SF-1 (steroidogenic factor-1) and C/EBP beta (CCAAT/enhancer binding protein-beta) cooperate to regulate the murine StAR (steroidogenic acute regulatory) promoter. *Mol Endocrinol* 13 729-741.

Sandhoff TW, Hales DB, Hales KH & McLean MP 1998 Transcriptional regulation of the rat steroidogenic acute regulatory protein gene by steroidogenic factor 1. *Endocrinology* 139 4820-4831.

Sen Sharma S & Majumdar SS 2017 Transcriptional co-activator YAP regulates cAMP signaling in Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol* 450 64-73.

Shea-Eaton W, Sandhoff TW, Lopez D, Hales DB & McLean MP 2002 Transcriptional repression of the rat steroidogenic acute regulatory (StAR) protein gene by the AP-1 family member c-Fos. *Mol Cell Endocrinol* 188 161-170.

Shiraishi K & Ascoli M 2006 Activation of the lutropin/choriogonadotropin receptor in MA-10 cells stimulates tyrosine kinase cascades that activate ras and the extracellular signal regulated kinases (ERK1/2). *Endocrinology* 147 3419-3427.

Shiraishi K & Ascoli M 2008 A co-culture system reveals the involvement of intercellular pathways as mediators of the lutropin receptor (LHR)-stimulated ERK1/2 phosphorylation in Leydig cells. *Exp Cell Res* 314 25-37.

Smith LB & Walker WH 2015. Chapter 16 - Hormone Signaling in the Testis. In *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Fourth Edition)*, pp. 637-690.

Song KH, Park YY, Park KC, Hong CY, Park JH, Shong M, Lee K & Choi HS 2004 The atypical orphan nuclear receptor DAX-1 interacts with orphan nuclear receptor Nur77 and represses its transactivation. *Mol Endocrinol* 18 1929-1940.

Song S, Ajani JA, Honjo S, Maru DM, Chen Q, Scott AW, Heallen TR, Xiao L, Hofstetter WL, Weston B, Lee JH, Wadhwa R, Sudo K, Stroehlein JR, Martin JF, Hung MC

& Johnson RL 2014 Hippo coactivator YAP1 upregulates SOX9 and endows esophageal cancer cells with stem-like properties. *Cancer Res* 74 4170-4182.

Song Y, Fu J, Zhou M, Xiao L, Feng X, Chen H & Huang W 2016 Activated Hippo/Yes-Associated Protein Pathway Promotes Cell Proliferation and Anti-apoptosis in Endometrial Stromal Cells of Endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 101 1552-1561.

Stocco DM, Zhao AH, Tu LN, Morohaku K & Selvaraj V 2017 A brief history of the search for the protein(s) involved in the acute regulation of steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 441 7-16.

Sugawara T, Kiriakidou M, McAllister JM, Holt JA, Arakane F & Strauss JF, 3rd 1997 Regulation of expression of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene: a central role for steroidogenic factor 1. *Steroids* 62 5-9.

Sugawara T, Saito M & Fujimoto S 2000 Sp1 and SF-1 interact and cooperate in the regulation of human steroidogenic acute regulatory protein gene expression. *Endocrinology* 141 2895-2903.

Svetelis A, Gevry N & Gaudreau L 2009 Chromatin immunoprecipitation in mammalian cells. *Methods Mol Biol* 543 243-251.

Tremblay JJ 2015 Molecular regulation of steroidogenesis in endocrine Leydig cells. *Steroids* 103 3-10.

Tremblay JJ & Viger RS 2001 GATA factors differentially activate multiple gonadal promoters through conserved GATA regulatory elements. *Endocrinology* 142 977-986.

Varelas X 2014 The Hippo pathway effectors TAZ and YAP in development, homeostasis and disease. *Development* 141 1614-1626.

Vassilev A, Kaneko KJ, Shu H, Zhao Y & DePamphilis ML 2001 TEAD/TEF transcription factors utilize the activation domain of YAP65, a Src/Yes-associated protein localized in the cytoplasm. *Genes Dev* 15 1229-1241.

Volle DH, Duggavathi R, Magnier BC, Houten SM, Cummins CL, Lobaccaro JM, Verhoeven G, Schoonjans K & Auwerx J 2007 The small heterodimer partner is a gonadal gatekeeper of sexual maturation in male mice. *Genes Dev* 21 303-315.

Wang C, Zhu X, Feng W, Yu Y, Jeong K, Guo W, Lu Y & Mills GB 2016 Verteporfin inhibits YAP function through up-regulating 14-3-3sigma sequestering YAP in the cytoplasm. *Am J Cancer Res* 6 27-37.

Wang Y, Yu A & Yu FX 2017 The Hippo pathway in tissue homeostasis and regeneration. *Protein Cell* 8 349-359.

Watt KI, Harvey KF & Gregorevic P 2017 Regulation of Tissue Growth by the Mammalian Hippo Signaling Pathway. *Front Physiol* 8 942.

Wooton-Kee CR & Clark BJ 2000 Steroidogenic factor-1 influences protein-deoxyribonucleic acid interactions within the cyclic adenosine 3,5-monophosphate-responsive regions of the murine steroidogenic acute regulatory protein gene. *Endocrinology* 141 1345-1355.

Yu FX, Zhang Y, Park HW, Jewell JL, Chen Q, Deng Y, Pan D, Taylor SS, Lai ZC & Guan KL 2013 Protein kinase A activates the Hippo pathway to modulate cell proliferation and differentiation. *Genes Dev* 27 1223-1232.

Zazopoulos E, Lalli E, Stocco DM & Sassone-Corsi P 1997 DNA binding and transcriptional repression by DAX-1 blocks steroidogenesis. *Nature* 390 311-315.

Zhang K, Hu Z, Qi H, Shi Z, Chang Y, Yao Q, Cui H, Zheng L, Han Y, Han X, Zhang Z, Chen T & Hong W 2016 G-protein-coupled receptors mediate omega-3 PUFAs-inhibited colorectal cancer by activating the Hippo pathway. *Oncotarget* 7 58315-58330.

Zhao B, Li L & Guan KL 2010 Hippo signaling at a glance. *J Cell Sci* 123 4001-4006.

Zhong W, Li Y, Li L, Zhang W, Wang S & Zheng X 2013 YAP-mediated regulation of the chondrogenic phenotype in response to matrix elasticity. *J Mol Histol* 44 587-595.

8. Figures

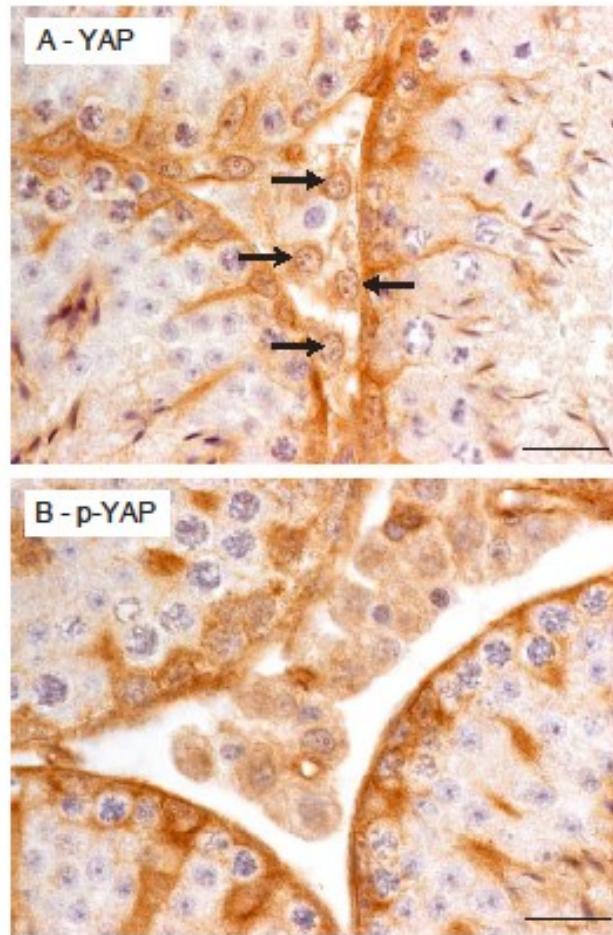


Figure 5.1 : Localization of YAP and phospho-YAP in mouse Leydig cells
Immunohistochemical analysis of YAP (A) and p-YAP (B) in testes of mice.
Arrows = nuclear expression in Leydig cells. Scale bar = 20 μ m.

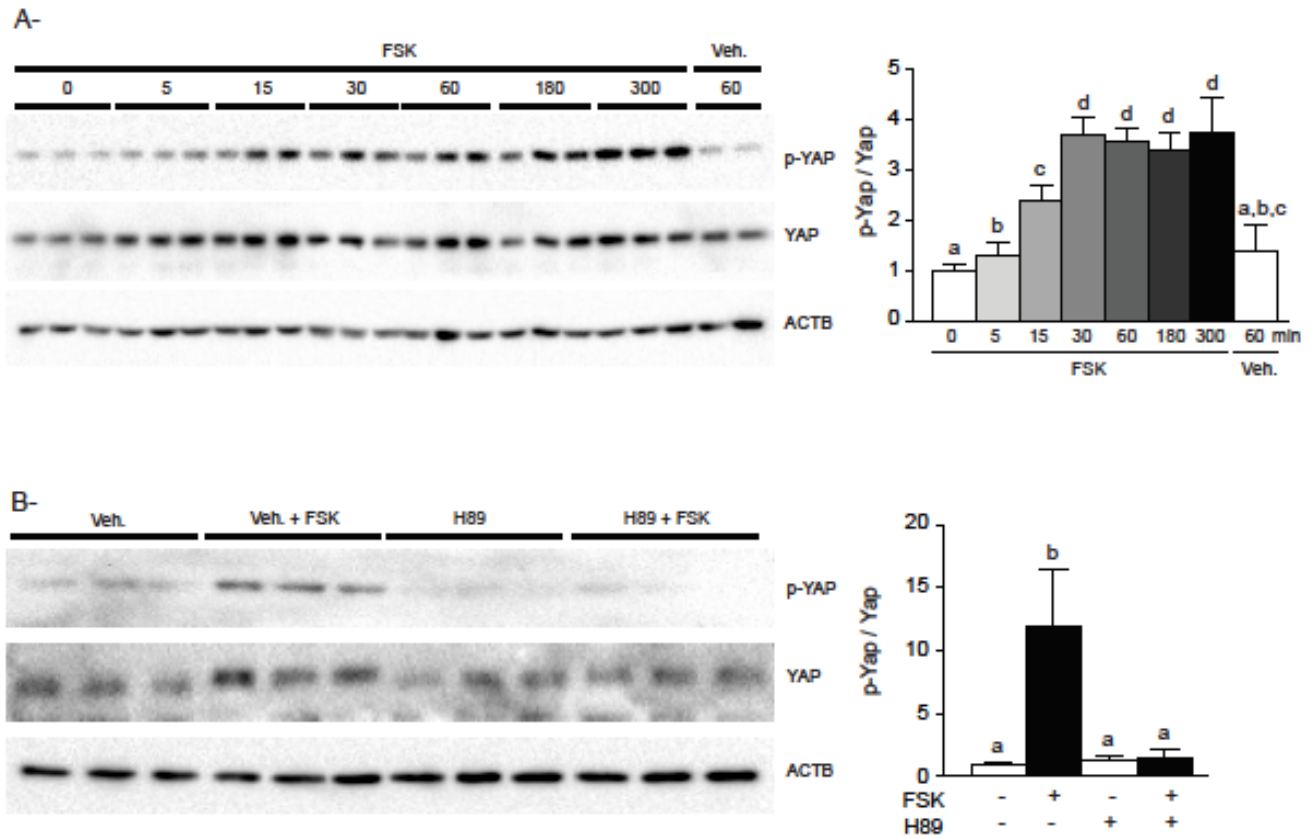


Figure 5.2. cAMP/PKA signaling upregulates YAP phosphorylation.

A) Representative immunoblots for YAP, p-YAP and actin using MLTC-1 cells following treatment with 10 μ M FSK for the indicated times. $n=3$ samples/treatment (except for the vehicle, treatment for 60 minutes, $n=2$), performed in triplicate. **B)** Representative immunoblot for YAP, p-YAP and actin using MLTC-1 cells treated for 1 hour with 10 μ M FSK following a 30 minute pretreatment with 50 μ M H89. $n=3$ samples/treatment. Quantitative analyses represent that average of the three experiments. p-YAP values are expressed relative to the corresponding total YAP at each time point and data are expressed as means (columns) \pm SEM (error bars). Columns marked with different letters are significantly different, $P < 0.05$.

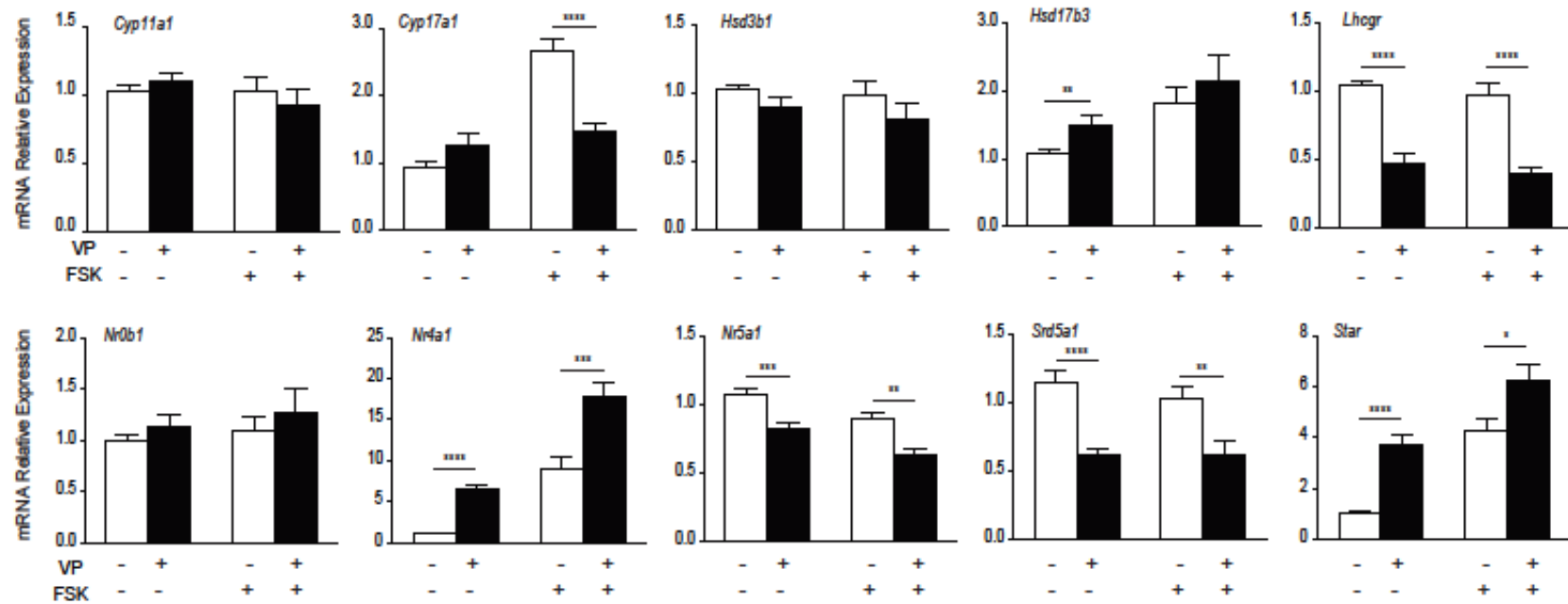


Figure 5.3. Inhibition of YAP activity regulates the expression of steroidogenic genes.

RT-qPCR analysis of steroidogenic genes were done using MLTC-1 cells treated with 5 μ M VP, 10 μ M FSK, 5 μ M VP and 10 μ M FSK or vehicle for 4 hours. n = 4 samples/treatment, performed in triplicate. All data were normalized to the housekeeping gene *Rpl19* and are expressed as means (columns) \pm SEM (error bars). Asterisks = significantly different from control (*P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; ****P<0.0001).

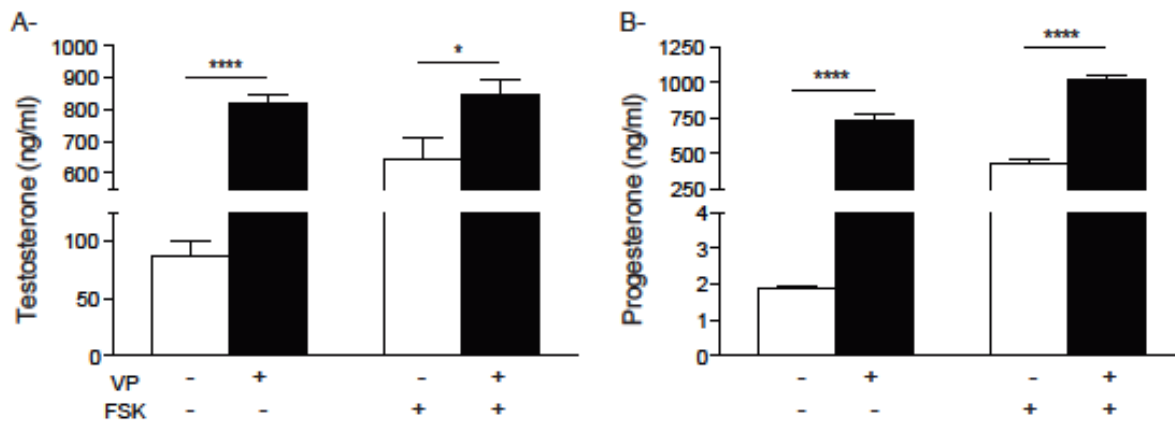


Figure 5.4. Inhibition of YAP activity increases steroid secretion.

A) Testosterone and **B)** progesterone levels in spent culture media from MLTC-1 cells treated with 5 μ M VP, 10 μ M FSK, 5 μ M VP and 10 μ M FSK or vehicle for 4 hours. n = 4 samples/treatment, performed in duplicate. Data are expressed as means (columns) \pm SEM (error bars). Asterisks = significantly different from control (* P <0.05; **** P <0.0001).

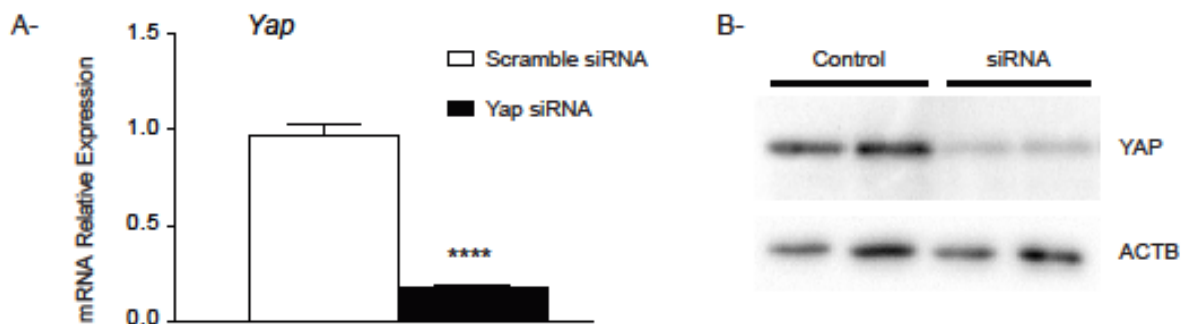


Figure 5.5. Efficiency of siRNA treatment targeting *Yap*.

A) RT-qPCR analysis of *Yap* using MLTC-1 cells treated for 48 hours with either siRNAs directed against *Yap* or a scrambled non-targeting siRNA (control). n = 4 samples/treatment, performed in triplicate. Data was normalized to the housekeeping gene *Rpl19* and is expressed as means (columns) \pm SEM (error bars). Asterisks = significantly different from control (**** P <0.0001). **B)** Immunoblot analysis of YAP using MLTC-1 cells treated for 48 hours with either an siRNA directed against *Yap* or a scrambled non-targeting siRNA (control).

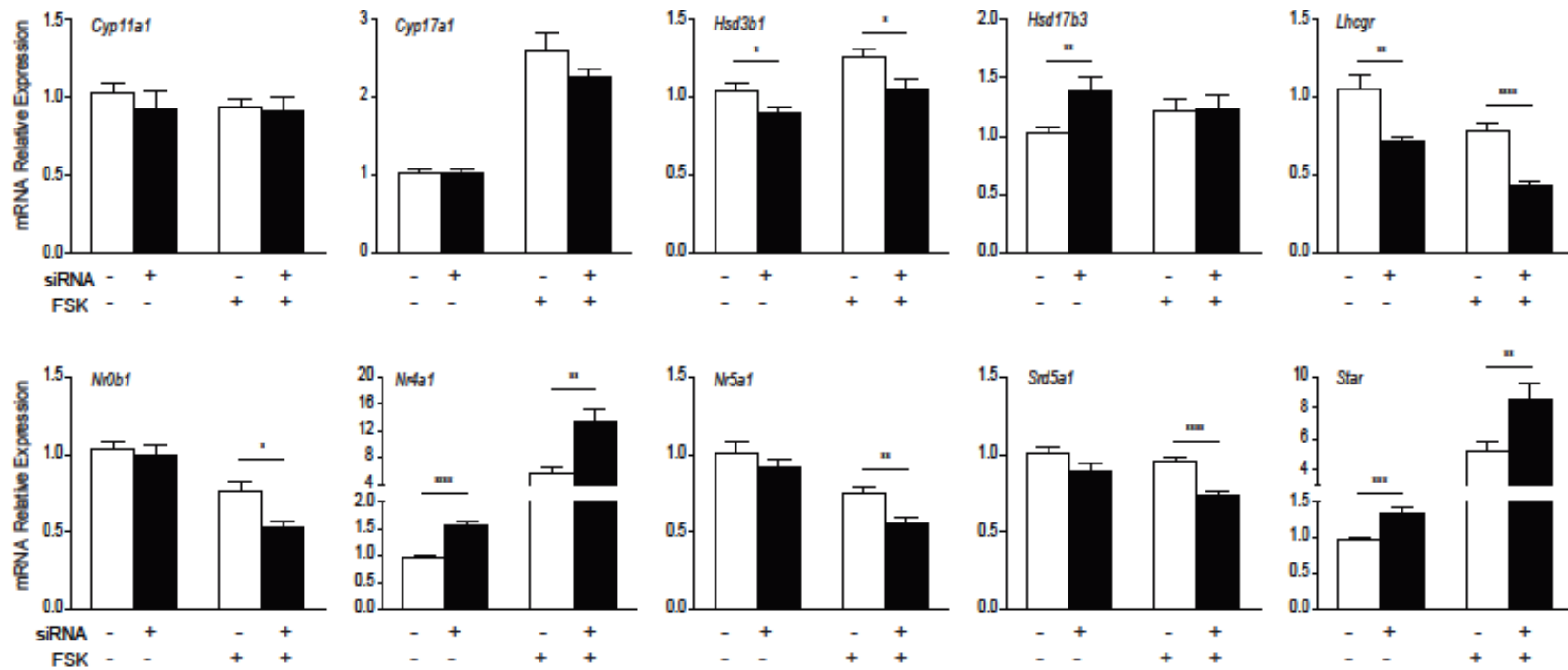


Figure 5.6. Depletion of *Yap* regulates the expression of steroidogenic genes.

RT-qPCR analysis of steroidogenic genes using MLTC-1 cells treated for 48 hours with siRNAs directed either against *Yap* or a scrambled non-targeting siRNA (control), followed by a 4-hour treatment with 10 μ M FSK or vehicle. n = 4 samples/treatment, performed in triplicate. All data were normalized to the housekeeping gene *Rpl19* and are expressed as means (columns) \pm SEM (error bars). Asterisks = significantly different from control (*P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; ****P<0.0001).

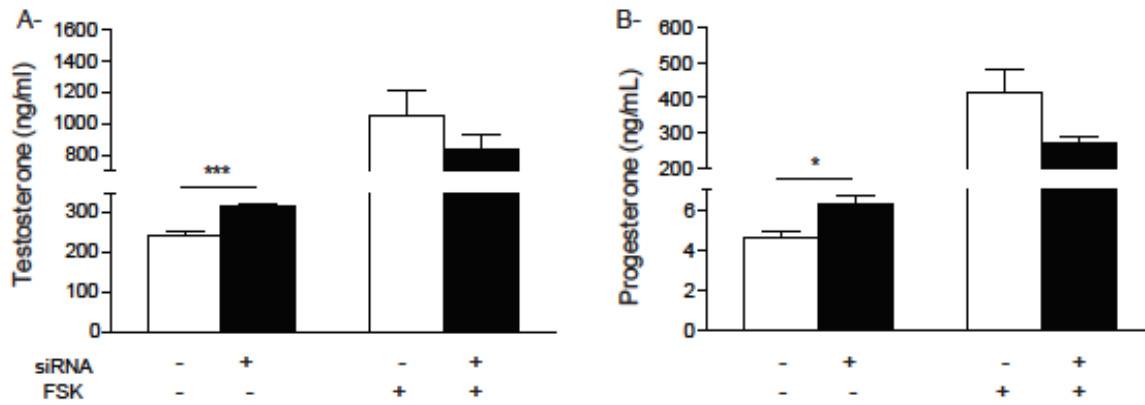


Figure 5.7. Depletion of *Yap* increases steroid secretion.

A) Testosterone and **B)** progesterone levels in spent culture media from MLTC-1 cells treated with siRNAs directed either against *Yap* or a scrambled non-targeting siRNA (control), followed by a 4-hour treatment with 10 μ M FSK or vehicle. n = 4 samples/treatment, performed in triplicate. Data are expressed as means (columns) \pm SEM (error bars). Asterisks = significantly different from control (***P<0.001).

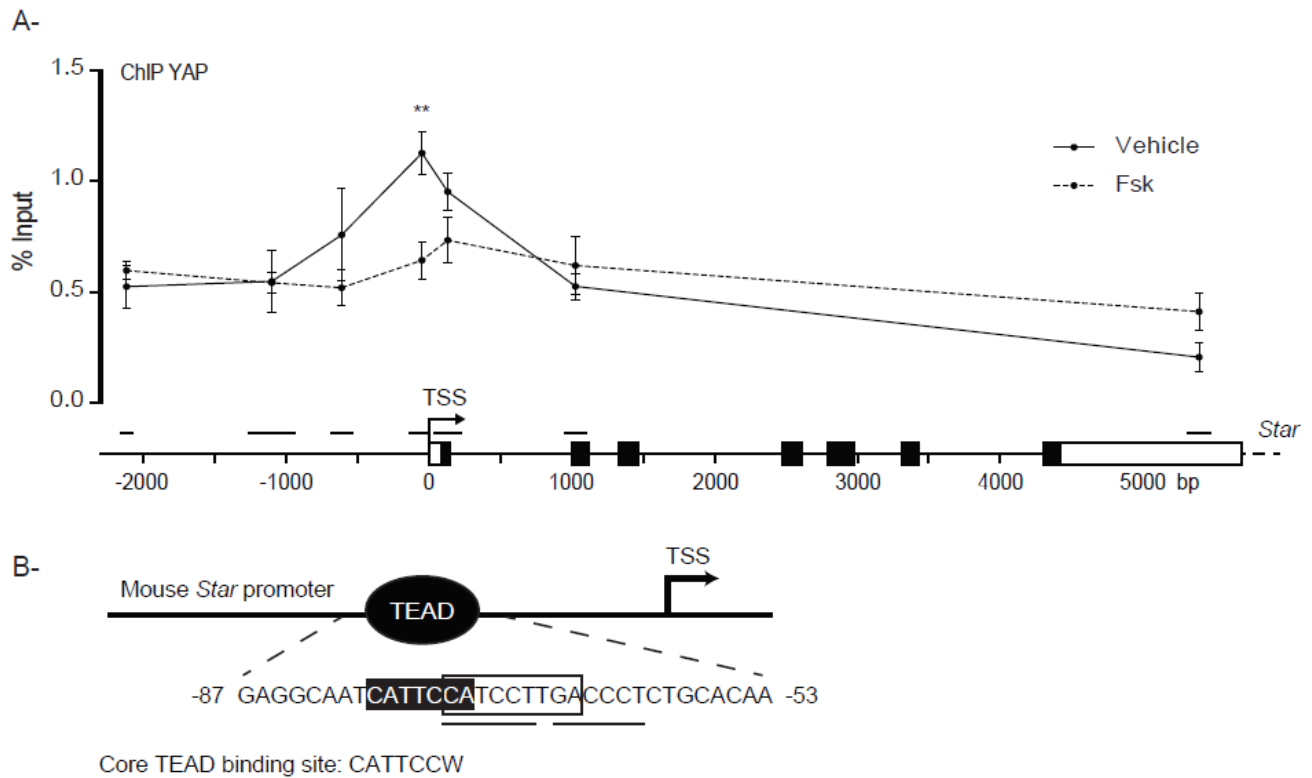


Figure 5.8. YAP interacts with the proximal *Star* promoter.

A) ChIP-qPCR analyses of YAP interacting on the *Star* promoter were done using MLTC1 cells treated with 10 μ M FSK or vehicle for 4 hours. Experiment was performed in triplicate. Data are expressed as means (columns) \pm SEM (error bars). Asterisks = significantly different from control (** P <0.01). TSS = transcription start site, open boxes = non-coding exon sequences, black boxes = coding sequences, black lines = regions amplified by the ChIP-qPCRs. **B)** Diagram of the proximal *Star* promoter showing the presence of a TEAD (black boxed sequences) regulatory element and its juxtaposition with NR5A1/NBRE (boxed sequences) and DR1-like (underlined sequences) regulatory elements. Proximal *Star* promoter bp numbering is based on the transcription start site of the ENSMUSG00000033979.5 and NM_011485.5 transcripts (CCDS22203.1).

9. Tables

Table 5.1 : Primer sequences

Gene	Forward	Reverse
RT-qPCR primers		
<i>Cyp11a1</i>	GTGACCTTGCAGAGGTACACTGT	GTGACTCCAGCCTTCAGTTCACA
<i>Cyp17a1</i>	GGTGGACATATTCCCGTGGTT	CTGGCCTTCCCCAGTGTTATT
<i>Hsd3b1</i>	AGCTGCAGACAAAGACCAAGGTGA	GAACACAGGCCTCCAATAGGTTCT
<i>Hsd17b3</i>	GAGTTGGCCAGACATGGACT	AGCTTCCAGTGGTCCTCTCA
<i>Lhcgr</i>	CGTCCCATTGAATGCATGG	TGTAACCACGGCATCCGGA
<i>Nr0b1</i>	TCCAGGCCATCAAGAGTTTC	ATCTGCTGGGTCTCTCACTG
<i>Nr4a1</i>	AGCTAGCAATGCGATTCTG	CTCATCTTCTGCTCAGGCCT
<i>Nr5a1</i>	TCTCTAACCGCACCATCA	TCGACAATGGAGATAAAGGT
<i>Rpl19</i>	CTGAAGGTCAAAGGGAATGTG	GGACAGAGTCTTGATGATCTC
<i>Srd5a1</i>	GTACGAGTGCATCCGTCCTG	CCAGCGTCCTTTGCACGTAG
<i>Star</i>	GATTAAGGCACCAAGCTGTGCTG	CTGCTGGCTTTCCTTCTTCCAGC
<i>Yap</i>	GACGCTGATGAATTCTGCCTCA	CATGGCAAACGAGGGTCC
ChIP– qPCR primers		
<i>Star -2117</i>	TTCTCCACAGAATGGCAACA	GTGGGACAGGCCATACAGAT
<i>Star -1100</i>	GCCTCATGACAGTAGCTCCC	TGACTGTTGTCAGTCCCTGC
<i>Star -610</i>	TCAGGAGGCCCCACATAGAA	AACAGGATGCCAGTGTCCAGG
<i>Star TSS</i>	AGGCAATCATTCCATCCTTG	AGGCTGTGCATCATCACTTG
<i>Star +133</i>	ACAACCCTTGAGCACCTCAG	TTTGGCAAGCTCTCATCCCT
<i>Star +1026</i>	CCTGCAGGATTAAGGCACCA	ACGTCGAACTTGACCCATCC
<i>Star +5394</i>	TAGTCCCAGGGAACCTGATG	CCGACAAGGGTTTTGTTGTT

Chapitre 6 : Discussion générale et conclusion

1. Discussion générale

Les connaissances de la voie Hippo aux points de vue tissulaires, cellulaires et moléculaires se sont développées depuis les dernières années. Les effecteurs YAP/TAZ de la voie de signalisation Hippo ont été identifiés comme des régulateurs majeurs de nombreux processus, tels que le maintien des cellules souches, l'homéostasie tissulaire et la prolifération cellulaire dans différents tissus (revue dans (Piccolo, Dupont, and Cordenonsi 2014; Varelas 2014)). Cependant, aucune étude n'avait été menée dans le testicule et dans la glande surrénale afin d'évaluer leur(s) fonction(s).

Les travaux effectués dans cette thèse ont mis en évidence le rôle de la voie Hippo dans les cellules somatiques du testicule et de l'adrénocortex surrénalien. Tout d'abord, au niveau du testicule, nous avons démontré que YAP et TAZ régulaient l'expression des gènes impliqués dans la différenciation sexuelle mâle dans les cellules de Sertoli. De plus, nous avons démontré que YAP régula négativement la stéroïdogénèse dans un modèle de cellules immortalisées de Leydig. Finalement, nous avons montré que l'inactivation de YAP et TAZ dans les cellules du cortex surrénalien entraînait une dégénérescence de la glande surrénale chez les mâles.

1.1. Rôle de YAP et TAZ dans les cellules de Sertoli

Dans le cadre du premier objectif de cette thèse portant sur le rôle de l'inactivation de YAP et TAZ dans les cellules de Sertoli, nous avons mis en évidence un rôle pour YAP/TAZ au niveau de la modulation des gènes impliqués dans la différenciation sexuelle chez le mâle. *In vitro*, à partir des cultures primaires de cellules de Sertoli provenant de souris âgées de 4 jours, la perte de YAP/TAZ entraîne une diminution de l'expression des gènes de la différenciation sexuelle mâle (*Dhh*, *Dmrt1*, *Sox9*, *Wt1*) et une augmentation des gènes impliqués dans la différenciation sexuelle femelle (*Foxl2*, *Rspo1*, *Wnt4*). Afin d'expliquer le mécanisme d'action menant à cette dédifférenciation nous nous sommes attardés au lien entre

l'expression de CTNNB1 et YAP/TAZ étant donné que dans certains types cellulaires la perte de YAP entraîne une activation et une surexpression de CTNNB1 et qu'une surexpression de CTNNB1 dans les cellules de Sertoli mène à une dédifférenciation de ces dernières (Boyer et al. 2008; Boyer et al. 2009; Li et al. 2017). Cependant, aucune augmentation de l'expression de CTNNB1 ni aucune translocation au noyau de cette protéine n'ont été observées ce qui indique que CTNNB1 n'est pas responsable de la modification observée dans l'expression des gènes associés à la différenciation du sexe. Des études supplémentaires sont requises afin de définir le mécanisme d'action de YAP/TAZ dans les cellules de Sertoli. Il a été montré que la voie Hippo peut réguler *Sox9* et *Wtl* dans d'autres types cellulaires que les cellules somatiques du testicule en s'associant à des protéines de la famille TEAD, elles-mêmes liées à leur site consensus présent sur le promoteur de ces gènes (Song et al. 2014; Zhong et al. 2013; Singh et al. 2016). Si YAP agit de la même manière dans les cellules de Sertoli reste à déterminer. Pour cela, des études de CHIP-qPCR (Chromatin immunoprécipitation – quantitative Polymerase Chain Reaction) pourraient être réalisées dans notre modèle de culture primaire de cellule de Sertoli afin d'étudier si le complexe YAP(TAZ)/TEAD se lie aux sites TEADs situés sur le promoteur de *Sox9* et de *Wtl* afin de réguler positivement leur expression dans les cellules de Sertoli. La liaison de YAP(TAZ)/TEAD aux promoteurs des gènes impliqués dans la différenciation sexuelle femelle, tels que *Foxl2*, *Rspo1* ou *Wnt4* pourrait également être évaluée par CHIP-qPCR. Bien que les protéines TEADs soient les cofacteurs privilégiés de YAP/TAZ, ces dernières pourraient également interagir avec un autre cofacteur afin de se lier à l'ADN. Des expériences de CHIP-seq permettraient donc d'identifier l'ensemble des sites d'interactions de YAP/TAZ dans les cellules de Sertoli. Combiner ce CHIP-seq à des études sur puces à ADN permettrait de définir le réseau de gènes régulés (directement et indirectement) par YAP/TAZ et impliqués dans la différenciation du sexe.

Si une dédifférenciation des cellules de Sertoli a été observée dans le modèle *in vitro*, la perte d'identité de ces cellules n'a pas été observée dans le modèle *in vivo*, *Yap*^{flox/flox}; *Taz*^{flox/flox}; *Amh*^{cre/+}, alors que seulement de minimes changements dans l'expression de *Sox9*, *Dmrt1*, *Dhh* et *Wnt4* ont été observés chez les animaux de 4 jours et qu'aucun changement n'était observé chez les animaux adultes. Ceci pourrait être expliqué de différentes façons. Tout d'abord, il est possible que les autres types cellulaires du testicule, via

la sécrétion de signaux paracrines, contribuent au maintien de l'identité des cellules de Sertoli dans le modèle *in vivo* alors que ces signaux seraient absents du modèle *in vitro*. Ensuite, il est possible que la recombinaison de *Yap* et *Taz* soit inefficace dans notre modèle *in vivo*. Nos résultats d'immunohistochimie révèlent en effet que certaines cellules de Sertoli expriment toujours YAP ou TAZ. Comme YAP et TAZ ont une activité en partie redondante, il est possible que l'expression de l'une de ces deux protéines dans les cellules de Sertoli soit suffisante pour permettre le maintien de l'identité mâle. Cette possibilité n'a en revanche pas pu être étudiée, car nous avons été incapables d'effectuer des expériences de double immunofluorescence avec nos anticorps et d'évaluer le pourcentage de cellules de Sertoli exprimant toujours YAP ou TAZ. En association avec une recombinaison plus ou moins efficace, il est aussi possible que les cellules de Sertoli ayant une recombinaison simultanée de *Yap* et *Taz* meurent par apoptose. En ce sens, il a été démontré que la perte de *Yap/Taz* conduit diverses cellules vers l'apoptose (Vigneron, Ludwig, and Vousden 2010; Deng et al. 2016; Ikon et al. 2015; Cao et al. 2014) et nous observons une augmentation de l'apoptose des cellules présentes dans les tubules séminifères chez les animaux *Yap^{flox/flox};Taz^{flox/flox};Amh^{cre/+}* âgés de 4 jours. Selon cette hypothèse, la majorité des cellules de Sertoli n'exprimant plus *Yap* et *Taz* mourraient durant le développement et la période périnatale alors que la prolifération des cellules de Sertoli exprimant toujours l'un ou l'autre de ces gènes serait favorisée. Comme l'allèle *Amh^{cre/+}* est exprimée vers le jour embryonnaire E14.5, il aurait été intéressant d'évaluer le modèle à divers jours embryonnaires afin de vérifier si une variation de l'expression des gènes de la différenciation du sexe ou de l'apoptose était plus importante durant la période embryonnaire.

La différenciation sexuelle repose sur un antagonisme entre l'expression des gènes impliqués dans la différenciation mâle et femelle. Des études complémentaires de surexpression de *Yap/Taz* chez la femelle, dans les cellules de granulosa, permettraient de compléter les études sur leurs rôles dans la différenciation sexuelle. Pour cela, deux approches peuvent être envisagées i) la suppression de l'activité de la voie Hippo (par exemple, en inactivant LATS1/2) ou ii) la surexpression de YAP à l'aide d'un transgène exprimant une forme constitutivement active de YAP telle que YAP-5SA qui ne peut plus être phosphorylée et dégradée. Il a été montré dans un modèle de culture de cellules de la

granulosa que LATS1 phosphoryle FOXL2 permettant l'augmentation de son activité (Pisarska et al. 2010) et comme mentionné précédemment, YAP induit l'expression de *Sox9* dans des cellules cancéreuses œsophagiennes (Song et al. 2014). Ces données suggèrent que LATS1/2 pourraient à la fois activer FOXL2 et réprimer l'expression de *Sox9* par la phosphorylation de YAP afin de favoriser la différenciation femelle. Des résultats préliminaires obtenus par le groupe du Dr Boerboom (Tsoi M. 2017) ont mis en évidence que l'inactivation conditionnelle de *Lats1/2* dans les cellules de la granulosa conduit à la perte de l'expression de FOXL2, à l'apparition de cellules SOX9+ et de pseudo-tubules séminifères dans l'ovaire chez des souris âgées de 4 mois dans le modèle *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Cyp19^{cre/+}*. Ensemble, les études effectuées dans les cellules de Sertoli et de granulosa suggèrent fortement que la voie Hippo joue un rôle dans la différenciation du sexe. De plus amples recherches sont en revanche encore requises afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents.

Au même moment que notre article était publié, un autre article qui évaluait le rôle de YAP dans un modèle de culture primaire de cellule de Sertoli provenant de rats âgés de 19 jours a été publié. Selon cet article, la perte de YAP dans les cellules de Sertoli diminuait l'expression de gènes répondant à l'AMPC (Sen Sharma and Majumdar 2017). Il est important cependant de mentionner que l'expression de seulement cinq gènes a été évaluée et qu'une diminution de l'expression était observée pour trois d'entre eux. Aussi, pour cette étude, seulement la VP a été utilisée pour inhiber YAP et, tel que mentionné préalablement, VP peut aussi agir via les protéines de la famille 14-3-3 et pourrait donc être non spécifique (Wang et al. 2016). Malgré ces bémols, il serait intéressant d'évaluer les cibles en aval de l'AMPC dans notre modèle de souris. De plus, le fait que YAP et la voie Hippo se situent en aval de l'AMPC est un concept important qui sera discuté dans les prochaines sections.

1.2. Rôle de YAP dans les cellules de Leydig

Pour faire suite à notre étude sur le rôle de *Yap/Taz* dans les cellules de Sertoli, nous avons voulu étudier le rôle de ceux-ci dans les cellules de Leydig. Nous avons donc créé le modèle de souris *Yap^{flox/flox};Taz^{flox/flox};Nr5a1^{cre/+}* afin d'inactiver ces gènes dans les précurseurs

des cellules de Leydig, de Sertoli et de l'adrénocortex surrénalien. Si la recombinaison a été efficace au niveau de l'adrénocortex surrénalien (discuté plus tard) la recombinaison était inefficace au niveau du testicule empêchant l'étude *in vivo* des effecteurs de la voie Hippo dans les cellules de Leydig. L'utilisation d'un autre modèle animal plus efficace (et plus spécifique) dans les cellules de Leydig serait nécessaire afin d'étudier le rôle de *Yap* et *Taz* dans ces cellules. L'utilisation de la souris *Cyp17a1* (Bridges et al. 2008) et la création du modèle *Yap^{flox/flox};Taz^{flox/flox};Cyp17a1^{cre/+}* pourrait être envisagée. Cependant, l'expression de la recombinase Cre n'est pas spécifique aux cellules de Leydig. Son expression est également retrouvée dans le foie (faiblement), dans le cortex surrénalien des animaux mâles ainsi que dans l'hypophyse (Bridges et al. 2008) et la recombinaison dans ces tissus stéroïdogéniques devrait être prise en compte. D'ailleurs, l'ensemble des modèles de souris Cre qui ciblent les cellules de Leydig actuellement disponibles ciblent également d'autres tissus stéroïdogéniques et l'analyse des résultats obtenus avec ces souris doivent tenir compte de la recombinaison potentielle dans divers types cellulaires de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique, de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien ainsi que de leurs interactions. Idéalement, un modèle de souris transgénique exprimant la recombinase Cre sous le contrôle d'un gène spécifiquement exprimé dans les cellules de Leydig devrait être créé. Un bon modèle serait un modèle de souris dans lequel l'enzyme Cre est exprimée de façon inductible sous le contrôle du gène *Ins13*. Ainsi la création d'une souris *Yap^{flox/flox};Taz^{flox/flox};Ins13^{creERT2/+}* permettrait d'induire l'expression de la recombinase Cre dans les cellules de Leydig et permettrait d'étudier de façon spécifique le rôle que joue *Yap/Taz* dans les cellules de Leydig fœtales (induction durant le développement embryonnaire) ou adultes matures (induction après la puberté).

En l'absence de bons modèles de souris transgéniques, mais également à cause de la complexité de mettre en culture des cellules primaires de Leydig, les lignées cellulaires immortalisées sont demeurées des outils clés pour l'étude de la stéroïdogénèse dans les cellules de Leydig. Afin d'étudier le rôle de l'effecteur de la voie hippo YAP au niveau des cellules de Leydig, nous avons donc décidé d'utiliser la lignée de cellules de Leydig murine MLTC-1 (Rebois 1982). Notre étude met en évidence que l'activation de l'AMPC entraîne la phosphorylation de YAP alors que l'inhibition pharmacologique de YAP ou l'inhibition de son expression par des siRNAs mène à une augmentation de l'expression basale de *Star* et de

la sécrétion d'hormones (testostérone et progestérone) par les cellules MLTC-1. Ces résultats suggèrent que YAP est un régulateur négatif de la stéroïdogénèse dans les cellules de Leydig et que l'AMPc active la voie Hippo afin de dégrader ou séquestrer YAP et permettre la biosynthèse adéquate des hormones stéroïdiennes. Afin d'apporter la preuve de l'implication de la PKA dans l'inactivation de YAP, nous avons utilisé l'inhibiteur H-89. Cet inhibiteur est connu pour non-seulement inhiber l'activité de la PKA, mais également d'autres protéines kinases (Davies et al. 2000; Lochner and Moolman 2006). Parmi ces kinases se trouvent S6K1 (p70 ribosomal protein S6 kinase), MSK1 (mitogen- and stress-activated protein kinase 1), ROCK-II (Rho-dependent protein kinase II) ou encore AKT (revue dans (Lochner and Moolman 2006)). Parmi ces kinases inhibées par H-89 à 10 μ M, il a été montré que l'activité d'AKT est diminuée d'environ 80% (Davies et al. 2000) et il est connu qu'AKT phosphoryle YAP afin de le maintenir dans le cytoplasme, et ainsi empêcher son action au niveau nucléaire (Basu et al. 2003). Ainsi, afin d'élucider la ou les voies de signalisation impliquées dans l'inhibition de YAP à la suite de l'activation de l'AMPc par la FSK, il sera judicieux d'utiliser une concentration de H-89 plus faible que celle employée dans notre étude (50 μ M) ainsi que d'autres inhibiteurs tel que PKI (un inhibiteur plus spécifique de la PKA). Cependant, certaines études suggèrent que YAP est phosphorylée par la PKA. Par exemple, dans la lignée cellulaire NIH-3T3 (fibroblastes embryonnaires), il a été montré que H89 et PKI empêchent la phosphorylation de YAP par la FSK (Kim et al. 2013).

La PKA n'est cependant pas la seule molécule activée par l'AMPc. Il a été mis en évidence qu'en réponse à l'AMPc, les protéines RAPGEF3 et 4 (Rap guanine nucleotide exchange factor 3 et 4), mieux connues sous le nom de EPAC1 et EPAC2 (Exchange protein activated by cAMP) peuvent également être activées par l'AMPc et réguler différents processus cellulaires (revue dans (Roscioni, Elzinga, and Schmidt 2008)). Dans les cellules HEK293A, il a été mis en évidence que les protéines EPACs, tout comme la PKA, mènent à la phosphorylation de YAP (Yu et al. 2012). Il serait donc possible que les protéines EPACs soient responsables de la phosphorylation de YAP dans les cellules de Leydig. Il est aussi intéressant de signaler que, dans des cellules placentaires, EPAC1 peut activer la kinase CAMKI (Chang, Chang, and Chen 2011). De plus, des études faites sur différents types cellulaires (cellules musculaires lisses de rat ou cellules épithéliales humaines) ont montré que

les EPACs activent la kinase AKT (Arcaro et al. 2018; Garcia-Morales, Luaces-Regueira, and Campos-Toimil 2017). Comme nous avons vu précédemment, CAMKI participe à l'induction de la stéroïdogenèse dans les cellules de Leydig (Manna et al. 2002; Martin et al. 2008). AKT peut également réguler positivement la stéroïdogenèse en réponse à la LH dans les cellules de la thèque chez la chèvre (Wang et al. 2018) ainsi que dans les cellules de Leydig murines (Lai et al. 2014). Ces différentes études nous amènent à suggérer qu'EPAC pourrait agir via CAMKI ou AKT et la voie Hippo pour réguler la stéroïdogenèse. Identifier et discriminer lequel de ces mécanismes entraîne la phosphorylation de YAP dans les cellules MLTC-1 reste à déterminer.

Nos données suggèrent également que YAP régule négativement la transcription de *Star* et interagit avec le promoteur proximal de *Star* où se trouve un site de liaison TEAD (un site de liaison pour le cofacteur principal de YAP). Sur le promoteur de *Star*, le site TEAD se superpose avec les sites de liaison pour NR4A1/NR5A1 et NR2F2. Le complexe YAP/TEAD pourrait donc interagir avec ces facteurs de transcription et ainsi empêcher l'induction de l'expression de *Star* par ces derniers. Une autre explication serait qu'en l'absence de stimulation par la LH, le complexe YAP/TEAD est présent sur le promoteur de *Star* et entre en compétition avec ces facteurs de transcription afin de lier le promoteur de *Star* et de réguler son expression. En réponse à l'activation de la voie AMPc/PKA par la LH, YAP serait phosphorylée (menant à sa dégradation ou rétention dans le cytoplasme) ce qui mènerait à une plus grande accessibilité du promoteur proximal de *Star* pour les facteurs de transcription (comme NR4A1) permettant l'activation maximale de la transcription de *Star*. Effectuer une expérience de CHIP pour NR5A1 ou NR2F2 pour le promoteur de *Star* en présence ou absence de YAP (traitement siRNAs) permettrait d'évaluer si YAP/TEAD diminue la liaison de ces facteurs de transcription lorsque *Star* est exprimé à un niveau basal. Il est important de mentionner que les études avec la lignée cellulaire ont seulement été faites pour YAP et non pour TAZ. Ce choix a été fait à cause de l'absence de bons anticorps permettant d'évaluer la phosphorylation de TAZ ainsi que pour effectuer les études de CHIP. Il est malgré tout possible que TAZ contribue aussi à la régulation de la stéroïdogenèse.

Bien que nos résultats mettent en avant un rôle de YAP dans la régulation de la stéroïdogenèse dans la lignée cellulaire MLTC-1, ces cellules présentent des différences par

rapport aux cellules de Leydig *in vivo*. Contrairement aux lignées cellulaires immortalisées, les cellules de Leydig adultes matures ne se divisent pas et leur caryotype est stable au sein d'une population. Dans les lignées, les cellules ont une prolifération importante et le nombre de chromosomes dans les cellules peut varier au sein d'une même population de cellules (Rebois 1982). De plus, les cellules MLTC-1 expriment toujours *Srd5a1*, ce qui suggère que ces cellules correspondent plutôt à des cellules de Leydig immatures, car l'expression de *Srd5a1* n'est pas détectée dans les cellules de Leydig matures (Ge and Hardy 1998). De plus, il a été montré que les cellules MA-10 (un autre type de lignée de cellules de Leydig semblables aux cellules MLTC-1) puisent leur ATP aussi bien de l'activité de la mitochondrie que de la glycolyse pour assurer la stéroïdogénèse contrairement aux cellules primaires pour lesquelles la principale source d'ATP provient de l'activité mitochondriale (Midzak et al. 2011). Ainsi, deux sources d'ATP sont disponibles dans les lignées afin d'assurer le transport du cholestérol dans la mitochondrie et de démarrer la stéroïdogénèse. Ces différences entre les lignées immortalisées et les cellules de Leydig en culture primaire suggèrent que l'inactivation de *Yap* dans pourrait entraîner des effets différents sur la stéroïdogénèse de ces cellules primaires. Malgré les difficultés techniques liées à la récupération et à l'utilisation de culture cellulaire primaire de Leydig, il serait donc pertinent de vérifier si les résultats que nous avons obtenus dans les lignées cellulaires sont également retrouvés dans des cultures primaires.

1.3. Rôle de YAP et TAZ dans l'adrénocortex surrénalien

Si le modèle *Yap*^{flox/flox};*Taz*^{flox/flox};*Nr5a1*^{cre/+} n'a pas été utile pour étudier les cellules de Leydig, ce modèle nous a conduits à étudier le rôle de la voie Hippo dans les cellules du cortex surrénalien. Dans ce modèle, le développement embryonnaire et la zonation de la glande surrénale sont normaux. Cependant, une dégénérescence de la glande surrénale est visible à partir du deuxième mois chez les mâles alors qu'aucune dégénérescence n'est observée chez la femelle. Deux questions se posent immédiatement : i) pourquoi ne voyons-nous pas de phénotype durant le développement? Et ii) comment expliquer le dimorphisme sexuel?

Comme mentionné dans la revue de littérature dans la section A, *Nr5a1/Sfl* est exprimé dès le stade embryonnaire, ce pourquoi nous avons décidé de l'utiliser afin d'élucider le rôle de YAP/TAZ dans les cellules progénitrices des cellules Leydig, de Sertoli et de l'adrénocortex. Cependant, il existe différents modèles de souris *Nr5a1^{cre/+}* ayant des efficacités de recombinaison différentes. Des différences de phénotypes ont déjà été observées en fonction du modèle utilisé pour étudier la recombinaison d'un même gène. C'est le cas lors de l'inactivation de *Ctnnb1* (souris *Ctnnb1^{flox/flox}*). En effet, lorsque la recombinaison de *Ctnnb1* est hautement efficace dans les cellules NR5A1+ (modèle *Nr5a1^{cre(high)/+}*), une dégénérescence de la glande surrénale est observée durant l'embryogenèse conduisant à la disparition des glandes surrénales à E18.5 (Kim et al. 2008). Cependant, lorsque la recombinaison est moins efficace (modèle *Nr5a1^{cre(low)/+}*), la dégénérescence des surrénales survient à partir de la quinzième semaine après la naissance (Kim et al. 2008). Bien que nous n'ayons pas utilisé l'une des souris *Nr5a1^{cre}* créées par Bingham (Bingham et al. 2006) et utilisé dans l'étude de Kim et al., il est possible qu'un certain degré de mosaïcisme dans la recombinaison de *Yap/Taz* soit présent dans l'adrénocortex de notre modèle de souris développé à partir de la souris *Nr5a1^{cre/+}* créée par Dhillon et al (Dhillon et al. 2006). Ce mosaïcisme ou encore une recombinaison plus tardive dans le développement embryonnaire pourraient expliquer l'absence d'un phénotype embryonnaire et l'apparition d'un phénotype surrénalien plus tardif. Le recours au modèle de souris *Nr5a1^{cre(high)/+}* (Bingham et al. 2006) serait sans doute plus approprié afin d'évaluer le rôle de *Yap/Taz* dans le développement de la glande surrénale. Dans le cas où la recombinaison de *Yap/Taz* se produirait lors du développement embryonnaire du cortex surrénalien, nous pourrions nous attendre à une dégénérescence embryonnaire de la glande surrénale qui pourrait mener à une déficience surrénalienne entraînant la mort de l'animal vers deux semaines d'âge. Bien que la mort de l'animal causé par l'aplasie surrénalienne serait plus que probable, il est possible que les souris survivent comme pour le modèle de souris *Gata4^{flox/flox};Gata6^{flox/flox};Nr5a1^{cre/+}*. Dans ce modèle, les cellules interstitielles du testicule produisent les hormones surrénaliennes nécessaires à la survie des souris mâles malgré l'absence de glandes surrénales fonctionnelles (Padua et al. 2015).

Le second point le plus intéressant de notre étude est le dimorphisme sexuel observé au niveau du phénotype alors qu'aucune dégénérescence n'est observée chez la femelle. Outre les études portant sur la zone X, peu d'études ont porté sur le dimorphisme sexuel de la glande surrénale, et ce, malgré le fait que l'adrénocortex de la femelle croît plus rapidement (Bielohuby et al. 2007; Kruger et al. 1982), que sa masse soit plus importante chez la femelle adulte (Bielohuby et al. 2007) et qu'une incidence plus importante des tumeurs surrenaliennes et de la maladie de Cushing (primaire et secondaire) soit observée chez les femmes (Rosmond 2006; Abiven-Lepage et al. 2010; Bertherat et al. 2009; Fassnacht et al. 2011; Steffensen et al. 2010). Les hormones circulantes pourraient expliquer le dimorphisme sexuel observé au niveau de la glande surrénale. En effet, il a été démontré par le passé que les androgènes étaient particulièrement importants pour la dégénérescence de la zone X alors que l'orchidectomie des souris mâles entraînait la réapparition d'une pseudo zone X (Hirokawa and Ishikawa 1975). Récemment, des études menées par différents groupes ont permis de mettre en évidence des différences entre les mâles et les femelles au niveau de la glande surrénale. Une étude de 2013 s'est attardée à comparer l'expression de gènes dans la glande surrénale entre les deux sexes ainsi qu'en fonction d'un traitement hormonal chez la souris (El Wakil et al. 2013). Cette étude a identifié 71 gènes différentiellement exprimés entre les mâles et les femelles, incluant notamment *Nr0b1* et *Nr5a1*, ce qui contribuerait à expliquer les différences en ce qui concerne la capacité stéroïdogénique et le renouvellement cellulaire au sein des glandes surrénales femelles comparativement aux mâles. Cette étude a été faite à partir de l'ensemble de la glande surrénale. Dans une étude faite chez le rat, il a été mis en évidence que la zone fasciculée est la zone présentant le plus grand nombre de gènes différentiellement exprimés entre les mâles et les femelles incluant entre autres les gènes codant pour AR et ERR γ (estrogen-related receptors γ) un activateur transcriptionnel capable de répondre à des signaux œstrogéniques (Trejter et al. 2015; Matsushima et al. 2007). Après la publication de notre article, il a été démontré que la PKA accélérât le renouvellement du cortex surrénalien ce qui résulte en une plus grande différenciation des cellules de la zG en cellule de la zF (au détriment de l'identité zG) (Dumontet et al. 2018). Dans un modèle où l'activité PKA est trop élevée (délétion du gène *Prkar1a* codant pour une sous-unité régulatrice de la PKA : *Prkar1a*^{fllox/fllox};*Cyp11b2*^{cre}) les souris femelles développent un syndrome de Cushing après 3 mois alors que le syndrome apparaît entre 7 et 12 mois chez le

mâle (Dumontet et al. 2018). Cette différence s'expliquerait par le fait que les androgènes testiculaires augmentent chez le mâle la voie de signalisation WNT/CTNNB1 qui « antagonise » la PKA (Dumontet et al. 2018). L'interaction entre les androgènes, la voie des WNTs et la PKA semble donc au cœur du processus de prolifération, maintien et zonation du cortex surrénalien (Drelon et al. 2016; Dumontet et al. 2018).

Dans notre modèle *Yap^{flox/flox};Taz^{flox/flox};Nr5a1^{cre/+}*, nous avons mis en évidence que l'inactivation de *Yap* et *Taz* dans le cortex surrénalien entraîne sa dégénérescence chez les mâles, mais pas chez les femelles malgré une diminution de l'expression de *Yap* et *Taz* similaire aux mâles. Dans le modèle *Yap^{flox/flox};Taz^{flox/flox};Nr5a1^{cre/+}*, nous avons montré que l'expression de *Shh*, exprimé dans les cellules progénitrices (Huang et al. 2010), est diminuée dans les deux sexes. Différentes hypothèses pourraient expliquer que la dégénérescence est plus importante chez le mâle. Tout d'abord, nous avons suggéré dans notre article que NR0B1 pourrait compenser pour la perte de *Yap* et *Taz* dans la glande surrénale des femelles. En effet, l'expression de *Nr0b1* n'est pas diminuée dans les femelles mutantes (contrairement aux mâles mutants) et cette expression est de 12 fois supérieures chez les femelles comparativement aux mâles. Il est aussi connu que l'expression de ce facteur de transcription est supérieure chez la femelle (El Wakil et al. 2013; Mukai et al. 2002) et qu'il est régulé par les concentrations de glucocorticoïdes, elles-mêmes plus élevées chez la femelle (Gummow et al. 2006). De plus, chez des souris adultes, NR0B1 joue un rôle dans le renouvellement du cortex en régulant de façon positive l'activité des cellules progénitrices capsulaires (Scheys, Heaton, and Hammer 2011).

En fonction des résultats obtenus par le groupe de Martinez et Val (Drelon et al. 2016; Dumontet et al. 2018) et étant donné que la voie Hippo peut être régulée par la PKA et peut réguler de manière négative ou positive la voie des WNTs, il aurait été intéressant d'évaluer plus en détail si la voie Hippo interagit avec la voie WNT/CTNNB1 et la voie de la PKA pour réguler le dimorphisme sexuel de l'adrénocortex. Cependant, l'expression de l'*Axin2* n'était pas modifiée dans notre modèle, suggérant que la voie WNT/CTNNB1 n'a pas été modifiée. En revanche, pour étudier l'interaction entre la voie Hippo et la voie AMPc/PKA, il serait intéressant d'utiliser des modèles de souris présentant une activation de la PKA. En effet, dans la glande surrénale il a été rapporté que l'augmentation de l'activité de la PKA dans

l'adrénocortex (souris *Prkar1a^{flox/flox};Akr1b7^{cre}*) entraîne une production excessive de glucocorticoïdes et une hyperplasie de la glande surrénale (Sahut-Barnola et al. 2010). Ce modèle de souris permettrait d'étudier les composantes de la voie Hippo ainsi que leur régulation lorsque la voie PKA est constitutivement active.

En plus d'une interaction potentielle entre les voies Hippo/WNT/PKA, il est possible que YAP et/ou TAZ interagissent aussi directement avec les récepteurs des androgènes (AR) pour jouer un rôle dans la prolifération puisqu'il a été démontré que YAP interagissait et se liait à l'AR dans le cancer de la prostate (Kuser-Abali et al. 2015). Il a aussi été démontré que la dihydrotestostérone (DHT) stimulait la sécrétion d'aldostérone dans la lignée de cellules tumorales surrénaliennes H295R suggérant que les androgènes pouvaient affecter la différenciation de ces cellules en cellules de la zF (Yanes and Romero 2009). En revanche, cela nécessitait des concentrations supraphysiologiques de DHT et cet effet ne semblait pas impliquer AR mais plutôt la voie CAMK. Cependant, l'effet non-génomique de l'activation de AR n'a pas été évalué dans ce modèle. Il pourrait être malgré tout intéressant d'évaluer si YAP et/ou TAZ interagissent avec CAMK dans un tel modèle. Enfin, une orchidectomie aurait dû être effectuée sur nos animaux *Yap^{flox/flox};Taz^{flox/flox};Nr5a1^{cre/+}* afin de déterminer si les androgènes, qui ralentissent le renouvellement de l'adrénocortex, exacerbe la dégénérescence de l'adrénocortex chez les mâles. Dans ce modèle, nous nous attendrions à ne plus observer de dégénérescence chez les mâles *Yap^{flox/flox};Taz^{flox/flox};Nr5a1^{cre/+}*. À l'inverse, nous aurions pu traiter les femelles *Yap^{flox/flox};Taz^{flox/flox};Nr5a1^{cre/+}* sur plusieurs jours avec de la testostérone ou de la DHT pour évaluer si cela menait à la dégénérescence des surrénales des animaux femelles.

Une autre explication possible afin d'expliquer le dimorphisme sexuel observé chez nos animaux mutants mâles et femelles est associée à la contribution potentielle des cellules souches (capsulaire) et progénitrices (sous-capsulaire) à l'homéostasie du cortex surrénalien. L'hypothèse actuelle, basée sur des études de traçage effectuées avec des modèles de souris transgéniques, suggère que le maintien de l'homéostasie de l'adrénocortex chez l'adulte est principalement assuré par le recrutement des cellules progénitrices (Finco, Lerario, and Hammer 2018). Cependant, ces études de traçage ont seulement été effectuées chez le mâle. Il est donc possible d'émettre l'hypothèse que les femelles pourraient être capables de recruter à

la fois les cellules progénitrices et les cellules souches afin de maintenir l'homéostasie du cortex. Selon cette hypothèse, la diminution de l'expression de *Shh* observée dans notre modèle *Yap^{flox/flox};Taz^{flox/flox};Nr5a1^{cre/+}* corrèlerait avec une diminution du nombre de cellules progénitrices SHH+. En revanche, cette diminution n'aurait pas un impact aussi important pour le maintien de la glande surrénale chez la femelle puisque ces dernières recruteraient également des cellules souches de la capsule. Afin de tester cette hypothèse, des souris Gli1-LacZ (Bai et al. 2002) et Shh-GFP (King, Paul, and Laufer 2009) marquant respectivement, les cellules souches et progénitrices sont disponibles et pourraient être croisées à notre modèle *Yap^{flox/flox};Taz^{flox/flox};Nr5a1^{cre/+}* afin d'effectuer des expériences de traçage. La création de ces modèles combinés à des expériences de régénération (post-traitement au dexaméthasone) nous permettrait d'évaluer la contribution de ces différentes populations cellulaires dans le renouvellement du cortex à la suite de la perte de l'expression de *Yap* et *Taz* chez les mâles et les femelles.

1.4. Extrapolation des résultats obtenus dans les cellules de Leydig aux cellules adrénocorticales

Bien que les cellules de Leydig et adrénocorticales partagent une origine commune au cours du développement embryonnaire et sont toutes deux capables de produire des hormones stéroïdiennes, des précautions sont à prendre si nous voulions éventuellement extrapoler des résultats portant sur la stéroïdogénèse obtenus dans des testicules à la stéroïdogénèse dans la glande surrénale. En effet de nombreuses différences existent entre les deux systèmes. Par exemple, le métabolisme du cholestérol est différent entre les cellules de Leydig et les cellules du cortex surrénalien (cf. section #B.1). De plus, la glande surrénale est un organe où les androgènes jouent un rôle primordial pour la stéroïdogénèse et qui présente un dimorphisme sexuel entre les souris mâles et femelles. Deux zones distinctes produisent des stéroïdes dans la glande surrénale murine alors que la zG produit de l'aldostérone et la zF de la corticostérone. Dans la zG, WNT/CTNNB1 régule positivement la stéroïdogénèse en augmentant l'expression de *Nr4a1* (Berthon et al. 2014) en plus de réprimer la voie PKA dans ces cellules (Drelon et al. 2016) ce qui démontre un mécanisme bien distinct de la régulation

de la stéroïdogénèse dans la zG. Bien que notre modèle *Yap^{flox/flox};Taz^{flox/flox};Nr5a1^{cre/+}* ne révèle pas un rôle important pour YAP et TAZ dans la stéroïdogénèse, il est toujours possible d’imaginer que la voie WNT/CTNNB1 pourrait affecter le rôle de la voie Hippo dans le zG alors que cela ne serait pas le cas dans les cellules de Leydig (dans lesquelles un rôle de la voie WNT/CTNNB1 dans la régulation de la stéroïdogénèse n’a pas été déterminé). Ces différentes raisons soulèvent le besoin de développer des modèles spécifiques afin d’étudier la stéroïdogénèse dans le testicule et dans les différentes zones de la glande surrénale.

1.5. Perspectives

La régulation de YAP et TAZ est importante pour le développement et le fonctionnement physiologique des différents types cellulaires qui ont été étudiés dans le cadre de cette thèse : les cellules de Sertoli, de Leydig et du cortex surrénalien. Cependant, le rôle des kinases formant la voie Hippo dans ces tissus demeure inconnu. Jusqu’à présent la voie Hippo est essentiellement présentée comme une voie canonique où différents signaux (polarité, mécanotransduction, le stress, le cycle cellulaire) activent la cascade de phosphorylation de MST1/2, LAST1/2 et YAP/TAZ. Or, il a été démontré que l’AMPC/PKA phosphoryle directement LATS1/2 et contourne donc le besoin d’activité MST1/2 (Kim et al. 2013; Yu et al. 2013). Il serait donc intéressant d’évaluer le rôle de MST1/2 et LATS1/2 dans nos tissus d’intérêt afin de mieux définir la contribution de la voie canonique et de la voie AMPC/PKA pour la régulation de YAP/TAZ. Dans un premier temps, il serait possible de créer les modèles *Mst1^{flox/flox};Mst2^{flox/flox};Nr5a1^{cre/+}* et *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1^{cre/+}* afin de mieux comprendre le fonctionnement de la voie Hippo dans les tissus stéroïdogéniques et de comparer leur phénotype respectif. Étant donné que YAP et TAZ sont nécessaires pour le maintien de la glande surrénale et qu’une surexpression de YAP est présente dans les adénocarcinomes pédiatriques (Abduch et al. 2016) nous pourrions nous attendre à ce que ces deux modèles développent un phénotype de tumeurs surrénaliennes. Cependant, une différence de phénotype entre ces deux modèles suggérerait que soit MST1/2 agit par d’autres kinases que LATS1/2 ou que MST1/2 n’est pas la molécule la plus importante pour activer LATS1/2 dans les tissus endocriniens. Étant donné l’importance de la voie médiée par l’AMPC

dans la glande surrénale et le testicule, ainsi que sa capacité à entraîner la phosphorylation de LATS1/2, il se pourrait que le phénotype soit plus prononcé dans le modèle d'inactivation de *Lats1/2* que de *Mst1/2*. En effet, en cas de perte d'expression de *Lats1/2*, YAP et TAZ ne seraient plus phosphorylées, que cela soit à la suite de l'activation de la voie canonique Hippo ou bien de la voie AMPc, et pourraient alors être transloquées au noyau et ainsi conduire à un phénotype marqué lié à l'expression de leurs gènes cibles. En revanche, en cas d'inactivation de *Mst1/2*, YAP/TAZ pourraient toujours être phosphorylées par LATS1/2 qui auraient été activées par les kinases en aval de l'AMPc, induisant éventuellement un phénotype moins sévère. Dans le testicule, nous pourrions nous attendre à une augmentation de la prolifération cellulaire aussi bien dans les cordons/tubules séminifères que dans l'interstitium étant donné que l'expression de la recombinaison Cre vise à la fois les précurseurs des cellules de Leydig et de Sertoli. Déjà des signes que la voie Hippo n'est pas aussi simple que la voie canonique décrite ont été démontrés au niveau de différents tissus. L'exemple des hépatocytes est particulièrement intéressant. En effet, l'étude de Zhou et al en 2009 a montré que l'inactivation de *Mst1/2* dans les hépatocytes murins, à l'aide d'un adénovirus recombinant, conduit à une diminution des niveaux de YAP phosphorylées et la formation de carcinome hépatocellulaire (Zhou et al. 2009). La réexpression de *Mst1* dans les hépatocytes provenant de ces souris entraîne à nouveau la phosphorylation de YAP sans passer par la phosphorylation de LATS1/2, suggérant la présence d'une kinase autre que LATS1/2 menant à la phosphorylation de YAP. En revanche, la délétion conditionnelle de LATS1/2 dans les hépatocytes murins entraînent une augmentation de l'expression de YAP/TAZ et une prolifération des hépatocytes au détriment de leur différenciation. L'absence d'anomalie phénotypique a pu être obtenue lors de l'inactivation combinée de *Lats1/2* et *Yap/Taz* (Yi et al. 2016) dans ce modèle. Cet exemple démontre l'importance d'inactiver les différents composants de la voie Hippo au niveau du testicule et de la glande surrénale.

Une seconde raison importante pour étudier plus en détail le rôle de LATS1/2 dans les tissus stéroïdogènes est le rôle potentiel de ces protéines pour la régulation de la voie de l'œstrogène. En effet, il a été démontré dans un modèle de tumeurs de la glande mammaire que l'inactivation de *Lats1/2* entraîne la stabilisation de ESR1 et YAP/TAZ, conduisant à l'activation des gènes cibles de ces deux voies de signalisation qui vont participer au

développement de la tumeur (Britschgi et al. 2017). Il serait donc intéressant d'évaluer si LATS1/2 agissent aussi sur ces deux voies afin de réguler la stéroïdogénèse dans les cellules de Leydig. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en utilisant à nouveau la lignée MLTC-1 (ou MA-10) en inactivant *Lats1* et *Lats2* par l'utilisation de siARNs ou de la technologie CRISPR/Cas9. Les cellules ainsi inactivées pourront être traitées avec de la forskoline, de l'œstradiol ou les deux combinées afin d'étudier l'expression des gènes impliqués dans la stéroïdogénèse. Il est possible d'imaginer que dans un tel scénario, l'inactivation concomitante de LATS1/2 entraînerait une diminution de la synthèse des stéroïdes, une diminution de la phosphorylation de YAP et une augmentation de la stabilité de ER α . Dans ces cellules inactivées pour LATS1/2, l'inhibition de YAP et ESR1 par des inhibiteurs pharmacologiques ou des siARNs permettrait de rétablir la stéroïdogénèse complètement ou partiellement. Compte tenu que l'œstradiol augmente également la prolifération de la lignée de cellules tumorales surrénaliennes H295R (Sirianni et al. 2012), le même type d'étude pourrait être effectuées afin d'évaluer l'interaction entre ces deux voies de signalisation pour la prolifération des adrénocarcinomes.

2. Conclusion

Les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse ont permis de mettre en avant pour la première fois le rôle de la voie de signalisation Hippo dans les cellules somatiques du testicule et du cortex surrénalien. Ces recherches fondamentales ont permis de positionner la voie Hippo comme une voie impliquée au niveau du développement afin de maintenir l'identité mâle des cellules de Sertoli. Bien que l'effet de la délétion de *Yap/Taz* dans les cellules de Sertoli n'entraîne pas de transdifférenciation, ces travaux permettent d'intégrer une nouvelle voie de signalisation dans la régulation de l'expression des gènes impliqués dans le déterminisme mâle. L'implication de la voie Hippo dans le contrôle de la stéroïdogénèse ouvre la voie vers de nouvelles recherches afin d'approfondir les mécanismes mis en jeu dans cette régulation au sein des cellules de Leydig mais également dans les autres cellules stéroïdogéniques. Enfin, la mise en avant du rôle de YAP/TAZ dans l'homéostasie de la

glande surrénale représente une pièce de puzzle qui apporte une nouvelle voie de signalisation dans la compréhension du dimorphisme sexuel entre les mâles et les femelles.

Ces résultats mettent en avant la voie Hippo dans les organes endocriniens et la nécessiter de poursuivre les recherches.

Bibliographie

- Abdou, H. S., F. Bergeron, and J. J. Tremblay. 2014. 'A cell-autonomous molecular cascade initiated by AMP-activated protein kinase represses steroidogenesis', *Mol Cell Biol*, 34: 4257-71.
- Abdou, H. S., N. M. Robert, and J. J. Tremblay. 2016. 'Calcium-dependent Nr4a1 expression in mouse Leydig cells requires distinct AP1/CRE and MEF2 elements', *J Mol Endocrinol*, 56: 151-61.
- Abdou, H. S., G. Villeneuve, and J. J. Tremblay. 2013. 'The calcium signaling pathway regulates leydig cell steroidogenesis through a transcriptional cascade involving the nuclear receptor NR4A1 and the steroidogenic acute regulatory protein', *Endocrinology*, 154: 511-20.
- Abduch, R. H., A. Carolina Bueno, L. F. Leal, M. M. Cavalcanti, D. C. Gomes, S. R. Brandalise, M. J. Masterallo, J. A. Yunes, C. E. Martinelli, Jr., L. G. Tone, S. Tucci, C. A. Molina, F. S. Ramalho, A. C. Moreira, I. A. Cardinalli, C. A. Scrideli, L. N. Ramalho, M. de Castro, and S. R. Antonini. 2016. '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*, 7: 84634-44.
- Abel, M. H., A. N. Wootton, V. Wilkins, I. Huhtaniemi, P. G. Knight, and H. M. Charlton. 2000. 'The effect of a null mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene on mouse reproduction', *Endocrinology*, 141: 1795-803.
- Aberle, H., A. Bauer, J. Stappert, A. Kispert, and R. Kemler. 1997. 'beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway', *EMBO J*, 16: 3797-804.
- Abiven-Lepage, G., J. Coste, F. Tissier, L. Groussin, L. Billaud, B. Dousset, F. Goffinet, X. Bertagna, J. Bertherat, and M. L. Raffin-Sanson. 2010. 'Adrenocortical carcinoma and pregnancy: clinical and biological features and prognosis', *Eur J Endocrinol*, 163: 793-800.
- Acton, S. L., P. E. Scherer, H. F. Lodish, and M. Krieger. 1994. 'Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor', *J Biol Chem*, 269: 21003-9.

- Aigueperse, C., A. Martinez, A. M. Lefrancois-Martinez, G. Veysière, and C. I. Jean. 1999. '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*, 160: 147-54.
- Aigueperse, C., P. Val, C. Pacot, C. Darne, E. Lalli, P. Sassone-Corsi, G. Veysière, C. Jean, and A. Martinez. 2001. 'SF-1 (steroidogenic factor-1), C/EBPbeta (CCAAT/enhancer binding protein), and ubiquitous transcription factors NF1 (nuclear factor 1) and Sp1 (selective promoter factor 1) are required for regulation of the mouse aldose reductase-like gene (AKR1B7) expression in adrenocortical cells', *Mol Endocrinol*, 15: 93-111.
- Akingbemi, B. T., R. Ge, C. S. Rosenfeld, L. G. Newton, D. O. Hardy, J. F. Catterall, D. B. Lubahn, K. S. Korach, and M. P. Hardy. 2003. 'Estrogen receptor-alpha gene deficiency enhances androgen biosynthesis in the mouse Leydig cell', *Endocrinology*, 144: 84-93.
- Anand-Ivell, R., and R. Ivell. 2014. 'Insulin-like factor 3 as a monitor of endocrine disruption', *Reproduction*, 147: R87-95.
- Andric, S. A., M. M. Janjic, N. J. Stojkov, and T. S. Kostic. 2007. 'Protein kinase G-mediated stimulation of basal Leydig cell steroidogenesis', *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 293: E1399-408.
- . 2010. 'Sildenafil treatment in vivo stimulates Leydig cell steroidogenesis via the cAMP/cGMP signaling pathway', *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 299: E544-50.
- Aoki, A., and E. M. Massa. 1975. 'Subcellular compartmentation of free and esterified cholesterol in the interstitial cells of the mouse testis', *Cell Tissue Res*, 165: 49-62.
- Aragona, M., T. Panciera, A. Manfrin, S. Giulitti, F. Michielin, N. Elvassore, S. Dupont, and S. Piccolo. 2013. 'A mechanical checkpoint controls multicellular growth through YAP/TAZ regulation by actin-processing factors', *Cell*, 154: 1047-59.
- Arakane, F., S. R. King, Y. Du, C. B. Kallen, L. P. Walsh, H. Watari, D. M. Stocco, and J. F. Strauss, 3rd. 1997. 'Phosphorylation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) modulates its steroidogenic activity', *J Biol Chem*, 272: 32656-62.
- Arcaro, C. A., R. P. Assis, N. M. Zanon, S. Paula-Gomes, L. C. C. Navegantes, I. C. Kettelhut, I. L. Brunetti, and A. M. Baviera. 2018. 'Involvement of cAMP/EPAC/Akt signaling in

- the antiproteolytic effects of pentoxifylline on skeletal muscles of diabetic rats', *J Appl Physiol* (1985), 124: 704-16.
- Archambeault, D. R., and H. H. Yao. 2010. 'Activin A, a product of fetal Leydig cells, is a unique paracrine regulator of Sertoli cell proliferation and fetal testis cord expansion', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 10526-31.
- Assie, G., E. Letouze, M. Fassnacht, A. Jouinot, W. Luscap, O. Barreau, H. Omeiri, S. Rodriguez, K. Perlemoine, F. Rene-Corail, N. Elarouci, S. Sbiera, M. Kroiss, B. Allolio, J. Waldmann, M. Quinkler, M. Mannelli, F. Mantero, T. Papatomas, R. De Krijger, A. Tabarin, V. Kerlan, E. Baudin, F. Tissier, B. Dousset, L. Groussin, L. Amar, E. Clauser, X. Bertagna, B. Ragazzon, F. Beuschlein, R. Libe, A. de Reynies, and J. Bertherat. 2014. 'Integrated genomic characterization of adrenocortical carcinoma', *Nat Genet*, 46: 607-12.
- Aylon, Y., Y. Ofir-Rosenfeld, N. Yabuta, E. Lapi, H. Nojima, X. Lu, and M. Oren. 2010. 'The Lats2 tumor suppressor augments p53-mediated apoptosis by promoting the nuclear proapoptotic function of ASPP1', *Genes Dev*, 24: 2420-9.
- Azzolin, L., T. Panciera, S. Soligo, E. Enzo, S. Bicciato, S. Dupont, S. Bresolin, C. Frasson, G. Basso, V. Guzzardo, A. Fassina, M. Cordenonsi, and S. Piccolo. 2014. 'YAP/TAZ incorporation in the beta-catenin destruction complex orchestrates the Wnt response', *Cell*, 158: 157-70.
- Azzolin, L., F. Zanconato, S. Bresolin, M. Forcato, G. Basso, S. Bicciato, M. Cordenonsi, and S. Piccolo. 2012. 'Role of TAZ as mediator of Wnt signaling', *Cell*, 151: 1443-56.
- Babu, P. S., D. L. Bavers, F. Beuschlein, S. Shah, B. Jeffs, J. L. Jameson, and G. D. Hammer. 2002. 'Interaction between Dax-1 and steroidogenic factor-1 in vivo: increased adrenal responsiveness to ACTH in the absence of Dax-1', *Endocrinology*, 143: 665-73.
- Bai, C. B., W. Auerbach, J. S. Lee, D. Stephen, and A. L. Joyner. 2002. 'Gli2, but not Gli1, is required for initial Shh signaling and ectopic activation of the Shh pathway', *Development*, 129: 4753-61.
- Baker, J., M. P. Hardy, J. Zhou, C. Bondy, F. Lupu, A. R. Bellve, and A. Efstratiadis. 1996. 'Effects of an Igf1 gene null mutation on mouse reproduction', *Mol Endocrinol*, 10: 903-18.

- Baker, P. J., and P. J. O'Shaughnessy. 2001. 'Role of gonadotrophins in regulating numbers of Leydig and Sertoli cells during fetal and postnatal development in mice', *Reproduction*, 122: 227-34.
- Bamforth, S. D., J. Braganca, J. J. Eloranta, J. N. Murdoch, F. I. Marques, K. R. Kranc, H. Farza, D. J. Henderson, H. C. Hurst, and S. Bhattacharya. 2001. 'Cardiac malformations, adrenal agenesis, neural crest defects and exencephaly in mice lacking Cited2, a new Tfap2 co-activator', *Nat Genet*, 29: 469-74.
- Bandiera, R., S. Sacco, V. P. Vidal, M. C. Chaboissier, and A. Schedl. 2015. 'Steroidogenic organ development and homeostasis: A WT1-centric view', *Mol Cell Endocrinol*, 408: 145-55.
- Bandiera, R., V. P. Vidal, F. J. Motamedi, M. Clarkson, I. Sahut-Barnola, A. von Gise, W. T. Pu, P. Hohenstein, A. Martinez, and A. Schedl. 2013. 'WT1 maintains adrenal-gonadal primordium identity and marks a population of AGP-like progenitors within the adrenal gland', *Dev Cell*, 27: 5-18.
- Baron, S., M. Manin, C. Aigueperse, M. Berger, C. Jean, G. Veysiere, and L. Morel. 2003. 'Hormonal and developmental regulation of the mouse aldose reductase-like gene akr1b7 expression in Leydig cells', *J Mol Endocrinol*, 31: 71-81.
- Barry, E. R., T. Morikawa, B. L. Butler, K. Shrestha, R. de la Rosa, K. S. Yan, C. S. Fuchs, S. T. Magness, R. Smits, S. Ogino, C. J. Kuo, and F. D. Camargo. 2013. 'Restriction of intestinal stem cell expansion and the regenerative response by YAP', *Nature*, 493: 106-10.
- Barsoum, I. B., N. C. Bingham, K. L. Parker, J. S. Jorgensen, and H. H. Yao. 2009. 'Activation of the Hedgehog pathway in the mouse fetal ovary leads to ectopic appearance of fetal Leydig cells and female pseudohermaphroditism', *Dev Biol*, 329: 96-103.
- Barsoum, I. B., J. Kaur, R. S. Ge, P. S. Cooke, and H. H. Yao. 2013. 'Dynamic changes in fetal Leydig cell populations influence adult Leydig cell populations in mice', *FASEB J*, 27: 2657-66.
- Bassett, M. H., T. Suzuki, H. Sasano, P. C. White, and W. E. Rainey. 2004. 'The orphan nuclear receptors NURR1 and NGFIB regulate adrenal aldosterone production', *Mol Endocrinol*, 18: 279-90.

- Basu, S., N. F. Totty, M. S. Irwin, M. Sudol, and J. Downward. 2003. 'Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis', *Mol Cell*, 11: 11-23.
- Baumgartner, R., I. Poernbacher, N. Buser, E. Hafen, and H. Stocker. 2010. 'The WW domain protein Kibra acts upstream of Hippo in Drosophila', *Dev Cell*, 18: 309-16.
- Beattie, M. C., L. Adekola, V. Papadopoulos, H. Chen, and B. R. Zirkin. 2015. 'Leydig cell aging and hypogonadism', *Exp Gerontol*, 68: 87-91.
- Behringer, R. R. 1994. 'The in vivo roles of mullerian-inhibiting substance', *Curr Top Dev Biol*, 29: 171-87.
- Bernascone, I., and F. Martin-Belmonte. 2013. 'Crossroads of Wnt and Hippo in epithelial tissues', *Trends Cell Biol*, 23: 380-9.
- Bertherat, J., A. Horvath, L. Groussin, S. Grabar, S. Boikos, L. Cazabat, R. Libe, F. Rene-Corail, S. Stergiopoulos, I. Bourdeau, T. Bei, E. Clauser, A. Calender, L. S. Kirschner, X. Bertagna, J. A. Carney, and C. A. Stratakis. 2009. 'Mutations in regulatory subunit type 1A of cyclic adenosine 5'-monophosphate-dependent protein kinase (PRKAR1A): phenotype analysis in 353 patients and 80 different genotypes', *J Clin Endocrinol Metab*, 94: 2085-91.
- Berthon, A., C. Drelon, B. Ragazzon, S. Boulkroun, F. Tissier, L. Amar, B. Samson-Couterie, M. C. Zennaro, P. F. Plouin, S. Skah, M. Plateroti, H. Lefebvre, I. Sahut-Barnola, M. Batische-Lignier, G. Assie, A. M. Lefrancois-Martinez, J. Bertherat, A. Martinez, and P. Val. 2014. 'WNT/beta-catenin signalling is activated in aldosterone-producing adenomas and controls aldosterone production', *Hum Mol Genet*, 23: 889-905.
- Berthon, A., I. Sahut-Barnola, S. Lambert-Langlais, C. de Jossineau, C. Damon-Soubeyrand, E. Louiset, M. M. Taketo, F. Tissier, J. Bertherat, A. M. Lefrancois-Martinez, A. Martinez, and P. Val. 2010. 'Constitutive beta-catenin activation induces adrenal hyperplasia and promotes adrenal cancer development', *Hum Mol Genet*, 19: 1561-76.
- Bielinska, M., A. Sehra, J. Toppari, M. Heikinheimo, and D. B. Wilson. 2007. 'GATA-4 is required for sex steroidogenic cell development in the fetal mouse', *Dev Dyn*, 236: 203-13.
- Bielohuby, M., N. Herbach, R. Wanke, C. Maser-Gluth, F. Beuschlein, E. Wolf, and A. Hoeflich. 2007. '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*, 293: E139-46.
- Bingham, N. C., S. Verma-Kurvari, L. F. Parada, and K. L. Parker. 2006. 'Development of a steroidogenic factor 1/Cre transgenic mouse line', *Genesis*, 44: 419-24.
- Bland, M. L., M. Desclozeaux, and H. A. Ingraham. 2003. 'Tissue growth and remodeling of the embryonic and adult adrenal gland', *Ann N Y Acad Sci*, 995: 59-72.
- Bland, M. L., R. C. Fowkes, and H. A. Ingraham. 2004. 'Differential requirement for steroidogenic factor-1 gene dosage in adrenal development versus endocrine function', *Mol Endocrinol*, 18: 941-52.
- Blok, L. J., A. P. Themmen, A. H. Peters, J. Trapman, W. M. Baarends, J. W. Hoogerbrugge, and J. A. Grootegoed. 1992. 'Transcriptional regulation of androgen receptor gene expression in Sertoli cells and other cell types', *Mol Cell Endocrinol*, 88: 153-64.
- Bollag, W. B. 2014. 'Regulation of aldosterone synthesis and secretion', *Compr Physiol*, 4: 1017-55.
- Bonavera, J. J., R. S. Swerdloff, A. Leung, Y. H. Lue, S. Baravarian, L. Superlano, A. P. Sinha-Hikim, and C. Wang. 1997. 'In the male brown-Norway (BN) male rat, reproductive aging is associated with decreased LH-pulse amplitude and area', *J Androl*, 18: 359-65.
- Bose, H. S., T. Sugawara, J. F. Strauss, 3rd, and W. L. Miller. 1996. 'The pathophysiology and genetics of congenital lipid adrenal hyperplasia', *N Engl J Med*, 335: 1870-8.
- Boyer, A., L. Hermo, M. Paquet, B. Robaire, and D. Boerboom. 2008. 'Seminiferous tubule degeneration and infertility in mice with sustained activation of WNT/CTNNB1 signaling in sertoli cells', *Biol Reprod*, 79: 475-85.
- Boyer, A., M. Paquet, M. N. Lague, L. Hermo, and D. Boerboom. 2009. 'Dysregulation of WNT/CTNNB1 and PI3K/AKT signaling in testicular stromal cells causes granulosa cell tumor of the testis', *Carcinogenesis*, 30: 869-78.
- Bradford, S. T., D. Wilhelm, R. Bandiera, V. Vidal, A. Schedl, and P. Koopman. 2009. 'A cell-autonomous role for WT1 in regulating Sry in vivo', *Hum Mol Genet*, 18: 3429-38.
- Brennan, J., C. Tilmann, and B. Capel. 2003. 'Pdgfr-alpha mediates testis cord organization and fetal Leydig cell development in the XY gonad', *Genes Dev*, 17: 800-10.

- Bridges, P. J., Y. Koo, D. W. Kang, S. Hudgins-Spivey, Z. J. Lan, X. Xu, F. DeMayo, A. Cooney, and C. Ko. 2008. 'Generation of Cyp17iCre transgenic mice and their application to conditionally delete estrogen receptor alpha (Esr1) from the ovary and testis', *Genesis*, 46: 499-505.
- Brion, L., P. M. Maloberti, N. V. Gomez, C. Poderoso, A. B. Gorostizaga, M. M. Mori Sequeiros Garcia, A. B. Acquier, M. Cooke, C. F. Mendez, E. J. Podesta, and C. Paz. 2011. 'MAPK phosphatase-1 (MKP-1) expression is up-regulated by hCG/cAMP and modulates steroidogenesis in MA-10 Leydig cells', *Endocrinology*, 152: 2665-77.
- Britschgi, A., S. Duss, S. Kim, J. P. Couto, H. Brinkhaus, S. Koren, D. De Silva, K. D. Mertz, D. Kaup, Z. Varga, H. Voshol, A. Vissieres, C. Leroy, T. Roloff, M. B. Stadler, C. H. Scheel, L. J. Miraglia, A. P. Orth, G. M. Bonamy, V. A. Reddy, and M. Bentires-Alj. 2017. 'The Hippo kinases LATS1 and 2 control human breast cell fate via crosstalk with ERalpha', *Nature*, 541: 541-45.
- Brown-Sequard, E. 1856. 'Recherches experimentales sur la physiologie et la pathologie des capsules surrénales', *Archives Generales de Medecine*, 8: 572-98.
- Brown, M. S., and J. L. Goldstein. 1986. 'A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis', *Science*, 232: 34-47.
- Buzzard, J. J., N. G. Wreford, and J. R. Morrison. 2003. 'Thyroid hormone, retinoic acid, and testosterone suppress proliferation and induce markers of differentiation in cultured rat sertoli cells', *Endocrinology*, 144: 3722-31.
- Cadigan, K. M., and M. L. Waterman. 2012. 'TCF/LEFs and Wnt signaling in the nucleus', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4.
- Callus, B. A., A. M. Verhagen, and D. L. Vaux. 2006. 'Association of mammalian sterile twenty kinases, Mst1 and Mst2, with hSalvador via C-terminal coiled-coil domains, leads to its stabilization and phosphorylation', *FEBS J*, 273: 4264-76.
- Cammas, F. M., G. D. Pullinger, S. Barker, and A. J. Clark. 1997. 'The mouse adrenocorticotropin receptor gene: cloning and characterization of its promoter and evidence for a role for the orphan nuclear receptor steroidogenic factor 1', *Mol Endocrinol*, 11: 867-76.
- Cao, J. J., X. M. Zhao, D. L. Wang, K. H. Chen, X. Sheng, W. B. Li, M. C. Li, W. J. Liu, and J. He. 2014. 'YAP is overexpressed in clear cell renal cell carcinoma and its

- knockdown reduces cell proliferation and induces cell cycle arrest and apoptosis', *Oncol Rep*, 32: 1594-600.
- Caron, K. M., S. C. Soo, W. C. Wetsel, D. M. Stocco, B. J. Clark, and K. L. Parker. 1997. 'Targeted disruption of the mouse gene encoding steroidogenic acute regulatory protein provides insights into congenital lipoid adrenal hyperplasia', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 11540-5.
- Cavallo, R. A., R. T. Cox, M. M. Moline, J. Roose, G. A. Polevoy, H. Clevers, M. Peifer, and A. Bejsovec. 1998. 'Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity', *Nature*, 395: 604-8.
- Chaboissier, M. C., A. Kobayashi, V. I. Vidal, S. Lutzkendorf, H. J. van de Kant, M. Wegner, D. G. de Rooij, R. R. Behringer, and A. Schedl. 2004. 'Functional analysis of Sox8 and Sox9 during sex determination in the mouse', *Development*, 131: 1891-901.
- Chan, E. H., M. Nousiainen, R. B. Chalamalasetty, A. Schafer, E. A. Nigg, and H. H. Sillje. 2005. 'The Ste20-like kinase Mst2 activates the human large tumor suppressor kinase Lats1', *Oncogene*, 24: 2076-86.
- Chan, L. H., W. Wang, W. Yeung, Y. Deng, P. Yuan, and K. K. Mak. 2014. 'Hedgehog signaling induces osteosarcoma development through Yap1 and H19 overexpression', *Oncogene*, 33: 4857-66.
- Chan, S. W., C. J. Lim, Y. F. Chong, A. V. Pobbati, C. Huang, and W. Hong. 2011. 'Hippo pathway-independent restriction of TAZ and YAP by angiomin', *J Biol Chem*, 286: 7018-26.
- Chan, S. W., C. J. Lim, L. S. Loo, Y. F. Chong, C. Huang, and W. Hong. 2009. 'TEADs mediate nuclear retention of TAZ to promote oncogenic transformation', *J Biol Chem*, 284: 14347-58.
- Chang, C., Y. T. Chen, S. D. Yeh, Q. Xu, R. S. Wang, F. Guillou, H. Lardy, and S. Yeh. 2004. 'Infertility with defective spermatogenesis and hypotestosteronemia in male mice lacking the androgen receptor in Sertoli cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 6876-81.
- Chang, C. W., G. D. Chang, and H. Chen. 2011. 'A novel cyclic AMP/Epac1/CaMKI signaling cascade promotes GCM1 desumoylation and placental cell fusion', *Mol Cell Biol*, 31: 3820-31.

- Chang, S. P., H. D. Morrison, F. Nilsson, C. J. Kenyon, J. D. West, and S. D. Morley. 2013. 'Cell proliferation, movement and differentiation during maintenance of the adult mouse adrenal cortex', *PLoS One*, 8: e81865.
- Chapin, R. E., R. N. Wine, M. W. Harris, C. H. Borchers, and J. K. Haseman. 2001. 'Structure and control of a cell-cell adhesion complex associated with spermiation in rat seminiferous epithelium', *J Androl*, 22: 1030-52.
- Chen, H., R. S. Ge, and B. R. Zirkin. 2009. 'Leydig cells: From stem cells to aging', *Mol Cell Endocrinol*, 306: 9-16.
- Chen, H., I. Huhtaniemi, and B. R. Zirkin. 1996. 'Depletion and repopulation of Leydig cells in the testes of aging brown Norway rats', *Endocrinology*, 137: 3447-52.
- Chen, H., Y. Wang, R. Ge, and B. R. Zirkin. 2017. 'Leydig cell stem cells: Identification, proliferation and differentiation', *Mol Cell Endocrinol*, 445: 65-73.
- Chida, D., S. Nakagawa, S. Nagai, H. Sagara, H. Katsumata, T. Imaki, H. Suzuki, F. Mitani, T. Ogishima, C. Shimizu, H. Kotaki, S. Kakuta, K. Sudo, T. Koike, M. Kubo, and Y. Iwakura. 2007. 'Melanocortin 2 receptor is required for adrenal gland development, steroidogenesis, and neonatal gluconeogenesis', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 18205-10.
- Ching, S., and E. Vilain. 2009. 'Targeted disruption of Sonic Hedgehog in the mouse adrenal leads to adrenocortical hypoplasia', *Genesis*, 47: 628-37.
- Chow, A., Y. Hao, and X. Yang. 2010. 'Molecular characterization of human homologs of yeast MOB1', *Int J Cancer*, 126: 2079-89.
- Clark, A. J., and A. Weber. 1998. 'Adrenocorticotropin insensitivity syndromes', *Endocr Rev*, 19: 828-43.
- Clark, B. J., V. Pezzi, D. M. Stocco, and W. E. Rainey. 1995. 'The steroidogenic acute regulatory protein is induced by angiotensin II and K⁺ in H295R adrenocortical cells', *Mol Cell Endocrinol*, 115: 215-19.
- Clem, B. F., E. A. Hudson, and B. J. Clark. 2005. 'Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP) enhances cAMP-responsive element binding (CREB) protein phosphorylation and phospho-CREB interaction with the mouse steroidogenic acute regulatory protein gene promoter', *Endocrinology*, 146: 1348-56.
- Clevers, H. 2006. 'Wnt/beta-catenin signaling in development and disease', *Cell*, 127: 469-80.

- Combes, A. N., D. Wilhelm, T. Davidson, E. Dejana, V. Harley, A. Sinclair, and P. Koopman. 2009. 'Endothelial cell migration directs testis cord formation', *Dev Biol*, 326: 112-20.
- Cordenonsi, M., F. Zanconato, L. Azzolin, M. Forcato, A. Rosato, C. Frasson, M. Inui, M. Montagner, A. R. Parenti, A. Poletti, M. G. Daidone, S. Dupont, G. Basso, S. Bicciato, and S. Piccolo. 2011. 'The Hippo transducer TAZ confers cancer stem cell-related traits on breast cancer cells', *Cell*, 147: 759-72.
- Costa, R. R., W. A. Varanda, and C. R. Franci. 2010. 'A calcium-induced calcium release mechanism supports luteinizing hormone-induced testosterone secretion in mouse Leydig cells', *Am J Physiol Cell Physiol*, 299: C316-23.
- Cotton, J. L., Q. Li, L. Ma, J. S. Park, J. Wang, J. Ou, L. J. Zhu, Y. T. Ip, R. L. Johnson, and J. Mao. 2017. 'YAP/TAZ and Hedgehog Coordinate Growth and Patterning in Gastrointestinal Mesenchyme', *Dev Cell*, 43: 35-47.e4.
- Crawford, P. A., C. Dorn, Y. Sadovsky, and J. Milbrandt. 1998. 'Nuclear receptor DAX-1 recruits nuclear receptor corepressor N-CoR to steroidogenic factor 1', *Mol Cell Biol*, 18: 2949-56.
- Cui, S., A. Ross, N. Stallings, K. L. Parker, B. Capel, and S. E. Quaggin. 2004. 'Disrupted gonadogenesis and male-to-female sex reversal in Pod1 knockout mice', *Development*, 131: 4095-105.
- Culty, M., L. Luo, Z. X. Yao, H. Chen, V. Papadopoulos, and B. R. Zirkin. 2002. 'Cholesterol transport, peripheral benzodiazepine receptor, and steroidogenesis in aging Leydig cells', *J Androl*, 23: 439-47.
- Davidoff, M. S., R. Middendorff, D. Muller, and A. F. Holstein. 2009. 'The neuroendocrine Leydig cells and their stem cell progenitors, the pericytes', *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 205: 1-107.
- Davies, S. P., H. Reddy, M. Caivano, and P. Cohen. 2000. 'Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors', *Biochem J*, 351: 95-105.
- De Gendt, K., J. V. Swinnen, P. T. Saunders, L. Schoonjans, M. Dewerchin, A. Devos, K. Tan, N. Atanassova, F. Claessens, C. Lecureuil, W. Heyns, P. Carmeliet, F. Guillou, R. M. Sharpe, and G. Verhoeven. 2004. 'A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 1327-32.

- de Kloet, E. R. 1995. 'Steroids, stability and stress', *Front Neuroendocrinol*, 16: 416-25.
- Deane, H. W., J. H. Shaw, and R. O. Greep. 1948. 'The effect of altered sodium or potassium intake on the width and cytochemistry of the zona glomerulosa of the rat's adrenal cortex', *Endocrinology*, 43: 133-53.
- Defalco, T., A. Saraswathula, A. Briot, M. L. Iruela-Arispe, and B. Capel. 2013. 'Testosterone levels influence mouse fetal Leydig cell progenitors through notch signaling', *Biol Reprod*, 88: 91.
- DeFalco, T., S. Takahashi, and B. Capel. 2011. 'Two distinct origins for Leydig cell progenitors in the fetal testis', *Dev Biol*, 352: 14-26.
- Deng, Y., Y. Matsui, W. Pan, Q. Li, and Z. C. Lai. 2016. 'Yap1 plays a protective role in suppressing free fatty acid-induced apoptosis and promoting beta-cell survival', *Protein Cell*, 7: 362-72.
- Dhillon, H., J. M. Zigman, C. Ye, C. E. Lee, R. A. McGovern, V. Tang, C. D. Kenny, L. M. Christiansen, R. D. White, E. A. Edelstein, R. Coppari, N. Balthasar, M. A. Cowley, S. Chua, Jr., J. K. Elmquist, and B. B. Lowell. 2006. 'Leptin directly activates SF1 neurons in the VMH, and this action by leptin is required for normal body-weight homeostasis', *Neuron*, 49: 191-203.
- Doghman, M., M. Arhatte, H. Thibout, G. Rodrigues, J. De Moura, S. Grosso, A. N. West, M. Laurent, J. C. Mas, A. Bongain, G. P. Zambetti, B. C. Figueiredo, P. Auberger, C. Martinerie, and E. Lalli. 2007. 'Nephroblastoma overexpressed/cysteine-rich protein 61/connective tissue growth factor/nephroblastoma overexpressed gene-3 (NOV/CCN3), a selective adrenocortical cell proapoptotic factor, is down-regulated in childhood adrenocortical tumors', *J Clin Endocrinol Metab*, 92: 3253-60.
- Dombrowicz, D., E. L. Hooghe-Peters, A. Gothot, B. Sente, L. Vanhaelst, J. Closset, and G. Hennen. 1992. 'Cellular localization of IGF-I and IGF-II mRNAs in immature hypophysectomized rat testis and epididymis after in vivo hormonal treatment', *Arch Int Physiol Biochim Biophys*, 100: 303-8.
- Dong, J., G. Feldmann, J. Huang, S. Wu, N. Zhang, S. A. Comerford, M. F. Gayyed, R. A. Anders, A. Maitra, and D. Pan. 2007. 'Elucidation of a universal size-control mechanism in *Drosophila* and mammals', *Cell*, 130: 1120-33.

- Drelon, C., A. Berthon, M. Mathieu, A. Martinez, and P. Val. 2015. 'Adrenal cortex tissue homeostasis and zonation: A WNT perspective', *Mol Cell Endocrinol*, 408: 156-64.
- Drelon, C., A. Berthon, I. Sahut-Barnola, M. Mathieu, T. Dumontet, S. Rodriguez, M. Batisse-Lignier, H. Tabbal, I. Tauveron, A. M. Lefrancois-Martinez, J. C. Pointud, C. E. Gomez-Sanchez, S. Vainio, J. Shan, S. Sacco, A. Schedl, C. A. Stratakis, A. Martinez, and P. Val. 2016. 'PKA inhibits WNT signalling in adrenal cortex zonation and prevents malignant tumour development', *Nat Commun*, 7: 12751.
- Dumontet, T., I. Sahut-Barnola, A. Septier, N. Montanier, I. Plotton, F. Roucher-Boulez, V. Ducros, A. M. Lefrancois-Martinez, J. C. Pointud, M. Zubair, K. I. Morohashi, D. T. Breault, P. Val, and A. Martinez. 2018. 'PKA signaling drives reticularis differentiation and sexually dimorphic adrenal cortex renewal', *JCI Insight*, 3.
- Dupont, S., L. Morsut, M. Aragona, E. Enzo, S. Giulitti, M. Cordenonsi, F. Zanconato, J. Le Digabel, M. Forcato, S. Bicciato, N. Elvassore, and S. Piccolo. 2011. 'Role of YAP/TAZ in mechanotransduction', *Nature*, 474: 179-83.
- El Wakil, A., B. Mari, J. Barhanin, and E. Lalli. 2013. 'Genomic analysis of sexual dimorphism of gene expression in the mouse adrenal gland', *Horm Metab Res*, 45: 870-3.
- Endoh, A., S. B. Kristiansen, P. R. Casson, J. E. Buster, and P. J. Hornsby. 1996. 'The zona reticularis is the site of biosynthesis of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate in the adult human adrenal cortex resulting from its low expression of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase', *J Clin Endocrinol Metab*, 81: 3558-65.
- Espanel, X., and M. Sudol. 2001. 'Yes-associated protein and p53-binding protein-2 interact through their WW and SH3 domains', *J Biol Chem*, 276: 14514-23.
- Evaul, K., and S. R. Hammes. 2008. 'Cross-talk between G protein-coupled and epidermal growth factor receptors regulates gonadotropin-mediated steroidogenesis in Leydig cells', *J Biol Chem*, 283: 27525-33.
- Ewing, L. L., T. Y. Wing, R. C. Cochran, N. Kromann, and B. R. Zirkin. 1983. 'Effect of luteinizing hormone on Leydig cell structure and testosterone secretion', *Endocrinology*, 112: 1763-9.

- Fan, J., E. Campioli, A. Midzak, M. Culty, and V. Papadopoulos. 2015. 'Conditional steroidogenic cell-targeted deletion of TSPO unveils a crucial role in viability and hormone-dependent steroid formation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112: 7261-6.
- Fan, J., K. Wang, B. Zirkin, and V. Papadopoulos. 2018. 'CRISPR/Cas9 Mediated Tspo Gene Mutations Lead to Reduced Mitochondrial Membrane Potential and Steroid Formation in MA-10 Mouse Tumor Leydig Cells', *Endocrinology*, 159: 1130-46.
- Fassnacht, M., R. Libe, M. Kroiss, and B. Allolio. 2011. 'Adrenocortical carcinoma: a clinician's update', *Nat Rev Endocrinol*, 7: 323-35.
- Ferlin, A., A. Pepe, L. Giansello, A. Garolla, S. Feng, S. Giannini, M. Zaccolo, A. Faccioli, R. Morello, A. I. Agoulnik, and C. Foresta. 2008. 'Mutations in the insulin-like factor 3 receptor are associated with osteoporosis', *J Bone Miner Res*, 23: 683-93.
- Fernandez, L. A., P. A. Northcott, J. Dalton, C. Fraga, D. Ellison, S. Angers, M. D. Taylor, and A. M. Kenney. 2009. 'YAP1 is amplified and up-regulated in hedgehog-associated medulloblastomas and mediates Sonic hedgehog-driven neural precursor proliferation', *Genes Dev*, 23: 2729-41.
- Finco, I., C. R. LaPensee, K. T. Krill, and G. D. Hammer. 2015. 'Hedgehog signaling and steroidogenesis', *Annu Rev Physiol*, 77: 105-29.
- Finco, I., A. M. Lerario, and G. D. Hammer. 2018. 'Sonic Hedgehog and WNT Signaling Promote Adrenal Gland Regeneration in Male Mice', *Endocrinology*, 159: 579-96.
- Foster, J. W., M. A. Dominguez-Steglich, S. Guioli, C. Kwok, P. A. Weller, M. Stevanovic, J. Weissenbach, S. Mansour, I. D. Young, P. N. Goodfellow, and et al. 1994. 'Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene', *Nature*, 372: 525-30.
- Francavilla, F., R. Santucci, A. Barbonetti, and S. Francavilla. 2007. 'Naturally-occurring antisperm antibodies in men: interference with fertility and clinical implications. An update', *Front Biosci*, 12: 2890-911.
- Freedman, B. D., P. B. Kempna, D. L. Carlone, M. Shah, N. A. Guagliardo, P. Q. Barrett, C. E. Gomez-Sanchez, J. A. Majzoub, and D. T. Breault. 2013. 'Adrenocortical zonation results from lineage conversion of differentiated zona glomerulosa cells', *Dev Cell*, 26: 666-73.

- Fu, D., X. Lv, G. Hua, C. He, J. Dong, S. M. Lele, D. W. Li, Q. Zhai, J. S. Davis, and C. Wang. 2014. 'YAP regulates cell proliferation, migration, and steroidogenesis in adult granulosa cell tumors', *Endocr Relat Cancer*, 21: 297-310.
- Fujimoto, Y., S. S. Tanaka, Y. L. Yamaguchi, H. Kobayashi, S. Kuroki, M. Tachibana, M. Shinomura, Y. Kanai, K. Morohashi, K. Kawakami, and R. Nishinakamura. 2013. 'Homeoproteins Six1 and Six4 regulate male sex determination and mouse gonadal development', *Dev Cell*, 26: 416-30.
- Gallo-Payet, N., and M. C. Battista. 2014. 'Steroidogenesis-adrenal cell signal transduction', *Compr Physiol*, 4: 889-964.
- Gambaryan, S., E. Butt, P. Tas, A. Smolenski, B. Allolio, and U. Walter. 2006. 'Regulation of aldosterone production from zona glomerulosa cells by ANG II and cAMP: evidence for PKA-independent activation of CaMK by cAMP', *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 290: E423-33.
- Garcia-Morales, V., M. Luaces-Regueira, and M. Campos-Toimil. 2017. 'The cAMP effectors PKA and Epac activate endothelial NO synthase through PI3K/Akt pathway in human endothelial cells', *Biochem Pharmacol*, 145: 94-101.
- Gardiner, Jennifer R., and Amanda Swain. 2015. 'Sex Determination and Differentiation': 267-92.
- Gaytan, F., S. Sangiao-Alvarellos, M. Manfredi-Lozano, D. Garcia-Galiano, F. Ruiz-Pino, A. Romero-Ruiz, S. Leon, C. Morales, F. Cordido, L. Pinilla, and M. Tena-Sempere. 2013. 'Distinct expression patterns predict differential roles of the miRNA-binding proteins, Lin28 and Lin28b, in the mouse testis: studies during postnatal development and in a model of hypogonadotropic hypogonadism', *Endocrinology*, 154: 1321-36.
- Ge, R. S., Q. Dong, C. M. Sottas, H. Chen, B. R. Zirkin, and M. P. Hardy. 2005. 'Gene expression in rat leydig cells during development from the progenitor to adult stage: a cluster analysis', *Biol Reprod*, 72: 1405-15.
- Ge, R. S., Q. Dong, C. M. Sottas, V. Papadopoulos, B. R. Zirkin, and M. P. Hardy. 2006. 'In search of rat stem Leydig cells: identification, isolation, and lineage-specific development', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 2719-24.

- Ge, R. S., and M. P. Hardy. 1997. 'Decreased cyclin A2 and increased cyclin G1 levels coincide with loss of proliferative capacity in rat Leydig cells during pubertal development', *Endocrinology*, 138: 3719-26.
- . 1998. 'Variation in the end products of androgen biosynthesis and metabolism during postnatal differentiation of rat Leydig cells', *Endocrinology*, 139: 3787-95.
- Genevet, A., M. C. Wehr, R. Brain, B. J. Thompson, and N. Tapon. 2010. 'Kibra is a regulator of the Salvador/Warts/Hippo signaling network', *Dev Cell*, 18: 300-8.
- Georg, I., F. Barrionuevo, T. Wiech, and G. Scherer. 2012. 'Sox9 and Sox8 are required for basal lamina integrity of testis cords and for suppression of FOXL2 during embryonic testis development in mice', *Biol Reprod*, 87: 99.
- Georges, A., D. L'Hote, A. L. Todeschini, A. Auguste, B. Legois, A. Zider, and R. A. Veitia. 2014. 'The transcription factor FOXL2 mobilizes estrogen signaling to maintain the identity of ovarian granulosa cells', *Elife*, 3.
- Giuli, G., W. H. Shen, and H. A. Ingraham. 1997. 'The nuclear receptor SF-1 mediates sexually dimorphic expression of Mullerian Inhibiting Substance, in vivo', *Development*, 124: 1799-807.
- Goulev, Y., J. D. Fauny, B. Gonzalez-Marti, D. Flagiello, J. Silber, and A. Zider. 2008. 'SCALLOPED interacts with YORKIE, the nuclear effector of the hippo tumor-suppressor pathway in Drosophila', *Curr Biol*, 18: 435-41.
- Greep, R. O., and H. W. Deane. 1949. 'Histological, cytochemical and physiological observations on the regeneration of the rat's adrenal gland following enucleation', *Endocrinology*, 45: 42-56.
- Gregory, S. J., and U. B. Kaiser. 2004. 'Regulation of gonadotropins by inhibin and activin', *Semin Reprod Med*, 22: 253-67.
- Grunfeld, C., J. Hagman, E. A. Sabin, D. I. Buckley, D. S. Jones, and J. Ramachandran. 1985. 'Characterization of adrenocorticotropin receptors that appear when 3T3-L1 cells differentiate into adipocytes', *Endocrinology*, 116: 113-7.
- Grzywacz, F. W., H. Chen, J. Allegretti, and B. R. Zirkin. 1998. 'Does age-associated reduced Leydig cell testosterone production in Brown Norway rats result from under-stimulation by luteinizing hormone?', *J Androl*, 19: 625-30.

- Gummow, B. M., J. O. Scheys, V. R. Cancelli, and G. D. Hammer. 2006. 'Reciprocal regulation of a glucocorticoid receptor-steroidogenic factor-1 transcription complex on the Dax-1 promoter by glucocorticoids and adrenocorticotrophic hormone in the adrenal cortex', *Mol Endocrinol*, 20: 2711-23.
- Guo, I. C., H. M. Tsai, and B. C. Chung. 1994. 'Actions of two different cAMP-responsive sequences and an enhancer of the human CYP11A1 (P450scc) gene in adrenal Y1 and placental JEG-3 cells', *J Biol Chem*, 269: 6362-9.
- Gwynne, J. T., and B. Hess. 1980. 'The role of high density lipoproteins in rat adrenal cholesterol metabolism and steroidogenesis', *J Biol Chem*, 255: 10875-83.
- Gwynne, J. T., B. Hess, T. Hughes, R. Rountree, and D. Mahaffee. 1984. 'The role of serum high density lipoproteins in adrenal steroidogenesis', *Endocr Res*, 10: 411-30.
- Gwynne, J. T., and J. F. Strauss, 3rd. 1982. 'The role of lipoproteins in steroidogenesis and cholesterol metabolism in steroidogenic glands', *Endocr Rev*, 3: 299-329.
- Hagiwara, M., A. Alberts, P. Brindle, J. Meinkoth, J. Feramisco, T. Deng, M. Karin, S. Shenolikar, and M. Montminy. 1992. 'Transcriptional attenuation following cAMP induction requires PP-1-mediated dephosphorylation of CREB', *Cell*, 70: 105-13.
- Haider, S. G., D. Passia, and G. Overmeyer. 1986. 'Studies on the fetal and postnatal development of rat Leydig cells employing 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity', *Acta Histochem Suppl*, 32: 197-202.
- Hakkarainen, J., F. P. Zhang, H. Jokela, A. Mayerhofer, R. Behr, S. Cisneros-Montalvo, M. Nurmio, J. Toppari, C. Ohlsson, N. Kotaja, P. Sipila, and M. Poutanen. 2018. 'Hydroxysteroid (17beta) dehydrogenase 1 expressed by Sertoli cells contributes to steroid synthesis and is required for male fertility', *FASEB J*: fj201700921R.
- Hamaratoglu, F., M. Willecke, M. Kango-Singh, R. Nolo, E. Hyun, C. Tao, H. Jafar-Nejad, and G. Halder. 2006. 'The tumour-suppressor genes NF2/Merlin and Expanded act through Hippo signalling to regulate cell proliferation and apoptosis', *Nat Cell Biol*, 8: 27-36.
- Hammar, M., and F. Petersson. 1986. 'Testosterone production in vitro in human testicular tissue', *Andrologia*, 18: 196-200.
- Hanahan, D., and R. A. Weinberg. 2011. 'Hallmarks of cancer: the next generation', *Cell*, 144: 646-74.

- Hansen, C. G., T. Moroishi, and K. L. Guan. 2015. 'YAP and TAZ: a nexus for Hippo signaling and beyond', *Trends Cell Biol*, 25: 499-513.
- Hansson, V., B. S. Skalhegg, and K. Tasken. 2000. 'Cyclic-AMP-dependent protein kinase (PKA) in testicular cells. Cell specific expression, differential regulation and targeting of subunits of PKA', *J Steroid Biochem Mol Biol*, 73: 81-92.
- Hao, Y., A. Chun, K. Cheung, B. Rashidi, and X. Yang. 2008. 'Tumor suppressor LATS1 is a negative regulator of oncogene YAP', *J Biol Chem*, 283: 5496-509.
- Hardie, D. G., F. A. Ross, and S. A. Hawley. 2012. 'AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13: 251-62.
- Hardy, M. P., W. R. Kelce, G. R. Klinefelter, and L. L. Ewing. 1990. 'Differentiation of Leydig cell precursors in vitro: a role for androgen', *Endocrinology*, 127: 488-90.
- Hardy, M. P., B. R. Zirkin, and L. L. Ewing. 1989. 'Kinetic studies on the development of the adult population of Leydig cells in testes of the pubertal rat', *Endocrinology*, 124: 762-70.
- Harvey, K. F., C. M. Pflieger, and I. K. Hariharan. 2003. 'The Drosophila Mst ortholog, hippo, restricts growth and cell proliferation and promotes apoptosis', *Cell*, 114: 457-67.
- Hasegawa, T., L. Zhao, K. M. Caron, G. Majdic, T. Suzuki, S. Shizawa, H. Sasano, and K. L. Parker. 2000. 'Developmental roles of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) as revealed by StAR knockout mice', *Mol Endocrinol*, 14: 1462-71.
- Hastie, N. D. 2001. 'Life, sex, and WT1 isoforms--three amino acids can make all the difference', *Cell*, 106: 391-4.
- Hatano, O., A. Takakusu, M. Nomura, and K. Morohashi. 1996. 'Identical origin of adrenal cortex and gonad revealed by expression profiles of Ad4BP/SF-1', *Genes Cells*, 1: 663-71.
- Hattangady, N. G., L. O. Olala, W. B. Bollag, and W. E. Rainey. 2012. 'Acute and chronic regulation of aldosterone production', *Mol Cell Endocrinol*, 350: 151-62.
- Hauet, T., J. Liu, H. Li, M. Gazouli, M. Culty, and V. Papadopoulos. 2002. 'PBR, StAR, and PKA: partners in cholesterol transport in steroidogenic cells', *Endocr Res*, 28: 395-401.
- Heallen, T., M. Zhang, J. Wang, M. Bonilla-Claudio, E. Klysik, R. L. Johnson, and J. F. Martin. 2011. 'Hippo pathway inhibits Wnt signaling to restrain cardiomyocyte proliferation and heart size', *Science*, 332: 458-61.

- Heikkila, M., H. Peltoketo, J. Leppaluoto, M. Ilves, O. Vuolteenaho, and S. Vainio. 2002. 'Wnt-4 deficiency alters mouse adrenal cortex function, reducing aldosterone production', *Endocrinology*, 143: 4358-65.
- Hershkovitz, L., F. Beuschlein, S. Klammer, M. Krup, and Y. Weinstein. 2007. 'Adrenal 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in the mouse catabolizes progesterone and 11-deoxycorticosterone and is restricted to the X-zone', *Endocrinology*, 148: 976-88.
- Hess, R. A., and P. S. Cooke. 2018. 'Estrogen in the male: a historical perspective', *Biol Reprod*, 99: 27-44.
- Hirokawa, N., and H. Ishikawa. 1975. 'Electron microscopic observations on the castration-induced X zone in the adrenal cortex of male mice', *Cell Tissue Res*, 162: 119-30.
- Holsberger, D. R., S. Jirawatnotai, H. Kiyokawa, and P. S. Cooke. 2003. 'Thyroid hormone regulates the cell cycle inhibitor p27Kip1 in postnatal murine Sertoli cells', *Endocrinology*, 144: 3732-8.
- Hong, J. H., and M. B. Yaffe. 2006. 'TAZ: a beta-catenin-like molecule that regulates mesenchymal stem cell differentiation', *Cell Cycle*, 5: 176-9.
- Hossain, Z., S. M. Ali, H. L. Ko, J. Xu, C. P. Ng, K. Guo, Z. Qi, S. Ponniah, W. Hong, and W. Hunziker. 2007. 'Glomerulocystic kidney disease in mice with a targeted inactivation of Wwtr1', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 1631-6.
- Hou, J. W., D. C. Collins, and R. L. Schleicher. 1990. 'Sources of cholesterol for testosterone biosynthesis in murine Leydig cells', *Endocrinology*, 127: 2047-55.
- Houston, C. S., J. M. Opitz, J. W. Spranger, R. I. Macpherson, M. H. Reed, E. F. Gilbert, J. Herrmann, and A. Schinzel. 1983. 'The campomelic syndrome: review, report of 17 cases, and follow-up on the currently 17-year-old boy first reported by Maroteaux et al in 1971', *Am J Med Genet*, 15: 3-28.
- Howell, M., C. Borchers, and S. L. Milgram. 2004. 'Heterogeneous nuclear ribonuclear protein U associates with YAP and regulates its co-activation of Bax transcription', *J Biol Chem*, 279: 26300-6.
- Hu, G. X., H. Lin, G. R. Chen, B. B. Chen, Q. Q. Lian, D. O. Hardy, B. R. Zirkin, and R. S. Ge. 2010. 'Deletion of the Igfl gene: suppressive effects on adult Leydig cell development', *J Androl*, 31: 379-87.

- Hu, Y. C., L. M. Okumura, and D. C. Page. 2013. 'Gata4 is required for formation of the genital ridge in mice', *PLoS Genet*, 9: e1003629.
- Huang, C. C., S. Miyagawa, D. Matsumaru, K. L. Parker, and H. H. Yao. 2010. 'Progenitor cell expansion and organ size of mouse adrenal is regulated by sonic hedgehog', *Endocrinology*, 151: 1119-28.
- Huang, J., S. Wu, J. Barrera, K. Matthews, and D. Pan. 2005. 'The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the Drosophila Homolog of YAP', *Cell*, 122: 421-34.
- Huang, W., X. Lv, C. Liu, Z. Zha, H. Zhang, Y. Jiang, Y. Xiong, Q. Y. Lei, and K. L. Guan. 2012. 'The N-terminal phosphodegron targets TAZ/WWTR1 protein for SCFbeta-TrCP-dependent degradation in response to phosphatidylinositol 3-kinase inhibition', *J Biol Chem*, 287: 26245-53.
- Huang, Z., E. M. Kaftanovskaya, B. Rivas, and A. I. Agoulnik. 2013. 'Mechanisms of INSL3 signaling in male reproductive organs', *Ital J Anat Embryol*, 118: 32-3.
- Ikeda, Y., A. Swain, T. J. Weber, K. E. Hentges, E. Zanaria, E. Lalli, K. T. Tamai, P. Sassone-Corsi, R. Lovell-Badge, G. Camerino, and K. L. Parker. 1996. 'Steroidogenic factor 1 and Dax-1 colocalize in multiple cell lineages: potential links in endocrine development', *Mol Endocrinol*, 10: 1261-72.
- Ikon, N., B. Su, F. F. Hsu, T. M. Forte, and R. O. Ryan. 2015. 'Exogenous cardiolipin localizes to mitochondria and prevents TAZ knockdown-induced apoptosis in myeloid progenitor cells', *Biochem Biophys Res Commun*, 464: 580-5.
- Imajo, M., K. Miyatake, A. Iimura, A. Miyamoto, and E. Nishida. 2012. 'A molecular mechanism that links Hippo signalling to the inhibition of Wnt/beta-catenin signalling', *EMBO J*, 31: 1109-22.
- Jameson, S. A., Y. T. Lin, and B. Capel. 2012. 'Testis development requires the repression of Wnt4 by Fgf signaling', *Dev Biol*, 370: 24-32.
- Jang, E. J., H. Jeong, K. H. Han, H. M. Kwon, J. H. Hong, and E. S. Hwang. 2012. 'TAZ suppresses NFAT5 activity through tyrosine phosphorylation', *Mol Cell Biol*, 32: 4925-32.

- Jang, S. W., S. J. Yang, S. Srinivasan, and K. Ye. 2007. 'Akt phosphorylates Mst1 and prevents its proteolytic activation, blocking FOXO3 phosphorylation and nuclear translocation', *J Biol Chem*, 282: 30836-44.
- Ji, S. Y., X. M. Liu, B. T. Li, Y. L. Zhang, H. B. Liu, Y. C. Zhang, Z. J. Chen, J. Liu, and H. Y. Fan. 2017. 'The polycystic ovary syndrome-associated gene Yap1 is regulated by gonadotropins and sex steroid hormones in hyperandrogenism-induced oligo-ovulation in mouse', *Mol Hum Reprod*, 23: 698-707.
- Jiang, L. L., J. K. Xie, J. Q. Cui, D. Wei, B. L. Yin, Y. N. Zhang, Y. H. Chen, X. Han, Q. Wang, and C. L. Zhang. 2017. 'Promoter methylation of yes-associated protein (YAP1) gene in polycystic ovary syndrome', *Medicine (Baltimore)*, 96: e5768.
- Jiao, S., H. Wang, Z. Shi, A. Dong, W. Zhang, X. Song, F. He, Y. Wang, Z. Zhang, W. Wang, X. Wang, T. Guo, P. Li, Y. Zhao, H. Ji, L. Zhang, and Z. Zhou. 2014. 'A peptide mimicking VGLL4 function acts as a YAP antagonist therapy against gastric cancer', *Cancer Cell*, 25: 166-80.
- Johnston, H., P. J. Baker, M. Abel, H. M. Charlton, G. Jackson, L. Fleming, T. R. Kumar, and P. J. O'Shaughnessy. 2004. 'Regulation of Sertoli cell number and activity by follicle-stimulating hormone and androgen during postnatal development in the mouse', *Endocrinology*, 145: 318-29.
- Justice, R. W., O. Zilian, D. F. Woods, M. Noll, and P. J. Bryant. 1995. 'The Drosophila tumor suppressor gene warts encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation', *Genes Dev*, 9: 534-46.
- Kaftanovskaya, E. M., C. Lopez, L. Ferguson, C. Myhr, and A. I. Agoulnik. 2015. 'Genetic ablation of androgen receptor signaling in fetal Leydig cell lineage affects Leydig cell functions in adult testis', *FASEB J*, 29: 2327-37.
- Kanai, F., P. A. Marignani, D. Sarbassova, R. Yagi, R. A. Hall, M. Donowitz, A. Hisaminato, T. Fujiwara, Y. Ito, L. C. Cantley, and M. B. Yaffe. 2000. 'TAZ: a novel transcriptional co-activator regulated by interactions with 14-3-3 and PDZ domain proteins', *EMBO J*, 19: 6778-91.
- Kango-Singh, M., R. Nolo, C. Tao, P. Verstreken, P. R. Hiesinger, H. J. Bellen, and G. Halder. 2002. 'Shar-pei mediates cell proliferation arrest during imaginal disc growth in Drosophila', *Development*, 129: 5719-30.

- Karl, J., and B. Capel. 1998. 'Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium', *Dev Biol*, 203: 323-33.
- Karpac, J., A. Kern, and U. Hochgeschwender. 2007. 'Pro-opiomelanocortin peptides and the adrenal gland', *Mol Cell Endocrinol*, 265-266: 29-33.
- Kato, M., S. Das, K. Petras, K. Kitamura, K. Morohashi, D. N. Abuelo, M. Barr, D. Bonneau, A. F. Brady, N. J. Carpenter, K. L. Ciperio, F. Frisone, T. Fukuda, R. Guerrini, E. Iida, M. Itoh, A. F. Lewanda, Y. Nanba, A. Oka, V. K. Proud, P. Saugier-Weber, S. L. Schelley, A. Selicorni, R. Shaner, M. Silengo, F. Stewart, N. Sugiyama, J. Toyama, A. Toutain, A. L. Vargas, M. Yanazawa, E. H. Zackai, and W. B. Dobyns. 2004. 'Mutations of ARX are associated with striking pleiotropy and consistent genotype-phenotype correlation', *Hum Mutat*, 23: 147-59.
- Keegan, C. E., and G. D. Hammer. 2002. 'Recent insights into organogenesis of the adrenal cortex', *Trends Endocrinol Metab*, 13: 200-8.
- Keeney, D. S., C. M. Jenkins, and M. R. Waterman. 1995. 'Developmentally regulated expression of adrenal 17 alpha-hydroxylase cytochrome P450 in the mouse embryo', *Endocrinology*, 136: 4872-9.
- Keeney, D. S., and J. I. Mason. 1992. 'Regulation of expression of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase is mediated by cAMP in rat Leydig cells and H540 rat Leydig tumor cells', *J Steroid Biochem Mol Biol*, 43: 915-22.
- Keeney, D. S., S. M. Mendis-Handagama, B. R. Zirkin, and L. L. Ewing. 1988. 'Effect of long term deprivation of luteinizing hormone on Leydig cell volume, Leydig cell number, and steroidogenic capacity of the rat testis', *Endocrinology*, 123: 2906-15.
- Kerr, J. B., and C. M. Knell. 1988. 'The fate of fetal Leydig cells during the development of the fetal and postnatal rat testis', *Development*, 103: 535-44.
- Kilcoyne, K. R., L. B. Smith, N. Atanassova, S. Macpherson, C. McKinnell, S. van den Driesche, M. S. Jobling, T. J. Chambers, K. De Gendt, G. Verhoeven, L. O'Hara, S. Platts, L. Renato de Franca, N. L. Lara, R. A. Anderson, and R. M. Sharpe. 2014. 'Fetal programming of adult Leydig cell function by androgenic effects on stem/progenitor cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111: E1924-32.
- Kim, A. C., and G. D. Hammer. 2007. 'Adrenocortical cells with stem/progenitor cell properties: recent advances', *Mol Cell Endocrinol*, 265-266: 10-6.

- Kim, A. C., A. L. Reuter, M. Zubair, T. Else, K. Serecky, N. C. Bingham, G. G. Lavery, K. L. Parker, and G. D. Hammer. 2008. 'Targeted disruption of beta-catenin in Sf1-expressing cells impairs development and maintenance of the adrenal cortex', *Development*, 135: 2593-602.
- Kim, D., S. Shu, M. D. Coppola, S. Kaneko, Z. Q. Yuan, and J. Q. Cheng. 2010. 'Regulation of proapoptotic mammalian ste20-like kinase MST2 by the IGF1-Akt pathway', *PLoS One*, 5: e9616.
- Kim, M. K., J. W. Jang, and S. C. Bae. 2018. 'DNA binding partners of YAP/TAZ', *BMB Rep.*
- Kim, M., M. Kim, S. Lee, S. Kuninaka, H. Saya, H. Lee, S. Lee, and D. S. Lim. 2013. 'cAMP/PKA signalling reinforces the LATS-YAP pathway to fully suppress YAP in response to actin cytoskeletal changes', *EMBO J*, 32: 1543-55.
- Kim, M., T. Kim, R. L. Johnson, and D. S. Lim. 2015. 'Transcriptional co-repressor function of the hippo pathway transducers YAP and TAZ', *Cell Rep*, 11: 270-82.
- Kim, N. G., E. Koh, X. Chen, and B. M. Gumbiner. 2011. 'E-cadherin mediates contact inhibition of proliferation through Hippo signaling-pathway components', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 11930-5.
- Kim, Y., N. Bingham, R. Sekido, K. L. Parker, R. Lovell-Badge, and B. Capel. 2007. 'Fibroblast growth factor receptor 2 regulates proliferation and Sertoli differentiation during male sex determination', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 16558-63.
- King, P., A. Paul, and E. Laufer. 2009. 'Shh signaling regulates adrenocortical development and identifies progenitors of steroidogenic lineages', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 21185-90.
- Kitamura, K., M. Yanazawa, N. Sugiyama, H. Miura, A. Iizuka-Kogo, M. Kusaka, K. Omichi, R. Suzuki, Y. Kato-Fukui, K. Kamiirisa, M. Matsuo, S. Kamijo, M. Kasahara, H. Yoshioka, T. Ogata, T. Fukuda, I. Kondo, M. Kato, W. B. Dobyns, M. Yokoyama, and K. Morohashi. 2002. 'Mutation of ARX causes abnormal development of forebrain and testes in mice and X-linked lissencephaly with abnormal genitalia in humans', *Nat Genet*, 32: 359-69.
- Koopman, P., J. Gubbay, N. Vivian, P. Goodfellow, and R. Lovell-Badge. 1991. 'Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry', *Nature*, 351: 117-21.

- Kreidberg, J. A., H. Sariola, J. M. Loring, M. Maeda, J. Pelletier, D. Housman, and R. Jaenisch. 1993. 'WT-1 is required for early kidney development', *Cell*, 74: 679-91.
- Kruger, R., N. Wernert, B. Kubatsch, O. Klein, and G. Aatz. 1982. 'Sex dimorphism of the adrenal cortex in rats after treatment with dexamethasone', *Pathol Res Pract*, 173: 191-201.
- Kuser-Abali, G., A. Alptekin, M. Lewis, I. P. Garraway, and B. Cinar. 2015. 'YAP1 and AR interactions contribute to the switch from androgen-dependent to castration-resistant growth in prostate cancer', *Nat Commun*, 6: 8126.
- Labrie, F., V. Luu-The, S. X. Lin, C. Labrie, J. Simard, R. Breton, and A. Belanger. 1997. 'The key role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in sex steroid biology', *Steroids*, 62: 148-58.
- Lachance, Y., V. Luu-The, C. Labrie, J. Simard, M. Dumont, Y. de Launoit, S. Guerin, G. Leblanc, and F. Labrie. 1990. 'Characterization of human 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase gene and its expression in mammalian cells', *J Biol Chem*, 265: 20469-75.
- Lai, M. S., Y. S. Cheng, P. R. Chen, S. J. Tsai, and B. M. Huang. 2014. 'Fibroblast growth factor 9 activates akt and MAPK pathways to stimulate steroidogenesis in mouse leydig cells', *PLoS One*, 9: e90243.
- Lai, Z. C., X. Wei, T. Shimizu, E. Ramos, M. Rohrbaugh, N. Nikolaidis, L. L. Ho, and Y. Li. 2005. 'Control of cell proliferation and apoptosis by mob as tumor suppressor, mats', *Cell*, 120: 675-85.
- Lallemand, D., M. Curto, I. Saotome, M. Giovannini, and A. I. McClatchey. 2003. 'NF2 deficiency promotes tumorigenesis and metastasis by destabilizing adherens junctions', *Genes Dev*, 17: 1090-100.
- Lasley, B. L., S. Crawford, and D. S. McConnell. 2011. 'Adrenal androgens and the menopausal transition', *Obstet Gynecol Clin North Am*, 38: 467-75.
- Laufer, E., D. Kesper, A. Vortkamp, and P. King. 2012. 'Sonic hedgehog signaling during adrenal development', *Mol Cell Endocrinol*, 351: 19-27.
- Le Douarin, N. M., and M. A. Teillet. 1974. '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*, 41: 162-84.
- Lee, S. Y., E. Park, S. C. Kim, R. S. Ahn, C. Ko, and K. Lee. 2012. 'ERalpha/E2 signaling suppresses the expression of steroidogenic enzyme genes via cross-talk with orphan nuclear receptor Nur77 in the testes', *Mol Cell Endocrinol*, 362: 91-103.
- Lefrancois-Martinez, A. M., C. Tournaire, A. Martinez, M. Berger, S. Daoudal, D. Tritsch, G. Veyssiere, and C. Jean. 1999. '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*, 274: 32875-80.
- Lei, Q. Y., H. Zhang, B. Zhao, Z. Y. Zha, F. Bai, X. H. Pei, S. Zhao, Y. Xiong, and K. L. Guan. 2008. 'TAZ promotes cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition and is inhibited by the hippo pathway', *Mol Cell Biol*, 28: 2426-36.
- Lei, Z. M., S. Mishra, W. Zou, B. Xu, M. Foltz, X. Li, and C. V. Rao. 2001. 'Targeted disruption of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor gene', *Mol Endocrinol*, 15: 184-200.
- Levy, D., Y. Adamovich, N. Reuven, and Y. Shaul. 2008. 'Yap1 phosphorylation by c-Abl is a critical step in selective activation of proapoptotic genes in response to DNA damage', *Mol Cell*, 29: 350-61.
- Li, H., G. MacLean, D. Cameron, M. Clagett-Dame, and M. Petkovich. 2009. 'Cyp26b1 expression in murine Sertoli cells is required to maintain male germ cells in an undifferentiated state during embryogenesis', *PLoS One*, 4: e7501.
- Li, J., X. Chen, X. Ding, Y. Cheng, B. Zhao, Z. C. Lai, K. Al Hezaimi, R. Hakem, K. L. Guan, and C. Y. Wang. 2013. 'LATS2 suppresses oncogenic Wnt signaling by disrupting beta-catenin/BCL9 interaction', *Cell Rep*, 5: 1650-63.
- Li, T., H. Zhao, X. Zhao, B. Zhang, L. Cui, Y. Shi, G. Li, P. Wang, and Z. J. Chen. 2012. 'Identification of YAP1 as a novel susceptibility gene for polycystic ovary syndrome', *J Med Genet*, 49: 254-7.
- Li, X., Z. Wang, Z. Jiang, J. Guo, Y. Zhang, C. Li, J. Chung, J. Folmer, J. Liu, Q. Lian, R. Ge, B. R. Zirkin, and H. Chen. 2016. 'Regulation of seminiferous tubule-associated stem Leydig cells in adult rat testes', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113: 2666-71.

- Li, Y., L. Zhang, Y. Hu, M. Chen, F. Han, Y. Qin, M. Chen, X. Cui, S. Duo, F. Tang, and F. Gao. 2017. 'beta-Catenin directs the transformation of testis Sertoli cells to ovarian granulosa-like cells by inducing Foxl2 expression', *J Biol Chem*, 292: 17577-86.
- Li, Z., B. Zhao, P. Wang, F. Chen, Z. Dong, H. Yang, K. L. Guan, and Y. Xu. 2010. 'Structural insights into the YAP and TEAD complex', *Genes Dev*, 24: 235-40.
- Lin, F. J., J. Qin, K. Tang, S. Y. Tsai, and M. J. Tsai. 2011. 'Coup d'Etat: an orphan takes control', *Endocr Rev*, 32: 404-21.
- Lin, S. C., H. C. Lee, P. C. Hou, J. L. Fu, M. H. Wu, and S. J. Tsai. 2017. 'Targeting hypoxia-mediated YAP1 nuclear translocation ameliorates pathogenesis of endometriosis without compromising maternal fertility', *J Pathol*, 242: 476-87.
- Liu, C., Y. Li, M. Semenov, C. Han, G. H. Baeg, Y. Tan, Z. Zhang, X. Lin, and X. He. 2002. 'Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism', *Cell*, 108: 837-47.
- Liu, C., K. Rodriguez, and H. H. Yao. 2016. 'Mapping lineage progression of somatic progenitor cells in the mouse fetal testis', *Development*, 143: 3700-10.
- Liu, C. Y., X. Lv, T. Li, Y. Xu, X. Zhou, S. Zhao, Y. Xiong, Q. Y. Lei, and K. L. Guan. 2011. 'PP1 cooperates with ASPP2 to dephosphorylate and activate TAZ', *J Biol Chem*, 286: 5558-66.
- Liu, C. Y., Z. Y. Zha, X. Zhou, H. Zhang, W. Huang, D. Zhao, T. Li, S. W. Chan, C. J. Lim, W. Hong, S. Zhao, Y. Xiong, Q. Y. Lei, and K. L. Guan. 2010. 'The hippo tumor pathway promotes TAZ degradation by phosphorylating a phosphodegron and recruiting the SCF{beta}-TrCP E3 ligase', *J Biol Chem*, 285: 37159-69.
- Liu, J., P. Heikkila, Q. H. Meng, A. I. Kahri, M. J. Tikkanen, and R. Voutilainen. 2000. 'Expression of low and high density lipoprotein receptor genes in human adrenals', *Eur J Endocrinol*, 142: 677-82.
- Liu, J., H. Li, and V. Papadopoulos. 2003. 'PAP7, a PBR/PKA-R1alpha-associated protein: a new element in the relay of the hormonal induction of steroidogenesis', *J Steroid Biochem Mol Biol*, 85: 275-83.
- Lochner, A., and J. A. Moolman. 2006. 'The many faces of H89: a review', *Cardiovasc Drug Rev*, 24: 261-74.

- Luo, L., H. Chen, and B. R. Zirkin. 2005. 'Temporal relationships among testosterone production, steroidogenic acute regulatory protein (StAR), and P450 side-chain cleavage enzyme (P450scc) during Leydig cell aging', *J Androl*, 26: 25-31.
- Luo, X., Y. Ikeda, and K. L. Parker. 1994. 'A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation', *Cell*, 77: 481-90.
- Ma, X., Y. Dong, M. M. Matzuk, and T. R. Kumar. 2004. 'Targeted disruption of luteinizing hormone beta-subunit leads to hypogonadism, defects in gonadal steroidogenesis, and infertility', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 17294-9.
- Manna, P. R., M. T. Dyson, D. W. Eubank, B. J. Clark, E. Lalli, P. Sassone-Corsi, A. J. Zeleznik, and D. M. Stocco. 2002. 'Regulation of steroidogenesis and the steroidogenic acute regulatory protein by a member of the cAMP response-element binding protein family', *Mol Endocrinol*, 16: 184-99.
- Manna, P. R., D. W. Eubank, E. Lalli, P. Sassone-Corsi, and D. M. Stocco. 2003. 'Transcriptional regulation of the mouse steroidogenic acute regulatory protein gene by the cAMP response-element binding protein and steroidogenic factor 1', *J Mol Endocrinol*, 30: 381-97.
- Manna, P. R., D. W. Eubank, and D. M. Stocco. 2004. 'Assessment of the role of activator protein-1 on transcription of the mouse steroidogenic acute regulatory protein gene', *Mol Endocrinol*, 18: 558-73.
- Manna, P. R., I. T. Huhtaniemi, and D. M. Stocco. 2009. 'Mechanisms of protein kinase C signaling in the modulation of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-mediated steroidogenesis in mouse gonadal cells', *Endocrinology*, 150: 3308-17.
- Manna, P. R., C. L. Stetson, A. T. Slominski, and K. Pruitt. 2016. 'Role of the steroidogenic acute regulatory protein in health and disease', *Endocrine*, 51: 7-21.
- Manna, P. R., and D. M. Stocco. 2007. 'Crosstalk of CREB and Fos/Jun on a single cis-element: transcriptional repression of the steroidogenic acute regulatory protein gene', *J Mol Endocrinol*, 39: 261-77.
- Manuylov, N. L., B. Zhou, Q. Ma, S. C. Fox, W. T. Pu, and S. G. Tevosian. 2011. 'Conditional ablation of Gata4 and Fog2 genes in mice reveals their distinct roles in mammalian sexual differentiation', *Dev Biol*, 353: 229-41.

- Marchal, R., D. Naville, P. Durand, M. Begeot, and A. Penhoat. 1998. 'A steroidogenic factor-1 binding element is essential for basal human ACTH receptor gene transcription', *Biochem Biophys Res Commun*, 247: 28-32.
- Martin, L. J., F. Bergeron, R. S. Viger, and J. J. Tremblay. 2012. 'Functional cooperation between GATA factors and cJUN on the star promoter in MA-10 Leydig cells', *J Androl*, 33: 81-7.
- Martin, L. J., N. Boucher, C. Brousseau, and J. J. Tremblay. 2008. 'The orphan nuclear receptor NUR77 regulates hormone-induced StAR transcription in Leydig cells through cooperation with Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I', *Mol Endocrinol*, 22: 2021-37.
- Martin, L. J., N. Boucher, B. El-Asmar, and J. J. Tremblay. 2009. 'cAMP-induced expression of the orphan nuclear receptor Nur77 in MA-10 Leydig cells involves a CaMKI pathway', *J Androl*, 30: 134-45.
- Matallanas, D., D. Romano, K. Yee, K. Meissl, L. Kucerova, D. Piazzolla, M. Baccarini, J. K. Vass, W. Kolch, and E. O'Neill. 2007. 'RASSF1A elicits apoptosis through an MST2 pathway directing proapoptotic transcription by the p73 tumor suppressor protein', *Mol Cell*, 27: 962-75.
- Matson, C. K., M. W. Murphy, A. L. Sarver, M. D. Griswold, V. J. Bardwell, and D. Zarkower. 2011. 'DMRT1 prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis', *Nature*, 476: 101-4.
- Matsushima, Ayami, Yoshimitsu Kakuta, Takamasa Teramoto, Takumi Koshiba, Xiaohui Liu, Hiroyuki Okada, Takatoshi Tokunaga, Shun-ichiro Kawabata, Makoto Kimura, and Yasuyuki Shimohigashi. 2007. 'Structural Evidence for Endocrine Disruptor Bisphenol A Binding to Human Nuclear Receptor ERR γ ', *The Journal of Biochemistry*, 142: 517-24.
- Matsuura, K., Y. Deyashiki, Y. Bunai, I. Ohya, and A. Hara. 1996. 'Aldose reductase is a major reductase for isocaproaldehyde, a product of side-chain cleavage of cholesterol, in human and animal adrenal glands', *Arch Biochem Biophys*, 328: 265-71.
- Mauviel, A., F. Nallet-Staub, and X. Varelas. 2012. 'Integrating developmental signals: a Hippo in the (path)way', *Oncogene*, 31: 1743-56.

- Mazaud-Guittot, S., E. Meugnier, S. Pesenti, X. Wu, H. Vidal, A. Gow, and B. Le Magueresse-Battistoni. 2010. 'Claudin 11 deficiency in mice results in loss of the Sertoli cell epithelial phenotype in the testis', *Biol Reprod*, 82: 202-13.
- McEwan, P. E., G. P. Vinson, and C. J. Kenyon. 1999. 'Control of adrenal cell proliferation by AT1 receptors in response to angiotensin II and low-sodium diet', *Am J Physiol*, 276: E303-9.
- McFarland, K. C., R. Sprengel, H. S. Phillips, M. Kohler, N. Rosembli, K. Nikolics, D. L. Segaloff, and P. H. Seeburg. 1989. 'Lutropin-choriogonadotropin receptor: an unusual member of the G protein-coupled receptor family', *Science*, 245: 494-9.
- Meachem, S. J., R. I. McLachlan, D. M. de Kretser, D. M. Robertson, and N. G. Wreford. 1996. 'Neonatal exposure of rats to recombinant follicle stimulating hormone increases adult Sertoli and spermatogenic cell numbers', *Biol Reprod*, 54: 36-44.
- Meeks, J. J., S. E. Crawford, T. A. Russell, K. Morohashi, J. Weiss, and J. L. Jameson. 2003. 'Dax1 regulates testis cord organization during gonadal differentiation', *Development*, 130: 1029-36.
- Mendis-Handagama, S. M., and H. B. Ariyaratne. 2001. 'Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis', *Biol Reprod*, 65: 660-71.
- Mendis-Handagama, S. M., G. P. Risbridger, and D. M. de Kretser. 1987. 'Morphometric analysis of the components of the neonatal and the adult rat testis interstitium', *Int J Androl*, 10: 525-34.
- Mendoza-Villarreal, R. E., N. M. Robert, L. J. Martin, C. Brousseau, and J. J. Tremblay. 2014. 'The nuclear receptor NR2F2 activates star expression and steroidogenesis in mouse MA-10 and MLTC-1 Leydig cells', *Biol Reprod*, 91: 26.
- Merchant-Larios, H., and N. Moreno-Mendoza. 1998. 'Mesonephric stromal cells differentiate into Leydig cells in the mouse fetal testis', *Exp Cell Res*, 244: 230-8.
- Merchant-Larios, H., N. Moreno-Mendoza, and M. Buehr. 1993. 'The role of the mesonephros in cell differentiation and morphogenesis of the mouse fetal testis', *Int J Dev Biol*, 37: 407-15.
- Metherell, L. A., J. P. Chapple, S. Cooray, A. David, C. Becker, F. Ruschendorf, D. Naville, M. Begeot, B. Khoo, P. Nurnberg, A. Huebner, M. E. Cheetham, and A. J. Clark. 2005.

- 'Mutations in MRAP, encoding a new interacting partner of the ACTH receptor, cause familial glucocorticoid deficiency type 2', *Nat Genet*, 37: 166-70.
- Middendorff, R., M. S. Davidoff, S. Behrends, M. Mewe, A. Miethens, and D. Muller. 2000. 'Multiple roles of the messenger molecule cGMP in testicular function', *Andrologia*, 32: 55-9.
- Midzak, A. S., H. Chen, M. A. Aon, V. Papadopoulos, and B. R. Zirkin. 2011. 'ATP synthesis, mitochondrial function, and steroid biosynthesis in rodent primary and tumor Leydig cells', *Biol Reprod*, 84: 976-85.
- Miller, E. D. 1981. 'The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in circulatory control and hypertension', *Br J Anaesth*, 53: 711-8.
- Miller, E., J. Yang, M. DeRan, C. Wu, A. I. Su, G. M. Bonamy, J. Liu, E. C. Peters, and X. Wu. 2012. 'Identification of serum-derived sphingosine-1-phosphate as a small molecule regulator of YAP', *Chem Biol*, 19: 955-62.
- Miller, W. L. 1995. 'Mitochondrial specificity of the early steps in steroidogenesis', *J Steroid Biochem Mol Biol*, 55: 607-16.
- Miller, W. L., and R. J. Auchus. 2011. 'The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders', *Endocr Rev*, 32: 81-151.
- Miyabayashi, K., Y. Katoh-Fukui, H. Ogawa, T. Baba, Y. Shima, N. Sugiyama, K. Kitamura, and K. Morohashi. 2013. 'Aristaless related homeobox gene, Arx, is implicated in mouse fetal Leydig cell differentiation possibly through expressing in the progenitor cells', *PLoS One*, 8: e68050.
- Miyamoto, Y., H. Taniguchi, F. Hamel, D. W. Silversides, and R. S. Viger. 2008. 'A GATA4/WT1 cooperation regulates transcription of genes required for mammalian sex determination and differentiation', *BMC Mol Biol*, 9: 44.
- Moniot, B., F. Declosmenil, F. Barrionuevo, G. Scherer, K. Aritake, S. Malki, L. Marzi, A. Cohen-Solal, I. Georg, J. Klattig, C. Englert, Y. Kim, B. Capel, N. Eguchi, Y. Urade, B. Boizet-Bonhoure, and F. Poulat. 2009. 'The PGD2 pathway, independently of FGF9, amplifies SOX9 activity in Sertoli cells during male sexual differentiation', *Development*, 136: 1813-21.
- Moon, S., S. Yeon Park, and H. Woo Park. 2018. 'Regulation of the Hippo pathway in cancer biology', *Cell Mol Life Sci*, 75: 2303-19.

- Moorthy, B. S., Y. Gao, and G. S. Anand. 2011. 'Phosphodiesterases catalyze hydrolysis of cAMP-bound to regulatory subunit of protein kinase A and mediate signal termination', *Mol Cell Proteomics*, 10: M110.002295.
- Morohaku, K., S. H. Pelton, D. J. Daugherty, W. R. Butler, W. Deng, and V. Selvaraj. 2014. 'Translocator protein/peripheral benzodiazepine receptor is not required for steroid hormone biosynthesis', *Endocrinology*, 155: 89-97.
- Morohashi, K. 1997. 'The ontogenesis of the steroidogenic tissues', *Genes Cells*, 2: 95-106.
- Moroishi, T., H. W. Park, B. Qin, Q. Chen, Z. Meng, S. W. Plouffe, K. Taniguchi, F. X. Yu, M. Karin, D. Pan, and K. L. Guan. 2015. 'A YAP/TAZ-induced feedback mechanism regulates Hippo pathway homeostasis', *Genes Dev*, 29: 1271-84.
- Motamedi, F. J., D. A. Badro, M. Clarkson, M. R. Lecca, S. T. Bradford, F. A. Buske, K. Saar, N. Hubner, A. W. Brandli, and A. Schedl. 2014. 'WT1 controls antagonistic FGF and BMP-pSMAD pathways in early renal progenitors', *Nat Commun*, 5: 4444.
- Mruk, D. D., and C. Y. Cheng. 2004. 'Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis', *Endocr Rev*, 25: 747-806.
- Mukai, T., M. Kusaka, K. Kawabe, K. Goto, H. Nawata, K. Fujieda, and K. Morohashi. 2002. 'Sexually dimorphic expression of Dax-1 in the adrenal cortex', *Genes Cells*, 7: 717-29.
- Murphy, L., I. A. Jeffcoate, and P. J. O'Shaughnessy. 1994. 'Abnormal Leydig cell development at puberty in the androgen-resistant Tfm mouse', *Endocrinology*, 135: 1372-7.
- Nachtigal, M. W., Y. Hirokawa, D. L. Enyeart-VanHouten, J. N. Flanagan, G. D. Hammer, and H. A. Ingraham. 1998. 'Wilms' tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression', *Cell*, 93: 445-54.
- Niehrs, C., and S. P. Acebron. 2012. 'Mitotic and mitogenic Wnt signalling', *EMBO J*, 31: 2705-13.
- Nishimoto, K., R. B. Harris, W. E. Rainey, and T. Seki. 2014. 'Sodium deficiency regulates rat adrenal zona glomerulosa gene expression', *Endocrinology*, 155: 1363-72.
- Nishino, K., K. Yamanouchi, K. Naito, and H. Tojo. 2001. 'Characterization of mesonephric cells that migrate into the XY gonad during testis differentiation', *Exp Cell Res*, 267: 225-32.

- Nishioka, N., K. Inoue, K. Adachi, H. Kiyonari, M. Ota, A. Ralston, N. Yabuta, S. Hirahara, R. O. Stephenson, N. Ogonuki, R. Makita, H. Kurihara, E. M. Morin-Kensicki, H. Nojima, J. Rossant, K. Nakao, H. Niwa, and H. Sasaki. 2009. 'The Hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophoctoderm from inner cell mass', *Dev Cell*, 16: 398-410.
- Novoselova, T. V., D. Jackson, D. C. Campbell, A. J. Clark, and L. F. Chan. 2013. 'Melanocortin receptor accessory proteins in adrenal gland physiology and beyond', *J Endocrinol*, 217: R1-11.
- O'Shaughnessy, P. J., P. J. Baker, M. Heikkila, S. Vainio, and A. P. McMahon. 2000. 'Localization of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase/17-ketosteroid reductase isoform expression in the developing mouse testis--androstenedione is the major androgen secreted by fetal/neonatal leydig cells', *Endocrinology*, 141: 2631-7.
- O'Shaughnessy, P. J., L. M. Fleming, G. Jackson, U. Hochgeschwender, P. Reed, and P. J. Baker. 2003. 'Adrenocorticotrophic hormone directly stimulates testosterone production by the fetal and neonatal mouse testis', *Endocrinology*, 144: 3279-84.
- O'Shaughnessy, P. J., H. Johnston, L. Willerton, and P. J. Baker. 2002. 'Failure of normal adult Leydig cell development in androgen-receptor-deficient mice', *J Cell Sci*, 115: 3491-6.
- O'Shaughnessy, Peter. 2015. 'Testicular Development': 567-94.
- Odeh, H. M., C. Kleinguetl, R. Ge, B. R. Zirkin, and H. Chen. 2014. 'Regulation of the proliferation and differentiation of Leydig stem cells in the adult testis', *Biol Reprod*, 90: 123.
- Oh, H., and K. D. Irvine. 2008. 'In vivo regulation of Yorkie phosphorylation and localization', *Development*, 135: 1081-8.
- Oh, H., M. Slattery, L. Ma, A. Crofts, K. P. White, R. S. Mann, and K. D. Irvine. 2013. 'Genome-wide association of Yorkie with chromatin and chromatin-remodeling complexes', *Cell Rep*, 3: 309-18.
- Oh, Y. S., I. K. Koh, B. Choi, and M. C. Gye. 2017. 'ESR1 inhibits hCG-induced steroidogenesis and proliferation of progenitor Leydig cells in mice', *Sci Rep*, 7: 43459.
- Oka, T., V. Mazack, and M. Sudol. 2008. 'Mst2 and Lats kinases regulate apoptotic function of Yes kinase-associated protein (YAP)', *J Biol Chem*, 283: 27534-46.

- Oka, T., and M. Sudol. 2009. 'Nuclear localization and pro-apoptotic signaling of YAP2 require intact PDZ-binding motif', *Genes Cells*, 14: 607-15.
- Okuneva, V., M. Zhvania, N. Japaridze, L. Gelazonia, and T. Lordkipanidze. 2009. 'Stress-system: corticotropin-releasing hormone and catecholamines (review)', *Georgian Med News*: 65-9.
- Olfe, J., G. Domanska, C. Schuett, and C. Kiank. 2010. 'Different stress-related phenotypes of BALB/c mice from in-house or vendor: alterations of the sympathetic and HPA axis responsiveness', *BMC Physiol*, 10: 2.
- Ota, M., and H. Sasaki. 2008. 'Mammalian Tead proteins regulate cell proliferation and contact inhibition as transcriptional mediators of Hippo signaling', *Development*, 135: 4059-69.
- Paavola, L. G., J. F. Strauss, 3rd, C. O. Boyd, and J. E. Nestler. 1985. 'Uptake of gold- and [3H]cholesteryl linoleate-labeled human low density lipoprotein by cultured rat granulosa cells: cellular mechanisms involved in lipoprotein metabolism and their importance to steroidogenesis', *J Cell Biol*, 100: 1235-47.
- Padua, M. B., S. C. Fox, T. Jiang, D. A. Morse, and S. G. Tevosian. 2014. 'Simultaneous gene deletion of gata4 and gata6 leads to early disruption of follicular development and germ cell loss in the murine ovary', *Biol Reprod*, 91: 24.
- Padua, M. B., T. Jiang, D. A. Morse, S. C. Fox, H. M. Hatch, and S. G. Tevosian. 2015. 'Combined loss of the GATA4 and GATA6 transcription factors in male mice disrupts testicular development and confers adrenal-like function in the testes', *Endocrinology*, 156: 1873-86.
- Papadopoulos, V., J. Fan, and B. Zirkin. 2018. 'Translocator protein (18 kDa): an update on its function in steroidogenesis', *J Neuroendocrinol*, 30.
- Papadopoulos, V., E. P. Widmaier, H. Amri, A. Zilz, H. Li, M. Culty, R. Castello, G. H. Philip, R. Sridaran, and K. Drieu. 1998. 'In vivo studies on the role of the peripheral benzodiazepine receptor (PBR) in steroidogenesis', *Endocr Res*, 24: 479-87.
- Paramasivam, M., A. Sarkeshik, J. R. Yates, 3rd, M. J. Fernandes, and D. McCollum. 2011. 'Angiotensin family proteins are novel activators of the LATS2 kinase tumor suppressor', *Mol Biol Cell*, 22: 3725-33.

- Pastel, E., J. C. Pointud, A. Martinez, and A. M. Lefrancois-Martinez. 2016. 'Aldo-Keto Reductases 1B in Adrenal Cortex Physiology', *Front Endocrinol (Lausanne)*, 7: 97.
- Pawlikowski, M., A. Gruszka, S. Mucha, and G. Melen-Mucha. 2001. 'Angiotensins II and IV stimulate the rat adrenocortical cell proliferation acting via different receptors', *Endocr Regul*, 35: 139-42.
- Payne, A. H. 1990. 'Hormonal regulation of cytochrome P450 enzymes, cholesterol side-chain cleavage and 17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase in Leydig cells', *Biol Reprod*, 42: 399-404.
- Pellock, B. J., E. Buff, K. White, and I. K. Hariharan. 2007. 'The Drosophila tumor suppressors Expanded and Merlin differentially regulate cell cycle exit, apoptosis, and Wingless signaling', *Dev Biol*, 304: 102-15.
- Pezzi, V., B. J. Clark, S. Ando, D. M. Stocco, and W. E. Rainey. 1996. 'Role of calmodulin-dependent protein kinase II in the acute stimulation of aldosterone production', *J Steroid Biochem Mol Biol*, 58: 417-24.
- Pfleger, C. M. 2017. 'The Hippo Pathway: A Master Regulatory Network Important in Development and Dysregulated in Disease', *Curr Top Dev Biol*, 123: 181-228.
- Phillips, D. M., V. Lakshmi, and C. Monder. 1989. 'Corticosteroid 11 beta-dehydrogenase in rat testis', *Endocrinology*, 125: 209-16.
- Piccolo, S., S. Dupont, and M. Cordenonsi. 2014. 'The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond', *Physiol Rev*, 94: 1287-312.
- Pierucci-Alves, F., A. M. Clark, and L. D. Russell. 2001. 'A developmental study of the Desert hedgehog-null mouse testis', *Biol Reprod*, 65: 1392-402.
- Pignatti, E., S. Leng, D. L. Carlone, and D. T. Breault. 2017. 'Regulation of zonation and homeostasis in the adrenal cortex', *Mol Cell Endocrinol*, 441: 146-55.
- Pihlajoki, M., E. Gretzinger, R. Cochran, A. Kyronlahti, A. Schrade, T. Hiller, L. Sullivan, M. Shoykhet, E. L. Schoeller, M. D. Brooks, M. Heikinheimo, and D. B. Wilson. 2013. 'Conditional mutagenesis of Gata6 in SF1-positive cells causes gonadal-like differentiation in the adrenal cortex of mice', *Endocrinology*, 154: 1754-67.
- Pimienta, G., and J. Pascual. 2007. 'Canonical and alternative MAPK signaling', *Cell Cycle*, 6: 2628-32.

- Pisarska, M. D., F. T. Kuo, I. K. Bentsi-Barnes, S. Khan, and G. M. Barlow. 2010. 'LATS1 phosphorylates forkhead L2 and regulates its transcriptional activity', *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 299: E101-9.
- Pitetti, J. L., P. Calvel, Y. Romero, B. Conne, V. Truong, M. D. Papaioannou, O. Schaad, M. Docquier, P. L. Herrera, D. Wilhelm, and S. Nef. 2013. 'Insulin and IGF1 receptors are essential for XX and XY gonadal differentiation and adrenal development in mice', *PLoS Genet*, 9: e1003160.
- Pobbati, A. V., S. W. Chan, I. Lee, H. Song, and W. Hong. 2012. 'Structural and functional similarity between the Vgll1-TEAD and the YAP-TEAD complexes', *Structure*, 20: 1135-40.
- Poderoso, C., C. Paz, A. Gorostizaga, F. Cornejo Maciel, C. F. Mendez, and E. J. Podesta. 2002. 'Protein serine/threonine phosphatase 2A activity is inhibited by cAMP in MA-10 cells', *Endocr Res*, 28: 319-23.
- Polesello, C., and N. Tapon. 2007. 'Salvador-warts-hippo signaling promotes Drosophila posterior follicle cell maturation downstream of notch', *Curr Biol*, 17: 1864-70.
- Porpaczy, Z., J. J. Tomasek, and D. A. Freeman. 1997. 'Internalized plasma membrane cholesterol passes through an endosome compartment that is distinct from the acid vesicle-lysosome compartment', *Exp Cell Res*, 234: 217-24.
- Praskova, M., F. Xia, and J. Avruch. 2008. 'MOBKL1A/MOBKL1B phosphorylation by MST1 and MST2 inhibits cell proliferation', *Curr Biol*, 18: 311-21.
- Pritchard, L. E., and A. White. 2007. 'Neuropeptide processing and its impact on melanocortin pathways', *Endocrinology*, 148: 4201-7.
- Pusch, W., M. Balvers, and R. Ivell. 1996. 'Molecular cloning and expression of the relaxin-like factor from the mouse testis', *Endocrinology*, 137: 3009-13.
- Qamar, I., E. Y. Gong, Y. Kim, C. H. Song, H. J. Lee, S. Y. Chun, and K. Lee. 2010. 'Anti-steroidogenic factor ARR19 inhibits testicular steroidogenesis through the suppression of Nur77 transactivation', *J Biol Chem*, 285: 22360-9.
- Qamar, I., E. Park, E. Y. Gong, H. J. Lee, and K. Lee. 2009. 'ARR19 (androgen receptor corepressor of 19 kDa), an antisteroidogenic factor, is regulated by GATA-1 in testicular Leydig cells', *J Biol Chem*, 284: 18021-32.

- Qin, J., M. J. Tsai, and S. Y. Tsai. 2008. 'Essential roles of COUP-TFII in Leydig cell differentiation and male fertility', *PLoS One*, 3: e3285.
- Qing, Y., F. Yin, W. Wang, Y. Zheng, P. Guo, F. Schozer, H. Deng, and D. Pan. 2014. 'The Hippo effector Yorkie activates transcription by interacting with a histone methyltransferase complex through Ncoa6', *Elife*, 3.
- Ragazzon, B., A. M. Lefrancois-Martinez, P. Val, I. Sahut-Barnola, C. Tournaire, C. Chambon, J. L. Gachancard-Bouya, R. J. Begue, G. Veyssiere, and A. Martinez. 2006. 'Adrenocorticotropin-dependent changes in SF-1/DAX-1 ratio influence steroidogenic genes expression in a novel model of glucocorticoid-producing adrenocortical cell lines derived from targeted tumorigenesis', *Endocrinology*, 147: 1805-18.
- Rainey, W. E., and Y. Nakamura. 2008. 'Regulation of the adrenal androgen biosynthesis', *J Steroid Biochem Mol Biol*, 108: 281-6.
- Rakoczy, J., S. L. Fernandez-Valverde, E. A. Glazov, E. N. Wainwright, T. Sato, S. Takada, A. N. Combes, D. J. Korbie, D. Miller, S. M. Grimmond, M. H. Little, H. Asahara, J. S. Mattick, R. J. Taft, and D. Wilhelm. 2013. 'MicroRNAs-140-5p/140-3p modulate Leydig cell numbers in the developing mouse testis', *Biol Reprod*, 88: 143.
- Rannikki, A. S., F. P. Zhang, and I. T. Huhtaniemi. 1995. 'Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in the rat testis and ovary', *Mol Cell Endocrinol*, 107: 199-208.
- Rato, L., S. Socorro, J. E. Cavaco, and P. F. Oliveira. 2010. 'Tubular fluid secretion in the seminiferous epithelium: ion transporters and aquaporins in Sertoli cells', *J Membr Biol*, 236: 215-24.
- Rebois, R. V. 1982. 'Establishment of gonadotropin-responsive murine leydig tumor cell line', *J Cell Biol*, 94: 70-6.
- Rebourcet, D., P. J. O'Shaughnessy, J. L. Pitetti, A. Monteiro, L. O'Hara, L. Milne, Y. T. Tsai, L. Cruickshanks, D. Riethmacher, F. Guillou, R. T. Mitchell, R. van't Hof, T. C. Freeman, S. Nef, and L. B. Smith. 2014. 'Sertoli cells control peritubular myoid cell fate and support adult Leydig cell development in the prepubertal testis', *Development*, 141: 2139-49.
- Reinhart, A. J., S. C. Williams, B. J. Clark, and D. M. Stocco. 1999. 'SF-1 (steroidogenic factor-1) and C/EBP beta (CCAAT/enhancer binding protein-beta) cooperate to

- regulate the murine StAR (steroidogenic acute regulatory) promoter', *Mol Endocrinol*, 13: 729-41.
- Remue, E., K. Meerschaert, T. Oka, C. Boucherie, J. Vandekerckhove, M. Sudol, and J. Gettemans. 2010. 'TAZ interacts with zonula occludens-1 and -2 proteins in a PDZ-1 dependent manner', *FEBS Lett*, 584: 4175-80.
- Ricci, G., M. C. Guglielmo, M. Caruso, F. Ferranti, R. Canipari, M. Galdieri, and A. Catizone. 2012. 'Hepatocyte growth factor is a mouse fetal Leydig cell terminal differentiation factor', *Biol Reprod*, 87: 146.
- Robertson, K. M., L. O'Donnell, M. E. Jones, S. J. Meachem, W. C. Boon, C. R. Fisher, K. H. Graves, R. I. McLachlan, and E. R. Simpson. 1999. 'Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (cyp 19) gene', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 7986-91.
- Robertson, K. M., E. R. Simpson, O. Lacham-Kaplan, and M. E. Jones. 2001. 'Characterization of the fertility of male aromatase knockout mice', *J Androl*, 22: 825-30.
- Roscioni, S. S., C. R. Elzinga, and M. Schmidt. 2008. 'Epac: effectors and biological functions', *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 377: 345-57.
- Rosmond, R. 2006. 'Androgen excess in women--a health hazard?', *Med Hypotheses*, 67: 229-34.
- Rouiller-Fabre, V., L. Lecref, C. Gautier, J. M. Saez, and R. Habert. 1998. 'Expression and effect of insulin-like growth factor I on rat fetal Leydig cell function and differentiation', *Endocrinology*, 139: 2926-34.
- Sadovsky, Y., P. A. Crawford, K. G. Woodson, J. A. Polish, M. A. Clements, L. M. Tourtellotte, K. Simburger, and J. Milbrandt. 1995. '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*, 92: 10939-43.
- Sahut-Barnola, I., C. de Jossineau, P. Val, S. Lambert-Langlais, C. Damon, A. M. Lefrancois-Martinez, J. C. Pointud, G. Marceau, V. Sapin, F. Tissier, B. Ragazzon, J. Bertherat, L. S. Kirschner, C. A. Stratakis, and A. Martinez. 2010. 'Cushing's

- syndrome and fetal features resurgence in adrenal cortex-specific Prkar1a knockout mice', *PLoS Genet*, 6: e1000980.
- Saito, K., T. Matsuzaki, T. Iwasa, M. Miyado, H. Saito, T. Hasegawa, K. Homma, E. Inoue, Y. Miyashiro, T. Kubota, M. Irahara, T. Ogata, and M. Fukami. 2016. 'Steroidogenic pathways involved in androgen biosynthesis in eumenorrhic women and patients with polycystic ovary syndrome', *J Steroid Biochem Mol Biol*, 158: 31-37.
- Sakaue, M., and B. B. Hoffman. 1991. 'Glucocorticoids induce transcription and expression of the alpha 1B adrenergic receptor gene in DTT1 MF-2 smooth muscle cells', *J Clin Invest*, 88: 385-9.
- Salah, Z., A. Alian, and R. I. Aqeilan. 2012. 'WW domain-containing proteins: retrospectives and the future', *Front Biosci (Landmark Ed)*, 17: 331-48.
- Scheys, J. O., J. H. Heaton, and G. D. Hammer. 2011. 'Evidence of adrenal failure in aging Dax1-deficient mice', *Endocrinology*, 152: 3430-9.
- Schlegelmilch, K., M. Mohseni, O. Kirak, J. Pruszek, J. R. Rodriguez, D. Zhou, B. T. Kreger, V. Vasioukhin, J. Avruch, T. R. Brummelkamp, and F. D. Camargo. 2011. 'Yap1 acts downstream of alpha-catenin to control epidermal proliferation', *Cell*, 144: 782-95.
- Sekido, R., and R. Lovell-Badge. 2008. 'Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer', *Nature*, 453: 930-4.
- Sen Sharma, S., and S. S. Majumdar. 2017. 'Transcriptional co-activator YAP regulates cAMP signaling in Sertoli cells', *Mol Cell Endocrinol*, 450: 64-73.
- Sewer, M. B., E. B. Dammer, and S. Jagarlapudi. 2007. 'Transcriptional regulation of adrenocortical steroidogenic gene expression', *Drug Metab Rev*, 39: 371-88.
- Shacham, S., D. Harris, H. Ben-Shlomo, I. Cohen, D. Bonfil, F. Przedeki, H. Lewy, I. E. Ashkenazi, R. Seger, and Z. Naor. 2001. 'Mechanism of GnRH receptor signaling on gonadotropin release and gene expression in pituitary gonadotrophs', *Vitam Horm*, 63: 63-90.
- Shan, L. X., and M. P. Hardy. 1992. 'Developmental changes in levels of luteinizing hormone receptor and androgen receptor in rat Leydig cells', *Endocrinology*, 131: 1107-14.
- Shan, L. X., D. M. Phillips, C. W. Bardin, and M. P. Hardy. 1993. 'Differential regulation of steroidogenic enzymes during differentiation optimizes testosterone production by adult rat Leydig cells', *Endocrinology*, 133: 2277-83.

- Shan, L. X., L. J. Zhu, C. W. Bardin, and M. P. Hardy. 1995. 'Quantitative analysis of androgen receptor messenger ribonucleic acid in developing Leydig cells and Sertoli cells by in situ hybridization', *Endocrinology*, 136: 3856-62.
- Sharpe, R. M., S. Maddocks, and J. B. Kerr. 1990. 'Cell-cell interactions in the control of spermatogenesis as studied using Leydig cell destruction and testosterone replacement', *Am J Anat*, 188: 3-20.
- Sharpe, R. M., C. McKinnell, C. Kivlin, and J. S. Fisher. 2003. 'Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood', *Reproduction*, 125: 769-84.
- Shaw, R. L., A. Kohlmaier, C. Polesello, C. Veelken, B. A. Edgar, and N. Tapon. 2010. 'The Hippo pathway regulates intestinal stem cell proliferation during Drosophila adult midgut regeneration', *Development*, 137: 4147-58.
- Shelton, J. H., and A. L. Jones. 1971. 'The fine structure of the mouse adrenal cortex and the ultrastructural changes in the zona glomerulosa with low and high sodium diets', *Anat Rec*, 170: 147-81.
- Shima, Y., S. Matsuzaki, K. Miyabayashi, H. Otake, T. Baba, S. Kato, I. Huhtaniemi, and K. Morohashi. 2015. 'Fetal Leydig Cells Persist as an Androgen-Independent Subpopulation in the Postnatal Testis', *Mol Endocrinol*, 29: 1581-93.
- Shima, Y., K. Miyabayashi, S. Haraguchi, T. Arakawa, H. Otake, T. Baba, S. Matsuzaki, Y. Shishido, H. Akiyama, T. Tachibana, K. Tsutsui, and K. Morohashi. 2013. 'Contribution of Leydig and Sertoli cells to testosterone production in mouse fetal testes', *Mol Endocrinol*, 27: 63-73.
- Shima, Y., and K. I. Morohashi. 2017. 'Leydig progenitor cells in fetal testis', *Mol Cell Endocrinol*, 445: 55-64.
- Silvis, M. R., B. T. Kreger, W. H. Lien, O. Klezovitch, G. M. Rudakova, F. D. Camargo, D. M. Lantz, J. T. Seykora, and V. Vasioukhin. 2011. 'alpha-catenin is a tumor suppressor that controls cell accumulation by regulating the localization and activity of the transcriptional coactivator Yap1', *Sci Signal*, 4: ra33.
- Singh, A., S. Ramesh, D. M. Cibi, L. S. Yun, J. Li, L. Li, L. J. Manderfield, E. N. Olson, J. A. Epstein, and M. K. Singh. 2016. 'Hippo Signaling Mediators Yap and Taz Are

- Required in the Epicardium for Coronary Vasculature Development', *Cell Rep*, 15: 1384-93.
- Sirianni, R., F. Zolea, A. Chimento, C. Ruggiero, L. Cerquetti, F. Fallo, C. Pilon, G. Arnaldi, G. Carpinelli, A. Stigliano, and V. Pezzi. 2012. 'Targeting estrogen receptor-alpha reduces adrenocortical cancer (ACC) cell growth in vitro and in vivo: potential therapeutic role of selective estrogen receptor modulators (SERMs) for ACC treatment', *J Clin Endocrinol Metab*, 97: E2238-50.
- Siril Ariyaratne, H. B., S. Chamindrani Mendis-Handagama, D. Buchanan Hales, and J. Ian Mason. 2000. 'Studies on the onset of Leydig precursor cell differentiation in the prepubertal rat testis', *Biol Reprod*, 63: 165-71.
- Skibinski, A., J. L. Breindel, A. Prat, P. Galvan, E. Smith, A. Rolfs, P. B. Gupta, J. LaBaer, and C. Kuperwasser. 2014. 'The Hippo transducer TAZ interacts with the SWI/SNF complex to regulate breast epithelial lineage commitment', *Cell Rep*, 6: 1059-72.
- Smith, Lee B., and William H. Walker. 2015. 'Hormone Signaling in the Testis.' in Knobil and Neill's (ed.), *Physiology of Reproduction* (Elsevier).
- Smole, Z., C. R. Thoma, K. T. Applegate, M. Duda, K. L. Gutbrodt, G. Danuser, and W. Krek. 2014. 'Tumor suppressor NF2/Merlin is a microtubule stabilizer', *Cancer Res*, 74: 353-62.
- Song, K. H., Y. Y. Park, K. C. Park, C. Y. Hong, J. H. Park, M. Shong, K. Lee, and H. S. Choi. 2004. 'The atypical orphan nuclear receptor DAX-1 interacts with orphan nuclear receptor Nur77 and represses its transactivation', *Mol Endocrinol*, 18: 1929-40.
- Song, S., J. A. Ajani, S. Honjo, D. M. Maru, Q. Chen, A. W. Scott, T. R. Heallen, L. Xiao, W. L. Hofstetter, B. Weston, J. H. Lee, R. Wadhwa, K. Sudo, J. R. Stroehlein, J. F. Martin, M. C. Hung, and R. L. Johnson. 2014. 'Hippo coactivator YAP1 upregulates SOX9 and endows esophageal cancer cells with stem-like properties', *Cancer Res*, 74: 4170-82.
- Spat, A., and L. Hunyady. 2004. 'Control of aldosterone secretion: a model for convergence in cellular signaling pathways', *Physiol Rev*, 84: 489-539.
- Sridharan, S., L. Simon, D. D. Meling, D. G. Cyr, D. E. Gutstein, G. I. Fishman, F. Guillou, and P. S. Cooke. 2007. 'Proliferation of adult sertoli cells following conditional

- knockout of the Gap junctional protein GJA1 (connexin 43) in mice', *Biol Reprod*, 76: 804-12.
- St John, M. A., W. Tao, X. Fei, R. Fukumoto, M. L. Carcangiu, D. G. Brownstein, A. F. Parlow, J. McGrath, and T. Xu. 1999. 'Mice deficient of Lats1 develop soft-tissue sarcomas, ovarian tumours and pituitary dysfunction', *Nat Genet*, 21: 182-6.
- Stanley, E. L., D. S. Johnston, J. Fan, V. Papadopoulos, H. Chen, R. S. Ge, B. R. Zirkin, and S. A. Jelinsky. 2011. 'Stem Leydig cell differentiation: gene expression during development of the adult rat population of Leydig cells', *Biol Reprod*, 85: 1161-6.
- Steffensen, C., A. M. Bak, K. Z. Rubeck, and J. O. Jorgensen. 2010. 'Epidemiology of Cushing's syndrome', *Neuroendocrinology*, 92 Suppl 1: 1-5.
- Stocco, D. M. 2001. 'StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis', *Annu Rev Physiol*, 63: 193-213.
- Sudol, M. 1994. 'Yes-associated protein (YAP65) is a proline-rich phosphoprotein that binds to the SH3 domain of the Yes proto-oncogene product', *Oncogene*, 9: 2145-52.
- Sudol, M., P. Bork, A. Einbond, K. Kastury, T. Druck, M. Negrini, K. Huebner, and D. Lehman. 1995. 'Characterization of the mammalian YAP (Yes-associated protein) gene and its role in defining a novel protein module, the WW domain', *J Biol Chem*, 270: 14733-41.
- Sugawara, T., M. Saito, and S. Fujimoto. 2000. 'Sp1 and SF-1 interact and cooperate in the regulation of human steroidogenic acute regulatory protein gene expression', *Endocrinology*, 141: 2895-903.
- Sun, S., B. V. Reddy, and K. D. Irvine. 2015. 'Localization of Hippo signalling complexes and Warts activation in vivo', *Nat Commun*, 6: 8402.
- Suzuki, T., M. Kasahara, H. Yoshioka, K. Morohashi, and K. Umesono. 2003. 'LXXLL-related motifs in Dax-1 have target specificity for the orphan nuclear receptors Ad4BP/SF-1 and LRH-1', *Mol Cell Biol*, 23: 238-49.
- Svingen, T., and P. Koopman. 2013. 'Building the mammalian testis: origins, differentiation, and assembly of the component cell populations', *Genes Dev*, 27: 2409-26.
- Swarnakar, S., R. E. Temel, M. A. Connelly, S. Azhar, and D. L. Williams. 1999. 'Scavenger receptor class B, type I, mediates selective uptake of low density lipoprotein cholesteryl ester', *J Biol Chem*, 274: 29733-9.

- Tan, K. A., K. De Gendt, N. Atanassova, M. Walker, R. M. Sharpe, P. T. Saunders, E. Denolet, and G. Verhoeven. 2005. 'The role of androgens in sertoli cell proliferation and functional maturation: studies in mice with total or Sertoli cell-selective ablation of the androgen receptor', *Endocrinology*, 146: 2674-83.
- Tang, H., J. Brennan, J. Karl, Y. Hamada, L. Raetzman, and B. Capel. 2008. 'Notch signaling maintains Leydig progenitor cells in the mouse testis', *Development*, 135: 3745-53.
- Tapon, N., K. F. Harvey, D. W. Bell, D. C. Wahrer, T. A. Schiripo, D. Haber, and I. K. Hariharan. 2002. 'salvador Promotes both cell cycle exit and apoptosis in Drosophila and is mutated in human cancer cell lines', *Cell*, 110: 467-78.
- Tasken, K., and E. M. Aandahl. 2004. 'Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A', *Physiol Rev*, 84: 137-67.
- Tena-Sempere, M., F. P. Zhang, and I. Huhtaniemi. 1994. 'Persistent expression of a truncated form of the luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid in the rat testis after selective Leydig cell destruction by ethylene dimethane sulfonate', *Endocrinology*, 135: 1018-24.
- Tevosian, S. G., K. H. Albrecht, J. D. Crispino, Y. Fujiwara, E. M. Eicher, and S. H. Orkin. 2002. 'Gonadal differentiation, sex determination and normal Sry expression in mice require direct interaction between transcription partners GATA4 and FOG2', *Development*, 129: 4627-34.
- Tevosian, S. G., E. Jimenez, H. M. Hatch, T. Jiang, D. A. Morse, S. C. Fox, and M. B. Padua. 2015. 'Adrenal Development in Mice Requires GATA4 and GATA6 Transcription Factors', *Endocrinology*, 156: 2503-17.
- Thomas, M., M. Keramidas, E. Monchaux, and J. J. Feige. 2004. 'Dual hormonal regulation of endocrine tissue mass and vasculature by adrenocorticotropin in the adrenal cortex', *Endocrinology*, 145: 4320-9.
- Toth, I. E., K. S. Szalay, D. Szabo, and J. Pill. 1990. 'Effect of a cholesterol synthesis inhibitor (BM 15.766) in the presence and absence of HDL on corticosteroidogenesis of isolated zona glomerulosa and fasciculata cells', *J Steroid Biochem Mol Biol*, 37: 687-91.
- Trejter, M., K. Jopek, P. Celichowski, M. Tyczewska, L. K. Malendowicz, and M. Rucinski. 2015. 'Expression of estrogen, estrogen related and androgen receptors in adrenal cortex of intact adult male and female rats', *Folia Histochem Cytobiol*, 53: 133-44.

- Tremblay, J. J. 2015. 'Molecular regulation of steroidogenesis in endocrine Leydig cells', *Steroids*, 103: 3-10.
- Tremblay, J. J., and R. S. Viger. 2001. 'GATA factors differentially activate multiple gonadal promoters through conserved GATA regulatory elements', *Endocrinology*, 142: 977-86.
- . 2003. 'Transcription factor GATA-4 is activated by phosphorylation of serine 261 via the cAMP/protein kinase a signaling pathway in gonadal cells', *J Biol Chem*, 278: 22128-35.
- Tsai, L. C., and J. A. Beavo. 2011. 'The roles of cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs) in steroidogenesis', *Curr Opin Pharmacol*, 11: 670-5.
- Tsai, L. C., M. Shimizu-Albergine, and J. A. Beavo. 2011. 'The high-affinity cAMP-specific phosphodiesterase 8B controls steroidogenesis in the mouse adrenal gland', *Mol Pharmacol*, 79: 639-48.
- Tsoi M., Paquet M., Boerboom D. 2017. "LATS1 and -2 are required for granulosa cell fate maintenance." In *10ème symposium annuel du Réseau Québécois en Reproduction*, 86. Saint-Hyacinthe.
- Tu, L. N., A. H. Zhao, D. M. Stocco, and V. Selvaraj. 2015. 'PK11195 effect on steroidogenesis is not mediated through the translocator protein (TSPO)', *Endocrinology*, 156: 1033-9.
- Udan, R. S., M. Kango-Singh, R. Nolo, C. Tao, and G. Halder. 2003. 'Hippo promotes proliferation arrest and apoptosis in the Salvador/Warts pathway', *Nat Cell Biol*, 5: 914-20.
- Uyanik, G., L. Aigner, P. Martin, C. Gross, D. Neumann, H. Marschner-Schafer, U. Hehr, and J. Winkler. 2003. 'ARX mutations in X-linked lissencephaly with abnormal genitalia', *Neurology*, 61: 232-5.
- Val, P., A. M. Lefrancois-Martinez, G. Veyssiere, and A. Martinez. 2003. 'SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues', *Nucl Recept*, 1: 8.
- Val, P., J. P. Martinez-Barbera, and A. Swain. 2007. 'Adrenal development is initiated by Cited2 and Wt1 through modulation of Sf-1 dosage', *Development*, 134: 2349-58.
- van den Driesche, S., M. Walker, C. McKinnell, H. M. Scott, S. L. Eddie, R. T. Mitchell, J. R. Seckl, A. J. Drake, L. B. Smith, R. A. Anderson, and R. M. Sharpe. 2012. 'Proposed

- role for COUP-TFII in regulating fetal Leydig cell steroidogenesis, perturbation of which leads to masculinization disorders in rodents', *PLoS One*, 7: e37064.
- VanSchouwen, B., R. Selvaratnam, R. Giri, R. Lorenz, F. W. Herberg, C. Kim, and G. Melacini. 2015. 'Mechanism of cAMP Partial Agonism in Protein Kinase G (PKG)', *J Biol Chem*, 290: 28631-41.
- Varelas, X. 2014. 'The Hippo pathway effectors TAZ and YAP in development, homeostasis and disease', *Development*, 141: 1614-26.
- Varelas, X., B. W. Miller, R. Sopko, S. Song, A. Gregorieff, F. A. Fellouse, R. Sakuma, T. Pawson, W. Hunziker, H. McNeill, J. L. Wrana, and L. Attisano. 2010. 'The Hippo pathway regulates Wnt/beta-catenin signaling', *Dev Cell*, 18: 579-91.
- Varelas, X., R. Sakuma, P. Samavarchi-Tehrani, R. Peerani, B. M. Rao, J. Dembowy, M. B. Yaffe, P. W. Zandstra, and J. L. Wrana. 2008. 'TAZ controls Smad nucleocytoplasmic shuttling and regulates human embryonic stem-cell self-renewal', *Nat Cell Biol*, 10: 837-48.
- Varelas, X., P. Samavarchi-Tehrani, M. Narimatsu, A. Weiss, K. Cockburn, B. G. Larsen, J. Rossant, and J. L. Wrana. 2010. 'The Crumbs complex couples cell density sensing to Hippo-dependent control of the TGF-beta-SMAD pathway', *Dev Cell*, 19: 831-44.
- Vasta, V., M. Shimizu-Albergine, and J. A. Beavo. 2006. 'Modulation of Leydig cell function by cyclic nucleotide phosphodiesterase 8A', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 19925-30.
- Venugopal, S., D. B. Martinez-Arguelles, S. Chebbi, F. Hullin-Matsuda, T. Kobayashi, and V. Papadopoulos. 2016. 'Plasma Membrane Origin of the Steroidogenic Pool of Cholesterol Used in Hormone-induced Acute Steroid Formation in Leydig Cells', *J Biol Chem*, 291: 26109-25.
- Verhoeven, G., and J. Cailleau. 1988. 'Follicle-stimulating hormone and androgens increase the concentration of the androgen receptor in Sertoli cells', *Endocrinology*, 122: 1541-50.
- Vidal, V. P., M. C. Chaboissier, D. G. de Rooij, and A. Schedl. 2001. 'Sox9 induces testis development in XX transgenic mice', *Nat Genet*, 28: 216-7.
- Vidal, V., S. Sacco, A. S. Rocha, F. da Silva, C. Panzolini, T. Dumontet, T. M. Doan, J. Shan, A. Rak-Raszewska, T. Bird, S. Vainio, A. Martinez, and A. Schedl. 2016. 'The adrenal

- capsule is a signaling center controlling cell renewal and zonation through Rspo3', *Genes Dev*, 30: 1389-94.
- Viger, R. S., and B. Robaire. 1995. 'Steady state steroid 5 alpha-reductase messenger ribonucleic acid levels and immunocytochemical localization of the type 1 protein in the rat testis during postnatal development', *Endocrinology*, 136: 5409-15.
- Vigneron, A. M., R. L. Ludwig, and K. H. Vousden. 2010. 'Cytoplasmic ASPP1 inhibits apoptosis through the control of YAP', *Genes Dev*, 24: 2430-9.
- Vilain, E., W. Guo, Y. H. Zhang, and E. R. McCabe. 1997. 'DAX1 gene expression upregulated by steroidogenic factor 1 in an adrenocortical carcinoma cell line', *Biochem Mol Med*, 61: 1-8.
- Volle, D. H., R. Duggavathi, B. C. Magnier, S. M. Houten, C. L. Cummins, J. M. Lobaccaro, G. Verhoeven, K. Schoonjans, and J. Auwerx. 2007. 'The small heterodimer partner is a gonadal gatekeeper of sexual maturation in male mice', *Genes Dev*, 21: 303-15.
- Wagner, T., J. Wirth, J. Meyer, B. Zabel, M. Held, J. Zimmer, J. Pasantes, F. D. Bricarelli, J. Keutel, E. Hustert, U. Wolf, N. Tommerup, W. Schempp, and G. Scherer. 1994. 'Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9', *Cell*, 79: 1111-20.
- Walczak, E. M., R. Kuick, I. Finco, N. Bohin, S. M. Hrycaj, D. M. Wellik, and G. D. Hammer. 2014. 'Wnt signaling inhibits adrenal steroidogenesis by cell-autonomous and non-cell-autonomous mechanisms', *Mol Endocrinol*, 28: 1471-86.
- Wang, C., X. Zhu, W. Feng, Y. Yu, K. Jeong, W. Guo, Y. Lu, and G. B. Mills. 2016. 'Verteporfin inhibits YAP function through up-regulating 14-3-3sigma sequestering YAP in the cytoplasm', *Am J Cancer Res*, 6: 27-37.
- Wang, G. M., R. S. Ge, S. A. Latif, D. J. Morris, and M. P. Hardy. 2002. 'Expression of 11beta-hydroxylase in rat Leydig cells', *Endocrinology*, 143: 621-6.
- Wang, G. M., P. J. O'Shaughnessy, C. Chubb, B. Robaire, and M. P. Hardy. 2003. 'Effects of insulin-like growth factor I on steroidogenic enzyme expression levels in mouse leydig cells', *Endocrinology*, 144: 5058-64.
- Wang, R. S., S. Yeh, C. R. Tzeng, and C. Chang. 2009. 'Androgen receptor roles in spermatogenesis and fertility: lessons from testicular cell-specific androgen receptor knockout mice', *Endocr Rev*, 30: 119-32.

- Wang, W., J. Huang, and J. Chen. 2011. 'Angiotensin-like proteins associate with and negatively regulate YAP1', *J Biol Chem*, 286: 4364-70.
- Wang, X., P. Zou, Y. He, K. Meng, F. Quan, and Y. Zhang. 2018. 'Effect of luteinizing hormone on goat theca cell apoptosis and steroidogenesis through activation of the PI3K/AKT pathway', *Anim Reprod Sci*, 190: 108-18.
- Wang, Z. X., N. G. Wreford, and D. M. De Kretser. 1989. 'Determination of Sertoli cell numbers in the developing rat testis by stereological methods', *Int J Androl*, 12: 58-64.
- Wilhelm, D., and C. Englert. 2002. 'The Wilms tumor suppressor WT1 regulates early gonad development by activation of Sfl1', *Genes Dev*, 16: 1839-51.
- Wilhelm, D., J. X. Yang, and P. Thomas. 2013. 'Mammalian sex determination and gonad development', *Curr Top Dev Biol*, 106: 89-121.
- Willems, A., K. De Gendt, J. Allemeersch, L. B. Smith, M. Welsh, J. V. Swinnen, and G. Verhoeven. 2010. 'Early effects of Sertoli cell-selective androgen receptor ablation on testicular gene expression', *Int J Androl*, 33: 507-17.
- Wong, W., and J. D. Scott. 2004. 'AKAP signalling complexes: focal points in space and time', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5: 959-70.
- Wood, M. A., A. Acharya, I. Finco, J. M. Swonger, M. J. Elston, M. D. Tallquist, and G. D. Hammer. 2013. 'Fetal adrenal capsular cells serve as progenitor cells for steroidogenic and stromal adrenocortical cell lineages in *M. musculus*', *Development*, 140: 4522-32.
- Wootton-Kee, C. R., and B. J. Clark. 2000. 'Steroidogenic factor-1 influences protein-deoxyribonucleic acid interactions within the cyclic adenosine 3,5-monophosphate-responsive regions of the murine steroidogenic acute regulatory protein gene', *Endocrinology*, 141: 1345-55.
- Wu, S., J. Huang, J. Dong, and D. Pan. 2003. 'hippo encodes a Ste-20 family protein kinase that restricts cell proliferation and promotes apoptosis in conjunction with salvador and warts', *Cell*, 114: 445-56.
- Wu, S., Y. Liu, Y. Zheng, J. Dong, and D. Pan. 2008. 'The TEAD/TEF family protein Scalloped mediates transcriptional output of the Hippo growth-regulatory pathway', *Dev Cell*, 14: 388-98.
- Xin, M., Y. Kim, L. B. Sutherland, X. Qi, J. McAnally, R. J. Schwartz, J. A. Richardson, R. Bassel-Duby, and E. N. Olson. 2011. 'Regulation of insulin-like growth factor

- signaling by Yap governs cardiomyocyte proliferation and embryonic heart size', *Sci Signal*, 4: ra70.
- Xing, Y., A. M. Lerario, W. Rainey, and G. D. Hammer. 2015. 'Development of adrenal cortex zonation', *Endocrinol Metab Clin North Am*, 44: 243-74.
- Xing, Y., K. I. Morohashi, H. A. Ingraham, and G. D. Hammer. 2017. 'Timing of adrenal regression controlled by synergistic interaction between Sfl SUMOylation and Dax1', *Development*, 144: 3798-807.
- Xing, Y., C. R. Parker, M. Edwards, and W. E. Rainey. 2010. 'ACTH is a potent regulator of gene expression in human adrenal cells', *J Mol Endocrinol*, 45: 59-68.
- Xu, T., W. Wang, S. Zhang, R. A. Stewart, and W. Yu. 1995. 'Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the *Drosophila* *lats* gene encodes a putative protein kinase', *Development*, 121: 1053-63.
- Yabuta, N., N. Okada, A. Ito, T. Hosomi, S. Nishihara, Y. Sasayama, A. Fujimori, D. Okuzaki, H. Zhao, M. Ikawa, M. Okabe, and H. Nojima. 2007. 'Lats2 is an essential mitotic regulator required for the coordination of cell division', *J Biol Chem*, 282: 19259-71.
- Yamauchi, Y., K. Abe, A. Mantani, Y. Hitoshi, M. Suzuki, F. Osuzu, S. Kuratani, and K. Yamamura. 1999. 'A novel transgenic technique that allows specific marking of the neural crest cell lineage in mice', *Dev Biol*, 212: 191-203.
- Yanes, L. L., and D. G. Romero. 2009. 'Dihydrotestosterone stimulates aldosterone secretion by H295R human adrenocortical cells', *Mol Cell Endocrinol*, 303: 50-6.
- Yang-Snyder, J., J. R. Miller, J. D. Brown, C. J. Lai, and R. T. Moon. 1996. 'A frizzled homolog functions in a vertebrate Wnt signaling pathway', *Curr Biol*, 6: 1302-6.
- Yang, Y., Z. Li, X. Wu, H. Chen, W. Xu, Q. Xiang, Q. Zhang, J. Chen, R. S. Ge, Z. Su, and Y. Huang. 2017. 'Direct Reprogramming of Mouse Fibroblasts toward Leydig-like Cells by Defined Factors', *Stem Cell Reports*, 8: 39-53.
- Yao, H. H., W. Whoriskey, and B. Capel. 2002. 'Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis', *Genes Dev*, 16: 1433-40.
- Yates, R., H. Katugampola, D. Cavlan, K. Cogger, E. Meimaridou, C. Hughes, L. Metherell, L. Guasti, and P. King. 2013. 'Adrenocortical development, maintenance, and disease', *Curr Top Dev Biol*, 106: 239-312.

- Ye, F., and M. Zhang. 2013. 'Structures and target recognition modes of PDZ domains: recurring themes and emerging pictures', *Biochem J*, 455: 1-14.
- Ye, L., X. Li, L. Li, H. Chen, and R. S. Ge. 2017. 'Insights into the Development of the Adult Leydig Cell Lineage from Stem Leydig Cells', *Front Physiol*, 8: 430.
- Yi, J., L. Lu, K. Yanger, W. Wang, B. H. Sohn, B. Z. Stanger, M. Zhang, J. F. Martin, J. A. Ajani, J. Chen, J. S. Lee, S. Song, and R. L. Johnson. 2016. 'Large tumor suppressor homologs 1 and 2 regulate mouse liver progenitor cell proliferation and maturation through antagonism of the coactivators YAP and TAZ', *Hepatology*, 64: 1757-72.
- Yin, F., J. Yu, Y. Zheng, Q. Chen, N. Zhang, and D. Pan. 2013. 'Spatial organization of Hippo signaling at the plasma membrane mediated by the tumor suppressor Merlin/NF2', *Cell*, 154: 1342-55.
- Yoo, G., T. Kim, C. Chung, D. S. Hwang, and D. S. Lim. 2017. 'The novel YAP target gene, SGK1, upregulates TAZ activity by blocking GSK3beta-mediated TAZ destabilization', *Biochem Biophys Res Commun*, 490: 650-56.
- Yu, F. X., and K. L. Guan. 2013. 'The Hippo pathway: regulators and regulations', *Genes Dev*, 27: 355-71.
- Yu, F. X., Y. Zhang, H. W. Park, J. L. Jewell, Q. Chen, Y. Deng, D. Pan, S. S. Taylor, Z. C. Lai, and K. L. Guan. 2013. 'Protein kinase A activates the Hippo pathway to modulate cell proliferation and differentiation', *Genes Dev*, 27: 1223-32.
- Yu, F. X., B. Zhao, N. Panupinthu, J. L. Jewell, I. Lian, L. H. Wang, J. Zhao, H. Yuan, K. Tumaneng, H. Li, X. D. Fu, G. B. Mills, and K. L. Guan. 2012. 'Regulation of the Hippo-YAP pathway by G-protein-coupled receptor signaling', *Cell*, 150: 780-91.
- Yu, J., Y. Zheng, J. Dong, S. Klusza, W. M. Deng, and D. Pan. 2010. 'Kibra functions as a tumor suppressor protein that regulates Hippo signaling in conjunction with Merlin and Expanded', *Dev Cell*, 18: 288-99.
- Yuen, H. F., C. M. McCrudden, Y. H. Huang, J. M. Tham, X. Zhang, Q. Zeng, S. D. Zhang, and W. Hong. 2013. 'TAZ expression as a prognostic indicator in colorectal cancer', *PLoS One*, 8: e54211.
- Zaidi, S. K., A. J. Sullivan, R. Medina, Y. Ito, A. J. van Wijnen, J. L. Stein, J. B. Lian, and G. S. Stein. 2004. 'Tyrosine phosphorylation controls Runx2-mediated subnuclear targeting of YAP to repress transcription', *EMBO J*, 23: 790-9.

- Zazopoulos, E., E. Lalli, D. M. Stocco, and P. Sassone-Corsi. 1997. 'DNA binding and transcriptional repression by DAX-1 blocks steroidogenesis', *Nature*, 390: 311-5.
- Zhang, F. P., T. Pakarainen, F. Zhu, M. Poutanen, and I. Huhtaniemi. 2004. 'Molecular characterization of postnatal development of testicular steroidogenesis in luteinizing hormone receptor knockout mice', *Endocrinology*, 145: 1453-63.
- Zhang, F. P., M. Poutanen, J. Wilbertz, and I. Huhtaniemi. 2001. 'Normal prenatal but arrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) mice', *Mol Endocrinol*, 15: 172-83.
- Zhang, H., C. Y. Liu, Z. Y. Zha, B. Zhao, J. Yao, S. Zhao, Y. Xiong, Q. Y. Lei, and K. L. Guan. 2009. 'TEAD transcription factors mediate the function of TAZ in cell growth and epithelial-mesenchymal transition', *J Biol Chem*, 284: 13355-62.
- Zhang, J., C. H. Wong, W. Xia, D. D. Mruk, N. P. Lee, W. M. Lee, and C. Y. Cheng. 2005. 'Regulation of Sertoli-germ cell adherens junction dynamics via changes in protein-protein interactions of the N-cadherin-beta-catenin protein complex which are possibly mediated by c-Src and myotubularin-related protein 2: an in vivo study using an androgen suppression model', *Endocrinology*, 146: 1268-84.
- Zhang, W., Y. Gao, P. Li, Z. Shi, T. Guo, F. Li, X. Han, Y. Feng, C. Zheng, Z. Wang, F. Li, H. Chen, Z. Zhou, L. Zhang, and H. Ji. 2014. 'VGLL4 functions as a new tumor suppressor in lung cancer by negatively regulating the YAP-TEAD transcriptional complex', *Cell Res*, 24: 331-43.
- Zhang, X., J. George, S. Deb, J. L. Degoutin, E. A. Takano, S. B. Fox, D. D. Bowtell, and K. F. Harvey. 2011. 'The Hippo pathway transcriptional co-activator, YAP, is an ovarian cancer oncogene', *Oncogene*, 30: 2810-22.
- Zhang, Y., T. Wang, S. Wang, Y. Xiong, R. Zhang, X. Zhang, J. Zhao, A. G. Yang, L. Wang, and L. Jia. 2018. 'Nkx2-2as Suppression Contributes to the Pathogenesis of Sonic Hedgehog Medulloblastoma', *Cancer Res*, 78: 962-73.
- Zhao, B., J. Kim, X. Ye, Z. C. Lai, and K. L. Guan. 2009. 'Both TEAD-binding and WW domains are required for the growth stimulation and oncogenic transformation activity of yes-associated protein', *Cancer Res*, 69: 1089-98.
- Zhao, B., L. Li, Q. Lei, and K. L. Guan. 2010. 'The Hippo-YAP pathway in organ size control and tumorigenesis: an updated version', *Genes Dev*, 24: 862-74.

- Zhao, B., L. Li, Q. Lu, L. H. Wang, C. Y. Liu, Q. Lei, and K. L. Guan. 2011. 'Angiomotin is a novel Hippo pathway component that inhibits YAP oncoprotein', *Genes Dev*, 25: 51-63.
- Zhao, B., L. Li, K. Tumaneng, C. Y. Wang, and K. L. Guan. 2010. 'A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF(beta-TRCP)', *Genes Dev*, 24: 72-85.
- Zhao, B., L. Li, L. Wang, C. Y. Wang, J. Yu, and K. L. Guan. 2012. 'Cell detachment activates the Hippo pathway via cytoskeleton reorganization to induce anoikis', *Genes Dev*, 26: 54-68.
- Zhao, B., X. Wei, W. Li, R. S. Udan, Q. Yang, J. Kim, J. Xie, T. Ikenoue, J. Yu, L. Li, P. Zheng, K. Ye, A. Chinnaiyan, G. Halder, Z. C. Lai, and K. L. Guan. 2007. 'Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control', *Genes Dev*, 21: 2747-61.
- Zhao, B., X. Ye, J. Yu, L. Li, W. Li, S. Li, J. Yu, J. D. Lin, C. Y. Wang, A. M. Chinnaiyan, Z. C. Lai, and K. L. Guan. 2008. 'TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control', *Genes Dev*, 22: 1962-71.
- Zhong, W., Y. Li, L. Li, W. Zhang, S. Wang, and X. Zheng. 2013. 'YAP-mediated regulation of the chondrogenic phenotype in response to matrix elasticity', *J Mol Histol*, 44: 587-95.
- Zhou, D., C. Conrad, F. Xia, J. S. Park, B. Payer, Y. Yin, G. Y. Lauwers, W. Thasler, J. T. Lee, J. Avruch, and N. Bardeesy. 2009. 'Mst1 and Mst2 maintain hepatocyte quiescence and suppress hepatocellular carcinoma development through inactivation of the Yap1 oncogene', *Cancer Cell*, 16: 425-38.
- Zirkin, B. R., and V. Papadopoulos. 2018. 'Leydig cells: formation, function, and regulation', *Biol Reprod*, 99: 101-11.
- Zubair, M., S. Ishihara, S. Oka, K. Okumura, and K. Morohashi. 2006. '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*, 26: 4111-21.

Zubair, M., K. L. Parker, and K. Morohashi. 2008. 'Developmental links between the fetal and adult zones of the adrenal cortex revealed by lineage tracing', *Mol Cell Biol*, 28: 7030-40.