



**HAL**  
open science

# Rôle de la signalisation Rspodin dans le développement et l'homéostasie de la glande surrénale

Sonia Sacco

## ► To cite this version:

Sonia Sacco. Rôle de la signalisation Rspodin dans le développement et l'homéostasie de la glande surrénale. Sciences agricoles. Université Côte d'Azur, 2016. Français. NNT : 2016AZUR4125 . tel-01493113

**HAL Id: tel-01493113**

**<https://theses.hal.science/tel-01493113>**

Submitted on 21 Mar 2017

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

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

**UNIVERSITE DE NICE SOPHIA-ANTIPOLIS UFR SCIENCES**

**Ecole doctorale de Sciences de la Vie et de la Santé**

# **THESE**

**Pour obtenir le titre de**

**Docteur en Sciences de l'Université de Nice Sophia-Antipolis**

**Mention : Interactions moléculaires et cellulaires**

**Présentée et soutenue par**

**SACCO Sonia**

**Le 16 décembre 2016**

**Rôle de la signalisation Rspodin dans le  
développement et l'homéostasie de la  
glande surrénale.**

## **COMPOSITION DU JURY**

Prof. LAMONERIE Thomas	Prof. Uni. Nice Sophia-Antipolis	Président
Dr. SCHEDL Andreas	Directeur de Recherche	Directeur de Thèse
Dr RAGAZZON Bruno	Chargé de recherche	Rapporteur
Dr. LE GRAND Fabien	Chargé de recherche	Rapporteur
Dr. NEF Serge	Prof. Uni. Genève	Examineur



# Sommaire

Résumé.....	6
Introduction.....	9
Partie1 : Les voies de signalisation .....	11
I.    Voie de signalisation SONIC HEDGEH.....	12
II.   Voie de signalisation WNT/B-CATENINE.....	14
III.  Les protéines R-SPONDIN.....	17
1. Généralités.....	17
2. Mode d'action des protéines R-SPONDIN.....	18
3. Rôle des protéines R-SPONDIN.....	19
a. RSPO1.....	19
b. RSPO2.....	19
c. RSPO3.....	20
d. RSPO4.....	20
Partie 2 : La glande surrénale.....	21
I.    Généralités.....	22
1. La médullo-surrénale.....	23
2. La corticosurrénale.....	24
2.1 La zone glomérulée.....	25
2.2 La zone fasciculée.....	27
2.3 La zone réticulée.....	29
2.4 La capsule.....	29
II.   La stéroïdogénèse.....	30
III.  Développement embryonnaire.....	32

1. Facteurs impliqués dans le développement de la glande surrénale.....	33
2. Mise en place embryonnaire des glandes surrénales Papier 1 : review Stéroidogenic organ development and homeostasis : A WT1 centric view.....	35
IV. Homéostasie.....	47
V. Zonation.....	51
<b>Objectifs.....</b>	<b>53</b>
<b>Résultats .....</b>	<b>55</b>
<b>Partie 1 : Papier 2</b>	
The adrenal capsule is a signaling center controlling cell renewal and zonation throught <i>Rspo3</i> .....	56
<b>Partie 2 : Etude du gain de fonction <i>Rspo1</i>.....</b>	<b>70</b>
I. Matériels et méthodes.....	72
II. Résultats.....	75
III. Discussion.....	88
<b>Conclusion.....</b>	<b>93</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>96</b>
<b>Remerciements.....</b>	<b>101</b>

# Résumé

# Rôle de la signalisation Rspodin dans le développement et l'homéostasie de la glande surrénale.

La glande surrénale est un organe endocrinien d'une importance vitale de par son rôle dans le maintien de l'homéostasie corporelle (régulation de la pression sanguine, de l'équilibre hydro-sodée, ...). Pour assurer cette fonction, le cortex surrénalien est divisé en différentes zones qui produisent des hormones spécifiques. Les mécanismes de la mise en place de cette zonation au niveau embryonnaire ainsi que de son maintien tout au long de vie sont encore inconnus de nos jours.

Ce travail de thèse s'intéresse au rôle que jouent les gènes de la famille R-spodin dans ces mécanismes. Il démontre d'abord que parmi les 4 gènes de cette famille (*Rspo1* à 4), seuls les gènes *Rspo1* et 3 sont exprimés dans la glande surrénale et ce au cours du développement embryonnaire et de la vie adulte. Ils sont exprimés de manière très spécifique au niveau de la capsule et codent pour des protéines secrétées qui agissent sur les cellules adjacentes de la zone glomérulée afin d'induire l'activation de la voie canonique Wnt/ $\beta$ -caténine.

La délétion du gène *Rspo3* pendant le développement embryonnaire et au cours de la vie adulte, démontre que celui-ci est un acteur majeur de la zonation et de l'homéostasie surrénalienne. En effet l'absence de ce gène pendant le développement embryonnaire entraîne une absence de recrutement des cellules positives pour *Gli1* elle-même induites par l'expression de *Shh*. Il en résulte donc une absence de zonation. Sa fonction reste également essentielle au cours de la vie adulte puisqu'elle assure à la fois le recrutement des cellules nécessaires au remplacement de celles qui sont perdues et le maintien de la zone glomérulée.

L'absence du gène *Rspo1*, n'affecte pas le développement ni la zonation ou l'homéostasie de la glande surrénale. Par contre, si on l'exprime de façon ectopique dans tous le cortex surrénalien, entraînant une activation anormale de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans cette zone, on peut observer une hyperplasie des glandes surrénales. A partir de 1 an d'âge, cette hyperplasie surrénalienne entraîne une formation de tumeurs.

Ces phénomènes pourraient s'expliquer par un recrutement trop important de cellules progénitrices censées remplacer uniquement les cellules perdues.

Ce travail démontre donc que la capsule par le biais du gène *Rspo3* agit comme un centre de signalisation capable de contrôler à la fois l'homéostasie par le remplacement des cellules endommagées et le maintien de la zonation de la glande surrénale. L'expression du gène *Rspo1* bien que non essentielle au bon développement et à l'homéostasie de la glande surrénale doit être finement régulée puisqu'une activation anormale induit chez la souris des anomalies et pourrait être associée à des pathologies chez l'homme.

# **Introduction**

Bien que petites par leur taille, les glandes surrénales sont d'une importance capitale. Elles produisent en effet des hormones nécessaires au maintien de l'homéostasie physiologique. La synthèse de ces hormones se fait dans des zones spécialisées se mettant en place dès le développement embryonnaire. La quantité et la qualité des hormones produites doivent être finement contrôlées pour leur bon fonctionnement. Il est donc capital que la zonation et l'homéostasie de ces organes se mettent en place correctement et soient maintenues tout au long de la vie. Il a déjà été montré que les voies de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine et SHH sont impliquées dans ces processus. De plus, au sein du laboratoire il a été démontré au préalable que la protéine RSPO1 connue comme agoniste de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine était présente dans la capsule surrénalienne.

Ce travail de thèse se demande donc si les protéines R-SPONDIN sont des facteurs nécessaires à la mise en place de la zonation lors du développement embryonnaire. Participent-elles également à son maintien tout au long de la vie ?

Ont-elles un rôle dans la détermination de la taille des glandes surrénales ? Et qu'est-ce qui permet à cette taille de se maintenir ?

Cette introduction présentera donc dans un premier temps, les voies de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine et SHH ainsi que la famille des protéines R-spondin.

Ensuite, elle traitera la glande surrénale dans la globalité et nos connaissances actuelles concernant son développement, sa zonation et son homéostasie.

# Partie 1 :

## Les voies de signalisation

# I. Voie de signalisation *Sonic Hedgehog*

La voie de signalisation SHH joue un rôle crucial lors du développement embryonnaire et de l'homéostasie des tissus à l'âge adulte (Jiang and Hui, 2008). Les dysfonctionnements de cette voie de signalisation sont à l'origine de nombreuses maladies humaines et cancers. Le gène *Hh* a été identifié pour la première fois chez la drosophile (Nüsslein-Volhard and Wieschaus, 1980). Son nom lui provient de l'aspect de hérissons qu'ont les embryons de drosophiles Knock Out pour ce gène.

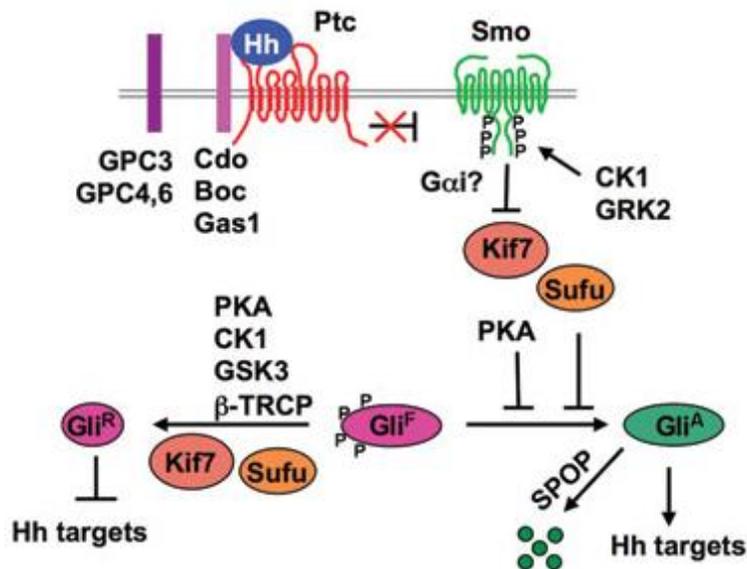
Il s'agit d'une protéine soluble sécrétée qui agit à distance. Lors du développement embryonnaire, elle joue le rôle d'un morphogène c'est-à-dire que le gradient de diffusion de la protéine sert à organiser et à polariser les tissus.

Les souris invalidées pour le gène *Shh* présentent de graves anomalies du développement embryonnaire (cyclopie, défaut dans la formation des membres, du système nerveux,...) démontrant l'importance de cette voie de signalisation (Chiang C. et al., 1996). Chez l'homme, une mutation du gène *Shh* conduit à l'holoprosencéphalie, une malformation cérébrale souvent liée à des anomalies faciales (Roessler et al., 1996).

SHH va agir comme un inhibiteur sur son récepteur PATCHED (PTC), une protéine à 12 segments transmembranaires (Ingham et al., 1991 ; Stone et al., 1996). Ptc inhibant lui-même la protéine SMOOTHENED (SMO), la liaison de SHH va entraîner une levée d'inhibition permettant ainsi sa phosphorylation par les protéines kinases CK1 et GRK2. SMO va alors s'accumuler dans le cil primaire et être activée (Denef et al., 2000). L'activation de SMO inhibe les protéines KIF7 et SUFU, elles même inhibant l'activation des protéines GLI (Svärd et al., 2006) (fig. 1).

Les protéines GLI sont des facteurs de transcription dont l'activité doit être finement régulée. En l'absence de SHH, elles sont clivées par le protéasome et la partie carboxy-terminale transloque dans le noyau où elle agit comme répresseur de la transcription, alors qu'en présence de SHH, la forme entière de GLI est stabilisée et va agir comme un activateur de transcription (Aza-Blanc et al., 1997, 2000) (fig.1).

La protéine GLI1 agit surtout comme activateur, alors que les protéines GLI2 et GLI3 ont une activité répressive forte. Les souris Knock-Out pour le gène *Gli1* se développent normalement alors que les souris Knock-out pour les gènes *Gli2* et *Gli3* présentent des anomalies majeures (Park et al., 2000). De plus, l'absence de *Gli1* aggrave le phénotype des souris knock-Out pour *Gli2*, montrant une redondance partielle de ces protéines (Park et al., 2000). Il semblerait que ces protéines agissent de manière combinée, mais que les combinaisons soit variables et dépendantes à la fois du contexte cellulaire et tissulaire et des espèces.



**Figure 1 : Voie de signalisation SHH chez les mammifères.** Adapté de (Chen and Jiang, 2013)

# II. Voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine

Il existe principalement deux types de voies de signalisation Wnt : La voie canonique et la voie non-canonique (fig.2).

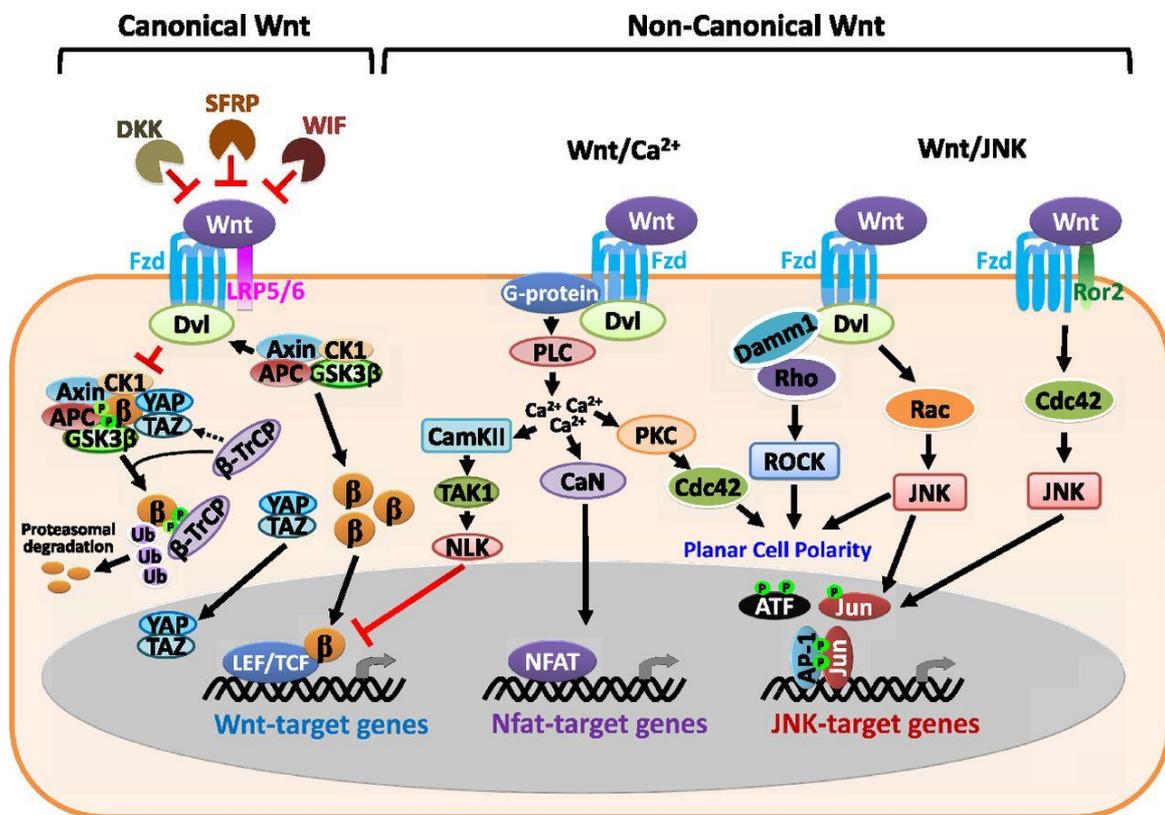


Figure 2 : Vue d'ensemble des voies canoniques et non-canoniques de WNT. (Lien and Fuchs, 2014)

La voie non-canonique comprend l'activation de la signalisation calcique qui aboutit à l'activation du facteur de transcription NFAT et la voie PCP (Planar cell Polarity) impliquant de petites GTPases et la protéine JNK.

La voie de signalisation canonique est cruciale pour l'embryogénèse puisqu'elle participe à la formation de la majorité des organes. Mais son rôle ne s'arrête pas au développement embryonnaire puisqu'il a été également démontré que cette voie de signalisation est déterminante pour l'activation et le renouvellement des cellules souches. Elle contribue donc au maintien de l'homéostasie tissulaire au cours de la vie adulte.

La principale caractéristique de la voie canonique est l'accumulation et la translocation de la protéine  $\beta$ -caténine dans le noyau. En absence du ligand WNT, la protéine  $\beta$ -caténine est séquestrée par un complexe protéique composé entre-autre par les protéines AXIN, GSK3 et APC. La protéine GSK3 phosphoryle alors la  $\beta$ -caténine sur des acides aminés sérines particuliers. Ces phosphorylations vont permettre à la protéine CK1 de reconnaître la  $\beta$ -caténine et d'entraîner son ubiquitinylation et sa dégradation par le protéasome.

En présence de WNT, celui-ci va aller se fixer à son récepteur FRIZZLED. La protéine FRIZZLED va alors pouvoir se fixer sur un autre récepteur LRP5/6. Cette interaction va entraîner le recrutement du complexe de dégradation de la  $\beta$ -caténine à la membrane. Il va donc libérer la  $\beta$ -caténine qui puisqu'elle n'est plus dégradée va s'accumuler dans le cytoplasme et migrer dans le noyau. A ce moment, elle pourra aller interagir avec ses cofacteurs TCF et LEF pour activer la transcription de gènes cibles (fig.3).

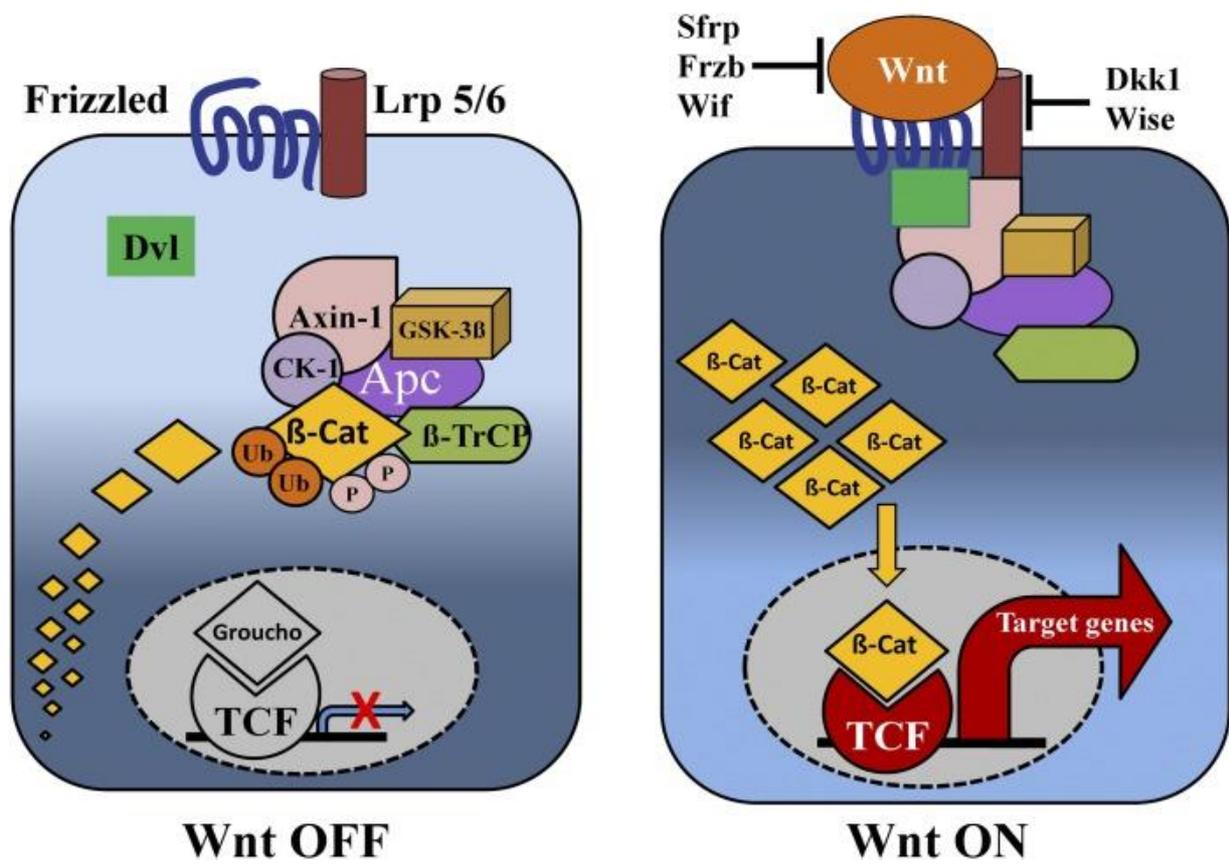


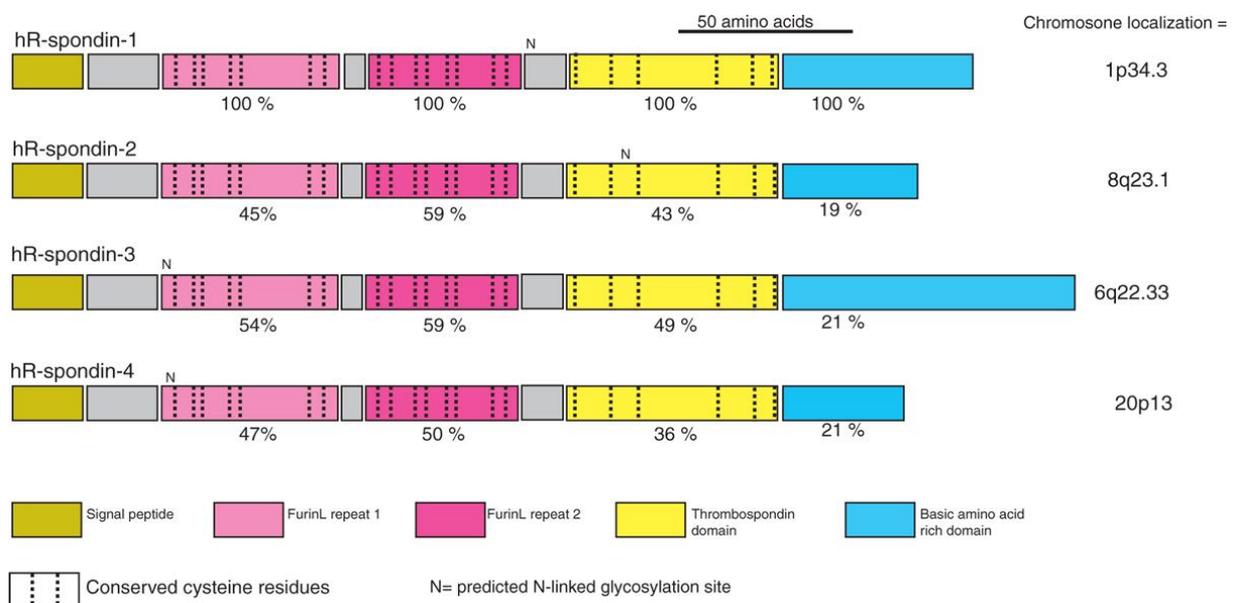
Figure 3 : Fonctionnement de la voie canonique Wnt/ $\beta$ -caténine. (de Lau et al., 2014)

# III. Les protéines R-spondin

## 1. Généralités

Les protéines R-spondin sont des membres de la superfamille de protéines TSR-1 pour *ThromboSpondin type 1 Repeat*. Le préfixe R provient du fait que la protéine murine soit exprimée au cours du développement embryonnaire dans le toit du tube neural (*Roof plate*). En plus du domaine TSR-1, ces protéines sont caractérisées par un domaine C-terminal chargé en acide aminés basiques et de 2 domaines furin-like riche en acide aminés Cystéines. Comme ce sont des protéines secrétées elles possèdent également un signal peptide.

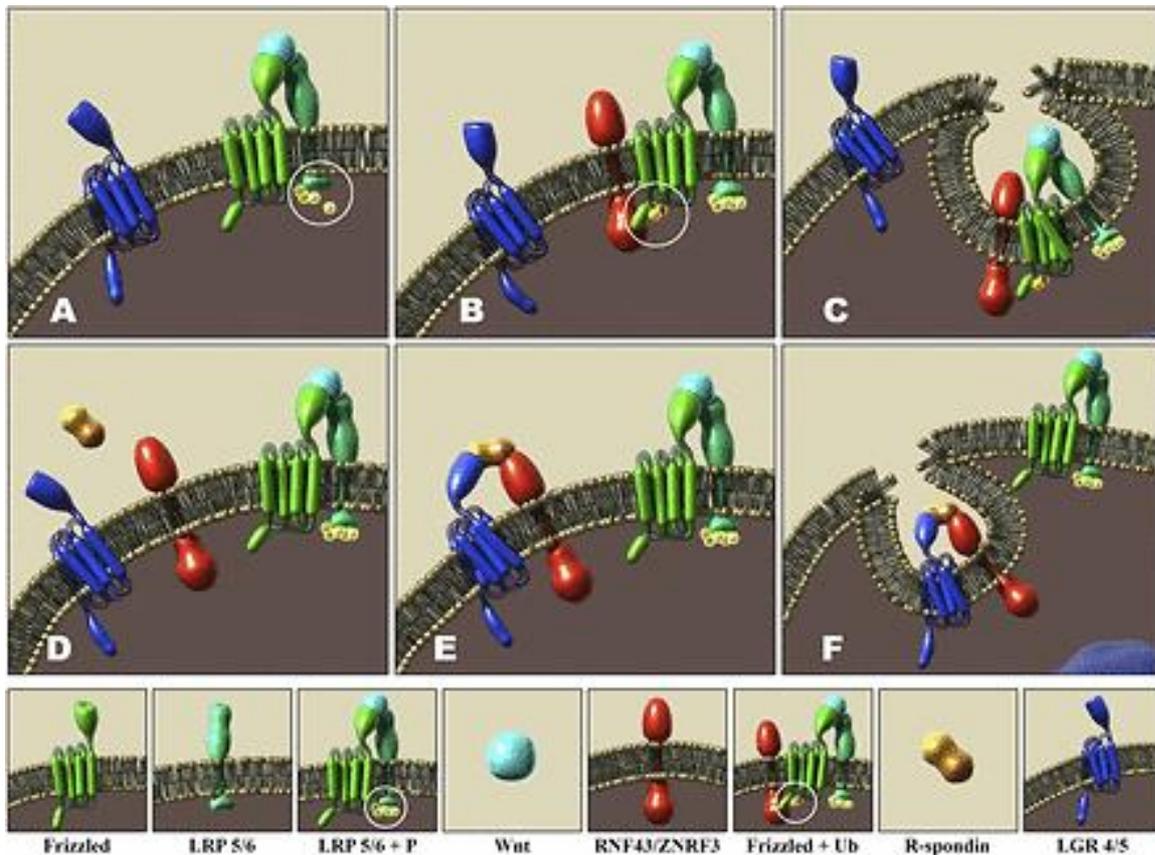
Il existe 4 membres dans la famille R-spondin : RSPO1 à RSPO4. Ces protéines sont hautement conservées au cours de l'évolution puisqu'on les retrouve chez tous les vertébrés ainsi que chez certains chordés primitifs, hémichordés et échinodermes.



**Figure 4 : Composition des protéines de la Famille R-spondin.** (de Lau et al., 2012)

## 2. Mode d'action des protéines R-spondin

Les protéines R-spondin sont des agonistes de la voie canonique Wnt/ $\beta$ -caténine et agissent de manière synergétique avec les protéines WNT. En effet, en l'absence de WNT et de R-spondin, il existe un système de rétroaction négative de la voie de signalisation due aux protéines ligase RNF43 et ZNRF3. Celles-ci vont associer leur domaine RING aux complexes FRIZZLED/LRP entraînant la poly-ubiquitination des domaines transmembranaires des protéines FRIZZLED et donc l'endocytose des complexes abrogeant ainsi l'activation de la voie de signalisation. Le mode d'action des R-spondin consiste à se fixer à leurs récepteurs qui sont les protéines de la famille LGR via leur domaine furin-like 2. Le domaine furin-like 1 va alors pouvoir interagir avec les protéines RNF43 et ZNRF3 entraînant leur exclusion de la membrane et empêchant ainsi le rétrocontrôle négatif de la voie (fig. 5).



**Figure 5 : Représentation schématique du mode d'action des protéines R-spondin sur la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine (de Lau et al., 2014)**

### 3. Rôle des protéines R-spondin

#### a. RSPO1 :

Chez l'Homme, les mutations du gène *RSPO1* sont responsables d'un syndrome extrêmement rare qui combine une réversion de sexe, une hyperkératose palmoplantaire (PKK) et une prédisposition au carcinome des cellules squameuse de la peau (SCC).

La PKK et le SCC pourraient s'expliquer par des niveaux réduits d'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans les kératinocytes. (Parma et al., 2006).

La réversion de sexe, serait due au fait que RSPO1 via la voie Wnt/ $\beta$ -caténine est nécessaire chez la femme pour le développement des ovaires. En effet, des études menées chez la souris femelle Knock-out pour le gène *Rspo1* montrent le développement de gonades masculinisées ou ovo-testis causé par un défaut d'activation de Wnt4 et par conséquent de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine (Chassot et al., 2008).

#### b. RSPO2 :

La protéine RSPO2 est exprimée dans les bourgeons des membres et des poumons au cours du développement embryonnaire (Nam et al., 2007). Les souris mutantes pour le gène *Rspo2* présentent un phénotype appelé « footless » en raison de l'absence de développement des membres. En effet l'absence de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine conduit à un défaut d'expression des facteurs de transcription FGF4 et FGF8 nécessaires au maintien de la crête apicale ectodermique (Nam et al., 2007b). Ces souris montrent également au niveau des poumons, une réduction du nombre de bronchioles.

Une étude menée sur des chiens domestiques montre une implication du gène *Rspo2* dans le recrutement du type de follicule pileux lors du développement (Cadieu et al., 2009).

### c. RSPO3 :

La protéine RSPO3 est exprimée très tôt au cours du développement embryonnaire puis qu'on la retrouve dans l'interface entre le chorion et l'allantoïde lors de la formation du placenta. Elle participe à la formation de celui-ci et notamment à la mise en place de la vascularisation. Les souris dont le gène *Rspo3* est inactivé meurent très tôt au cours du développement embryonnaire suite aux défauts de formation du placenta (Aoki et al., 2007) (Kazanskaya et al., 2008). Une inactivation ciblée au niveau du cœur entraîne une mortalité précoce suite à des défauts de formation du cœur (Cambier et al., 2014).

De plus, parmi les protéines R-spondin, RSPO3 est la seule à activer en plus de la voie canonique de Wnt, les voies non-canoniques. Chez le xénope, il a été démontré qu'elle pouvait activer le Syndecan (Ohkawara et al., 2011) et chez la souris la protéine RSPO3 endothéliale contrôle la stabilité et la taille de la vascularisation via la voie non canonique Wnt/Ca<sup>2+</sup>/NFAT (Scholz et al., 2016).

### d. RSPO4 :

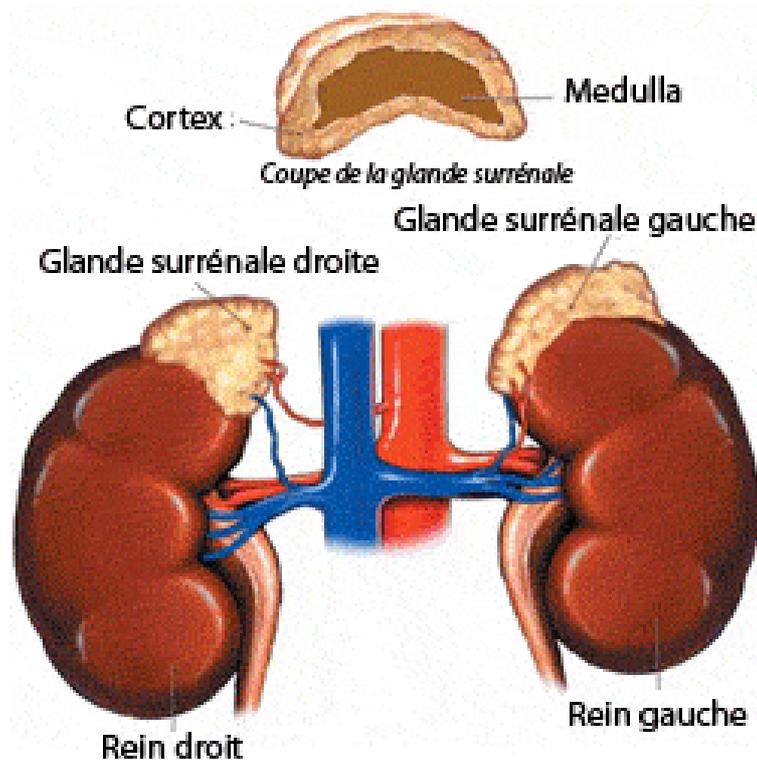
Des mutations du gène *RSPO4* provoquent un syndrome appelé anonychie qui se caractérise par l'absence d'ongle sur les doigts et les orteils (Bergmann et al., 2006).

# Partie 2 :

# La glande surrénale

# I. Généralités

Bien que les glandes surrénales aient été décrites pour la 1ère fois en 1563 par Eustache, leur importance vitale n'a été démontrée qu'au cours du 19<sup>e</sup> siècle par Brown-Séquard après une série d'adrénalectomies sur des chiens. Plus tard au cours de ce même siècle, les progrès en termes d'histochimie ont permis de révéler la présence de 2 parties bien distinctes au niveau cellulaire et fonctionnel : la corticosurrénale et la médullo-surrénale.



**Figure 6 : Représentation schématique de la localisation et de la structure des glandes surrénales.**

# 1. La médullo-surrénale :

Comme son nom l'indique, la médullo-surrénale est située au centre de la glande surrénale. Elle a pour fonction la synthèse des catécholamines telles que l'adrénaline et la noradrénaline en réponse à une stimulation du système nerveux sympathique. Celles-ci sont sécrétées en cas de stress ou lors d'une activité physique. Elles se fixent alors sur les récepteurs de types bêta et entraînent une hausse de la pression artérielle, une augmentation du rythme cardiaque et une dilatation des bronches et des pupilles.

L'origine embryonnaire des cellules chromaffines diffère de celle des cellules corticales. En effet, les cellules de la médulla ne proviennent pas du mésoderme intermédiaire mais sont dérivées de la crête neurale ectodermique. Au stade E10, un groupe de cellules de la crête neurale, va commencer à migrer et n'atteindra la future glande surrénale qu'au stade E12. Ces cellules envahissent alors le primordium adrénalien mais restent isolées les unes des autres. Elles ne se compacteront pour former la médulla qu'après la naissance (Anderson and Axel, 1986) (Anderson et al., 1991).

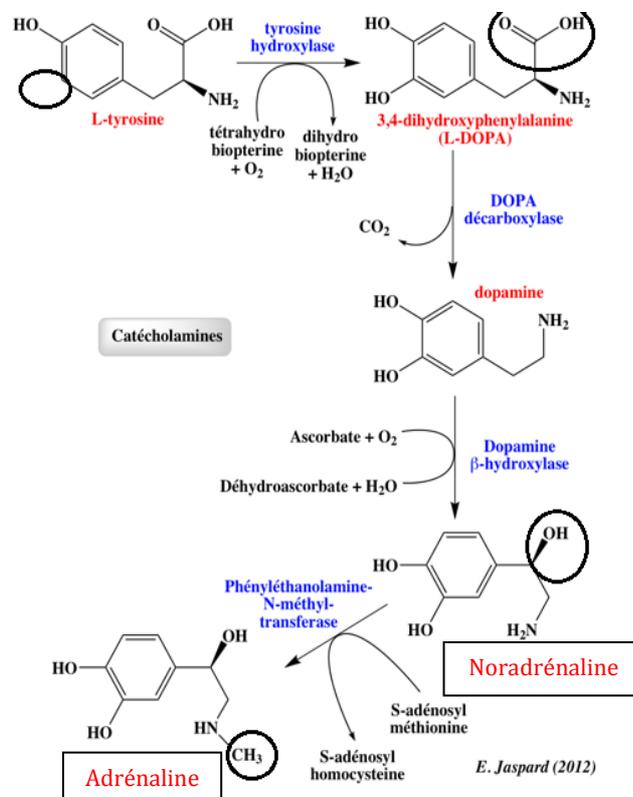
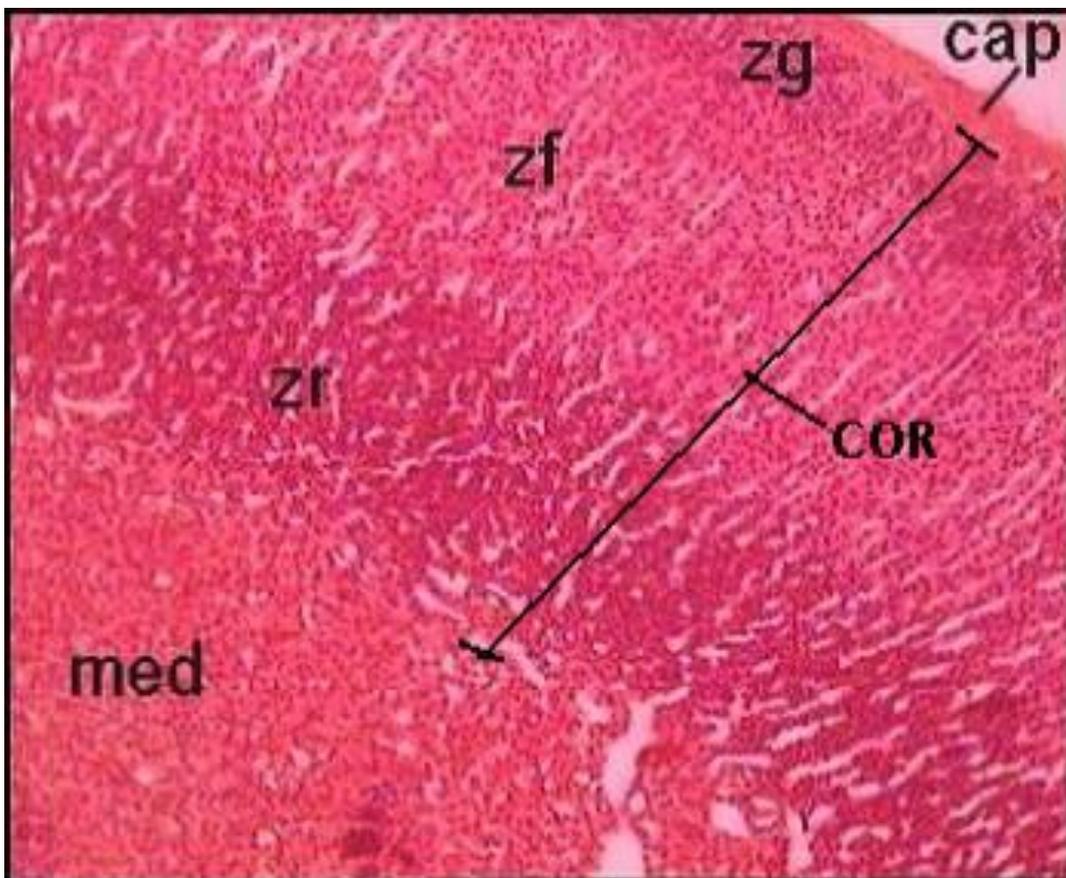


Figure 7 : Voie métabolique de synthèse des catécholamines dans la médullo-surrénale

## 2. La corticosurrénale

La glande corticosurrénale constitue la partie externe de la glande surrénale et représente environ 90% du volume total de l'organe. Elle assure la synthèse de stéroïdes dérivant du cholestérol et se compose de différentes zones distinctes à la fois par l'organisation, le type cellulaire mais aussi par leur fonction. Du plus externe vers le plus interne, on retrouve la zone glomérulée, la zone fasciculée et la zone réticulée (ou zone X chez la souris) (fig.8).

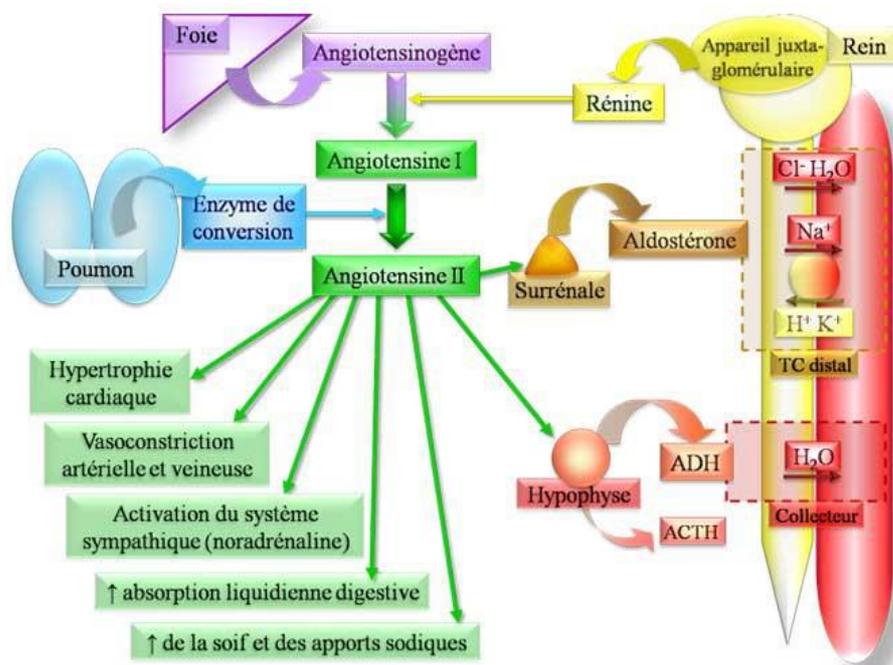


**Figure 8 : Vue histologique de la glande surrénale.**

cap: capsule; zg: zone glomérulée; zf: zone fasciculée; zr: zone réticulée; med: médulla.

## 2.1 La zone glomérulée :

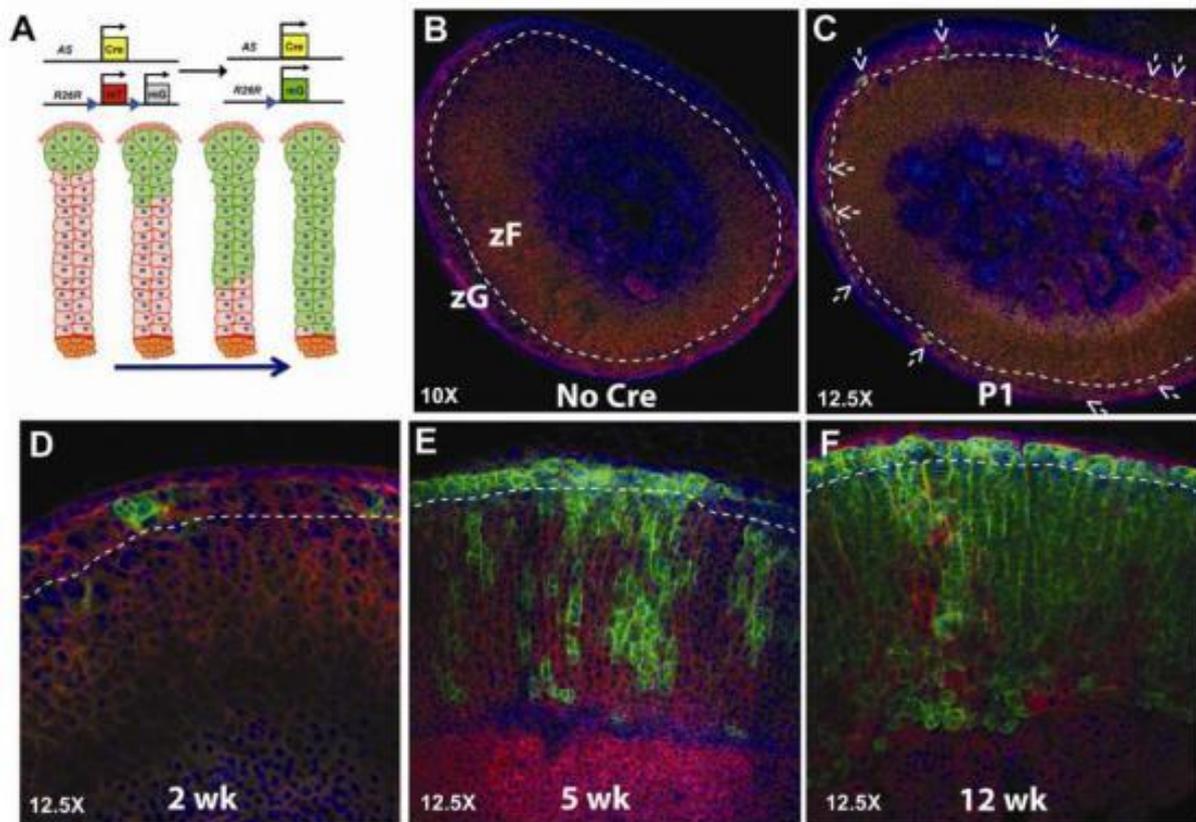
La zone glomérulée est une fine couche cellulaire située juste en dessous de la capsule. Les cellules sont organisées en glomérule autour des vaisseaux sanguins et assurent la synthèse des minéralocorticoïdes (aldostérone). L'aldostérone est l'hormone responsable de la régulation de l'équilibre hydrominéral. En effet, elle va agir au niveau des reins, de la muqueuse intestinale et des glandes salivaires et sudoripares pour favoriser la rétention d'eau, de sodium et l'élimination du potassium. Sa sécrétion dans le sang est sous le contrôle du système rénine-angiotensine (fig.9).



**Figure 9 : Régulation de différentes constantes corporelles par le système rénine-angiotensine.**

En cas de baisse de la pression dans l'artère rénale ou encore de baisse de la natrémie, la rénine sera sécrétée par les cellules de l'appareil juxtaglomérulaire du rein. Elle va alors cliver l'angiotensinogène pour produire l'angiotensine I qui elle-même sera convertie en angiotensine II. Celle-ci a de nombreux effets physiologiques dont la stimulation de la synthèse et de la sécrétion d'aldostérone par les cellules de la zone glomérulée du cortex surrénalien. Il existe un rétrocontrôle négatif de la rénine par l'angiotensine II puisque celle-ci inhibe la sécrétion de rénine. De plus l'augmentation de l'aldostérone entraîne via l'activation de la pompe sodium potassium, l'augmentation de la pression artérielle au niveau de l'artère rénale ce qui inhibe fortement la sécrétion de rénine.

La zone glomérulée participe également au maintien de l'homéostasie de tout le cortex surrénalien. En effet, il a été démontré par un suivi de lignée cellulaire que les cellules exprimant la protéine Cyp11b2 nécessaire à la synthèse de l'aldostérone étaient capables de migrer et de se transformer en cellules de la zone fasciculée exprimant les protéines nécessaires à la production de glucocorticoïdes (Freedman et al., 2013) (fig.10).



**Figure 10 : Les cellules de la zone fasciculée dérivent des cellules de la zone glomérulée.**

(A) Représentation schématique des locus  $AS^{+/Cre}$  et du rapporteur  $R26R^{mT/mG}$  ainsi que du modèle de remplacement des cellules fasciculées par les cellules glomérulées.

(B–F) Analyse confocale de l'expression des protéines mGFP et mTomato dans les souris  $AS^{+/Cre} :: R26R^{mT/mG}$  depuis la naissance jusqu'à 12 semaines. Les flèches indiquent les cellules GFP+.

(Freedman et al., 2013)

## 2.2 La zone fasciculée :

La zone fasciculée est dédiée à la production de glucocorticoïdes tels que le cortisol. Ses fonctions ou actions principales sont l'augmentation de la glycémie par le biais de la néoglucogénèse, l'inhibition de certaines réponses du système immunitaire, la régulation du métabolisme des graisses, protéines et glucides et la régulation du cycle circadien (en complément de la mélatonine) (fig.11).

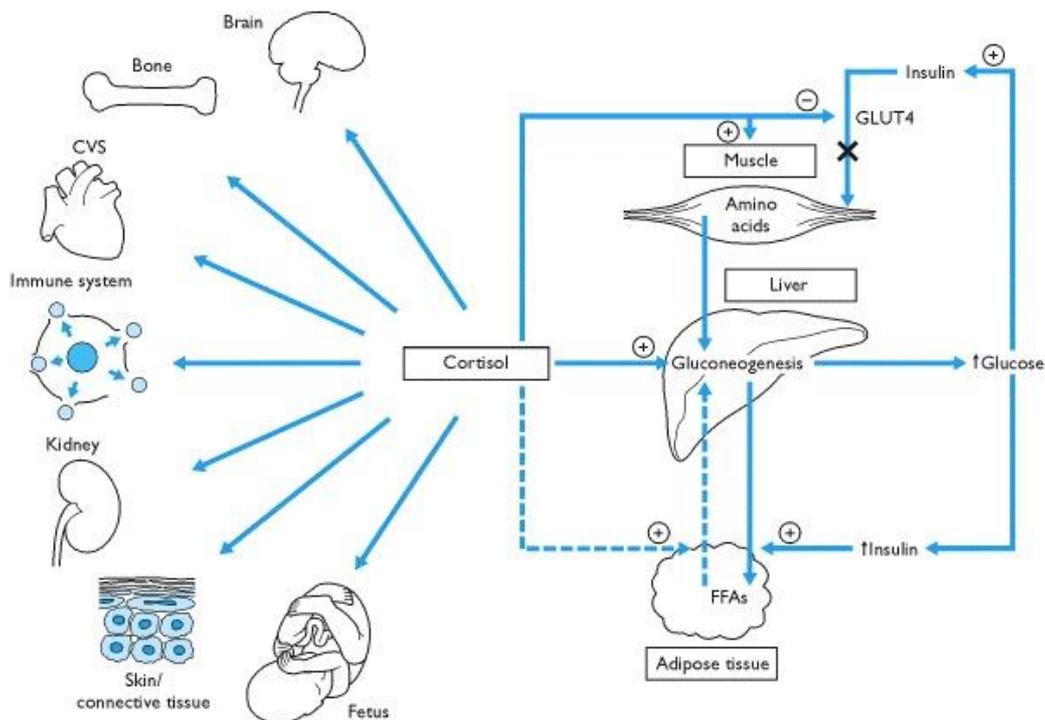
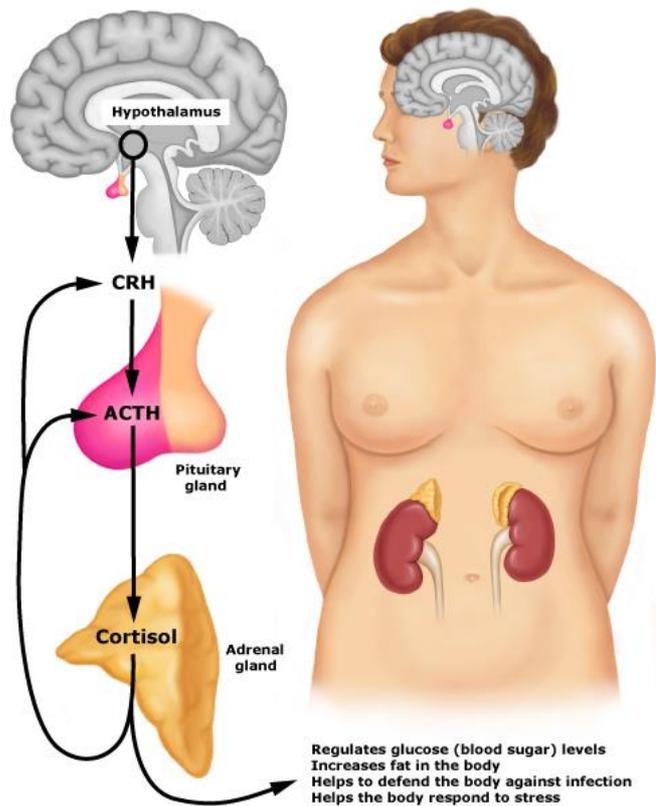


Figure 11 : Représentation schématique des différentes fonctions du cortisol.

La sécrétion de cortisol est principalement contrôlée par 3 régions du corps humain : l'hypothalamus, l'hypophyse et la glande surrénale (fig.12). En effet la sécrétion de CRH (Corticotrophin Releasing Hormone) par l'hypothalamus stimule l'hypophyse qui en réponse secrète une autre hormone : l'ACTH (AdrénocorticoTropic Hormone). Celle-ci agira sur les cellules de la zone fasciculée dans la glande surrénale qui vont alors produire et sécréter le cortisol. En retour, le cortisol agit sur l'hypothalamus pour stopper la sécrétion de CRH. Il y a donc une boucle de rétroaction négative permettant la régulation fine du taux de cortisol dans le sang.



**Figure 12 : Régulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien.**

## 2.3 La zone réticulée :

Il s'agit de la zone la plus interne du cortex surrénalien. Chez l'Homme, elle a pour fonction la production de DHEA qui sera ensuite converti en testostérone. Bien que cette production soit négligeable chez l'homme par rapport à la quantité produite par les testicules, chez la femme il s'agit de l'unique source de testostérone.

Chez la souris, cette zone n'existe pas. La zone la plus interne du cortex surrénalien est appelée zone X, et ne produit pas de DHEA. Son rôle reste encore inconnu à ce jour. En fait il s'agit d'un reliquat de la glande surrénale embryonnaire. Elle va même complètement disparaître lors de la puberté chez les mâles et après la 1ère gestation chez les femelles.

## 2.4 La capsule :

Il s'agit d'une zone fine constituée seulement de quelques couches cellulaires. Pendant très longtemps son importance a été négligée par la communauté scientifique qui pensait son rôle uniquement structural. Cependant de récentes découvertes ont montré son importance tant au niveau du développement que de l'homéostasie.

Il a été démontré que la capsule renferme des populations cellulaires variées (Bandiera et al., 2013; Wood et al., 2013). Des cellules exprimant fortement la protéine GLI1 vont avoir un rôle fondamental au cours du développement embryonnaire puisque ce sont elles qui vont proliférer et se différencier pour former le cortex définitif qui remplacera le cortex fœtal (Wood et al., 2013). D'autres cellules exprimant le facteur de transcription WT1 sont aussi capables de se différencier en cellules stéroïdogéniques et de participer à l'homéostasie (Bandiera et al., 2013). De plus, mon travail de thèse montre également un rôle primordial de la capsule agissant comme centre de signalisation contrôlant la zonation et l'homéostasie du cortex surrénalien.

## II. La stéroïdogénèse

Les hormones stéroïdiennes constituent une classe importante d'hormones lipidiques possédant un noyau stérol. Elles ont pour précurseur commun le cholestérol dont la principale source est l'alimentation. Elles sont synthétisées par différents organes tels que la glande surrénale ou encore les gonades et le cerveau.

La première étape de la stéroïdogénèse se fait à l'intérieur de la mitochondrie. Il faut donc que le cholestérol hydrophobe puisse traverser les deux membranes mitochondriales et l'espace intermembranaire hydrophile. Cette étape limitante se fait grâce à l'action de 2 protéines : StAR (sterogenic acute regulatory proteine) et PBR (peripheral benzodiazepine receptor).

Une fois que le cholestérol est entré dans la mitochondrie, il est pris en charge par une enzyme présente dans tous les tissus stéroïdogéniques : CYP11A1 (ou P450SCC : cytochrome P450 side chain clivage). Celle-ci va cliver la chaîne latérale du cholestérol pour donner la prégnénolone. La prégnénolone va ensuite quitter la mitochondrie pour les membranes du réticulum endoplasmique. Elle est alors convertie en progestérone grâce à l'action de l'enzyme 3 $\beta$ HSD (3 $\beta$  hydroxysteroid dehydrogenase).

La progestérone sera ensuite convertie par différentes enzymes selon le tissu dans lequel elle se trouve et cela aboutira à la formation des différents types d'hormones stéroïdiennes (fig. 13).

Dans la zone fasciculée et réticulée, les enzymes CYP21 (ou P450c21 : cytochrome P450 21-hydroxylase) et CYP11B1 (ou P450c11 : cytochrome P450 11b hydroxylase) permettent la formation du cortisol et de la corticostérone. Mais l'enzyme CYP17 (ou P450c17 : cytochrome P450 17 $\alpha$ -hydroxylase) nécessaire à la formation du cortisol n'est présente que chez les primates. Les autres espèces tels que les rongeurs ne secrètent que la corticostérone.

De plus l'enzyme CYP17 possède une activité 17,20 lyase qui permet en conjugaison de son autre activité de fabriquer les androgènes surrénaliens DHEA et DHEA-S.

Dans la zone glomérulée, la synthèse d'aldostérone nécessite la présence des enzymes CYP21 et CYP11B2 (ou P450aldo : cytochrome P450 aldostérone synthase). CYP11B2

étant spécifique de la zone glomérulée, elle catalyse la transformation de la déoxycorticostérone en aldostérone.

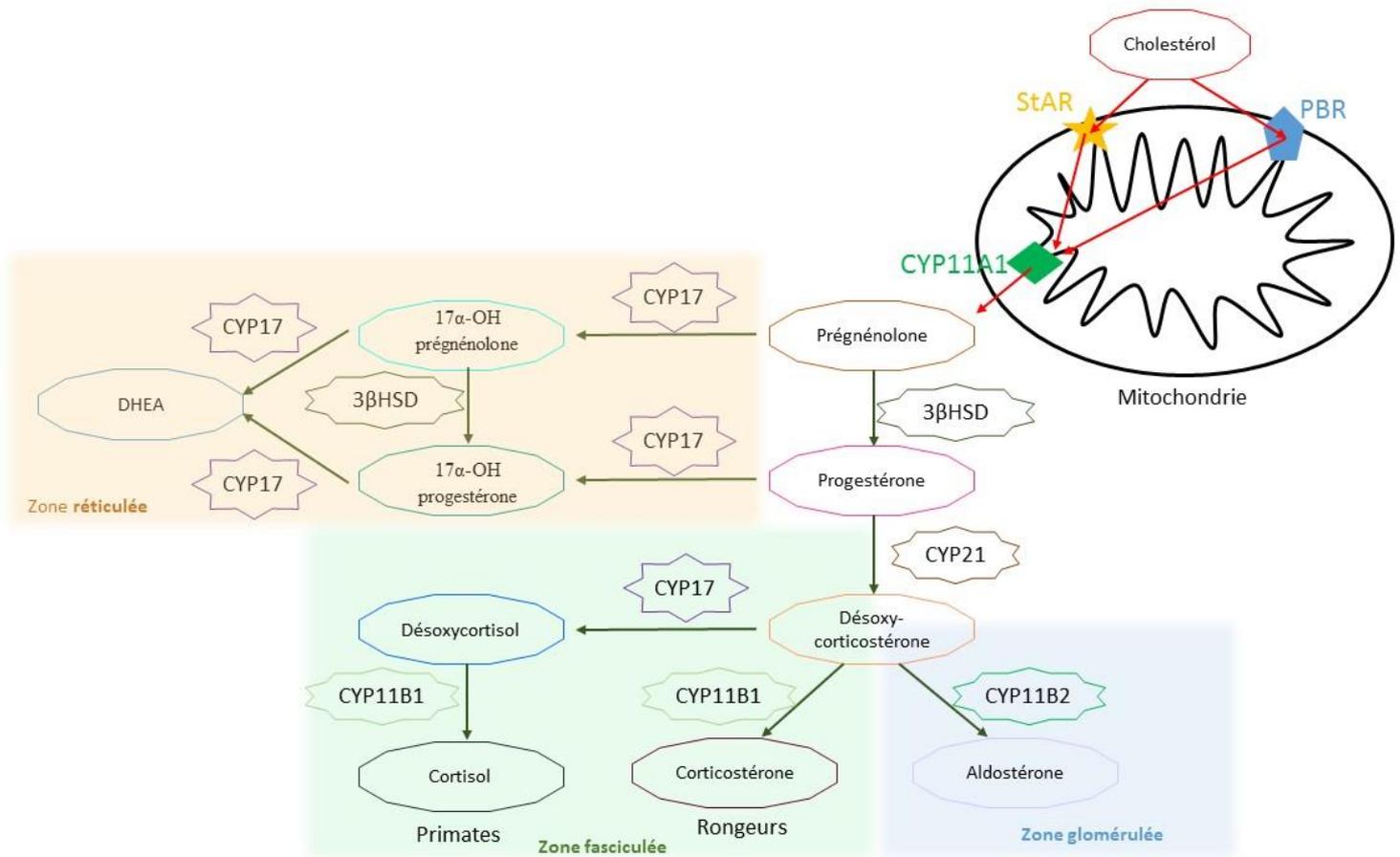


Figure 13 : Voies de synthèse des hormones stéroïdiennes de la corticosurréale.

# III. Développement embryonnaire :

La mise en place de la glande surrénale commence par la prolifération de l'épithélium cœlomique face au mésonéphros ventral à 9 jours de développement chez la souris ou 4 semaines chez l'homme. Il y a alors formation du primordium adrénogonadique (Bland et al., 2003; Hu et al., 1999). A ce stade, on peut identifier les cellules du primordium adrénogonadique dans le tractus urogénital par l'expression du facteur de transcription SF1. Ce primordium va ensuite se différencier en 2 structures : le primordium gonadique et le primordium adrénalien. Cette séparation s'effectuera à 8 semaines chez l'homme soit 10 jours chez la souris et elle est dépendante de l'expression du gène *Gata4* lui-même nécessaire à l'expression des gènes *Sfl* et *Lhx9* (Tevosian et al., 2015). L'expression de *Sfl* est ensuite maintenue dans le primordium adrénalien grâce aux facteurs de transcription WT1 et CITED2 (Val et al., 2007). Plus tard à 12 jours, le primordium adrénalien est envahi par des cellules issues de la crête neurale ectoblastique qui seront à l'origine de la médullosurrénale (Anderson et al., 1991). Cette invasion est suivie par l'encapsulation de la glande par des cellules du mésenchyme entourant le primordium adrénalien. Le facteur de transcription WT1 ne sera alors plus exprimé que dans les cellules de la capsule. En effet, l'arrêt de l'expression de *Wt1* est nécessaire à la différenciation des cellules stéroïdogéniques (Bandiera et al., 2013).

Dans la capsule, son expression va ensuite permettre l'activation de GLI1 (Bandiera et al., 2013). Les cellules exprimant GLI1 vont maintenir une très faible expression de WT1. On distingue ainsi la présence de 2 populations cellulaires dans la capsule : les cellules avec un fort niveau d'expression de WT1 et un faible niveau d'expression de GLI1 et celles avec un fort niveau d'expression de GLI1 et un faible niveau d'expression de WT1.

La mise en place du cortex définitif va alors pouvoir débiter grâce à la prolifération et à la différenciation des cellules avec un fort niveau d'expression de GLI1 qui vont alors petit à petit remplacer les cellules du cortex fœtal (Huang et al., 2010). Le développement de la glande surrénale ne se terminera qu'après la naissance avec la mise en place de la zone

réticulée entre 6 et 8 ans chez l'Homme (Else and Hammer, 2005; Lalli, 2010).

Chez la souris, une partie du cortex foetal appelée zone X est maintenue jusqu'à la puberté chez les mâles et jusqu'à la première gestation chez les femelles où elle subira une apoptose massive. Le rôle de cette structure est encore méconnu puisqu'on ne sait toujours pas si elle est capable de synthèse enzymatique.

## 1. Facteurs impliqués dans le développement de la glande surrénale

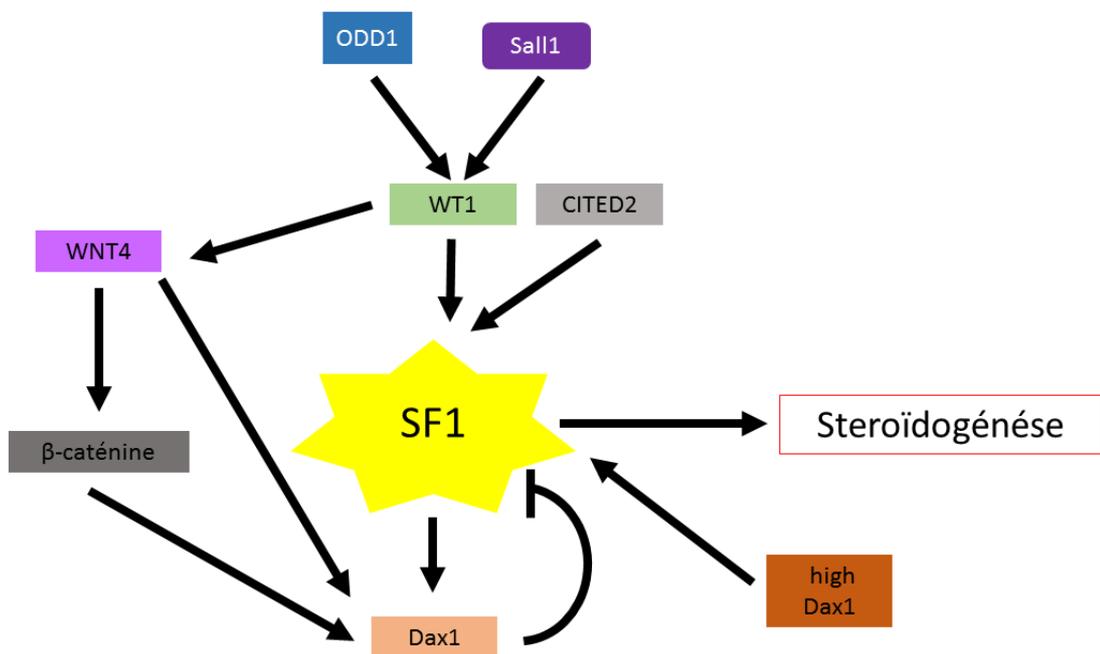
Dans le but d'identifier les mécanismes contrôlant le développement de la glande surrénale, de nombreuses études ont été menées sur des modèles animaux. L'analyse des anomalies ou des insuffisances surrénaliennes observées dans ces différents modèles ainsi que chez des patients humains ont permis d'identifier de nombreux gènes et voies de signalisations importantes.

Parmi ces gènes, le facteur de transcription WT1 est d'une importance capitale. En effet, les souris KO pour ce gène meurent après 13.5 jours de développement embryonnaire. Le développement de la glande surrénale s'arrête au stade de l'épaississement de l'épithélium cœlomique. Il n'y a donc pas de formation de glande surrénale, ni de gonades. L'expression du facteur de transcription WT1 est retrouvée au niveau de l'AGP (Primordium Adreno-Gonadal) puis elle est maintenue dans le primordium gonadique mais disparaît dans le primordium surrénalien. Ceci suggère donc que l'arrêt de l'expression de ce gène est nécessaire pour l'induction de la différenciation des cellules stéroïdogéniques. Ceci est d'ailleurs confirmé dans l'étude du Dr Bandiera (Bandiera et al., 2013).

Un autre gène d'une importance capitale est celui codant pour le facteur de transcription SF1. Cette protéine est nécessaire à l'activation des gènes codant pour les enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse. L'absence de celle-ci est associée à des défauts sévères des glandes surrénales et des gonades chez la souris mais également chez l'Homme.

Les souris KO pour le gène *SF1* ne développent pas de glandes surrénales ni de gonades (Luo et al., 1994; Sadovsky et al., 1995). Les souris hétérozygotes pour ce gène ont une AGP plus petite mais compensent partiellement par une prolifération intense (Babu et al., 2002). L'expression du gène codant pour la protéine SF1 doit être finement régulée. Elle est activée par les protéines ODD1 et SALL1 via le facteur de transcription WT1

(Nishinakamura et al., 2001; Val et al., 2007; Wang et al., 2005). Il existe également une boucle de rétroaction négative avec la protéine DAX1. En effet, SF1 active l'expression de DAX1 qui l'inhibe en retour (Clipsham and McCabe, 2003; Mizusaki et al., 2003) (fig.14). Des mutations sur les gènes contrôlant l'expression de *SF1* sont également à l'origine de troubles de développement des glandes surrénales. Par exemple, les mutations du gène codant pour la protéine DAX1 sont responsables chez l'homme de l'hypoplasie congénitale des glandes surrénales (Zanaria et al., 1994).



**Fig. 14 : Contrôle de l'expression du facteur de transcription SF1**

La voie de l'insuline est elle aussi capable de contrôler l'activité de SF1. En effet, chez la souris des mutations touchant à la fois le récepteur de l'insuline et le récepteur de l'IGF1 (IGFR1) sont responsables entre autres de défauts sévères du développement surrénalien (Pitetti et al., 2013). Dans ce modèle, il a été observé une réduction drastique du taux d'expression de SF1 lors de la formation de l'AGP pouvant être à l'origine des défauts observés.

## **2. Mise en place embryonnaire des glandes surrénales**

Cette partie étant entièrement traitée dans l'article 1, j'ai choisi de présenter ici cet article (En anglais ci- dessous).

### **Article 1 : Review Steroidogenic organ development and homeostasis : A WT1-centric view**



## Review

## Steroidogenic organ development and homeostasis: A WT1-centric view



Roberto Bandiera <sup>a,1</sup>, Sonia Sacco <sup>b,c,d,1</sup>, Valerie P.I. Vidal <sup>b,c,d</sup>,  
Marie-Christine Chaboissier <sup>b,c,d</sup>, Andreas Schedl <sup>b,c,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Wellcome Trust – Medical Research Council Cambridge Stem Cell Institute, University of Cambridge, Tennis Court Road, Cambridge CB2 1QR, UK

<sup>b</sup> Institute of Biology Valrose, Université de Nice-Sophia, F-06108 Nice, France

<sup>c</sup> Inserm, UMR1091, F-06108, France

<sup>d</sup> CNRS, UMR7277, F-06108, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 3 November 2014

Received in revised form 6 January 2015

Accepted 6 January 2015

Available online 14 January 2015

## Keywords:

Adrenal development

Gonadal development

WT1

$\beta$ -Catenin

Progenitor cells

Steroidogenic differentiation

## ABSTRACT

Adrenal and gonads are the main steroidogenic organs and are central to regulate body homeostasis in the vertebrate organism. Although adrenals and gonads are physically separated in the adult organism, both organs share a common developmental origin, the adrenogonadal primordium. One of the key genes involved in the development of both organs is the Wilms' tumor suppressor *WT1*, which encodes a zinc finger protein that has fascinated the scientific community for more than two decades. This review will provide an overview of the processes leading to the development of these unique organs with a particular focus on the multiple functions *WT1* serves during adrenogonadal development. In addition, we will highlight some recent findings and open questions on how maintenance of steroidogenic organs is achieved in the adult organism.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

## Contents

1. Introduction .....	145
2. WT1 structure–function relationships .....	146
3. The adrenogonadal primordium: WT1 as a survival factor .....	146
4. <i>Wt1</i> in gonadal development: Lessons from mice and humans .....	146
4.1. Decisions, decisions: WT1 at the crossroad of signaling pathways .....	149
4.2. Building a testis .....	150
4.3. WT1 in female development .....	150
5. Building and maintaining the adrenal .....	150
5.1. Adrenal development .....	150
5.2. Adrenal homeostasis: Progenitor cells .....	151
5.3. <i>Wt1</i> <sup>+</sup> progenitors in adulthood and the role of capsular cells .....	152
6. Conclusions and perspectives .....	153
Acknowledgements .....	153
References .....	153

\* Corresponding author. Inserm UMR1091, Centre de Biochimie, Parc Valrose, 06108 Nice, France. Tel.: +33 492076401; fax: +33 492076402.

E-mail addresses: [schedl@unice.fr](mailto:schedl@unice.fr); [aschedl@yahoo.com](mailto:aschedl@yahoo.com) (A. Schedl).

<sup>1</sup> Equal contribution.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2015.01.009>

0303-7207/© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Steroid hormones are a class of lipid-based molecules that in the vertebrate system act as signaling molecules during sexual development, body homeostasis and in the response to inflammation. Due to their peculiar chemical structure, a unique set of enzymes is

required for their biosynthesis. Although several tissues (pituitary, placenta, brain, gut, heart and skin) contain cells that are capable of producing steroids, vertebrates have evolved dedicated steroidogenic organs: the adrenals and gonads. During embryonic development these two steroidogenic organs share a common primordium: the adrenogonadal primordium (AGP) (Bland et al., 2003). A set of transcription factors orchestrates events leading to the development of the AGP, its separation into two organ-specific primordia and, ultimately, differentiation of progenitors into terminally differentiated cell types (Morohashi, 1997). These include sexually dimorphic development of gonads into testes and ovaries in males and females, respectively (Carre and Greenfield, 2014; DeFalco and Capel, 2009; Quinn and Koopman, 2012). Research over the past 20 years has identified the Wilms' tumor suppressor *WT1* as a central gene involved in several steps during development and homeostasis of steroidogenic organs (Barbaux et al., 1997; Hammes et al., 2001; Kikuchi et al., 1998; Klamt et al., 1998; Kreidberg et al., 1993; Pelletier et al., 1991; Riccardi et al., 1978; Wilhelm and Englert, 2002). In this review we will give an overview of the known functions of *WT1* at each stage of adrenogonadal development and homeostasis.

## 2. *WT1* structure–function relationships

*WT1* has been cloned in 1990 as a gene mutated in children suffering from Wilms' tumor, a pediatric kidney tumor affecting approximately 1 out of 10,000 newborns (Gessler et al., 1990; Haber et al., 1990). The *WT1* gene encodes a zinc finger protein that can bind to DNA and regulate downstream target genes both as a transcriptional activator or suppressor (Madden et al., 1991). *WT1* action seems to be highly cell type dependent, with for example *Wnt4* being repressed in the heart, but activated within the developing kidney (Essafi et al., 2011). This differential action appears to be achieved by recruitment of co-activators such as CBP or p300 (Essafi et al., 2011) or co-repressors such as BASP1 (Carpenter et al., 2004) or WTIP (Srichai et al., 2004). *WT1* binding not only affects the transcription of neighboring genes, but induces changes in the epigenetic landscape that can spread over large distances (Essafi et al., 2011). Whether these changes are transmitted to their progeny even when *WT1* becomes switched off remains to be determined.

Understanding *WT1* function is further complicated by the fact that as many as 36 different isoforms are produced by a combination of alternative translation start sites, alternative splicing, and RNA editing (Fig. 1; for details see Hohenstein and Hastie, 2006). How these variants affect the function of the resulting *WT1* protein has only been partly addressed: The alternatively spliced exon 5 seems to mediate interaction with the prostate apoptosis response factor PRKC (PAR4) (Richard et al., 2001), but deletion of this exon in mice did not affect development (Natoli et al., 2002). Similarly, removal of an alternative translation start site that leads to an additional 68 amino acids at the N-terminus had no overt effect on development, and mutant mice survived normally (Miles et al., 2003).

A much more important protein modification appears to be the insertion or omission of the three amino acids KTS between zinc fingers 3 and 4. *WT1(+KTS)* and *WT1(-KTS)* variants are produced by an alternative splice-donor site at the end of exon 9, a feature that has been conserved throughout evolution (Kent et al., 1995). Insertion of the KTS sequence changes the spacing between zinc fingers 3 and 4 and, not surprisingly, affects the biochemical properties of the protein. *WT1(-KTS)* isoforms have strong affinity to DNA and show a diffuse staining pattern in nuclei (Larsson et al., 1995). By contrast, *WT1(+KTS)* isoforms have lower affinity to DNA (Laity et al., 2000) and, since *WT1* can interact with RNA (Caricasole et al., 1996; Kennedy et al., 1996; Ladomery et al., 2003) and splicing factors (Davies et al., 1998), it has been suggested that these isoforms

may regulate splicing. A confirmation or refutation of this hypothesis is however still missing. Alternatively, *WT1(+KTS)* may be involved in splicing-independent posttranscriptional regulation and evidence that this isoform enhances interaction of certain RNAs with polyribosomes has been reported (Bor et al., 2006). Finally, *WT1(+KTS)* may interact with other DNA-binding proteins to regulate downstream targets, as seems to be the case for the activation of *Sry* gene expression (see discussion later).

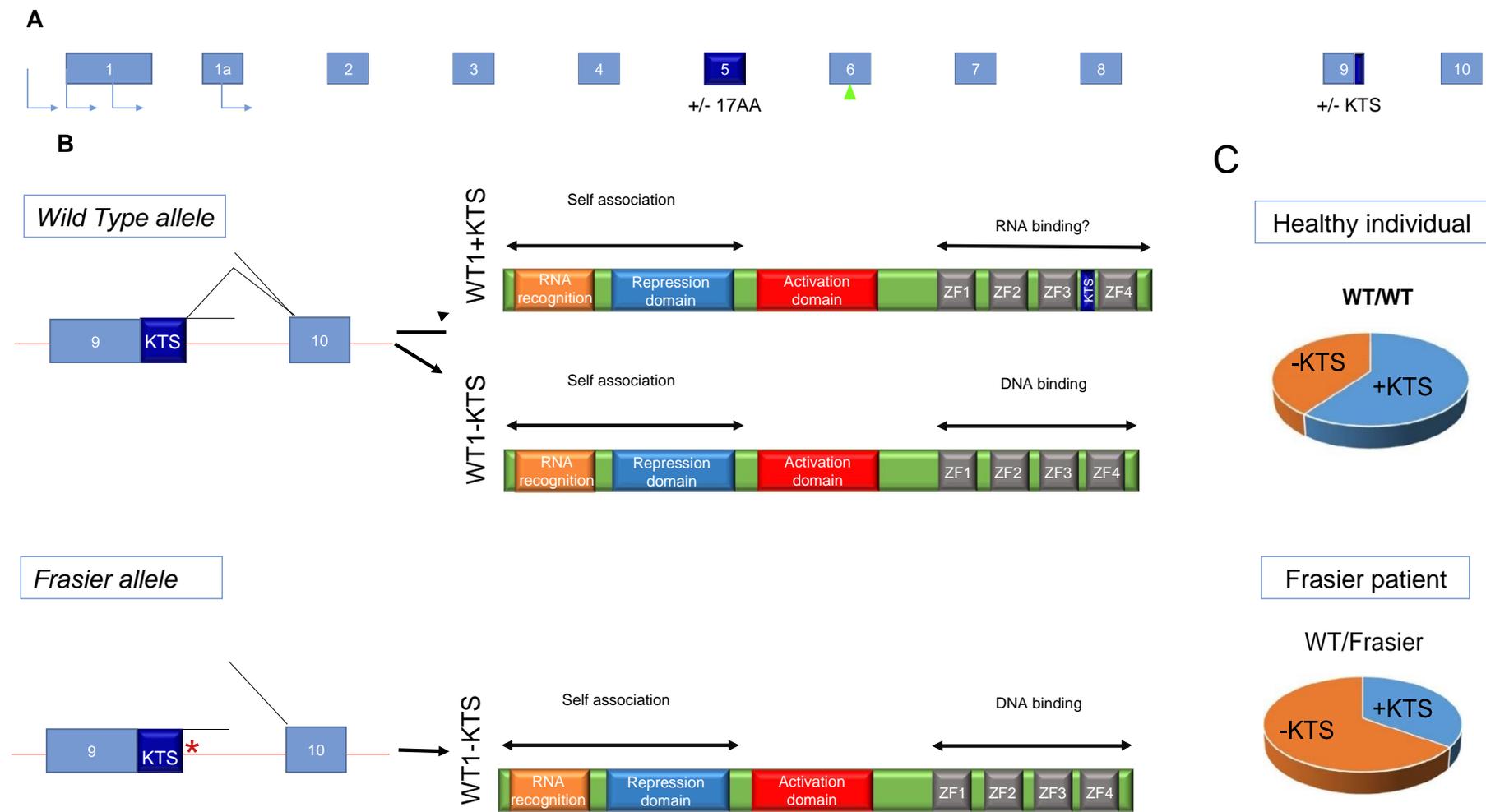
Whatever its precise molecular role, it is clear that *WT1(+KTS)* is important for normal development. Indeed, heterozygous mutations abrogating production of this isoform from the affected allele lead to Frasier syndrome, a disease characterized by XY sex reversal and early onset glomerular disease (Barbaux et al., 1997; Klamt et al., 1998). Since the wildtype allele continues to produce both variants, it must be the change of ratio between +KTS and -KTS (Fig. 1B and C), a general reduction of +KTS, or an increase of -KTS variants that is causing the severe phenotype in this disorder. However, while *WT1* isoforms seem to have specific roles, they must also share certain functions, as gene targeting experiments reveal a much less severe phenotype of splice specific knockouts when compared to the full deletion of the *Wt1* gene (Hammes et al., 2001).

## 3. The adrenogonadal primordium: *WT1* as a survival factor

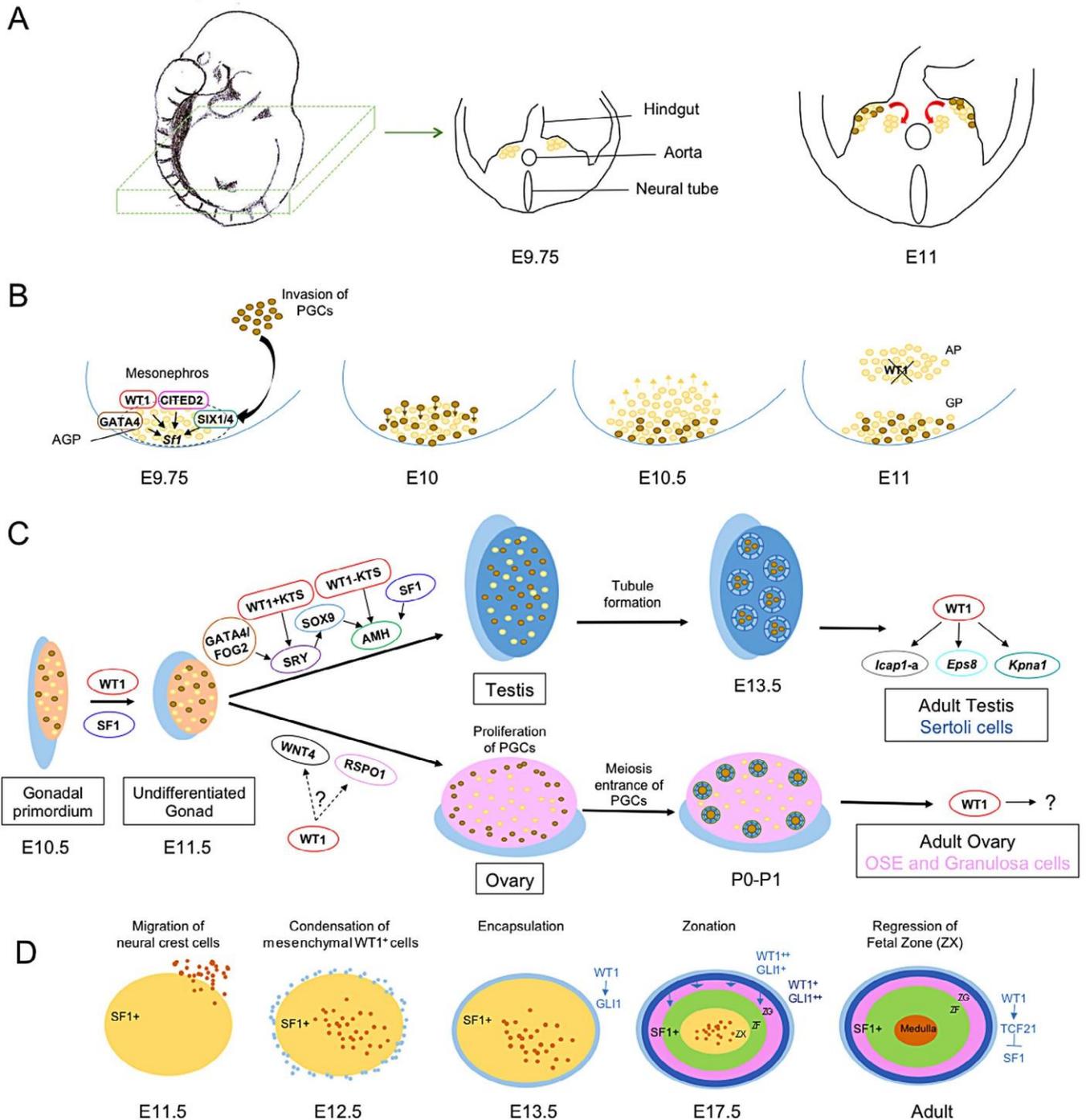
Adrenals and gonads are mesoderm derived and develop through proliferation of the coelomic epithelium, an initially single-layered epithelium overlying the nephrogenic cord that becomes stratified (Hatano et al., 1996). In mice, the AGP can first be detected at around E10. Its formation depends on *GATA4* (Fig. 2A and B) (Hu et al., 2013), a transcription factor that is required for the activation of the steroidogenic factor *Sf1* (*Nr5a1*) and Lim homeobox protein 9 (*Lhx9*), but not *Wt1*. Expression of *Sf1* at this early time point also depends on the presence of *WT1* (Wilhelm and Englert, 2002) and transcriptional activation appears to be enhanced via physical interaction with the CBP/p300-interacting transactivator *CITED2* (Val et al., 2007). *Sf1* regulation is however more complex (Zubair et al., 2006) and also requires the transcription factors *SIX1* and *SIX4* (Fujimoto et al., 2013). Whether these transcription factors form a multiprotein complex or whether they act on independent enhancer elements is presently unknown. The upregulation/maintenance of *Sf1* expression is crucial and deletion leads to widespread apoptosis and, as a consequence, mutant animals lack both adrenals and gonads (Luo et al., 1994). Consistent with the lack of *Sf1* expression, *Wt1* and *Cited2* knockout mice also lack adrenals (Bamforth et al., 2001; Moore et al., 1999) and, in the case of *Wt1* mutants, also gonads (Kreidberg et al., 1993). How these factors suppress apoptosis in steroidogenic organs is not clear, but it maybe interesting to draw parallels to kidney development. In early kidney anlagen *WT1* suppresses cell death by directly activating fibroblast growth factors (FGFs), such as *Fgf20*, and suppressing BMP-pSMAD signaling (Motamedi et al., 2014). Whether a similar mechanism is in place to suppress apoptosis in adrenogonadal development remains to be elucidated.

## 4. *Wt1* in gonadal development: Lessons from mice and humans

While adrenals and gonads share a common origin on both the genetic and developmental level, by E10.5 the adrenogonadal primordium has split. The adrenal cells remain rostral moving to a slightly more medial position, whereas the coelomic epithelium continues to proliferate along the rostral–caudal axis contributing to further growth of the gonadal primordium (Fig. 2A and B). Primordial germ cells migrate along the hindgut with the first cells reaching the adreno-gonadal primordium by E10 (Molyneaux et al., 2001).



**Fig. 1.** (A) Structural features of the Wilms' tumor suppressor gene WT1. A combination of alternative start codons (blue arrows), alternatively spliced exons (in dark blue) and RNA editing (green triangle) gives rise to at least 36 protein isoforms. Blue boxes: exons; red line: intron and 5' and 3' regions. (B) In the wild type allele the usage of two alternative splice donor sites located at the end of exon 9 leads to the insertion or omission of the 3 amino acids KTS between zinc fingers 3 and 4 of the WT1 protein. The Frasier allele harbors a point mutation (red star) at the second splice donor site of exon 9, leading to the production of only WT1(-KTS) variants. (C) In healthy individuals the ratio between WT1(+KTS) and WT1(-KTS) isoforms is rather constant (60%:40%, respectively). In Frasier patients, the presence of one mutated allele leads to a shift in the overall ratio between the two isoforms. ZF: zinc finger domain.



**Fig. 2.** WT1 in adrenogonadal development. (A) Representation of a transverse view of a developing mouse embryos at the level of the adrenogonadal primordium (AGP, beige color). The AGP arises at E9.75 as a thickening of the coelomic epithelium. By E11 the AGP has separated (red arrows) to give rise to the adrenal (AP) and gonadal primordia (GP) (beige color). At this stage, primordial germ cells (brown color) have invaded the gonad. (B) Schematic view of a urogenital ridge. At E9.75, GATA4, SIX1/4 and WT1 together with CITED2 are required for *Sf1* activation. At E10, primordial germ cells (brown color) invade the AGP and then move ventrally. By E11 the gonad and the adrenal are distinct structures, WT1 expression is maintained in the gonad and lost in SF1 positive adrenal progenitors. (C) Steroidogenic cells of the gonadal primordium maintain expression of WT1, which is important to induce the male and female pathways. In males, WT1+/-KTS isoforms together with cofactors (SF1 and GATA4/FOG2) induce expression of *Sry* leading to the formation of a testis. WT1-KTS also contributes, together with SOX9, to the expression of the anti Mullerian hormone *Amh*. In the adult testis, WT1 maintains Sertoli cell function throughout life by regulating *Eps8*, *Icap1-a* and *Kpna1*. In females, *Wnt4* and *Rspo1* are required for ovary formation. In analogy to the kidney, WT1 may regulate both genes on the transcriptional level, although formal proof for this regulation is presently missing. In the adult ovary, WT1 expression is maintained in the ovarian surface epithelium (OSE) and in the granulosa cells, but its role in these tissues has not been elucidated so far. (D) Main events during adrenal development. At E11.5 neural crest derived chromaffin cells approach the adrenal primordium. By E12.5 chromaffin cells invade the future adrenal cortex and in parallel WT1+ mesenchymal cells surrounding the adrenal start to condensate giving rise to the adrenal capsule. In these cells, WT1 enhances *Gli1* activation. Later in embryonic development, adrenal zonation begins to give rise to the *zona glomerulosa* (ZG), the *zona fasciculata* (ZF) and the X-zone (ZX) (which is the remaining part of the fetal cortex). Both WT1 and *Gli1* expressing capsular cells are involved in the generation of the definitive cortex. Expression of zone-specific markers (e.g. *Cyp11b2* in ZG) commences around E17.5. Adrenal development is completed after birth with X-zone regression at puberty in males and at the first pregnancy in females. In adult adrenal glands, WT1 is found in the external layers of the capsule where it represses steroidogenic differentiation by up-regulating *Tcf21*, which in turn represses *Sf1* expression.

Clear evidence that WT1 is involved in gonadal development first arose from the study of human patients. Indeed, this gene was originally cloned from patients with submicroscopic deletions on chromosome 11p13, who suffered from WAGR syndrome, a predisposition to Wilms' tumor, Aniridia, Genitourinary abnormalities, mental Retardation (Call et al., 1990; Gessler et al., 1990). WAGR associated abnormalities of the genitourinary system range from cryptorchidism to hypospadias (Riccardi et al., 1978) and a small proportion of patients develop gonadoblastoma (Andersen et al., 1977), probably as a result of dysgenic gonads. Analysis of other patient cohorts that also suffered from gonadal defects revealed more specific mutations within the WT1 locus (Table 1): Heterozygous mutations clustering in the C-terminal zinc finger region that appear to act in a dominant negative fashion (Little et al., 1993) are associated with Denys–Drash syndrome (DDS) (Pelletier et al., 1991) a disease causing early onset diffuse glomerular sclerosis in the kidney and pseudo-hermaphroditism. Similar mutations were found in patients suffering from Meacham syndrome that in addition to genital defects show diaphragmatic and cardiac malformations (Suri et al., 2007). Mutations that affect alternative splicing of WT1 and cause a reduction of WT1(+KTS) isoforms cause Frasier syndrome (FS) (Barboux et al., 1997; Klamt et al., 1998) characterized by focal segmental glomerulosclerosis and XY sex reversal. While DDS and Frasier mutations are often classified on the basis of genetic mutations (Jaubert et al., 2003), genotype–phenotype correlations have to be taken with care and some patients with classical Frasier mutations (splice donors site mutation in intron 9) show a phenotype that is highly reminiscent of Denys–Drash syndrome (Koziell et al., 2000).

Mouse models for Frasier and DDS syndrome have also been generated (Table 1) and while they largely recapitulate the kidney phenotype found in human patients, gonadal defects are often less pronounced in mice. In contrast to human patients, heterozygous XY 'Frasier' mice (*Wt1(+KTS)<sup>+/−</sup>*) develop as males and are fertile (Hammes et al., 2001) although a small proportion of mice have ootestes (unpublished data). However, when crossed to homozygosity, a complete sex reversal was observed, thus confirming an absolute requirement for WT1(+KTS) during male sex determination (Hammes et al., 2001). Introduction of the classical DDS mutation (R394W) in mice recapitulated the kidney phenotype found in patients, but had apparently no effect on gonad development (Gao et al., 2004) suggesting that the mouse is less susceptible to changes in *Wt1* gene expression.

4.1. Decisions, decisions: WT1 at the crossroad of signaling pathways

To understand how WT1 influences male sex determination on the molecular level, we have to first consider how the decision between male and female fates is made (Fig. 2C). A detailed review of the literature would be beyond the scope of this review and the interested reader is referred to a recent review on this topic (Carre and Greenfield, 2014). In brief, the decision primarily depends on the presence or absence of the Sry gene located on the Y-chromosome (Berta et al., 1990; Gubbay et al., 1990). SRY induces *Sox9* expression (Sekido and Lovell-Badge, 2008), which is both required and sufficient to trigger the testicular genetic network (Chaboissier et al., 2004; Vidal et al., 2001). In XX gonads, or in individuals with a defective Sry gene, the ovarian genetic network is activated, with *Wnt4/Rspo1* (Chassot et al., 2008; Vainio et al., 1999), *Ctnnb1* (β-catenin) (Maatouk et al., 2008) and *Foxl2* (Schmahl et al., 2000; Schmidt et al., 2004), being some of the key players. While historically the female pathway has been considered as 'default', this view has been recently challenged (Lavery et al., 2012) and it has become now accepted that male and female pathways are equally important and act in an antagonistic manner both during devel-

**Table 1**  
Summary of human diseases associated with WT1 mutations and corresponding mouse models.

Disease	Phenotype	Genotype	Molecular consequences	Mouse model	References
Frasier syndrome	Focal segmental glomerulo-sclerosis Male pseudo-hermaphroditism Gonadoblastoma	Mutation s at the splice donor site in intron 9	Changes in the ratio between n WT1 <sup>+/+</sup> -KTS isoforms	Ablation of +KTS-specific isoform with a mutation in the second splice donor site at position +2 in intron 9 (GT→GC): Glome rulosclerosis in he terozygous mice; podocyte defects and XY sex reversal in homozygous mice.	Barboux et al., 1997 Hammes et al., 2001 Klamt et al., 1998
Denys–Drash syndrome	Ambiguous genitalia Wilms' tumor Diffuse glomerulo-sclerosis Abnormalities of the genitourinary system Wilms' tumor Aniridia Mental re tardation syndrome	Point mutations or truncations predominantly in exon 8 or 9 Deletion of 11p13 including WT1 and PAX6	Alteration of DNA binding activity (dominant negative) Haploinsufficiency	Introduction of the classic mutation of DDS R394W: Glomerulo-sclerosis and early kidney failure Full deletion of the WAGR locus not available; WT1 null mutation: absence of kidneys, adrenals and gonads; for additional abnormalities see review of Disce nza and Pelletier, 2004 Not available	Gao et al., 2004 Pelletier et al., 1991 Disce nza and Pelletier, 2004 Kreidberg et al., 1993 Moore et al., 1999
Me acham syndrome	Male pseudo-hermaphroditism Abnormal internal female genitalia Diaphragmatic abnormalities Congenital heart defects	Mutations in the zinc finger region	Alteration of DNA binding activity		Suri et al., 2007

opment (Kim et al., 2006) and in adults (Matson et al., 2011; Uhlenhaut et al., 2009).

In Frasier syndrome, sex reversal results from at least two events. Firstly, molecular studies showed that while the number of SRY-expressing cells is lower in Frasier mutants, SRY levels per cell are also reduced (Bradford et al., 2009). This indicates a cell autonomous action of WT1 within Sertoli cell precursors and would be consistent with a direct regulation of Sry on the molecular level. Indeed, *in vitro* experiments suggest that WT1 can synergize with GATA4/FOG2, a transcription factor complex required for the activation of Sry (Tevosian et al., 2002). This interaction seems to be stronger for WT1(+KTS) variants (Miyamoto et al., 2008), which is in agreement with the observed XY sex reversal phenotype in Frasier patients that express reduced levels of this isoform. Secondly, reduced expression of SRY in *Wt1(+KTS)* mutants causes a failure to activate *Sox9*, and its downstream mediator *Fgf9*, a gene required to reinforce proliferation and recruitment of additional progenitors (Schmahl et al., 2004). In agreement with this model, addition of recombinant FGF9 to XY gonads from Frasier animals was sufficient to rescue male sex determination and induce male specific markers (Bradford et al., 2009). Thus, *Wt1(+KTS)* mutants show a reduced number of Sry-expressing cells that is likely to be the cause of sex reversal in Frasier patients.

#### 4.2. Building a testis

SRY expressing cells differentiate through the action of SOX9 into Sertoli cells, the first somatic lineage within the testis. They corral the germ cells to form the testis cords or presumptive seminiferous tubules. Further recruitment of vascular endothelial cells and myoid cells will complete testis cord formation. Sertoli cells also regulate the establishment of testicular steroidogenesis (androgens) by DHH secretion, which promotes fetal Leydig cell differentiation (Svingen and Koopman, 2013). The developmental lineage of these gonadal steroidogenic cells has been a disputed area, with some evidence hinting at the coelomic epithelium as a source for these cells (Schmahl et al., 2000), whereas other data suggested a mesonephric origin (Val et al., 2006). Recent analysis indicates that probably both models are correct and fetal steroidogenic cells may arise from two distinct developmental lineages (DeFalco et al., 2011).

*Wt1* becomes switched off in Leydig cells as soon as they differentiate, but is maintained in Sertoli cells throughout life. Maintenance of *Wt1* expression in the latter seems to be essential, as knock-down (Rao et al., 2006) or ablation (Chang et al., 2008) after differentiation leads to reduced *Sox9* expression, loss of Sertoli cells and an increase of WNT/CTNNB1 signaling. Whether loss of WT1 directly influences *Sox9* expression is presently unclear, but it is interesting to note that, similar to Sry, *Sox9* expression also depends on GATA4/FOG2 (Manuylov et al., 2007). We can speculate that WT1 may also be part of this complex. In addition, germ cells are lost in these mice due to a requirement of Sertoli cells in maintaining these cells (Gao et al., 2006). In turn, SOX9 seems to cooperate with WT1 and SF1 to activate the anti-mullerian hormone *Amh* (*Mis*) (Arango et al., 1999), although the contribution of WT1 to this activation seems to be only minor.

Heterozygous mutations in *WT1* have been recently identified in patients affected by non-obstructive azoospermia (Wang et al., 2013). Consistent with these findings, tissue-specific knock-down of WT1 in Sertoli cells of adult mice induces germ cell apoptosis and impaired maturation leading to reduced sperm motility (Rao et al., 2006). The authors suggest the phenotype to be linked to the ability of WT1 to regulate the expression of *Eps8* and *Icap1- $\alpha$* , two  $\beta$ 1-integrin binding proteins, and *importin- $\alpha$ 1* (*Kpna1*) involved in the formation of the ectoplasmic specialization, a specialized adherence junction involved in facilitating the movement of germ cells on the membrane of Sertoli cells (Rao et al., 2006). Finally, a recent

paper from Prof. Jaenisch's group demonstrated that direct reprogramming of fibroblasts into Sertoli cells is achieved by transfecting the five factors *Nr5a1*, *Wt1*, *Dmrt1*, *Sox9* and *Gata4* (Buganim et al., 2012). WT1 seems to be an essential co-factor for proliferation, aggregation and mesenchyme-to-epithelial transition in this trans-differentiation process. In conclusion, these studies demonstrate an essential role for WT1 in maintaining Sertoli cell function throughout life.

#### 4.3. WT1 in female development

Whereas an important role for WT1 in male sex determination and Sertoli cell differentiation is well documented, much less is known about its potential involvement in female gonad development. As described earlier, absence of Sry expression in the XX gonad leads to activation of  $\beta$ -catenin signaling. Nuclear CTNNB1 has at least two effects: (1) it represses the expression of *Sox9* and *Fgf9* (Bernard et al., 2012; Maatouk et al., 2008) and (2) it activates ovarian differentiation (Maatouk et al., 2008). Activation of CTNNB1 depends on RSPO1 and WNT4 (Chassot et al., 2008; Liu et al., 2010) and mutations in the corresponding genes are responsible of human sex reversal (XX men) (Biaison-Lauber et al., 2004; Mandel et al., 2008; Parma et al., 2006). In the kidney, *Rspo1* and *Wnt4* expression directly depend on WT1 (Essafi et al., 2011; Motamedi et al., 2014). Whether a similar relationship also exists in the female gonad is unknown, as loss of WT1 leads to apoptosis before the expression of these genes (Kreidberg et al., 1993).

The ovary is constituted of two supporting cell populations, the granulosa cells issued from progenitors of the coelomic epithelium (Mork et al., 2012) and the steroidogenic Theca cells that probably have the same origin (Nicol and Yao, 2014). Granulosa cells develop in two waves: The first wave of progenitors generated during embryogenesis between E11.5 and late gestation gives rise to medullary follicles that are activated after birth. The second wave produces cortical follicles that get successively activated after sexual maturation (Mork et al., 2012; Zheng et al., 2014). Interestingly, follicles of the first wave express the transcription factor FOXL2, whereas formation of the secondary follicles involves initially activation of the WNT/CTNNB1 signaling pathway and its downstream target LGR5 (Rastetter et al., 2014). WT1 expression is maintained throughout development within granulosa cells and the coelomic epithelium that will later on become the overlying surface epithelium (OSE). The role of WT1 within these structures at later stages is unknown, but it is worth noting that generalized deletion using a conditional gene targeting approach in adult mice led to a reduction of ovarian weight as early as 2 weeks after deletion of WT1, even though this did not reach statistical significance (Chau et al., 2011). Future experiments will require tissue-specific deletion using granulosa or OSE specific Cre-driver strains.

### 5. Building and maintaining the adrenal

#### 5.1. Adrenal development

At the same time as the gonad develops, the adrenal primordium remains rostral moving to a more medial position (Fig. 2A and B). After induction, *Sf1* expression in the adrenal gland becomes WT1-independent and is initially driven by binding of a PBX1/HOX1/PREP1 complex to an intronic fetal adrenal enhancer (FAde) (Zubair et al., 2006). SF1 itself then establishes an auto-regulatory feedback loop by replacing the PBX1/HOX1/PREP1 complex in the FAde (Zubair et al., 2006). This induces further upregulation of SF1 in cells that become steroidogenic. At this time point WT1 expression is lost in SF1 positive cells while it is maintained in surrounding mesenchymal cells.

Growth of the adrenal cortex appears to involve both, proliferation within SF1 positive cells and, at later time points, recruitment of GLI1<sup>+</sup>/SF1<sup>-</sup> progenitors (Fig. 2D) (King et al., 2009). *Gli1* is a direct downstream target of the SHH signaling pathway and SHH secreting cells are SF1<sup>+</sup> cells clustered at the cortical periphery from E12.5 onward. Labeling those cells with a constitutive *Shh:Cre-GFP* resulted in labeling of the quasi totality of the cortex by P12 (King et al., 2009).

SHH receiving cells (GLI1<sup>+</sup>) are instead mainly located within the adrenal capsule, with only very few cells reaching into the subcapsular cortex (Huang et al., 2010; King et al., 2009). Lineage tracing analysis performed using *Shh:Cre-ERT2* and *Gli1:Cre-ERT2* clearly showed contribution to all the adrenocortical lineages from both populations when labeled during development (E14.5) (Huang et al., 2010; King et al., 2009). Interestingly, GLI1<sup>+</sup> progenitors give rise to *Shh* expressing cells before differentiating into other adrenocortical lineages (King et al., 2009). Mice lacking *Shh* show severely reduced adrenals thus confirming its essential role in the formation of this organ (Huang et al., 2010).

Cell lineage tracing experiments using a constitutive *WT1:Cre* line in combination with a GFP reporter system showed that all of the steroid-producing cells in the adult adrenal cortex are derived from WT1<sup>+</sup> progenitors (Bandiera et al., 2013), indicating that the GLI1<sup>+</sup> population is also WT1<sup>+</sup> progenitor derived. Indeed, WT1 may have a direct role in this cell type, as it seems to directly bind and activate the *Gli1* locus (Bandiera et al., 2013). However, *Shh* signaling does not act alone to ensure adrenal growth, but interacts with other signaling pathways including  $\beta$ -catenin (Kim et al., 2008), IGF (Pitetti et al., 2013) and FGF (Guasti et al., 2013; Kim et al., 2007). Because of lack of space we are not able to cover these pathways in depth and the interested reader is referred to an excellent recent review on this topic (Walczak and Hammer, 2015).

At E12.5 SF1<sup>+</sup> progenitor cells of the adrenal cortex are invaded by a neural crest derived population that will give rise to the adrenal medulla. WT1 expression is maintained in the surrounding mesenchyme, and recent lineage tracing studies show that WT1<sup>+</sup> cells from this mesenchyme will give rise to most, if not all, adrenal capsular cells (Fig. 2D) (Bandiera et al., 2013).

Zonation of the adrenal cortex occurs already at a very early time point and a clear distinction of *zona glomerulosa* and *zona fasciculata*, both on the histological and molecular level, is already visible at E17.5 (Fig. 2D). How patterning of the adrenal cortex is achieved and which signaling pathways maintain the zonation throughout life is presently unclear.  $\beta$ -catenin has been suggested to play an important part in ensuring aldosterone production (Berthon et al., 2014), but in an independent study Walczak et al. suggested that  $\beta$ -catenin suppresses steroidogenesis at least in *zona fasciculata* cells (Walczak et al., 2014). Whether glomerulosa and fasciculata cells respond differentially to  $\beta$ -catenin or whether the somewhat contrary findings are due to differences in  $\beta$ -catenin levels remains to be addressed.

## 5.2. Adrenal homeostasis: Progenitor cells

As other organs, the adult adrenal cortex needs to replace dying cells under normal physiological conditions or to proliferate in response to damage and external stimuli. The existence of such a high regenerative potential is consistent with the presence of an adrenocortical stem cell population. Recent years have seen significant progress in our understanding of cell lineage relationships in the developing and adult adrenal cortex. In this section we will discuss the historical evidence supporting the existence of adrenocortical stem cells along with the most recent discoveries.

The first model of centripetal migration of cells from the periphery inward was proposed by Gottschau (1883). Thereafter several studies have demonstrated the capacity of capsular or sub-capsular cells to regenerate the adrenal cortex after enucleation (Ingle and

Higgins, 1938; Nussmann and Zwemer, 1941). In the late 1980s, work aiming at testing the proliferative potential of the adrenal cortex showed a stream of cells from the periphery, where most proliferation occurs, toward the innermost cortical areas, where the highest rate of apoptosis is observed (McNicol and Duffy, 1987; Zajicek et al., 1986). Further evidence indicating the existence of a progenitor population at the periphery of the gland came from both studies on chimeric rats (Iannaccone and Weinberg, 1987) and transgenic mice expressing reporter genes in the adrenal cortex, in which columnar expression of the transgene was observed (Hu et al., 1999; Morley et al., 1996). More recently, the usage of genetically modified mouse models and cell lineage tracing techniques allowed the contribution of different cell populations to adrenocortical maintenance and regeneration to be dissected.

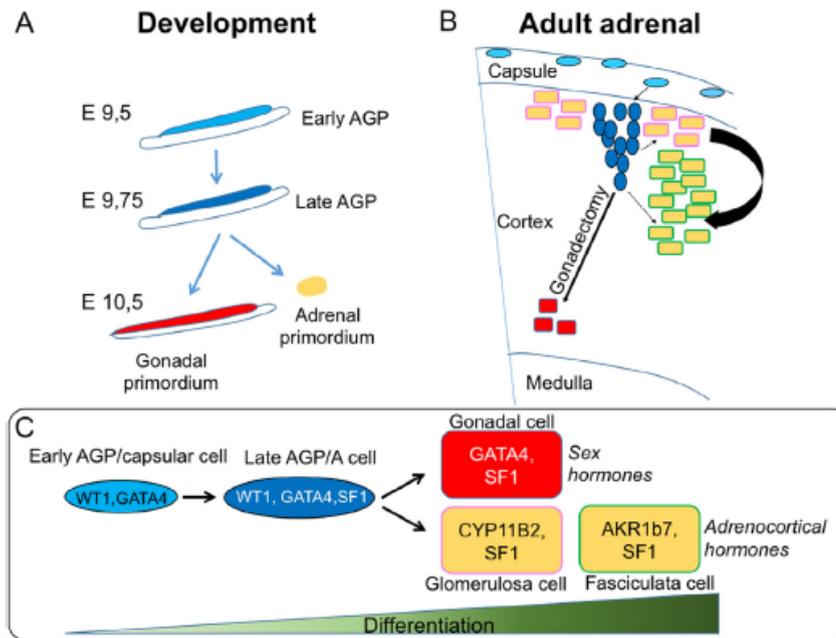
As mentioned in the previous sections, the hedgehog signaling pathway is critical in adrenal development. Labeling GLI1<sup>+</sup> progenitors postnatally also generated clones that expanded centripetally, but the size of the clones was nevertheless much smaller than those generated during development and they did not reach the innermost areas, at least at the relatively short time points analyzed by the authors (King et al., 2009). The relevance of the contribution of GLI1<sup>+</sup> cells to adrenal homeostasis in adults has not been investigated in detail so far.

Apart from *Shh* progenitors, other cells located within the *zona glomerulosa* have been shown to have the ability to differentiate and migrate centripetally. In recent work by the Breaux's lab the fate of aldosterone producing cells was followed by generating mice harboring Cre recombinase in the *Cyp11B2* locus (*Cyp11B2:Cre* or *AS:Cre*) (Freedman et al., 2013). When crossing *AS:Cre* mice with a reporter line the authors were able to detect patches of cells that were centripetally expanding and reaching the innermost cortex by 12 weeks of age (Fig. 3) (Freedman et al., 2013). Similar results were obtained in a regeneration model using dexamethasone. Interestingly, CYP11B2<sup>+</sup> cells participated in the regeneration process indicating a role of glomerulosa cells in adrenocortical regeneration (Freedman et al., 2013). While these results clearly show lineage conversion of glomerulosa into fasciculata cells, it remains unclear whether this is a process occurring only during adrenocortical growth (both experiments were performed using young mice) or whether it is a continuous event throughout life. Generation of *Cyp11B2:CreER* mice used to perform cell lineage tracing experiments in adult life would help answer this open question.

Independent evidence for a role of cells located within the *zona glomerulosa* in maintaining adrenal homeostasis come from mice deleted for the *Ctnnb1* gene (encoding for  $\beta$ -catenin) (Kim et al., 2008). Deletion of *Ctnnb1* in the developing adrenal cortex with a highly expressing *Sf1:Cre* transgene (*Sf1:Cre<sup>high</sup>*) induced adrenal aplasia in newborns (Bingham et al., 2006; Kim et al., 2008). Interestingly, mice with *Ctnnb1* deleted by a low expressing *Sf1:Cre* transgene (*Sf1:Cre<sup>low</sup>*) presented normal adrenals at birth, but underwent a progressive cortical loss in adult life (Bingham et al., 2006; Kim et al., 2008).

On the contrary, hyper activation of Wnt signaling within the adrenal cortex is a hallmark for adrenocortical tumors (Berthon et al., 2012) and is one of the most frequent alterations found in aldosterone producing adenomas in human (Berthon et al., 2014). Indeed, when a constitutive active form of  $\beta$ -catenin ( $\beta$ -catenin  $\Delta$ -exon3) is expressed in steroidogenic cells of the adrenal cortex, mice developed adrenocortical carcinoma with an increased proportion of glomerulosa cells and as a consequence hyperaldosteronism (Berthon et al., 2010).

Taken together these results suggest the importance of properly balancing Wnt signaling in adrenal development and homeostasis. Given the fact that  $\beta$ -catenin activation is restricted to the *zona glomerulosa*, we can speculate that this pathway is important in maintaining both glomerulosa identity and possibly in



**Fig. 3.** Comparison of the role of WT1 in adrenogonadal development and the differentiation of AGP like cells in the adult adrenal cortex. (A) During development, WT1 and GATA4 expression marks the early AGP (light blue) before thickening of the coelomic epithelium. By E9.75 SF1, a direct target of WT1 can be detected in the late AGP (dark blue) prior to separation of the AGP into adrenal (yellow) and gonadal (red) primordia. (B) In the adult adrenal WT1<sup>+</sup>; GATA4<sup>+</sup> capsular cells (light blue) give rise to 'A cells' (dark blue), which – similar to what happens in development – acquire SF1 expression and can terminally differentiate into adrenocortical or, following gonadectomy, to sex hormone producing cells (B cells). Glomerulosa CYP11B2<sup>+</sup> cells can as well differentiate into fasciculata cells. (C) Schematic showing the main factors involved in differentiation of steroidogenic cells. The same factors are involved in both embryonic development and in adult homeostasis.

regulating progenitor cells homeostasis. How  $\beta$ -catenin activation within the *zona glomerulosa* is achieved remains an important open question. Our own unpublished data point to a crucial role of Rspodins that are expressed within the subcapsular compartment.

### 5.3. *Wt1*<sup>+</sup> progenitors in adulthood and the role of capsular cells

Another possible location for adrenocortical stem cells is the mesenchymal capsule. In a recent paper published by our group we discovered the existence of long living WT1<sup>+</sup> cells, which reside within the adrenal capsule throughout life (Bandiera et al., 2013). These cells directly derive from mesenchymal cells that encapsulate the adrenal primordium during development and maintain AGP features throughout life. In adult life, WT1<sup>+</sup> capsular cells invade the cortex and generate wedges of spindle shape cells gradually invading deeper areas (Fig. 3). Those invading cells maintain WT1 expression and acquire mild expression of SF1, but do not express steroidogenic markers. Interestingly, when performing cell lineage tracing analysis using a *Wt1:Cre-ERT2* line (Muzumdar et al., 2007; Zhou et al., 2008), we observed that a small proportion of the cortical WT1 expressing cells had terminally differentiated into adrenocortical cells, which express the fasciculata marker *Akr1b7* (Bandiera et al., 2013). Thus, WT1<sup>+</sup> capsular cells are adrenocortical stem/progenitor cells (Fig. 3). However, under normal conditions terminal differentiation is a very rare event and it is unlikely that those cells represent the main source of steroidogenic cells that maintain adrenal homeostasis.

When mice are subjected to gonadectomy, adrenal glands undergo severe cortical rearrangements. Initial appearance of subcapsular spindle shaped cells (called A cells) is followed by formation of steroidogenic gonadal-like cells (B cells) (Woolley et al., 1952, 1953). This process was described as a malignancy induced by the

increased levels of luteinizing hormone (LH) as a consequence of gonadectomy (Bielinska et al., 2003, 2005; Kero et al., 2000; Woolley et al., 1952, 1953). By performing gonadectomy to *Wt1:Cre-ERT2*; *mTmG* mice few days after Cre activation at 10–12 weeks of age, we could observe a quick and remarkable expansion of the pool of WT1<sup>+</sup> spindle shaped cortical cells. Those cells will ultimately differentiate into sex hormones producing gonadal-like cells (Bandiera et al., 2013). We concluded that gonadectomy induces already existing WT1<sup>+</sup> cortical cells, which most likely coincide with previously described 'A cells', to proliferate and differentiate into gonadal-like cells (B cells) (Fig. 3).

WT1 is not only a marker for these cells, but plays also an important role in maintaining their undifferentiated state. In fact, to undergo terminal differentiation *Wt1* needs to be shut down in both normal homeostasis or after gonadectomy (Bandiera et al., 2013). Transgenic mice ectopically expressing the transcriptionally active isoform of WT1(-KTS) in the developing adrenal cortex (*Rosa26:Wt1-KTS*; *Sf1:Cre<sup>flp</sup>* mice) develop highly abnormal adrenal glands mostly composed by undifferentiated cells both histologically and molecularly similar to 'A cells' (Bandiera et al., 2013). Interestingly, WT1 accomplishes this function by directly upregulating *Tcf21*, a transcription factor able to repress *Sf1* and thus preventing terminal differentiation (Bandiera et al., 2013; Franca et al., 2013; Tamura et al., 2001). TCF21 is coexpressed with WT1 in both capsular cells and cortical 'A cells' and was suggested by the Hammer's lab as a possible marker for adrenocortical stem cells (Kim and Hammer, 2007; Kim et al., 2009).

Given the fact that both WT1<sup>+</sup> and GLI1<sup>+</sup> cells are located in the adrenal capsule we investigated the relations between those two markers. Indeed, whereas most capsular cells express GLI1, only a subset of them, and mostly those located in the external capsule, also express WT1. Interestingly, spindle shaped WT1<sup>+</sup> cortical cells also expressed GLI1. Indeed we confirmed *Gli1* to be a direct target

of WT1 and to be ectopically expressed in undifferentiated cells in *Rosa26:Wt1-KTS; Sf1:Cre<sup>high</sup>* mice (Bandiera et al., 2013).

Taken together our data indicate that WT1<sup>+</sup> capsular cells represent a reservoir stem cell population with some features resembling early AGP cells (including expression of GATA4 and absence of SF1). Those cells will recapitulate developmental pathways upregulating *Sf1*, which is a direct target of WT1 (Wilhelm and Englert, 2002) and originating 'A cells', which maintain the potential to differentiate in both gonadal and adrenocortical lineages as happens in late AGP cells. Whereas terminal differentiation is rare, it can be triggered by extreme events such as gonadectomy.

Despite its long history the debate about adrenocortical stem cells is still fascinating the scientific community. The latest discoveries are depicting a very complex scenario in which different stem/progenitor cell populations coexist to serve different roles. Better characterization of those populations and development of new genetic tools will help to shed further light on the intriguing world of adrenocortical stem cells.

## 6. Conclusions and perspectives

In summary, WT1 serves multiple roles during adrenogonadal development. (1) It is essential for AGP survival, which involves activation of *Sf1* expression. (2) It plays an essential role during sex determination by controlling key genes in male (*Sry*) and probably female development (*Wnt4*, *Rspo1*). (3) It is required for the differentiation and maintenance of Sertoli cells. These multiple and highly diverse functions of WT1 are achieved through the interaction with tissue-specific transcription factors and epigenetic modifiers. On the contrary, WT1 expression needs to be suppressed in the steroidogenic adrenal cortex and ectopic expression seems to be incompatible with a fully differentiated steroidogenic cell (Bandiera et al., 2013).

While in the past research has mostly focused on the developmental function of WT1, it is clear that this gene is also required for adult homeostasis. We have seen that continuous expression is essential to maintain Sertoli cell function, but the role of WT1 in adult female gonads is presently unknown. In addition, it is unclear how important WT1<sup>+</sup> progenitors are for normal adrenal homeostasis and whether similar cells exist in other organs. Future analysis will therefore need to focus on tissue-specific deletion of WT1 in a time-controlled manner (e.g. tissue-specific Cre-ERT2 system). This should allow us to further understand WT1 function in maintaining cellular differentiation, uncover further cell lineage relationships and reveal whether WT1 may also mark adult progenitor populations in other organs than the adrenal.

## Acknowledgements

This work was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-ADSTEM & ANR-11-LABX-0028-01) and Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer (SL22020605297, PJA 20131200236). R.B. was supported by a fellowship from the Boehringer Ingelheim Fonds and ARC.

## References

Andersen, S.R., Geertinger, P., Larsen, H.W., Mikkelsen, M., Parving, A., Vestermark, S., et al., 1977. Aniridia, cataract and gonadoblastoma in a mentally retarded girl with deletion of chromosome II. A clinicopathological case report. *Ophthalmologica* 176, 171–177.

Arango, N.A., Lovell-Badge, R., Behringer, R.R., 1999. Targeted mutagenesis of the endogenous mouse *Mis* gene promoter: *in vivo* definition of genetic pathways of vertebrate sexual development. *Cell* 99, 409–419.

Bamforth, S.D., Braganca, J., Eloranta, J.J., Murdoch, J.N., Marques, F.I., Kranc, K.R., et al., 2001. Cardiac malformations, adrenal agenesis, neural crest defects and exencephaly in mice lacking *Cited2*, a new Tlap2 co-activator. *Nat. Genet.* 29, 469–474.

Bandiera, R., Vidal, V.P., Moramedi, F.J., Clarkson, M., Sahut-Barnola, I., von Gise, A., et al., 2013. WT1 maintains adrenal-gonadal primordium identity and marks a population of AGP-like progenitors within the adrenal gland. *Dev. Cell* 27, 5–18.

Barboux, S., Niaudet, P., Gubler, M.C., Grunfeld, J.P., Jaubert, F., Kuttann, F., et al., 1997. Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome. *Nat. Genet.* 17, 467–470.

Bernard, P., Ryan, J., Sim, H., Czech, D.P., Sinclair, A.H., Koopman, P., et al., 2012. Wnt signaling in ovarian development inhibits SF1 activation of *Sox9* via the Tesco enhancer. *Endocrinology* 153, 901–912.

Berta, P., Hawkins, J.R., Sinclair, A.H., Taylor, A., Griffiths, B.L., Goodfellow, P.N., et al., 1990. Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature* 348, 448–450.

Berthou, A., Sahut-Barnola, I., Lambert-Langlais, S., de Joussineau, C., Damon-Soubeyrand, C., Louiser, E., et al., 2010. Constitutive beta-catenin activation induces adrenal hyperplasia and promotes adrenal cancer development. *Hum. Mol. Genet.* 19, 1561–1576.

Berthou, A., Martinez, A., Bertherat, J., Val, P., 2012. Wnt/beta-catenin signalling in adrenal physiology and tumour development. *Mol. Cell. Endocrinol.* 351, 87–95.

Berthou, A., Drelon, C., Ragazzon, B., Boulkroun, S., Tissier, F., Amar, L., et al., 2014. WNT/beta-catenin signalling is activated in aldosterone-producing adenomas and controls aldosterone production. *Hum. Mol. Genet.* 23, 889–905.

Biason-Laubier, A., Konrad, D., Navratil, F., Schoenle, E.J., 2004. A WNT4 mutation associated with Mullerian-duct regression and virilization in a 46,XX woman. *N. Engl. J. Med.* 351, 792–798.

Bielinska, M., Parviainen, H., Porter-Tinge, S.B., Kiiveri, S., Genova, E., Rahman, N., et al., 2003. Mouse strain susceptibility to gonadectomy-induced adrenocortical tumor formation correlates with the expression of GATA-4 and luteinizing hormone receptor. *Endocrinology* 144, 4123–4133.

Bielinska, M., Genova, E., Boime, I., Parviainen, H., Kiiveri, S., Leppaluoto, J., et al., 2005. Gonadotropin-induced adrenocortical neoplasia in NU/J nude mice. *Endocrinology* 146, 3975–3984.

Bingham, N.C., Verma-Kurvari, S., Parada, L.F., Parker, K.L., 2006. Development of a steroidogenic factor 1/Cre transgenic mouse line. *Genesis* 44, 419–424.

Bland, M.L., Desclozeaux, M., Ingraham, H.A., 2003. Tissue growth and remodeling of the embryonic and adult adrenal gland. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 995, 59–72.

Bor, Y.C., Swartz, J., Morrison, A., Rekosh, D., Ladomery, M., Hammarskjold, M.L., 2006. The Wilms' tumor 1 (WT1) gene (+KTS isoform) functions with a CTE to enhance translation from an unspliced RNA with a retained intron. *Genes Dev.* 20, 1597–1608.

Bradford, S.T., Wilhelm, D., Bandiera, R., Vidal, V., Schedl, A., Koopman, P., 2009. A cell-autonomous role for WT1 in regulating *Sry* *in vivo*. *Hum. Mol. Genet.* 18, 3429–3438.

Buganim, Y., Itskovich, E., Hu, Y.C., Cheng, A.W., Ganz, K., Sarkar, S., et al., 2012. Direct reprogramming of fibroblasts into embryonic Sertoli-like cells by defined factors. *Cell Stem Cell* 11, 373–386.

Call, K.M., Glaser, T., Ito, C.Y., Buckler, A.J., Pelletier, J., Haber, D.A., et al., 1990. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell* 60, 509–520.

Caricasole, A., Duarte, A., Larsson, S.H., Hastie, N.D., Little, M., Holmes, G., et al., 1996. RNA binding by the Wilms tumor suppressor zinc finger proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 7562–7566.

Carpenter, B., Hill, K.J., Charalambous, M., Wagner, K.J., Lahiri, D., James, D.J., et al., 2004. BASP1 is a transcriptional cosuppressor for the Wilms' tumor suppressor protein WT1. *Mol. Cell. Biol.* 24, 537–549.

Carre, G.A., Greenfield, A., 2014. Characterising novel pathways in testis determination using mouse genetics. *Sex. Dev.* 8, 199–207.

Chaboissier, M.C., Kobayashi, A., Vidal, V.I., Lutzendorf, S., van de Kant, H.J., Wegner, M., et al., 2004. Functional analysis of *Sox8* and *Sox9* during sex determination in the mouse. *Development* 131, 1891–1901.

Chang, H., Gao, F., Guillou, F., Taketo, M.M., Huff, V., Behringer, R.R., 2008. Wt1 negatively regulates beta-catenin signaling during testis development. *Development* 135, 1875–1885.

Chassot, A.A., Ranc, F., Gregoire, E.P., Roepers-Gajadien, H.L., Taketo, M.M., Camerino, G., et al., 2008. Activation of (beta)-catenin signalling by *Rspo1* controls differentiation of the mammalian ovary. *Hum. Mol. Genet.* 17, 1264–1277.

Chau, Y.Y., Brownstein, D., Mjoseng, H., Lee, W.C., Buza-Vidas, N., Nerlov, C., et al., 2011. Acute multiple organ failure in adult mice deleted for the developmental regulator *wf1*. *PLoS Genet.* 7, e1002404.

Davies, R.C., Calvio, C., Bratt, E., Larsson, S.H., Lamond, A.I., Hastie, N.D., 1998. WT1 interacts with the splicing factor U2AF65 in an isoform-dependent manner and can be incorporated into spliceosomes. *Genes Dev.* 12, 3217–3225.

DeFalco, T., Capel, B., 2009. Gonad morphogenesis in vertebrates: divergent means to a convergent end. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 25, 457–482.

DeFalco, T., Takahashi, S., Capel, B., 2011. Two distinct origins for Leydig cell progenitors in the fetal testis. *Dev. Biol.* 352, 14–26.

Disceza, M.T., Pelletier, J., 2004. Insights into the physiological role of WT1 from studies of genetically modified mice. *Physiol. Genomics* 16, 287–300.

Essafi, A., Webb, A., Berry, R.L., Slight, J., Burn, S.F., Spraggon, L., et al., 2011. A wt1-controlled chromatin switching mechanism underpins tissue-specific wnt4 activation and repression. *Dev. Cell* 21, 559–574.

Franca, M.M., Ferraz-de-Souza, B., Santos, M.G., Lerario, A.M., Fragoso, M.C., Latronico, A.C., et al., 2013. POD-1 binding to the E-box sequence inhibits SF-1 and StAR expression in human adrenocortical tumor cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 371, 140–147.

- Freedman, B.D., Kempna, P.B., Carlone, D.L., Shah, M.S., Guagliardo, N.A., Barrett, P.Q., et al., 2013. Adrenocortical zonation results from lineage conversion of differentiated zona glomerulosa cells. *Dev. Cell* 26, 666–673.
- Fujimoto, Y., Tanaka, S.S., Yamaguchi, Y.L., Kobayashi, H., Kuroki, S., Tachibana, M., et al., 2013. Homeoproteins Six1 and Six4 regulate male sex determination and mouse gonadal development. *Dev. Cell* 26, 416–430.
- Gao, F., Maiti, S., Sun, G., Ordonez, N.G., Udtha, M., Deng, J.M., et al., 2004. The Wt1+/R394W mouse displays glomerulosclerosis and early-onset renal failure characteristic of human Denys-Drash syndrome. *Mol. Cell. Biol.* 24, 9899–9910.
- Gao, F., Maiti, S., Alam, N., Zhang, Z., Deng, J.M., Behringer, R.R., et al., 2006. 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.* 103, 11987–11992.
- Gessler, M., Poustka, A., Cavenee, W., Neve, R.L., Orkin, S.H., Bruns, G.A., 1990. Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. *Nature* 343, 774–778.
- Gottschau, M., 1883. Struktur und embryonale entwicklung der nebennieren bei säugetieren. *Arch. Anat. Physiol.* 9, 412–458.
- Guasti, L., Candy Sze, W.C., McKay, T., Grose, R., King, P.J., 2013. FGF signalling through Fgf2 isoform Il1b regulates adrenal cortex development. *Mol. Cell. Endocrinol.* 371, 182–188.
- Gubbay, J., Collignon, J., Koopman, P., Capel, B., Economou, A., Munsterberg, A., et al., 1990. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 346, 245–250.
- Haber, D.A., Buckler, A.J., Glaser, T., Call, K.M., Pelletier, J., Sohn, R.L., et al., 1990. An internal deletion within an 11p13 zinc finger gene contributes to the development of Wilms' tumor. *Cell* 61, 1257–1269.
- Hammes, A., Guo, J.K., Lutsch, G., Leheste, J.R., Landrock, D., Ziegler, U., et al., 2001. Two splice variants of the Wilms' tumor 1 gene have distinct functions during sex determination and nephron formation. *Cell* 106, 319–329.
- Harano, O., Takakusu, A., Nomura, M., Morohashi, K., 1996. Identical origin of adrenal cortex and gonad revealed by expression profiles of Ad4BP/SF-1. *Genes Cells* 1, 663–671.
- Hohenstein, P., Hastie, N.D., 2006. The many facets of the Wilms' tumour gene, WT1. *Hum. Mol. Genet.* 15 (Spec2), R196–R201.
- Hu, M.C., Chou, S.J., Huang, Y.Y., Hsu, N.C., Li, H., Chung, B.C., 1999. Tissue-specific, hormonal, and developmental regulation of SCC-LacZ expression in transgenic mice leads to adrenocortical zone characterization. *Endocrinology* 140, 5609–5618.
- Hu, Y.C., Okumura, L.M., Page, D.C., 2013. Gata4 is required for formation of the genital ridge in mice. *PLoS Genet.* 9, e1003629.
- Huang, C.C., Miyagawa, S., Matsumaru, D., Parker, K.L., Yao, H.H., 2010. Progenitor cell expansion and organ size of mouse adrenal is regulated by sonic hedgehog. *Endocrinology* 151, 1119–1128.
- Iannaccone, P.M., Weinberg, W.C., 1987. The histogenesis of the rat adrenal cortex: a study based on histologic analysis of mosaic pattern in chimeras. *J. Exp. Zool.* 243, 217–223.
- Ingle, D.J., Higgins, G.M., 1938. Autotransplantation and regeneration of the adrenal gland. *Endocrinology* 22, 458–464.
- Jaubert, F., Vasilu, V., Patey-Mariaud de Serre, N., Auber, F., Jeanpierre, C., Gubler, M.C., et al., 2003. Gonad development in Drash and Frasier syndromes depends on WT1 mutations. *Arkh. Patol.* 65, 40–44.
- Kennedy, D., Ramsdale, T., Mattick, J., Little, M., 1996. An RNA recognition motif in Wilms' tumour protein (WT1) revealed by structural modelling. *Nat. Genet.* 12, 329–331.
- Kent, J., Coriat, A.M., Sharpe, P.T., Hastie, N.D., van Heyningen, V., 1995. The evolution of WT1 sequence and expression pattern in the vertebrates. *Oncogene* 11, 1781–1792.
- Kero, J., Poutanen, M., Zhang, F.P., Rahman, N., McNicol, A.M., Nilson, J.H., et al., 2000. Elevated luteinizing hormone induces expression of its receptor and promotes steroidogenesis in the adrenal cortex. *J. Clin. Invest.* 105, 633–641.
- Kikuchi, H., Takata, A., Akasaka, Y., Fukuzawa, R., Yoneyama, H., Kurosawa, Y., et al., 1998. Do intronic mutations affecting splicing of WT1 exon 9 cause Frasier syndrome? *J. Med. Genet.* 35, 45–48.
- Kim, A.C., Hammer, G.D., 2007. Adrenocortical cells with stem/progenitor cell properties: recent advances. *Mol. Cell. Endocrinol.* 265–266, 10–16.
- Kim, A.C., Reuter, A.L., Zubair, M., Else, T., Serecky, K., Bingham, N.C., et al., 2008. Targeted disruption of beta-catenin in Sf1-expressing cells impairs development and maintenance of the adrenal cortex. *Development* 135, 2593–2602.
- Kim, A.C., Bartaskar, F.M., Heaton, J.H., Else, T., Kelly, V.R., Krill, K.T., et al., 2009. In search of adrenocortical stem and progenitor cells. *Endocr. Rev.* 30, 241–263.
- Kim, Y., Kobayashi, A., Sekido, R., DiNapoli, L., Brennan, J., Chaboissier, M.C., et al., 2006. Fgf9 and Wnt4 act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination. *PLoS Biol.* 4, e187.
- Kim, Y., Bingham, N., Sekido, R., Parker, K.L., Lovell-Badge, R., Capel, B., 2007. Fibroblast growth factor receptor 2 regulates proliferation and Sertoli differentiation during male sex determination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 16558–16563.
- King, P., Paul, A., Lauffer, E., 2009. Shh signaling regulates adrenocortical development and identifies progenitors of steroidogenic lineages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 21185–21190.
- Klamt, B., Koziell, A., Poular, F., Wieacker, P., Scambler, P., Berta, P., et al., 1998. Frasier syndrome is caused by defective alternative splicing of WT1 leading to an altered ratio of WT1+/KTS splice isoforms. *Hum. Mol. Genet.* 7, 709–714.
- Koziell, A., Charmandari, E., Hindmarsh, P.C., Rees, L., Scambler, P., Brook, C.G., 2000. Frasier syndrome, part of the Denys Drash continuum or simply a WT1 gene associated disorder of intersex and nephropathy? *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 52, 519–524.
- Kreidberg, J.A., Sariola, H., Loring, J.M., Maeda, M., Pelletier, J., Housman, D., et al., 1993. WT-1 is required for early kidney development. *Cell* 74, 679–691.
- Ladomery, M., Sommerville, J., Woolner, S., Slight, J., Hastie, N., 2003. Expression in Xenopus oocytes shows that WT1 binds transcripts in vivo, with a central role for zinc finger one. *J. Cell Sci.* 116, 1539–1549.
- Laiti, J.H., Dyson, H.J., Wright, P.E., 2000. Molecular basis for modulation of biological function by alternate splicing of the Wilms' tumor suppressor protein [In process citation]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 11932–11935.
- Larsson, S.H., Charlieu, J.P., Miyagawa, K., Engelkamp, D., Rassoulzadegan, M., Ross, A., et al., 1995. Subnuclear localization of WT1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing. *Cell* 81, 391–401.
- Lavery, R., Chassot, A.A., Pauper, E., Gregoire, E.P., Klopfenstein, M., de Rooij, D.G., et al., 2012. Testicular differentiation occurs in absence of R-spondin1 and Sox9 in mouse sex reversals. *PLoS Genet.* 8, e1003170.
- Little, M.H., Williamson, K.A., Mannens, M., Kelsey, A., Gosden, C., Hastie, N.D., et al., 1993. Evidence that WT1 mutations in Denys-Drash syndrome patients may act in a dominant-negative fashion. *Hum. Mol. Genet.* 2, 259–264.
- Liu, C.F., Liu, C., Yao, H.H., 2010. Building pathways for ovary organogenesis in the mouse embryo. *Curr. Top. Dev. Biol.* 90, 263–290.
- Luo, X., Ikeda, Y., Parker, K.L., 1994. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 77, 481–490.
- Maatouk, D.M., DiNapoli, L., Alvers, A., Parker, K.L., Taketo, M.M., Capel, B., 2008. Stabilization of beta-catenin in XY gonads causes male-to-female sex-reversal. *Hum. Mol. Genet.* 17, 2949–2955.
- Madden, S.L., Cook, D.M., Morris, J.F., Gashler, A., Sukharme, V.P., Rauscher, F.J.I.I.I., 1991. Transcriptional repression mediated by the WT1 Wilms tumor gene product. *Science* 253, 1550–1553.
- Mandel, H., Shemer, R., Borochowitz, Z.U., Okopnik, M., Knopf, C., Indelman, M., et al., 2008. SERKAL syndrome: an autosomal-recessive disorder caused by a loss-of-function mutation in WNT4. *Am. J. Hum. Genet.* 82, 39–47.
- Manuylov, N.L., Fujiwara, Y., Adameyko, I.L., Poular, F., Tevosian, S.G., 2007. The regulation of Sox9 gene expression by the GATA4/FOG2 transcriptional complex in dominant XX sex reversal mouse models. *Dev. Biol.* 307, 356–367.
- Matson, C.K., Murphy, M.W., Sarver, A.L., Griswold, M.D., Bardwell, V.J., Zarkower, D., 2011. DMRT1 prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis. *Nature* 476, 101–104.
- McNicol, A.M., Duffy, A.E., 1987. A study of cell migration in the adrenal cortex of the rat using bromodeoxyuridine. *Cell Tissue Kinet.* 20, 519–526.
- Miles, C.G., Slight, J., Spraggon, L., O'Sullivan, M., Patek, C., Hastie, N.D., 2003. Mice lacking the 68-amino-acid, mammal-specific N-terminal extension of WT1 develop normally and are fertile. *Mol. Cell. Biol.* 23, 2608–2613.
- Miyamoto, Y., Taniguchi, H., Hamel, F., Silversides, D.W., Viger, R.S., 2008. A GATA4/WT1 cooperation regulates transcription of genes required for mammalian sex determination and differentiation. *BMC Mol. Biol.* 9, 44.
- Molyneux, K.A., Stallock, J., Schaible, K., Wylie, C., 2001. Time-lapse analysis of living mouse germ cell migration. *Dev. Biol.* 240, 488–498.
- Moore, A.W., McInnes, L., Kreidberg, J., Hastie, N.D., Schedl, A., 1999. YAC complementation shows a requirement for Wt1 in the development of epicardium, adrenal gland and throughout nephrogenesis. *Development* 126, 1845–1857.
- Mork, L., Maatouk, D.M., McMahon, J.A., Guo, J.J., Zhang, P., McMahon, A.P., et al., 2012. Temporal differences in granulosa cell specification in the ovary reflect distinct follicle fates in mice. *Biol. Reprod.* 86, 37.
- Morley, S.D., Viard, I., Chung, B.C., Ikeda, Y., Parker, K.L., Mullins, J.J., 1996. Variegated expression of a mouse steroid 21-hydroxylase/beta-galactosidase transgene suggests centripetal migration of adrenocortical cells. *Mol. Endocrinol.* 10, 585–598.
- Morohashi, K., 1997. The ontogenesis of the steroidogenic tissues. *Genes Cells* 2, 95–106.
- Moramedi, F.J., Badro, D.A., Clarkson, M., Rita Lecca, M., Bradford, S.T., Buske, F.A., et al., 2014. WT1 controls antagonistic FGF and BMP-pSMAD pathways in early renal progenitors. *Nat. Commun.* 5, 4444.
- Muzumdar, M.D., Tasic, B., Miyamichi, K., Li, L., Luo, L., 2007. A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *Genesis* 45, 593–605.
- Natoli, T.A., McDonald, A., Alberta, J.A., Taglienti, M.E., Housman, D.E., Kreidberg, J.A., 2002. A mammal-specific exon of WT1 is not required for development or fertility. *Mol. Cell. Biol.* 22, 4433–4438.
- Nicol, B., Yao, H.H., 2014. Building an ovary: insights into establishment of somatic cell lineages in the mouse. *Sex. Dev.* 8, 243–251.
- Nussmann, T., Zwemer, R.L., 1941. A study of the life history of cortico-adrenal gland cells of the rat by means of trypan blue injections. *Anat. Rec.* 80, 421–429.
- Parma, P., Radi, O., Vidal, V., Chaboissier, M.C., Dellambra, E., Valentini, S., et al., 2006. R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nat. Genet.* 38, 1304–1309.
- Pelletier, J., Bruening, W., Li, F.P., Haber, D.A., Glaser, T., Housman, D.E., 1991. WT1 mutations contribute to abnormal genital system development and hereditary Wilms' tumour. *Nature* 353, 431–434.
- Pitetti, J.L., Calvel, P., Romero, Y., Conne, B., Truong, V., Papaioannou, M.D., et al., 2013. Insulin and IGF1 receptors are essential for XX and XY gonadal differentiation and adrenal development in mice. *PLoS Genet.* 9, e1003160.

- Quinn, A., Koopman, P., 2012. The molecular genetics of sex determination and sex reversal in mammals. *Semin. Reprod. Med.* 30, 351–363.
- Rao, M.K., Pham, J., Imam, J.S., MacLean, J.A., Murali, D., Furuta, Y., et al., 2006. Tissue-specific RNAi reveals that WT1 expression in nurse cells controls germ cell survival and spermatogenesis. *Genes Dev.* 20, 147–152.
- Rastetter, R.H., Bernard, P., Palmer, J.S., Chassot, A.A., Chen, H., Western, P.S., et al., 2014. Marker genes identify three somatic cell types in the fetal mouse ovary. *Dev. Biol.* 394, 242–252.
- Riccardi, V.M., Sujansky, E., Smith, A.C., Francke, U., 1978. Chromosomal imbalance in the Aniridia-Wilms' tumor association: 11p interstitial deletion. *Pediatrics* 61, 604–610.
- Richard, D.J., Schumacher, V., Royer-Pokora, B., Roberts, S.G., 2001. Par4 is a coactivator for a splice isoform-specific transcriptional activation domain in WT1. *Genes Dev.* 15, 328–339.
- Schmahl, J., Eicher, E.M., Washburn, L.L., Capel, B., 2000. Sry induces cell proliferation in the mouse gonad. *Development* 127, 65–73.
- Schmahl, J., Kim, Y., Colvin, J.S., Ornitz, D.M., Capel, B., 2004. Fgf9 induces proliferation and nuclear localization of FGFR2 in Sertoli precursors during male sex determination. *Development* 131, 3627–3636.
- Schmidt, D., Ovirt, C.E., Anlag, K., Fehsenfeld, S., Gredsted, L., Treier, A.C., et al., 2004. The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development* 131, 933–942.
- Sekido, R., Lovell-Badge, R., 2008. Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature* 453, 930–934.
- Srichai, M.B., Konieczkowski, M., Padiyar, A., Konieczkowski, D.J., Mukherjee, A., Hayden, P.S., et al., 2004. A WT1 co-regulator controls podocyte phenotype by shuttling between adhesion structures and nucleus. *J. Biol. Chem.* 279, 14398–14408.
- Suri, M., Kelehan, P., O'Neill, D., Vadeyar, S., Grant, J., Ahmed, S.F., et al., 2007. WT1 mutations in Meacham syndrome suggest a coelomic mesothelial origin of the cardiac and diaphragmatic malformations. *Am. J. Med. Genet. A* 143A, 2312–2320.
- Svingen, T., Koopman, P., 2013. Building the mammalian testis: origins, differentiation, and assembly of the component cell populations. *Genes Dev.* 27, 2409–2426.
- Tamura, M., Kanno, Y., Chuma, S., Saito, T., Nakatsuji, N., 2001. Pod-1/Capsulin shows a sex- and stage-dependent expression pattern in the mouse gonad development and represses expression of Ad4BP/SF-1. *Mech. Dev.* 102, 135–144.
- Tevosian, S.G., Albrecht, K.H., Crispino, J.D., Fujiwara, Y., Eicher, E.M., Orkin, S.H., 2002. Gonadal differentiation, sex determination and normal Sry expression in mice require direct interaction between transcription partners GATA4 and FOG2. *Development* 129, 4627–4634.
- Uhlenhaut, N.H., Jakob, S., Anlag, K., Eisenberger, T., Sekido, R., Kress, J., et al., 2009. Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation. *Cell* 139, 1130–1142.
- Vainio, S., Heikkila, M., Kispert, A., Chin, N., McMahon, A.P., 1999. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* 397, 405–409.
- Val, P., Jeays-Ward, K., Swain, A., 2006. Identification of a novel population of adrenal-like cells in the mammalian testis. *Dev. Biol.* 299, 250–256.
- Val, P., Martinez-Barbera, J.P., Swain, A., 2007. Adrenal development is initiated by Cited2 and Wt1 through modulation of SF-1 dosage. *Development* 134, 2349–2358.
- Vidal, V.P., Chaboissier, M.C., de Rooij, D.G., Schedl, A., 2001. Sox9 induces testis development in XX transgenic mice. *Nat. Genet.* 28, 216–217.
- Walczak, E.M., Hammer, G.D., 2015. Regulation of the adrenocortical stem cell niche: implications for disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* 11, 14–28.
- Walczak, E.M., Kuick, R., Finco, I., Bohin, N., Hrycaj, S.M., Wellik, D.M., et al., 2014. Wnt signaling inhibits adrenal steroidogenesis by cell-autonomous and non-cell-autonomous mechanisms. *Mol. Endocrinol.* 28, 1471–1486.
- Wang, X.N., Li, Z.S., Ren, Y., Jiang, T., Wang, Y.Q., Chen, M., et al., 2013. The Wilms tumor gene, Wt1, is critical for mouse spermatogenesis via regulation of sertoli cell polarity and is associated with non-obstructive azoospermia in humans. *PLoS Genet.* 9, e1003645.
- Wilhelm, D., Englert, C., 2002. The Wilms tumor suppressor WT1 regulates early gonad development by activation of SF1. *Genes Dev.* 16, 1839–1851.
- Woolley, G.W., Dickie, M.M., Little, C.C., 1952. Adrenal tumors and other pathological changes in reciprocal crosses in mice. I. Strain DBA x strain CE and the reciprocal. *Cancer Res.* 12, 142–152.
- Woolley, G.W., Dickie, M.M., Little, C.C., 1953. Adrenal tumors and other pathological changes in reciprocal crosses in mice. II. An introduction to results of four reciprocal crosses. *Cancer Res.* 13, 231–245.
- Zajicek, G., Ariel, I., Arber, N., 1986. The streaming adrenal cortex: direct evidence of centripetal migration of adrenocytes by estimation of cell turnover rate. *J. Endocrinol.* 111, 477–482.
- Zheng, W., Zhang, H., Gorre, N., Risal, S., Shen, Y., Liu, K., 2014. Two classes of ovarian primordial follicles exhibit distinct developmental dynamics and physiological functions. *Hum. Mol. Genet.* 23, 920–928.
- Zhou, B., Ma, Q., Rajagopal, S., Wu, S.M., Domian, I., Rivera-Feliciano, J., et al., 2008. Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. *Nature* 454, 109–113.
- Zubair, M., Ishihara, S., Oka, S., Okumura, K., Morohashi, K., 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, 4111–4121.

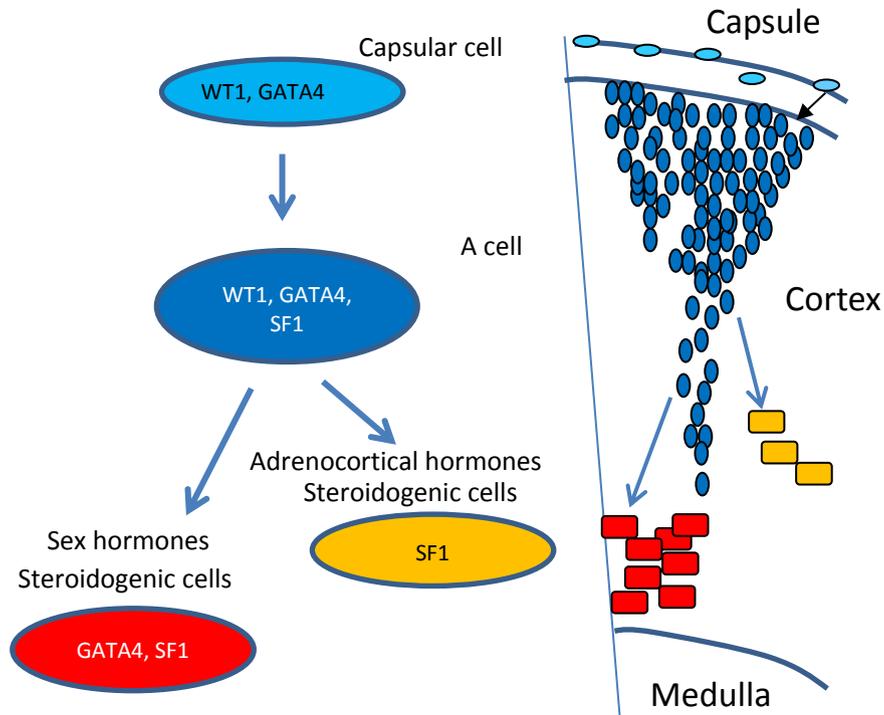
# IV. Homéostasie

L'homéostasie d'un tissu est sa capacité à se régénérer pour remplacer les cellules mortes et ainsi conserver sa taille et sa fonction tout au long de sa vie. Pour cela, il doit avoir une réserve de cellules souches indifférenciées capables de proliférer et de se différencier en différents types cellulaires spécialisés. Cette capacité doit être finement régulée, puisque pas assez de prolifération conduirait à une réduction progressive du tissu (hypotrophie) alors que trop de prolifération conduirait à une augmentation de taille (hypertrophie).

Dans le cortex surrénalien, il a été d'abord proposé un modèle centripétal dans lequel les cellules souches seraient situées à la périphérie (capsule ou zone subcapsulaire) et migreraient de manière centripète pour donner successivement les cellules des différentes zones. Nous savons aujourd'hui que la réalité est plus complexe puisque plusieurs études ont démontré la présence de différents types cellulaires pouvant être considérés comme des cellules souches/progénitrices s'activant à des périodes ou dans des conditions particulières. Les mécanismes régulant ces populations cellulaires et leur activation sont encore mal connus à ce jour. De plus, il semblerait que l'homéostasie du cortex surrénalien puisse également être maintenue grâce à une certaine plasticité cellulaire permettant à des cellules déjà différenciées de donner un autre type cellulaire.

Dans la capsule, des études de suivi de lignées cellulaires ont démontré l'existence de plusieurs types cellulaires pouvant donner des cellules stéroïdogéniques et non stéroïdogéniques dans le cortex.

Parmi elles, les cellules exprimant le facteur de transcription WT1, sont capables de migrer dans le cortex et de se différencier en cellules stéroïdogéniques exprimant le facteur de transcription SF1 (Bandiera et al., 2013). Toutefois cet événement reste rare mais peut être stimulé par la réalisation d'une gonadectomie. Ces cellules se différencient alors en cellules stéroïdogéniques de type sexuelles (gonadal like). Pour plus de détails sur ce mécanisme voir la revue (Bandiera et al., 2015) dans l'introduction, partie 2.

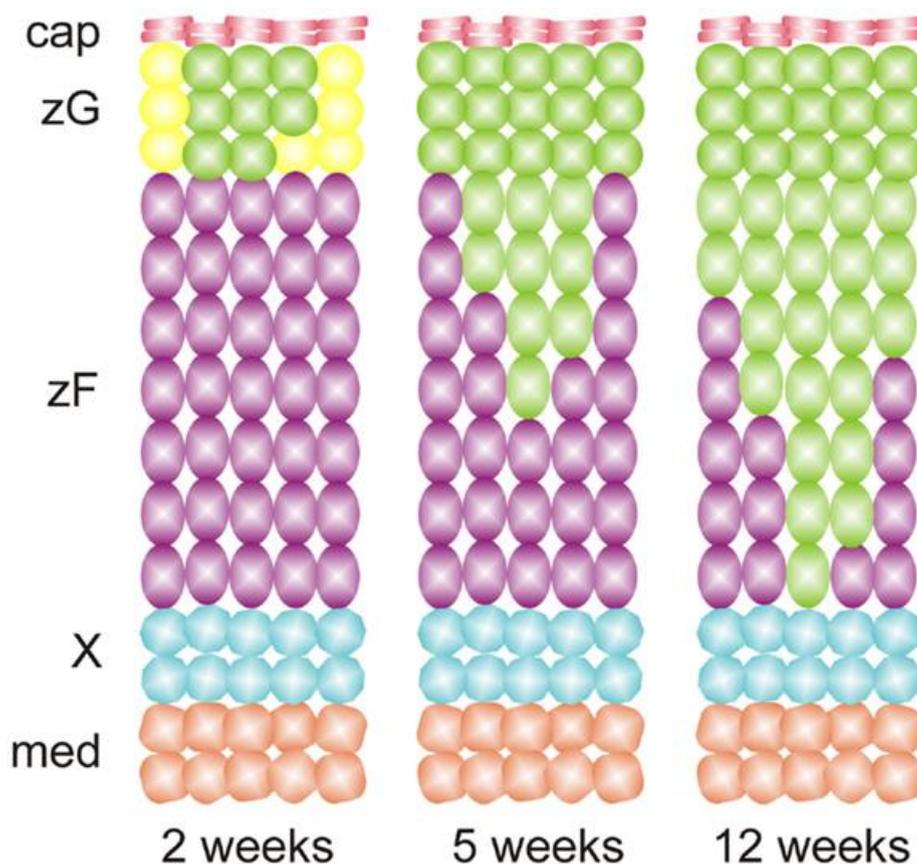


**Figure 15 : Modèle de migration et de différenciation des cellules exprimant WT1 dans des conditions normales ou après une gonadectomie. Adapté de (Bandiera et al., 2013).**

D'autres cellules capsulaires exprimant le facteur de transcription GLI1 ou le facteur de transcription TCF21 sont également capables de migrer dans le cortex et de se différencier mais surtout au cours de la formation du cortex définitif pendant l'embryogenèse (Wood et al., 2013). Les cellules exprimant GLI1 forment alors les cellules stéroïdogéniques alors que les cellules exprimant TCF21 donnent des cellules stromales non-stéroïdogéniques. Ces phénomènes extrêmement rares à l'âge adulte participent peu à l'homéostasie mais peuvent être réactivés dans certaines conditions pathologiques (Berthon et al., 2010; Sahut-Barnola et al., 2010).

Dans la zone glomérulée, il existe également plusieurs types cellulaires dont certains expriment la protéine SHH. Ces cellules stimulent les cellules capsulaires exprimant GLI1 mais sont également capables de migrer et de donner des cellules de type fasciculé (King et al., 2009). D'ailleurs un knock-out du gène *Shh* chez la souris entraîne une hypoplasie de la glande surrénale (King et al., 2009).

D'autres cellules exprimant la protéine CYP11B2 donc déjà différenciés en cellules stéroïdogéniques de type glomérulée produisant de l'aldostérone sont capables de plasticité cellulaire puisqu'elles migrent dans la zone fasciculée et se différencient alors en cellules stéroïdogéniques de type fasciculé produisant du cortisol (Freedman et al., 2013). Mais s'agit-il des mêmes cellules que celles exprimant *Shh* ? L'étude menée par (Walczak et al., 2014) semble démontrer qu'il s'agit de deux populations distinctes.



**Figure 16 : Modèle de conversion des cellules de la zone Glomérulée en cellule de la zone fasciculée.** (Freedman et al., 2013; Pihlajoki et al., 2015)

La voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine semble également impliquée dans l'homéostasie du cortex surrénalien. En effet, l'expression de la protéine  $\beta$ -caténine activée est détectable lors de la formation de l'AGP ainsi que dans les cellules de la zone glomérulée chez l'adulte. L'activation de cette protéine est connue pour maintenir les cellules souches/progénitrices dans un état indifférencié.

Le knock-out conditionnel du gène *Ctnnb1* codant pour la protéine  $\beta$ -caténine dans les cellules du cortex surrénalien montre une réduction drastique des cellules adrénocorticales au stade E12.5 et une absence totale de glande surrénale au stade E16.5 (Kim et al., 2008). La réduction du taux de protéine  $\beta$ -caténine (SF1-Cre low) permet un développement normal de la glande surrénale mais à partir de 30 semaines on observe une dégénérescence du cortex (Kim et al., 2008). Ces phénotypes sont présumés être le résultat d'une déplétion dans les réserves de cellules souches/progénitrices.

De plus, la stabilisation de  $\beta$ -caténine par l'excision de l'exon 3 entraîne une hyperplasie de la glande surrénale à partir de 5 semaines qui se transforme en tumeur à partir de 17 semaines (Berthon et al., 2010) et chez l'homme, les mutations activant la voie Wnt/ $\beta$ -caténine sont la principale cause de tumeurs surrénaliennes.

Une fine régulation de cette voie de signalisation est donc nécessaire au maintien des réserves et à l'activation des cellules souches progénitrices à la fois au cours du développement embryonnaire et chez l'adulte.

## V. Zonation

Chez l'Homme, le cortex surrénalien se compose de trois différentes zones : la zone glomérulée (ZG), la zone fasciculée (ZF) et la zone réticulée (ZR). Elles sont toutes trois différentes de par leur organisation structurale et leur fonction. Elles produisent chacune différents types d'enzymes nécessaires à notre métabolisme et à notre survie. Il est donc nécessaire que la zonation se fasse correctement et soit maintenue tout au long de la vie.

La protéine  $\beta$ -caténine est importante dans l'organisation de nombreux tissus chez l'adulte. Par exemple, dans le foie la présence de cette protéine de manière restrictive dans les cellules du système central est nécessaire au maintien de la zonation. De la même manière, il semblerait que la présence de la protéine  $\beta$ -caténine dans la zone glomérulée soit nécessaire à la zonation du cortex surrénalien. L'activation de  $\beta$ -caténine dans les cellules de la zone fasciculée chez les souris *Akr1b7 : cre; Catnb<sup>lox(ex3)</sup>* entraîne une activation de gènes tels que *Cyp11b2* normalement spécifiques de la zone glomérulée. Des études récentes ont également démontré que la protéine  $\beta$ -caténine devait être absente de la zone fasciculée pour que les cellules puissent se différencier normalement (Drelon et al., 2015).

Les souris Knock-out pour le gène *Wnt4*, agoniste de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, montrent des défauts dans la formation de la zone glomérulée, ainsi qu'une absence de production d'aldostérone (Heikkilä et al., 2002). La voie Wnt/ $\beta$ -caténine doit donc être présente dans la zone glomérulée et absente de la zone fasciculée pour obtenir une zonation normale de la glande surrénale.

Une autre voie de signalisation importante est celle de l'AMP cyclique. En effet celle-ci est active dans la zone fasciculée en réponse à une stimulation par l'hormone ACTH via le récepteur MC2R (Novoselova et al., 2013). Les souris Knock-Out pour le gène codant pour le récepteur MC2R ont d'ailleurs une zone fasciculée atrophiée et ne produisent pas de corticostérone. Leur zone glomérulée, elle n'est pas affectée (Chida et al., 2007). Chez l'Homme, des mutations sur ce gène causent une déficience en glucocorticoïdes due à une glande surrénale atrophiée ne contenant pas de zone fasciculée.

Tout cela montre donc l'importance de la voie de l'AMP cyclique dans la formation et le maintien de la zone fasciculée.

Il a été également démontré que la voie Wnt/ $\beta$ -caténine pouvait inhiber l'expression du récepteur MC2R et donc la voie de l'AMP cyclique (Walczak et al., 2014). Il se pourrait donc qu'une inhibition mutuelle de ces 2 voies de signalisation soit à l'origine de la mise en place et du maintien de la zonation du cortex surrénalien.

# Objectifs

Les protéines de la famille Rspodin, ont pour fonction l'activation de la voie canonique Wnt/ $\beta$ -caténine. Cette voie de signalisation est connue pour être essentielle pour l'activation, la prolifération et la différenciation des cellules souches dans divers organes dont la glande surrénale et cela à la fois au cours du développement embryonnaire pour la formation des organes ainsi que durant la vie adulte pour le maintien de l'homéostasie (Berthon et al., 2010; Kim et al., 2008). Sachant que le gène *Rspo1* était exprimé dans cet organe, nous nous sommes intéressés à l'expression des autres gènes de la famille et aux rôles qu'ils pouvaient jouer dans toutes ces fonctions. Nous avons alors montré que seuls *Rspo1* et *Rspo3* étaient exprimés dans la glande surrénale.

Les objectifs de ma thèse étaient donc :

- Détermination du rôle joué par le gène *Rspo3* :

Le Knock out complet du gène *Rspo3* étant létal très tôt au cours du développement embryonnaire à cause de son rôle dans la formation du placenta, nous avons dû recourir à une stratégie de Knock out conditionnel. Pour cela nous avons croisé des souris portant l'allèle floxé pour le gène *Rspo3* avec des souris exprimant la CRE recombinase de manière ubiquitaire mais sous le contrôle du tamoxifène. Ainsi nous avons pu éteindre le gène *Rspo3* au stade E11.5 après formation du placenta, mais avant la formation de la glande surrénale pour étudier le rôle de ce gène durant le développement embryonnaire. Pour étudier son rôle durant la vie adulte l'induction au tamoxifène a été réalisée à 12 semaines.

- Détermination du rôle joué par le gène *Rspo1* :

L'étude du rôle du gène *Rspo1* a été possible grâce au modèle de souris Knock-Out pour ce gène dont nous disposons au laboratoire (Chassot et al., 2008). Nous disposons également au laboratoire d'un modèle de souris pouvant exprimer de manière ectopique le gène *Rspo1* (Rocha et al., 2015). Ces souris ont été croisées avec des souris exprimant une CRE recombinase sous le contrôle du promoteur SF1 afin d'étudier l'effet de l'expression de *Rspo1* dans le cortex surrénalien.

# Résultats

**Partie 1: Article 2**  
**The adrenal capsule is a  
signalling center  
controlling cell renewal  
and zonation through**  
*Rspo3*

# The adrenal capsule is a signaling center controlling cell renewal and zonation through *Rspo3*

Valerie Vidal,<sup>1,2,3,9</sup> Sonia Sacco,<sup>1,2,3,9</sup>  
 Ana Sofia Rocha,<sup>1,2,3,8</sup> Fabio da Silva,<sup>1,2,3</sup>  
 Clara Panzolini,<sup>1,2,3</sup> Typhanie Dumontet,<sup>4,5</sup>  
 Thi Mai Phuong Doan,<sup>1,2,3</sup> Jingdong Shan,<sup>6</sup>  
 Aleksandra Rak-Raszewska,<sup>6</sup> Tom Bird,<sup>7</sup>  
 Seppo Vainio,<sup>6</sup> Antoine Martinez,<sup>4,5</sup>  
 and Andreas Schedl<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biology Valrose, Université de Nice-Sophia, F-06108 Nice, France; <sup>2</sup>UMR1091, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, F-06108 Nice, France; <sup>3</sup>CNRS, UMR7277, F-06108 Nice, France; <sup>4</sup>UMR6293, Centre National de la Recherche Scientifique, Clermont Université, F-63178 Aubière, France; <sup>5</sup>U1103, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Clermont Université, F-63178 Aubière, France; <sup>6</sup>Biocenter Oulu, 90220 Oulu, Finland; <sup>7</sup>Beatson Institute, Glasgow G61 1BD, United Kingdom

Adrenal glands are zoned endocrine organs that are essential in controlling body homeostasis. How zonation is induced and maintained and how renewal of the adrenal cortex is ensured remain a mystery. Here we show that capsular RSPO3 signals to the underlying steroidogenic compartment to induce  $\beta$ -catenin signaling and imprint glomerulosa cell fate. Deletion of RSPO3 leads to loss of SHH signaling and impaired organ growth. Importantly, *Rspo3* function remains essential in adult life to ensure replenishment of lost cells and maintain the properties of the zona glomerulosa. Thus, the adrenal capsule acts as a central signaling center that ensures replacement of damaged cells and is required to maintain zonation throughout life.

Supplemental material is available for this article.

Received January 12, 2016; accepted in revised form May 16, 2016.

The mammalian adrenal gland is derived from the adrenal primordium, a precursor of the adrenal cortex that becomes invaded by neural crest cells, which will later form the adrenal medulla. By embryonic day 12.5 (E12.5) in mice, the developing organ becomes surrounded by condensing mesenchymal cells that ultimately form the capsule (Bandiera et al. 2013). A second contribution to the capsule is likely derived from adrenal progenitor cells that have lost SF1 expression (Wood et al. 2013).

[**Keywords:** R-spondin signaling; adrenal zonation;  $\beta$ -catenin signaling; mouse models; organ maintenance]

<sup>8</sup>Present address: Beatson Institute, Glasgow G61 1BD, UK.

<sup>9</sup>These authors contributed equally to this work.

Corresponding author: schedl@unice.fr

Article published online ahead of print. Article and publication date are online at <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.277756.116>.

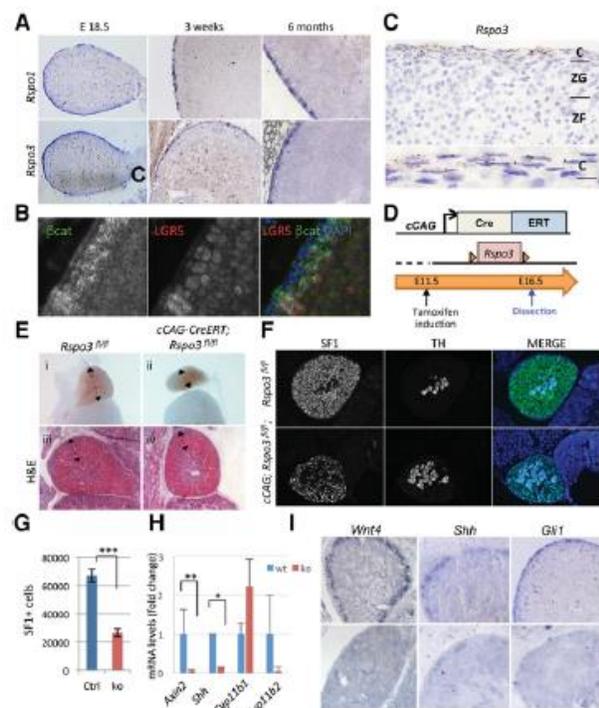
The permanent cortex is formed through recruitment of capsular cells in a process that involves SHH signaling (King et al. 2009). By E17.5, steroidogenic cells have adopted specific expression profiles, with the outermost cell layers (zona glomerulosa [ZG]) producing enzymes that are required for mineralocorticoid production (e.g., CYP11B2), and deeper layers (zona fasciculata [ZF]) expressing genes involved in glucocorticoid synthesis (*Cyp11b1*). In humans, but not rodents, a third layer (zona reticularis) can be distinguished that produces androgens and is located close to the medulla. Several lines of evidence suggest that  $\beta$ -catenin plays an important role in adrenal zonation and maintenance. Activation of the  $\beta$ -catenin pathway is restricted to the ZG (Kim et al. 2008; Walczak et al. 2014), and ectopic expression leads to the activation of ZG markers in ZF cells (Berthon et al. 2010). Moreover,  $\beta$ -catenin seems to bind to and control the expression of *At1r*, a gene specifically expressed within the ZG (Berthon et al. 2014). Finally, stochastic deletion of  $\beta$ -catenin using a low-level expressing *Sf1-Cre* line leads to progressive loss of the adrenal cortex in adult life (Kim et al. 2008).

## Results and Discussion

Recent lineage tracing studies have revealed that adrenal maintenance likely involves cell conversion of ZG cells into ZF cells (Freedman et al. 2013), with cells being displaced in a centripetal fashion. In our search for signaling molecules that may be involved in adrenal cell renewal and zonation, we identified members of the *R-spondin* gene family to be expressed from E12.5 onward within mesenchymal cells surrounding the forming adrenal (Supplemental Fig. S1). Expression of *Rspo1* and *Rspo3* was maintained throughout development and well into adulthood (Fig. 1A; Supplemental Fig. S1A). R-spondins are signaling molecules that bind to LGR receptors and positively modulate the  $\beta$ -catenin signaling pathway (de Lau et al. 2014). As expected from previous studies,  $\beta$ -catenin was highly expressed in the ZG (Fig. 1B). Moreover, immunofluorescence analysis revealed LGR5 to be enriched within ZG cells (Fig. 1B), which is consistent with an active RSPO/LGR5/ $\beta$ -catenin cascade.

The adrenal capsule consists of mesenchymal cells that are positive for the SHH mediator GLI1 (King et al. 2009) and COUPTFII (also known as NR2F2) (Wood et al. 2013) and surrounded by a thin layer of mesothelial lining expressing the Wilms tumor suppressor WT1 (Bandiera et al. 2013). To determine whether *Rspo1* and *Rspo3* are expressed in the same cell population, we performed cell-sorting experiments on dissociated adult adrenals from *Wt1-GFP* animals (Hosen et al. 2007). Quantitative PCR (qPCR) analysis revealed the majority of *Rspo1* expression to be within the WT1<sup>+</sup> population (Supplemental Fig. S1D), which is consistent with previously published data showing a direct regulation of this gene by this

© 2016 Vidal et al. This article is distributed exclusively by Cold Spring Harbor Laboratory Press for the first six months after the full-issue publication date (see <http://genesdev.cshlp.org/site/misc/terms.xhtml>). After six months, it is available under a Creative Commons License (Attribution-NonCommercial 4.0 International), as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.



**Figure 1.** *Rspo3* is expressed in the adrenal capsule and is required for adrenal growth and the onset of zonation. (A) In situ hybridization (ISH) analysis reveals *Rspo1* and *Rspo3* in the capsule surrounding the adrenal cortex. (B) Immunostaining showing the LGR5 receptor to be enriched in ZG cells that also show strong staining for  $\beta$ -catenin. (C) RNA-Scope analysis on adult adrenals. (D) Schematic outline of the experimental strategy used. *Rspo3* was deleted by injecting tamoxifen into pregnant mothers at E11.5 and collecting embryos at E16.5. (E) Macroscopic analysis (panels i,ii) and hematoxylin and eosin (H&E) staining (panels iii,iv) demonstrate a dramatic reduction of adrenal size in the absence of *Rspo3* expression. (CAG) cCAG-CreERT. (F) Immunofluorescent analysis shows a reduction of adrenal cortex (SF1-positive cells, green) but not medullary (TH, light blue) cells. (G) Quantification of SF1-positive cells confirms dramatic loss of the steroidogenic compartment.  $n_{wt} = 4$ ;  $n_{ko} = 4$ ;  $P = 8 \times 10^{-4}$ , Student's *t*-test. (H) Quantitative PCR (qPCR) analysis of RNA extracted from E16.5 adrenals.  $n_{wt} = 3$ ;  $n_{ko} = 4$ ; *Axin2*,  $P = 9 \times 10^{-3}$ ; *Shh*,  $P = 0.02$ . (I) ISH analysis shows complete loss of *Wnt4*, *Shh*, and *Gli1* expression.

transcription factor (Motamedi et al. 2014). In contrast, *Rspo3* appeared to be in a distinct cell population that does not express high levels of WT1. RNA-Scope analysis revealed *Rspo3* to be expressed throughout the capsule (Fig. 1C), reminiscent of the expression pattern of *Gli1* (King et al. 2009) and NR2F2/COUPTFII (Wood et al. 2013). To test whether *Rspo3*-expressing cells may be identical to the *Gli1*-positive population, we used a *Gli1-CreERT2* line in combination with a conditional allele for *Rspo3* (Rocha et al. 2015). Deletion was induced at E14.5 by tamoxifen induction, and samples were collected at E16.5 (Supplemental Fig. S1E). Strikingly, RNA expression analysis showed an almost 70% reduction after deletion, indicating that *Gli1*- and *Rspo3*-expressing cells are largely identical (Supplemental Fig. S1F).

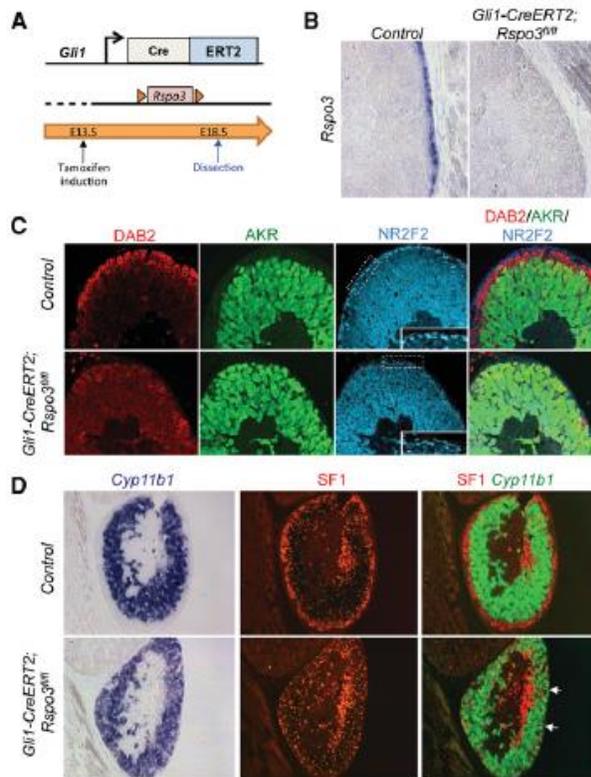
We next used genetic analysis to address whether *R-spondins* may play a direct role in adrenal formation and homeostasis. Deletion of *Rspo1* was compatible

with survival (Chassot et al. 2008; Tomizuka et al. 2008) and had no significant effect on adrenal development, zonation, or tissue maintenance (Supplemental Fig. S2). *Rspo3*-deficient embryos die early in development due to defects in placenta formation (Kazanskaya et al. 2008). We therefore resorted to a tamoxifen-inducible approach (Fig. 1D) combining the *Rspo3<sup>fllox</sup>* allele (Rocha et al. 2015) with the ubiquitously expressed cCAG-CreERT driver strain (Hayashi and McMahon 2002). Induced deletion of *Rspo3* at E11.5 resulted in smaller adrenals and thinning of the adrenal cortex at E16.5 (Fig. 1E). Indeed, quantitation of SF1-positive cells revealed a 2.5-fold decrease of the adrenal steroidogenic compartment in the absence of *Rspo3* (Fig. 1F,G).

The dramatic reduction of SF1<sup>+</sup> cells in *Rspo3* knockout animals indicated an important function for this gene in the formation of the adult adrenal cortex. Previous studies have demonstrated a key role for SHH signaling in the recruitment of capsular *Gli1*<sup>+</sup> cells to the steroidogenic lineage (Ching and Vilain 2009; King et al. 2009; Huang et al. 2010), and *Shh* has been suggested to be regulated by canonical  $\beta$ -catenin signaling in the adrenal system (Drelon et al. 2015) and several other developmental systems (Iwatsuki et al. 2007; Ahn et al. 2010). To test whether this pathway is affected in *Rspo3* mutants, we carried out qPCR, immunohistochemistry, and in situ hybridization (ISH) analysis on E16.5 tissues. Deletion resulted in a near-complete loss of the  $\beta$ -catenin target *Axin2* (Lustig et al. 2002), thus indicating a requirement of *Rspo3* for canonical signaling (Fig. 1H). *Shh* was prominently expressed in steroidogenic cells juxtaposing the capsule of control animals but became almost undetectable in *Rspo3* mutant animals (Fig. 1H,I). Consistent with the loss of SHH signaling, expression of its direct target, *Gli1*, also disappeared from capsular cells after *Rspo3* deletion (Fig. 1I). *Wnt4*, a gene that has been shown to be directly regulated by  $\beta$ -catenin in the kidney (Park et al. 2012), was no longer expressed in the mutant cortex (Fig. 1I).

Taken together, these data suggest a double-paracrine mechanism in adrenal cortex development, in which RSPO3 is released from the capsule to induce  $\beta$ -catenin signaling within juxtaposed steroidogenic cells, leading to the activation of *Shh*. In turn, SHH signals back to capsular cells, where it activates *Gli1* and other downstream targets to recruit cells to the steroidogenic lineage. Loss of *Rspo3* signaling leads to lack of cell recruitment and, as a consequence, a severely reduced adrenal cortex.

Zonation of the adrenal cortex into ZG and ZF commences at around E16.5 in mice and has been suggested to depend on  $\beta$ -catenin signaling. Ubiquitous deletion of *Rspo3* at E11.5 results in heart failure (F Da Silva, AS Rocha, J Ryler, C Basboga, H Morrison, KD Wagner, and A Schedl, in prep.), thus prohibiting the analysis of later time points. We therefore resorted to the capsular-expressed *Gli1-CreERT2* strain and induced deletion at E13.5, which resulted in a lack of *Rspo3* expression at E18.5 (Fig. 2A,B). Immunofluorescent analysis revealed loss of the ZG-specific marker DAB2 (Fig. 2C). In contrast, expression of the ZF-specific markers AKR1B7 and CYP11B1 persisted and now extended throughout the remaining cortex up to the capsule. BrdU labeling experiments confirmed an almost complete loss of proliferation in the adrenal cortex, whereas dividing cells persisted in other tissues (Supplemental Fig. S3). NR2F2 expression persisted in the capsule (Fig. 2C), although the number of cells also appeared to be somewhat reduced.



**Figure 2.** Deletion of RSPO3 interferes with the development of adrenal zonation. (A) Experimental setup using *Rspo3<sup>fl/fl</sup>*; *Gli1-CreERT2* animals. (B) ISH analysis at E18.5 showing the complete loss of *Rspo3* expression in mutant animals. (C) Immunofluorescent analysis demonstrates loss of the ZG marker DAB2 and an expansion of AKR1B7 up to the capsule. NR2F2-positive capsular cells are maintained in mutant animals. (D) *Cyp11b1* ISH, SF1 antibody staining, and a digital overlay of the two data sets. The ZF marker *Cyp11b1* also extends to the capsule in mutant animals [white arrows].

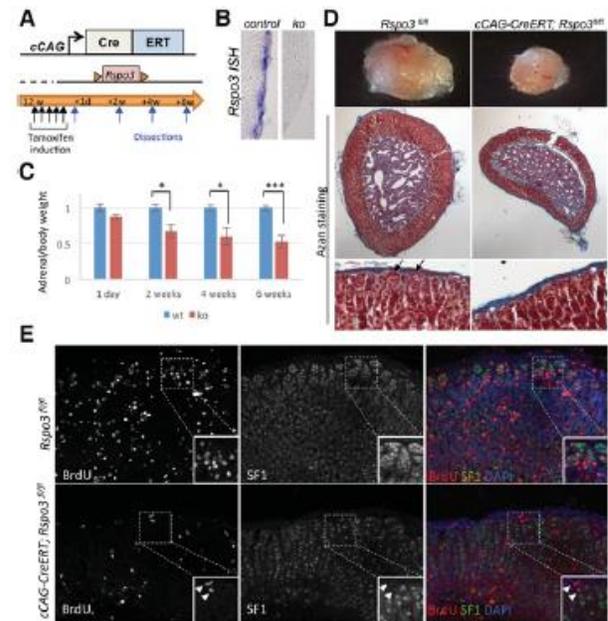
To test whether continuous RSPO3 signaling was required to maintain adrenal homeostasis, we induced Cre recombination [*cCAG-CreERT* driven] in adult mice (12 wk) and sacrificed animals at various time points after induction (Fig. 3A). ISH confirmed near-complete loss of *Rspo3* expression in the adrenal capsule (Fig. 3B; Supplemental Fig. S4B). Adrenal weight in *Rspo3* mutants progressively decreased over time and dropped to 50% of that in control animals 6 wk after induction (Fig. 3C). Histological analyses confirmed a severely reduced adrenal cortex, while the medulla appeared unaffected (Fig. 3D). High-power views revealed loss of the typical ZG organization in arches. Instead, the remaining cortical cells showed the columnar arrangement reminiscent of the ZF. To test whether mutant adrenals showed reduced proliferation, we performed long-term BrdU tracing experiments. In control animals, a large number of SF1/BrdU double-positive cells were detected, indicating that they underwent cell division during the labelling period (Fig. 3E). In contrast, BrdU-labeled cells were dramatically reduced after *Rspo3* deletion, and SF1/BrdU double-positive cells were almost absent.

To confirm the loss of ZG differentiation, we next analyzed a range of molecular markers using ISH and

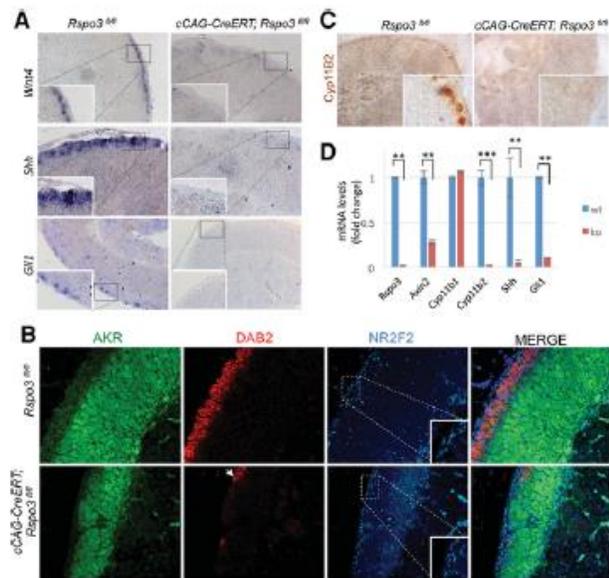
immunostaining. *Wnt4*, *Shh*, *Gli1* (Fig. 4A), DAB2, and CYP11B2 (Fig. 4B,C) were dramatically reduced in mutant mice. Similar to development, the ZF marker AKR1B7 now extended up to the capsule (Fig. 4B). qPCR assays confirmed these findings with no alteration in ZF markers and an almost complete loss of ZG marker genes (Fig. 4B).

To exclude secondary effects that might have been caused by systemic deletion of *Rspo3*, we next performed tissue-specific deletion experiments using the *Gli1-CreERT2* strain (Supplemental Fig. S4A). qPCR analysis revealed a reduction of *Rspo3* expression to ~30% of wild-type levels, which is somewhat lower than what we observed using the ubiquitously expressed *cCAG-CreERT* line (Supplemental Fig. S4B). The less efficient deletion is likely to be due to lower levels of expression from the *Gli1* promoter. *Axin2* expression levels closely followed those of *Rspo3* (Supplemental Fig. S4A). Importantly, *Gli1-CreERT2*-specific deletion also caused a reduction of the adrenal cortex and the loss of ZG markers (Supplemental Fig. S4C,D), indicating that, indeed, zonation depends on capsular expression of *Rspo3*.

The striking loss of ZG markers could be caused by either apoptosis of ZG cells, lack of cell renewal, or a continuous requirement for RSPO3 signaling to specify ZG cells. To distinguish between these alternatives, we analyzed



**Figure 3.** Continuous RSPO3 signaling is required for adrenal homeostasis. (A) Experimental design. Twelve-week-old mice were induced and analyzed at various time points. (B) Analysis at 4 wk demonstrates a complete loss of capsular *Rspo3* expression upon tamoxifen induction. (C) Loss of *Rspo3* leads to progressive loss of adrenal weight. 1 d,  $n_{wt} = 6$ ,  $n_{ko} = 6$ ; 2 wk,  $n_{wt} = 6$ ,  $n_{ko} = 6$ ; 4 wk,  $n_{wt} = 4$ ,  $n_{ko} = 5$ ; 6 wk,  $n_{wt} = 12$ ,  $n_{ko} = 15$ . 2 wk,  $P = 1.5 \times 10^{-3}$ ; 4 wk,  $P = 2.6 \times 10^{-3}$ ; 6 wk,  $P = 3.0 \times 10^{-8}$ , Student's *t*-test. (D) Macroscopic and histological examination (Azan staining) 6 wk after *Rspo3* deletion reveals smaller adrenal glands and the dramatic thinning and loss of the ZG typical arrangement of cells in arches [black arrows]. (E) BrdU analysis (40 d) reveals a dramatic loss of proliferation after *Rspo3* deletion. The only labeled cells in *Rspo3* knockout animals [white arrowheads] are nonsteroidogenic, as indicated by the absence of SF1.



**Figure 4.** Loss of *Rspo3* abolishes adrenal zonation. ISH (A), immunofluorescent (B), and immunohistochemical (C) analyses reveal loss of all ZG-specific markers analyzed. Note the persistence of pockets of DAB2 expression [white arrowhead in (B)] that are likely associated with incomplete deletion of *Rspo3*. (B) NR2F2 capsular cells appear to be largely unaffected. (D) qPCR analysis confirms the dramatic reduction of expression of the  $\beta$ -catenin target *Axin2* and a near loss of ZG markers *Cyp11B2* and *Shh* as well as the capsular marker *Gli1*.  $n_{wt} = 5$ ;  $n_{ko} = 5$ . *Rspo3*,  $P = 8 \times 10^{-3}$ ; *Axin2*,  $P = 1 \times 10^{-3}$ ; *Cyp11B2*,  $P = 3 \times 10^{-5}$ ; *Shh*,  $P = 2 \times 10^{-3}$ ; *Gli1*,  $P = 5 \times 10^{-3}$ , Student's *t*-test.

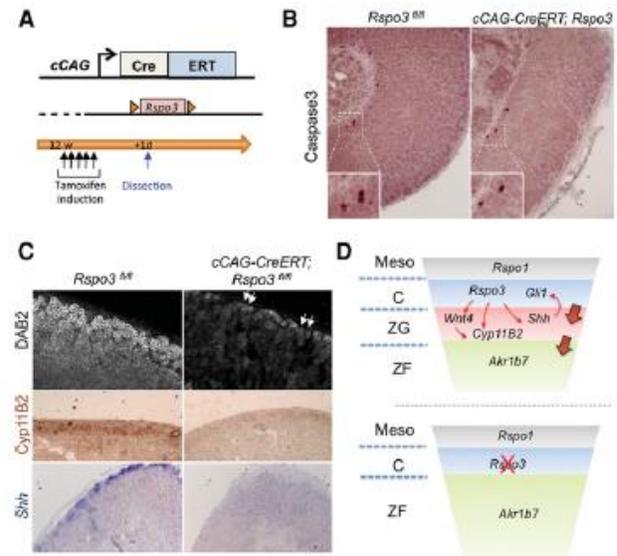
samples 1 d after completion of the tamoxifen deletion protocol (Fig. 5), in which lack of cell renewal can be excluded. Knockout adrenals at this early time point showed only a very mild reduction in size that did not reach statistical significance (Fig. 3C). Caspase3 analysis identified a number of apoptotic cells close to the medulla (Fig. 5B), which is consistent with the centripetal model of cell renewal (Freedman et al. 2013). Deletion of *Rspo3* did not increase apoptosis, thus excluding cell death as a reason for the loss of ZG markers. Strikingly, molecular analysis confirmed a near-complete loss of all ZG markers analyzed (*Shh*, *Wnt4*, *DAB2*, and *Cyp11b2*) even at this early time point after *Rspo3* deletion (Fig. 5C). The absence of apoptosis in steroidogenic cells after *Rspo3* deletion and the expansion of ZF markers up to the capsule at 4 wk after deletion suggest that ZG cells convert to ZF cells, a process that is also occurring under normal conditions when steroidogenic cells move centripetally, thus losing signals derived from the adrenal capsule (Freedman et al. 2013).

*Wnt4* has been demonstrated previously to be required for the activation of *Cyp11b2* expression (Heikkila et al. 2002), and we showed recently that this dependence also persists in adult mice (C Drelon, A Berthon, I Sahut-Barnola, M Mathieu, T Dumontet, S Rodriguez, M Batisse-Lignier, H Tabbal, I Tauveron, AM Lefrançois-Martinez, et al., in prep.). To test whether deletion of *Wnt4* may affect RSPO3-controlled signaling pathways and cell renewal, we analyzed *Wnt4*; *Sf1-Cre* knockout mice (Supplemental Fig. S5A) that showed efficient depletion of *Wnt4* in adrenal glands (Supplemental Fig. S5C). Surprisingly, mice survived into adulthood (>12 mo) with no

overt defects detectable. Adrenals in *Wnt4* knockout mice were only slightly smaller (Supplemental Fig. S5B), demonstrating that this gene does not play a major role in cell renewal. Molecular analysis revealed a significant reduction of the ZG markers *Axin2* and *At1b* but only a mild reduction of *Rspo3*, *Shh*, and *Gli1* expression that did not reach statistical significance (Supplemental Fig. S5C,D). Thus, *Wnt4* appears to act as a local relay signal that reinforces  $\beta$ -catenin activity in the ZG but does not have a major influence on organ renewal.

A recent study suggested RSPO3 to bind to LGR5 and induce noncanonical signaling in adrenal cortical cells. This signaling appeared to inhibit aldosterone production and cell renewal and induce apoptosis (Shaikh et al. 2015). These findings are in stark contrast to the data presented in this study. We presume the discrepancy to be caused by the in vitro setting of the previously reported study, which does not take into account the complex interactions of cells in an in vivo environment. Our data clearly demonstrate a canonical role for *Rspo3* signaling within the adrenal cortex, where it induces well-established direct downstream targets of  $\beta$ -catenin (*Axin2* and *Dab2*) and maintains organ size in the adult organism. This role is consistent with the generally accepted function of RSPO/LGR5 signaling in controlling the activation of the stem cell pool, and we can now add the adrenal cortex as an additional organ in which this pathway is used.

Even more surprising than the involvement of RSPO3 in controlling organ renewal is its absolute requirement for maintaining adrenal zonation. The rapid loss of zonation markers after *Rspo3* deletion in the adult demonstrates that it acts as an instructive signal to direct



**Figure 5.** *Rspo3* deletion leads to a rapid loss of ZG identity. (A) Experimental design. (B) Caspase staining revealed some apoptotic cells close to the medulla, whereas the ZG was devoid even after deletion of *Rspo3*. (C) ISH and immunostaining demonstrated a rapid loss of ZG marker gene expression. Note the complete loss of DAB2 in a proportion of subcapsular cells (white arrow) upon *Rspo3* deletion. (D) Model describing the central role of *Rspo3* in establishing adrenal zonation and ensuring cell renewal. Large red arrows symbolize the centripetal movement of cells during cell renewal. (Meso) Mesothelial lining; (C) capsule.

steroidogenic cells toward the ZG phenotype. The adrenal capsule is the ideal location to provide this stimulus. Since R-spondins appear to be tightly bound to the extracellular matrix (Kim et al. 2005), diffusion is limited, and only several cell layers are instructed to express ZG markers. Activation of *Wnt4* within the ZG cells is likely to serve as a local reinforcement signal, as loss of *Wnt4* also leads to a reduction of ZG markers (Supplemental Fig. S5; Heikkilä et al. 2002).

Apart from the adrenal cortex, hepatocytes also display metabolic zonation along the liver lobule that is set up by a gradient of canonical  $\beta$ -catenin signaling (Benhamouche et al. 2006). We showed recently that, in a fashion similar to the adrenal, liver zonation strictly depends on RSPO3 that is released from endothelial cells located in the central vein (Rocha et al. 2015). Thus, our evidence suggests that the liver and adrenal cortex have adopted the same signaling system to establish organ-specific zonation despite the fact that both organs are derived from distinct embryological origins.

In conclusion, our data establish a genetic network in which *Rspo3* induces *Wnt4* and *Shh* expression within steroidogenic cells that are in close contact with the capsule (Fig. 5D). *Shh* in turn signals back to recruit capsular cells to form the adrenal cortex, at least during development. The fact that *Shh* knockout mice show normal adrenal zonation (Huang et al. 2010) while *Rspo3* deletion affects ZG identity indicates that *Rspo3* must also act through additional, *Shh*-independent pathways. The dramatic thinning of the entire steroidogenic compartment further supports the model of a ZG-driven adrenal cortex renewal, a concept that has been put forward by Freedman et al. (2013). Thus, our study identifies the adrenal capsule as a crucial signaling center that, through the production of RSPO3, not only ensures organ renewal but also provides an instructive signal that is continuously required for proper zonation.

## Materials and methods

### Mouse work

All animal work was conducted according to national and international guidelines and was approved by the local ethics committee (PEA-NCE/2013-88). The *Rspo1* (Chassot et al. 2008), *Rspo3<sup>flac</sup>* (Rocha et al. 2015), *Wt1-GFP* (Hosen et al. 2007), *Gli1-CreERT2* (Ahn and Joyner 2004), *cCAG-CreERT* (Hayashi and McMahon 2002), *Sfl-Cre* (Bingham et al. 2006), and *Wnt4<sup>flac</sup>* (Shan et al. 2009) lines have been described previously. Cre activation during development was obtained by a single tamoxifen administration (force feeding) of pregnant females carrying either E11.5, E13.5, or E14.5 embryos. Cre activation in adult mice was obtained by intraperitoneal injection of 12-wk-old mice with 1 mg of tamoxifen (Sigma-Aldrich) dissolved in corn oil (Sigma-Aldrich) per 20 g of body weight five times a week for 1 wk. With the exception of embryonic analysis, only male mice were used for the described experiments.

For proliferation assays, 1 mg/mL BrdU was added to drinking water, the solution was changed every 2 d, and animals were sacrificed at the end of 4 wk of treatment.

### Cell sorting

Adrenals from adult WT1GFP or control animals were collected and incubated for 30 min in 1 mg/mL collagenase at 37°C, and the adrenal capsule was separated from the rest of the adrenal using a binocular microscope. After a further 30 min of incubation in trypsin at 37°C with occasional pipetting up and down, the digestion was stopped by adding 100  $\mu$ L of FBS, and the cell suspension was filtered (40- $\mu$ m filters), centrifuged (2000 rpm for 3 min), and resuspended in 200  $\mu$ L of PBS-EDTA-serum solution. Cells were analyzed with a FACS Aria II (BD).

### Immunofluorescence and histological analysis

For immunofluorescence experiments, tissues were fixed overnight in 4% paraformaldehyde, progressively dehydrated, and paraffin-embedded. Seven-micrometer-thick sections were rehydrated, boiled in a pressure cooker for 2 min with antigen unmasking solution (Vector Laboratories), and blocked in a PBS solution containing 10% normal donkey serum (Jackson ImmunoResearch) and 3% BSA. All primary antibodies were applied overnight at 4°C at the concentrations listed in the antibody table in the Supplemental Material. Secondary antibodies were diluted 1:200 and applied at room temperature for 1 h.  $\beta$ -Catenin was detected using a biotinylated secondary antibody followed by streptavidin-Cy3 detection (Sigma-Aldrich).

For histological analysis, adrenal glands from embryos or adult mice were fixed overnight in 4% paraformaldehyde, progressively dehydrated, and embedded in paraffin. Seven-micrometer-thick sections were then stained with hematoxylin and eosin according to standard procedures.

For CYP11B2 and caspase3 staining, sections were unmasked, incubated for 30 min in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%), and blocked for 1 h in 5% PBS/BSA. Primary antibody was left overnight at 4°C in 0.1% PBS/BSA, and polymer-Hrp rabbit (Cell Signaling, 8114) was used as a secondary and incubated for 30 min at room temperature. Revelation was performed with a Novared kit (Vector Laboratories) for 4 min.

### Azan staining

Histological sections at 5  $\mu$ m were stained using the Azan trichrome kit (Diapath) according to the manufacturer's instructions.

### RNA ISH

Tissues were fixed overnight in 4% paraformaldehyde, progressively dehydrated, and paraffin-embedded. The *Gli1* in situ probe was kindly provided by M. Studer (Institute of Biology Valrose, Université de Nice-Sophia Antipolis). Seven-micrometer-thick sections were hybridized with *Rspo1*, *Rspo3*, *Wnt4*, and *Shh* as well as *Gli1* probes according to previously described protocols (Comai et al. 2010). RNA-Scope analysis for *Rspo3* was performed on adult sections according to the manufacturer's instructions.

### Real-time PCR analysis

RNA was extracted from E16.5 or adult adrenal glands using TRIzol reagent (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. Reverse transcription was performed using M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen) in combination with random primers. The cDNA obtained was then used as template for qPCR analysis using the SYBR Green master kit (Roche) and a LightCycler 1.5 (Roche). The expression levels were normalized for *Hprt*. Primers (see the primer table in the Supplemental Material) were designed on the Universal ProbeLibrary Web site (Roche).

### Statistical analysis

Statistical significance was determined using two-tailed Student's *t*-test. Error bars in all figures represent the standard error of mean, and *P*-values are indicated by asterisks as follows: *P* < 0.05 (\*), *P* < 0.01 (\*\*), and *P* < 0.001 (\*\*\*)

For the developmental analysis (Fig. 1G), SFI-positive cells were counted on every second section of four control and four knockout adrenals using Volocity 6.3 software. Statistical analysis was performed with the total of nuclei obtained for each adrenal using a two-tailed Student's *t*-test.

## Acknowledgments

We thank the staff of the animal facility for their dedication, and Agnès Loubat (cytometry platform, iBV) for FACs analysis. We are indebted to Hitoshi Okamoto (Riken Institute, Japan) for providing the *Rspo3* conditional allele, and Celso Gomez-Sanchez (Jackson, MS) for the Cyp11B2 antibody. We are grateful to Pierre Val (Clermont Ferrand, France) for critically reading this manuscript, and Roberto Bandiera (Cambridge, UK) for initial input into this project. This work was supported by grants from the Fondation du France, Association pour la Recherche sur le Cancer

(SL2202.0605297), and Agence Nationale de la Recherche (ANR-ADSTEM and ANR-11-LABX-0028-01) to A.S., and the Agence Nationale de la Recherche (ANR-14-CE12-0007) to A.S. and A.M.

## References

- Ahn S, Joyner AL. 2004. Dynamic changes in the response of cells to positive hedgehog signaling during mouse limb patterning. *Cell* **118**: 505–516.
- Ahn Y, Sanderson BW, Klein OD, Krumlauf R. 2010. Inhibition of Wnt signaling by Wise (Sostdc1) and negative feedback from Shh controls tooth number and patterning. *Development* **137**: 3221–3231.
- Bandiera R, Vidal VP, Motamedi FJ, Clarkson M, Sahut-Barnola I, von Gise A, Pu WT, Hohenstein P, Martinez A, Schedl A. 2013. WT1 maintains adrenal-gonadal primordial identity and marks a population of AGP-like progenitors within the adrenal gland. *Dev Cell* **27**: 5–18.
- Benhamouche S, Decaens T, Godard C, Chambrey R, Rickman DS, Moirand C, Vasseur-Cognet M, Kuo CJ, Kahn A, Perret C, et al. 2006. Apc tumor suppressor gene is the 'zonation-keeper' of mouse liver. *Dev Cell* **10**: 759–770.
- Berthon A, Sahut-Barnola I, Lambert-Langlais S, de Joussineau C, Damon-Soubeyrand C, Louiset E, Taketo MM, Tissier F, Bertherat J, Lefrançois-Martinez AM, et al. 2010. Constitutive  $\beta$ -catenin activation induces adrenal hyperplasia and promotes adrenal cancer development. *Hum Mol Genet* **19**: 1561–1576.
- Berthon A, Drelon C, Ragazzon B, Boulkroun S, Tissier F, Amar L, Samson-Couterie B, Zennaro MC, Plouin PF, Skah S, et al. 2014. WNT/ $\beta$ -catenin signalling is activated in aldosterone-producing adenomas and controls aldosterone production. *Hum Mol Genet* **23**: 889–905.
- Bingham NC, Verma-Kurvari S, Parada LF, Parker KL. 2006. Development of a steroidogenic factor 1/Cre transgenic mouse line. *Genesis* **44**: 419–424.
- Chassot AA, Ranc F, Gregoire EP, Roepers-Gajadien HL, Taketo MM, Camerino G, de Rooij DG, Schedl A, Chaboissier MC. 2008. Activation of  $\beta$ -catenin signaling by Rspo1 controls differentiation of the mammalian ovary. *Hum Mol Genet* **17**: 1264–1277.
- Ching S, Vilain E. 2009. Targeted disruption of Sonic Hedgehog in the mouse adrenal leads to adrenocortical hypoplasia. *Genesis* **47**: 628–637.
- Comai G, Boutet A, Neirijnck Y, Schedl A. 2010. Expression patterns of the Wtx/Amer gene family during mouse embryonic development. *Dev Dyn* **239**: 1867–1878.
- de Lau W, Peng WC, Gros P, Clevers H. 2014. The R-spondin/Lgr5/Rnf43 module: regulator of Wnt signal strength. *Genes Dev* **28**: 305–316.
- Drelon C, Berthon A, Mathieu M, Martinez A, Val P. 2015. Adrenal cortex tissue homeostasis and zonation: a WNT perspective. *Mol Cell Endocrinol* **408**: 156–164.
- Freedman BD, Kempna PB, Carlone DL, Shah MS, Guagliardo NA, Barrett PQ, Gomez-Sanchez CE, Majzoub JA, Breault DT. 2013. Adrenocortical zonation results from lineage conversion of differentiated zona glomerulosa cells. *Dev Cell* **26**: 666–673.
- Hayashi S, McMahon AP. 2002. Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of Cre: a tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse. *Dev Biol* **244**: 305–318.
- Heikkilä M, Peltoketo H, Leppaluoto J, Iives M, Vuolteenaho O, Vainio S. 2002. Wnt-4 deficiency alters mouse adrenal cortex function, reducing aldosterone production. *Endocrinology* **143**: 4358–4365.
- Hosen N, Shirakata T, Nishida S, Yanagihara M, Tsuboi A, Kawakami M, Oji Y, Oka Y, Okabe M, Tan B, et al. 2007. The Wilms' tumor gene WT1-GFP knock-in mouse reveals the dynamic regulation of WT1 expression in normal and leukemic hematopoiesis. *Leukemia* **21**: 1783–1791.
- Huang CC, Miyagawa S, Matsumaru D, Parker KL, Yao HH. 2010. Progenitor cell expansion and organ size of mouse adrenal is regulated by sonic hedgehog. *Endocrinology* **151**: 1119–1128.
- Iwatsuki K, Liu HX, Gronder A, Singer MA, Lane TF, Grosschedl R, Mistretta CM, Margolske RF. 2007. Wnt signaling interacts with Shh to regulate taste papilla development. *Proc Natl Acad Sci* **104**: 2253–2258.
- Kazanskaya O, Ohkawara B, Heroult M, Wu W, Maltry N, Augustin HG, Niehrs C. 2008. The Wnt signaling regulator R-spondin 3 promotes angioblast and vascular development. *Development* **135**: 3655–3664.
- Kim KA, Kakitani M, Zhao J, Oshima T, Tang T, Binnerts M, Liu Y, Boyle B, Park E, Emtage P, et al. 2005. Mitogenic influence of human R-spondin1 on the intestinal epithelium. *Science* **309**: 1256–1259.
- Kim AC, Reuter AL, Zubair M, Else T, Serecky K, Bingham NC, Lavery GG, Parker KL, Hammer GD. 2008. Targeted disruption of  $\beta$ -catenin in Sf1-expressing cells impairs development and maintenance of the adrenal cortex. *Development* **135**: 2593–2602.
- King P, Paul A, Laufer E. 2009. Shh signaling regulates adrenocortical development and identifies progenitors of steroidogenic lineages. *Proc Natl Acad Sci* **106**: 21185–21190.
- Lustig B, Jerchow B, Sachs M, Weiler S, Pietsch T, Karsten U, van de Wetering M, Clevers H, Schlag PM, Birchmeier W, et al. 2002. Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors. *Mol Cell Biol* **22**: 1184–1193.
- Motamedi FJ, Badro DA, Clarkson M, Lecca MR, Bradford ST, Buske FA, Saar K, Hubner N, Brandli AW, Schedl A. 2014. WT1 controls antagonistic FGF and BMP-pSMAD pathways in early renal progenitors. *Nat Commun* **5**: 4444.
- Park JS, Ma W, O'Brien LL, Chung E, Guo JJ, Cheng JG, Valerius MT, McMahon JA, Wong WH, McMahon AP. 2012. Six2 and Wnt regulate self-renewal and commitment of nephron progenitors through shared gene regulatory networks. *Dev Cell* **23**: 637–651.
- Rocha AS, Vidal V, Mertz M, Kendall TJ, Charlet A, Okamoto H, Schedl A. 2015. The angiocrine factor R-spondin3 is a key determinant of liver zonation. *Cell Rep* **13**: 1757–1764.
- Shaikh LH, Zhou J, Teo AE, Garg S, Neogi SG, Figg N, Yeo GS, Yu H, Maguire JJ, Zhao W, et al. 2015. LGR5 activates noncanonical Wnt signaling and inhibits aldosterone production in the human adrenal. *J Clin Endocrinol Metab* **100**: E836–E844.
- Shan J, Jokela T, Peltoketo H, Vainio S. 2009. Generation of an allele to inactivate Wnt4 gene function conditionally in the mouse. *Genesis* **47**: 782–788.
- Tomizuka K, Horikoshi K, Kitada R, Sugawara Y, Iba Y, Kojima A, Yoshitome A, Yamawaki K, Amagai M, Inoue A, et al. 2008. R-spondin1 plays an essential role in ovarian development through positively regulating Wnt-4 signaling. *Hum Mol Genet* **17**: 1278–1291.
- Walczak EM, Kuick R, Finco I, Bohin N, Hrycaj SM, Wellik DM, Hammer GD. 2014. Wnt signaling inhibits adrenal steroidogenesis by cell-autonomous and non-cell-autonomous mechanisms. *Mol Endocrinol* **28**: 1471–1486.
- Wood MA, Acharya A, Finco I, Swonger JM, Elston MJ, Tallquist MD, Hammer GD. 2013. Fetal adrenal capsular cells serve as progenitor cells for steroidogenic and stromal adrenocortical cell lineages in *M. musculus*. *Development* **140**: 4522–4532.

## SUPPLEMENTARY INFORMATION INVENTORY

**Figure S1 - related to Figure 1: R-spondin expression analysis.** This figure provides a detailed expression analysis during adrenal development and demonstrates that *Rspo1* and *Rspo3* are expressed in different compartments of the capsule.

**Figure S2 - related to Figures 2 and 3: Loss of *Rspo1* does not affect adrenal glands.** This figure provides an analysis of adrenals from adult *Rspo1* knockout animals.

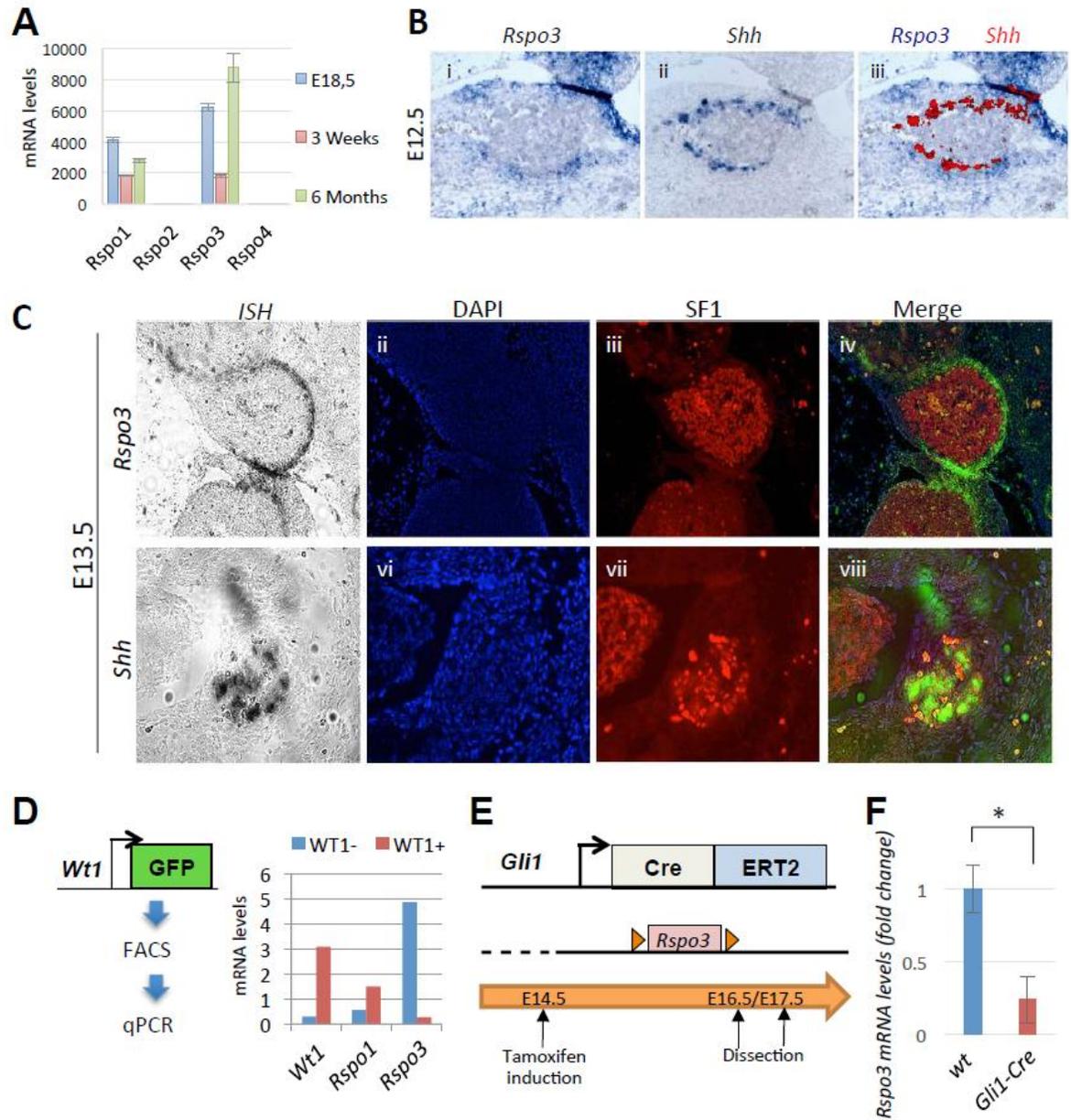
**Figure S3 - related to Figure 1 and 2: *Rspo3* is required for proliferation during adrenal development.** This figure represents BrdU labeling experiments in the presence or absence of *Rspo3* at embryonic day E18.5.

**Figure S4 – relates to Figure 3: Phenotypic analysis of *Rspo3*<sup>fl/fl</sup>; *Gli1-CreERT2* animals.** This figure provides a dataset for tissue-specific deletion of *Rspo3* and thus demonstrates that the adrenal phenotype in *Rspo3* loss-of-function animals is not due to systemic effects.

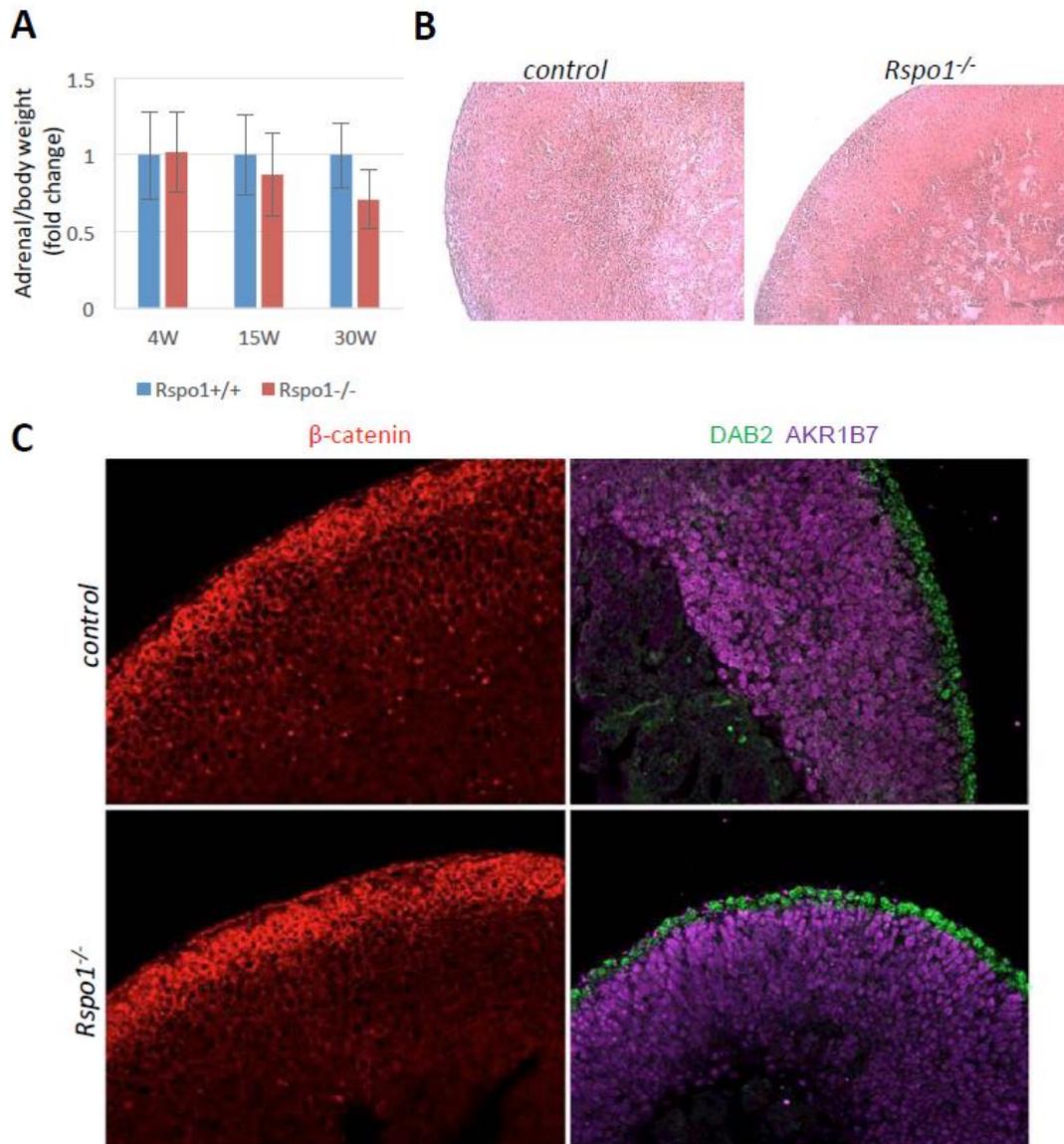
**Figure S5 – relates to Figure 4: Loss of *Wnt4* shows mild effects on adrenal maintenance.** This figure describes *Wnt4* loss of function analysis and its effect on adrenal zonation/renewal.

**Primers table:** complete list of primers.

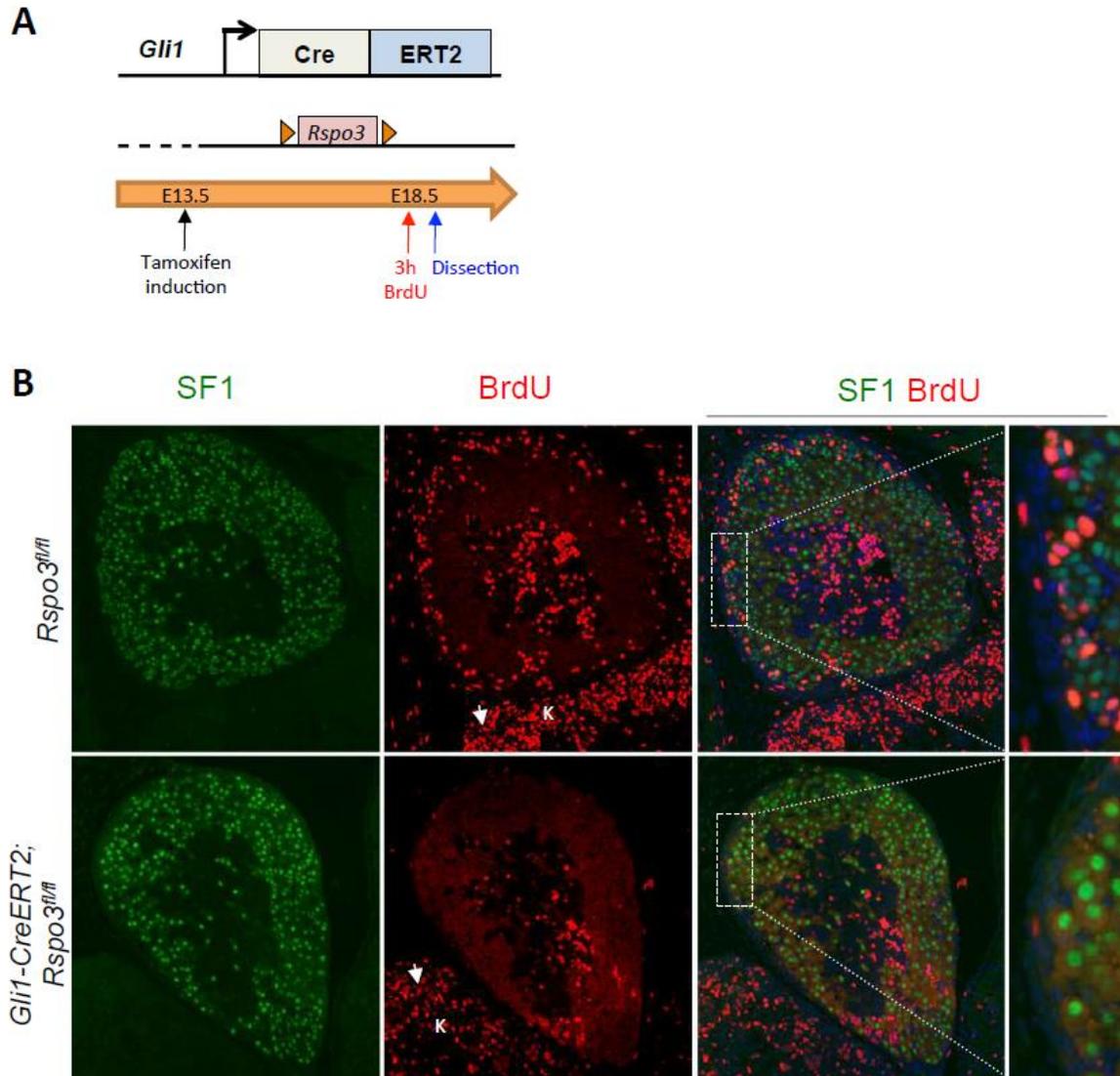
**Antibodies table:** complete list of antibodies with references



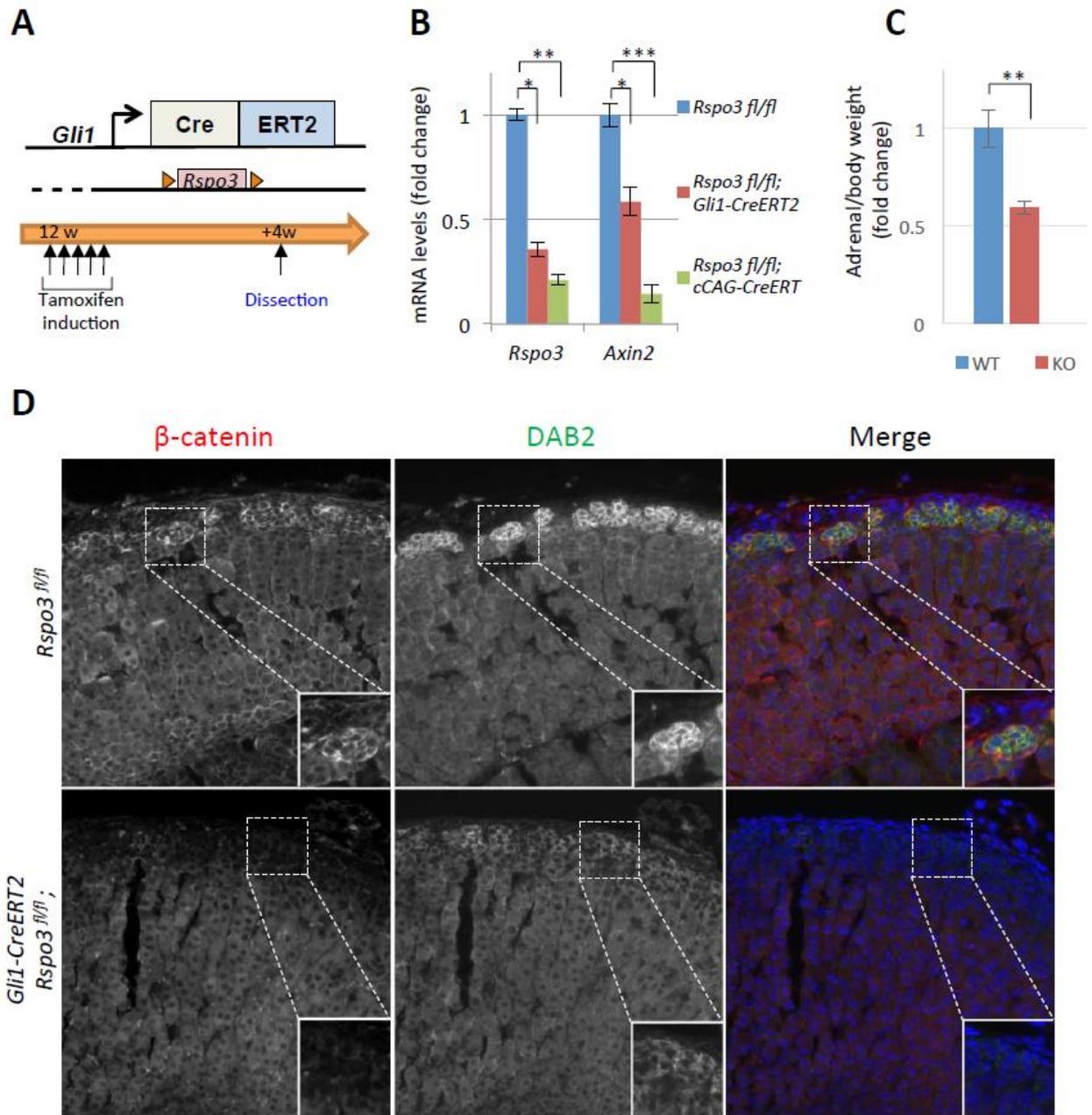
**Suppl. Figure 1 – relates to Figure 1: *Rspodin* expression analysis. A)** qPCR analysis identifies *Rspo1* and *Rspo3*, but not *Rspo2* and *Rspo4* to be expressed within the adrenal throughout life. **B)** Consecutive sections were hybridized with *Rspo3* and *Shh* probes. Panel iii represents a digital overlay of panels i and ii. **C)** *Ish* analysis was followed by immunostaining for SF1. Upper panels (i-iv) are consecutive to lower panels (v-viii). Panels iv and viii are digital merges of I and iii and v and vii, respectively (ISH signal appears in green). While *Shh* expression overlaps with the SF1 positive compartment, *Rspo3* is expressed in mesenchymal cells surrounding the forming adrenal gland. **D)** FACS cell sorting on adult adrenals using the Wt1-GFP strain reveals *Rspo1* and *Rspo3* to be expressed in distinct cell populations. **E)** Approach to delete *Rspo3* in capsular cells. **F)** Loss of *Rspo3* expression demonstrates that *Gli1* and *Rspo3* expressing cells are overlapping ( $n_{wt}=3$ ;  $n_{Gli1Cre}=4$ ; Students t-Test  $p=0.037$ ).



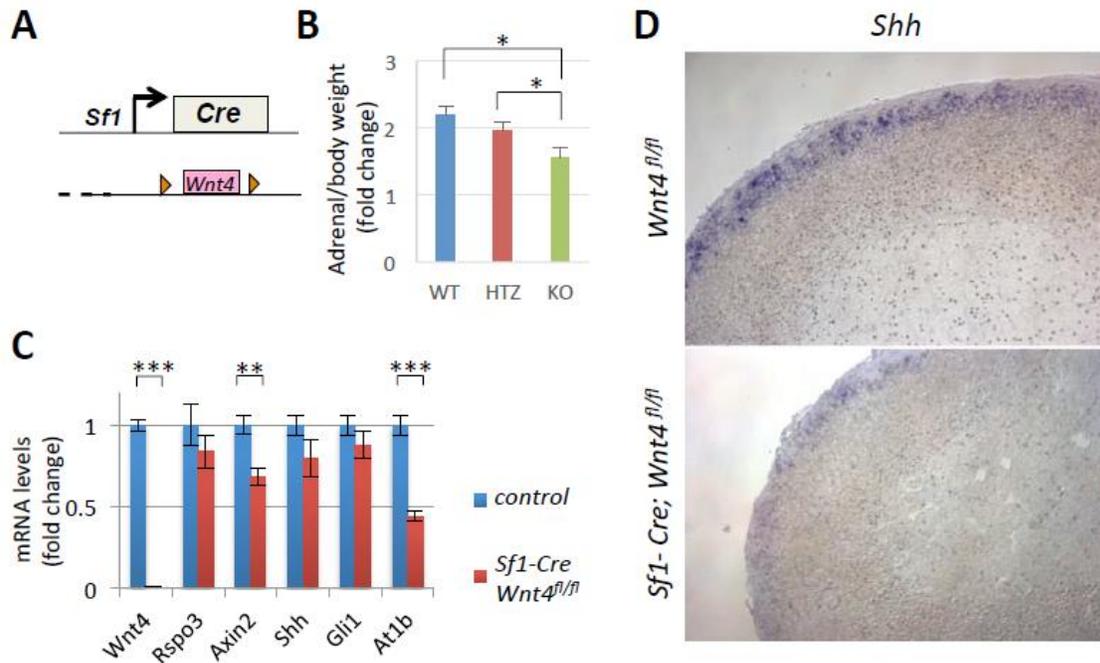
**Suppl. Figure 2 – relates to Figure 3 and 4: Loss of *Rspo1* does not affect adrenal glands.** **A)** Analysis of adrenal glands shows no significant change in adrenal weight (4 weeks:  $n_{wt}=8$ ,  $n_{ko}=8$ ; 15 weeks:  $n_{wt}=6$ ,  $n_{ko}=6$ ; 30 weeks:  $n_{wt}=6$ ,  $n_{ko}=6$ ) and **B)** overall normal histology (H&E staining) . **C)** Immunostaining confirmed persistent expression of  $\beta$ -catenin and the zonation markers DAB2 (ZG) and AKR1B7 (ZF).



**Suppl. Figure 3 – relates to Figure 1 and 2: Deletion of *Rspo3* causes dramatic loss of proliferation. A)** Experimental setup: Deletion of *Rspo3* was induced at E13.5 using the *Gli1-CreERT2* driver and mice sacrificed at E18.5 with BrdU injected 3h before sample collection. **B)** Mutant animals show dramatically reduced proliferation in the adrenal cortex, while labeling persists within the kidney (K; white arrowheads).



**Suppl. Figure 4 – relates to Figure 3: Phenotypic analysis of *Rspo3*<sup>fl/fl</sup>; *Gli1-CreERT2* animals. **A**) Experimental setup. **B**) qPCR analysis reveals deletion of *Rspo3* and a reduction of the  $\beta$ -catenin target gene *Axin2* using the *Gli1-CreERT2* line, albeit slightly less efficiently when compared to the cCAG-CreERT line. ( $n_{wt}=4$ ,  $n_{GliCre}=4$ ,  $n_{CAGCre}=5$ ; p-values:  $Rspo3_{Gli1}=0.017$ ;  $Rspo3_{CAG}=2.6e-4$ ;  $Axin2_{Gli1}=1.2e-3$ ;  $Axin2_{CAG}=9.9e-11$ ; Student's t-test). **C**) Comparison of adrenal weight. ( $n_{wt}=6$ ,  $n_{ko}=6$ ; p-value=5.8e-3; Student's t-test) **D**) Immunostaining confirmed reduced expression of  $\beta$ -catenin and the ZG marker DAB2.**



**Suppl. Figure 5 – relates to Figure 4: (A)** strategy to delete *Wnt4* in steroidogenic cells. **(B)** Adrenals from *Wnt4* knockout animals show a small, but significant reduction of weight 12 weeks after birth (p-values: htz/ko=4.4e-3; wt/ko=4.0e-3; Student's t-test). qPCR **(C)** and ISH **(D)** analyses reveal mild reduction of *Rspo1*, *Shh* and *Gli1* expression, but significant loss of the ZG-marker *At1b*. (n<sub>wt</sub>=14, n<sub>ko</sub>=6; p-values: *Wnt4*=1.2e-12; *Axin2*=1e-3; *At1b*=2.5e-7; Student's t-test).

### Primers table

Name	Sequence	Direction	Usage
<i>Rspo1</i> right	CTCCTGACACTTGGTGCAGA	antisense	Q-PCR
<i>Rspo1</i> left	CGACATGAACAAATGCATCA	sense	Q-PCR
<i>Rspo2</i> right	TCACAGTTTTCTATTCTGCATCG	antisense	QPCR
<i>Rspo2</i> left	GCCCATCAGGGTATTATGGA	sense	Q-PCR
<i>Rspo3</i> right	CAGCCATTGTAATCTGAACACG	antisense	Q-PCR
<i>Rspo3</i> left	TCATTTTGAAC TTTATGGAATACATTG	sense	Q-PCR
<i>Rspo4</i> right	TTGTGTATGCAGGGACTCCA	antisense	Q-PCR
<i>Rspo4</i> left	CCTTGACCCACCAGAGTACC	sense	Q-PCR
<i>Axin2</i> right	CGGCTGACTCGTTCTCCT	antisense	Q-PCR
<i>Axin2</i> left	GAGAGTGAGCGGCAGAGC	sense	Q-PCR
<i>SHH</i> right	TTAACTTGTCTTTGCACCTCTGA	antisense	Q-PCR
<i>SHH</i> left	ACCCCGACATCATATTTAAGGA	sense	Q-PCR
<i>Cyp11b1</i> right	CATTACCAAGGGGGTTGATG	antisense	Q-PCR
<i>Cyp11b1</i> left	GCCATCCAGGCTAACTCAAT	sense	Q-PCR
<i>Cyp11b2</i> right	CCATTCTGGCCCATTTAGC	antisense	Q-PCR
<i>Cyp11b2</i> left	GCACCAGGTGGAGAGTATGC	sense	Q-PCR
<i>Gli1</i> right	CGCTGCTGCAAGAGGACT	antisense	Q-PCR
<i>Gli1</i> left	CTGACTGTGCCCCGAGAGTG	sense	Q-PCR
At1b right	TCACCTGCATCATCATCTGG	sense	Q-PCR
At1b left	AGCTGGTGAGAATAATAACG	antisense	Q-PCR

### Antibodies table

Protein	Host	Type	Dilution	Secondary	Producer	Reference
$\beta$ -catenin	Mouse	monoclonal	1:100	Biotinilated/Streptavidin-Cy3	BD Transduction Laboratories	Ref 610153
LGR5	Rabbit	monoclonal	1:100	AlexaFluor 488	Abcam	ab75850
SF1	Bovine	polyclonal	1:500-1000	AlexaFluor 488	Transgenic Inc.	#KAL-KO611
TH	Rabbit	polyclonal	1:500	AlexaFluor 647	AbCam	ab290
DAB2	Rabbit	polyclonal	1:250	AlexaFluor 647	Abcam	ab33441
Caspase3	Rabbit	polyclonal	1:200	Cy3	R&D Systems	AF835
AKR1B7	goat	polyclonal	1:250	AlexaFluor 488	Santa Cruz	sc27763
CYP11B2	Rabbit	polyclonal	1 :500	Rabbit-HRP	Gomez-Sanchez	Kind gift

Partie 2:  
Etude du gain de fonction *Rspo1*

Nous venons de démontrer l'importance du gène *Rspo3* et de la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine pour le développement, la zonation et l'homéostasie des glandes surrénales.

De plus, chez l'homme les principales causes de développement de cancers surrénaux sont liées à des dérèglements de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine (Espiard and Bertherat, 2015) et chez la souris une activation constitutive de cette voie entraîne également une hyperplasie des glandes surrénales et le développement de tumeurs (Berthon et al., 2010). Les protéines R-spondin en tant qu'agonistes de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine pourraient aussi jouer un rôle dans ce processus. Pour le vérifier, nous avons généré un modèle de souris qui exprime de manière ectopique la protéine RSPO1 dans le cortex surréalien. Nous étudierons ici les effets de cette surexpression dans les glandes surrénales.

# I. Matériels et méthodes

## **Expérimentation animale :**

Tous les travaux menés sur les animaux ont été conformes aux lignes directrices nationales et internationales et ont été approuvés par le comité d'éthique local (PEA-RCE / 2013-88).

## **Immunofluorescence et analyse histologique :**

Pour les expériences d'immunofluorescence, les tissus ont été fixés pendant une nuit dans une solution à 4% de paraformaldéhyde, progressivement déshydratés et inclus dans la paraffine. Les sections de 7 micromètres d'épaisseur ont été réhydratées, bouillies dans une cocotte-minute pendant 2 minutes avec une solution de démasquage d'antigène (Vector Laboratories), et bloquées dans une solution PBS contenant 10% de sérum d'âne normal (Jack- fils Immunoresearch) et 3% de BSA. Tous les anticorps primaires ont été appliqués pendant une nuit à 4 ° C aux concentrations indiquées dans le tableau d'anticorps. Les anticorps secondaires ont été dilués à 1 : 200 et incubés à température ambiante pendant 1 h.  $\beta$ -caténine a été détectée en utilisant un anticorps secondaire biotynylé suivie d'une détection streptavidine-Cy3 (Sigma-Aldrich).

Pour l'analyse histologique, les glandes surrénales obtenues à partir d'embryons ou de souris adultes ont été fixées pendant une nuit dans une solution à 4% de paraformaldéhyde, progressivement déshydratées et incubées dans de la paraffine. Les sections de sept micromètres d'épaisseur ont été ensuite colorées avec de l'hématoxyline et de l'éosine selon des procédures standard.

Protéine	Host	Type	Dilution	Secondaire	Producer	Reference
B-caténine	Mouse	Monoclonal	1 :100	Biothynilated/Streptavidin-Cy3	BD Transduction Laboratories	réf. 610153
SF1	Rabbit	Polyclonal	1 :500-1000	AlexaFluor 488	Morohashi K,	Ref. <sup>35</sup>
TH	Rabbit	Polyclonal	1 :500	AlexaFluor 647	AbCam	ab290
DAB2	Rabbit	Polyclonal	1 :250	AlexaFluor 647	Abcam	ab33441
AKR1b7	Goat	Polyclonal	1 :250	AlexaFluor 488	Santa Cruz	sc27763

## Hybridation in situ

Les tissus ont été fixés pendant une nuit dans une solution à 4% de paraformaldéhyde, progressivement déshydratés et inclus en paraffine. Des sections de sept micromètres d'épaisseur ont été hybridées avec des sondes *Rspo1*, *P450scc* et *21oh* selon les protocoles décrits précédemment (Cormai et al., 2010).

## L'analyse par PCR en temps réel

L'ARN a été extrait à partir des glandes surrénales d'embryons à E18,5 ou d'adultes en utilisant un agent Trizol (Invitrogen) en suivant les instructions du fabricant. La transcription reverse a été réalisée en utilisant l'enzyme M-MLV transcriptase inverse (Invitrogen) en combinaison avec des amorces aléatoires. L'ADNc obtenu a ensuite été utilisé comme matrice pour l'analyse qPCR en utilisant le kit SYBR Green Master (Roche) et un appareil LightCycler 1.5 (Roche). Les niveaux d'expression ont été normalisés sur le niveau d'expression de *Hprt*. Les amorces ont été conçues sur le site Web Universal ProbeLibrary (Roche).

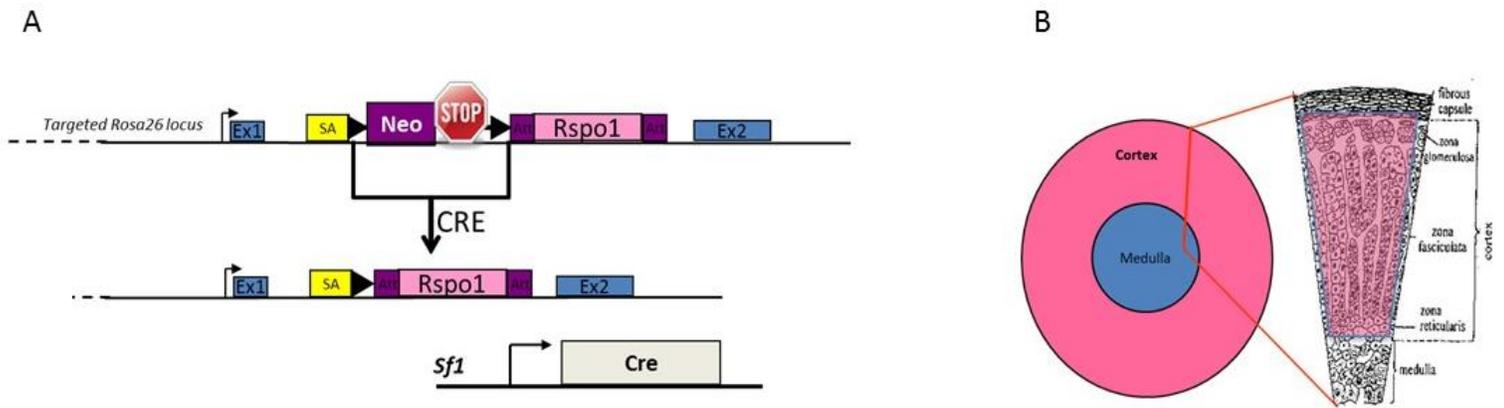
## Coloration au Salmon GAL

Les souris sauvages et gain de fonction ont été croisés avec des souris exprimant une cassette d'insertion *Axin2-lacZ*, exprimant donc la protéine LacZ sous le contrôle du promoteur du gène *Axin2*. La détection de présence de la protéine LacZ a été réalisé en suivant le protocole décrit ci-dessous :(Sundararajan et al., 2012).

## II. Résultats

Pour étudier le rôle du gène *Rspo1* dans les glandes surrénales, nous avons généré un modèle de souris (que nous appellerons gain de fonction : *Rspo1<sup>GOF</sup>*), qui exprime de manière ectopique la protéine RSPO1 dans le cortex surrénalien. Pour cela, nous avons inséré dans le génome de la souris une cassette contenant le gène *Rspo1* précédé par le gène codant pour la néomycine se terminant par un site d'arrêt de transcription et flanqué de 2 régions loxP.

Ainsi en l'absence de protéine CRE recombinase, ce sera la néomycine qui sera exprimé et grâce à la présence du site d'arrêt de transcription le gène *Rspo1* ne s'exprimera pas. Par contre en, présence de protéine CRE, celle-ci entrainera une recombinaison des sites loxP et entrainera l'excision du gène *néomycine* ainsi que du site d'arrêt de transcription. Dans cette conformation, le gène *Rspo1* pourra être exprimé. Nous avons ensuite croisé ces souris avec des souris exprimant la protéine CRE recombinase sous le contrôle du promoteur du gène *Sfl*. Ainsi ce modèle de souris exprimera la protéine RSPO1 dans toutes les cellules exprimant le gène *Sfl* (fig. 1).

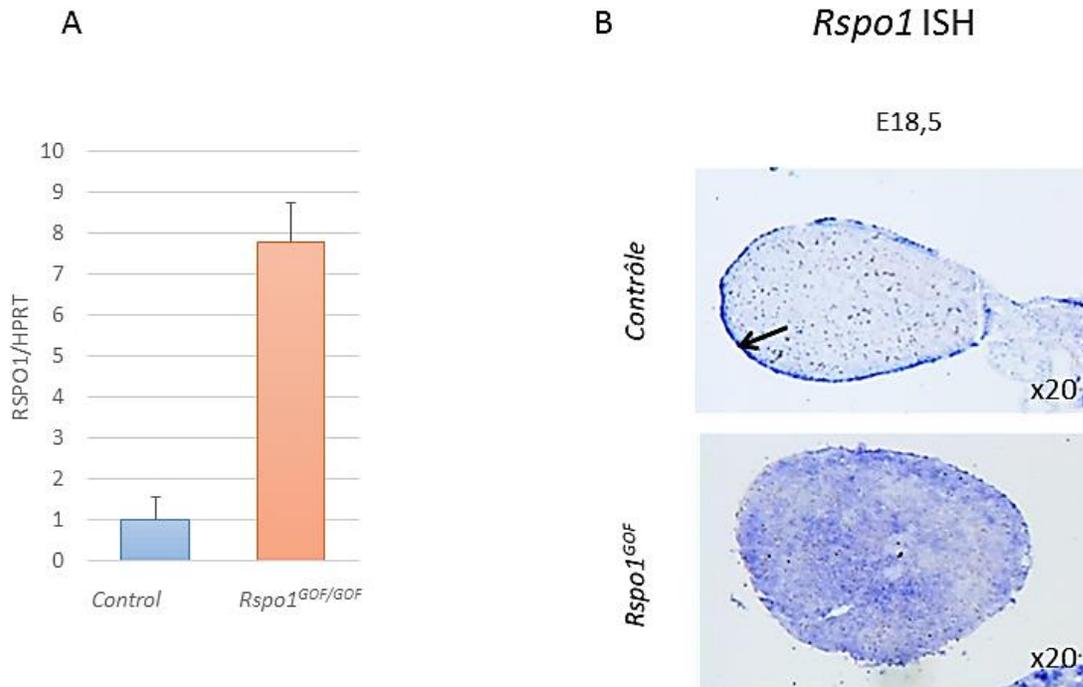


**Figure 1 : Représentation schématique du modèle Gain de fonction.**

Schéma représentant l'insertion de l'ADNc codant pour le gène *Rspo1* dans le locus *Rosa 26* avec en amont la présence d'une cassette de résistance à la néomycine encadrée de site *loxP* permettant l'expression du transgène *Rspo1* uniquement en présence de recombinaison CRE. L'expression de la recombinaison CRE étant sous le contrôle du promoteur du gène *Sf1*, elle induit l'expression du transgène dans le cortex surrénalien.

Nous avons d'abord vérifié que le transgène soit bien exprimé dans les glandes surrénales des souris gain de fonction (*Rspo1<sup>GOF</sup>*). Pour cela nous avons extrait les ARNs de souris contrôles et gain de fonction âgées de 6 mois. Nous avons ensuite réalisé des expériences de reverse transcription et de PCR quantitative afin de quantifier le niveau d'expression du gène *Rspo1*. Pour des souris homozygotes (*Rspo1<sup>GOF/GOF</sup>*) âgées de 6 mois, nous pouvons observer presque 8 fois plus d'expression de *Rspo1* comparé à des souris contrôles (fig. 2A).

Afin de confirmer ces résultats, nous avons également réalisé une hybridation *in situ* avec une sonde dirigée contre les ARNm du gène *Rspo1* sur des coupes de glandes surrénales de souris gain de fonction et de souris contrôles. Les glandes surrénales de souris contrôles expriment le gène *Rspo1* uniquement dans la capsule surrénalienne (fig. 2B). Au contraire, les souris gain de fonction expriment fortement l'ARNm du gène *Rspo1* dans tout le cortex surrénalien (fig. 2B).

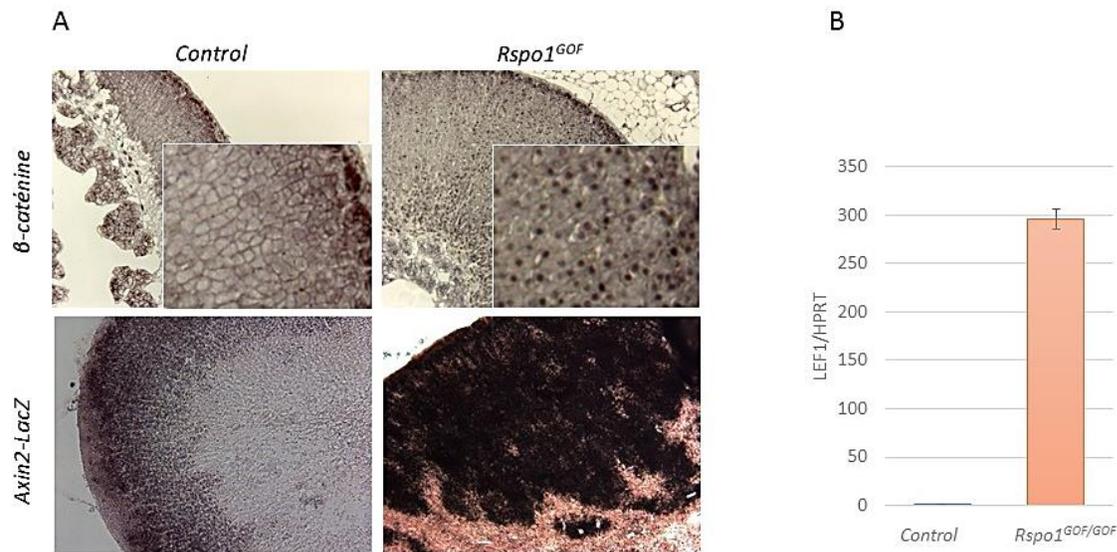


**Figure 2 : Expression du transgène.**

A : RT-Q-PCR réalisée sur des ARNs extraits de glandes surrénales prélevées chez des souris gain de fonction ou sauvages âgées de 6 mois et quantifiant le niveau d'expression du gène *Rspo1* normalisé par rapport à l'expression du gène *Hprt*. Les souris gain de fonction homozygotes expriment de manière plus forte le gène *Rspo1* que les souris contrôles. (n=4, p<0.05). B : Hybridation *in situ* dirigée contre les ARNm du gène *Rspo1* réalisée sur des coupes de glandes surrénales prélevées chez des souris gain de fonction ou contrôles âgées de 18 jours et demi de développement. Noter la présence de signal dans tout le cortex surrénalien chez les souris *Rspo1*<sup>GOF</sup>.

La protéine RSPO1 étant un agoniste de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, nous avons ensuite vérifié l'activation de cette voie dans le cortex surrénalien. Une immunohistochimie dirigée contre la protéine  $\beta$ -caténine a été réalisée et montre que dans le modèle gain de fonction elle est localisée dans le noyau des cellules de la zone fasciculée (fig. 3A). Pour confirmer l'activation de la voie dans le cortex, les souris gain de fonction ont été croisées avec des souris exprimant une cassette d'insertion Axin2-Lacz. Le gène *Axin2* étant une cible de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, sa présence indique que la voie est bien active. Des colorations utilisant le Salmon gal comme substrat pour la  $\beta$ -galactosidase réalisées sur les sections de ces souris montrent que chez les souris contrôles la coloration est présente uniquement dans la zone glomérulée alors que chez les souris gain de fonction elle est aussi présente dans la zone fasciculée (fig. 3A). La protéine Axin2 est donc exprimée uniquement dans la zone glomérulée chez les souris sauvages mais dans les 2 zones glomérulée et fasciculée chez les souris gain de fonction.

La quantification du taux d'expression du gène *Lef1* qui est une cible directe de la voie  $\beta$ -caténine montre également une activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine beaucoup plus forte chez les souris gain de fonction (fig. 3B).



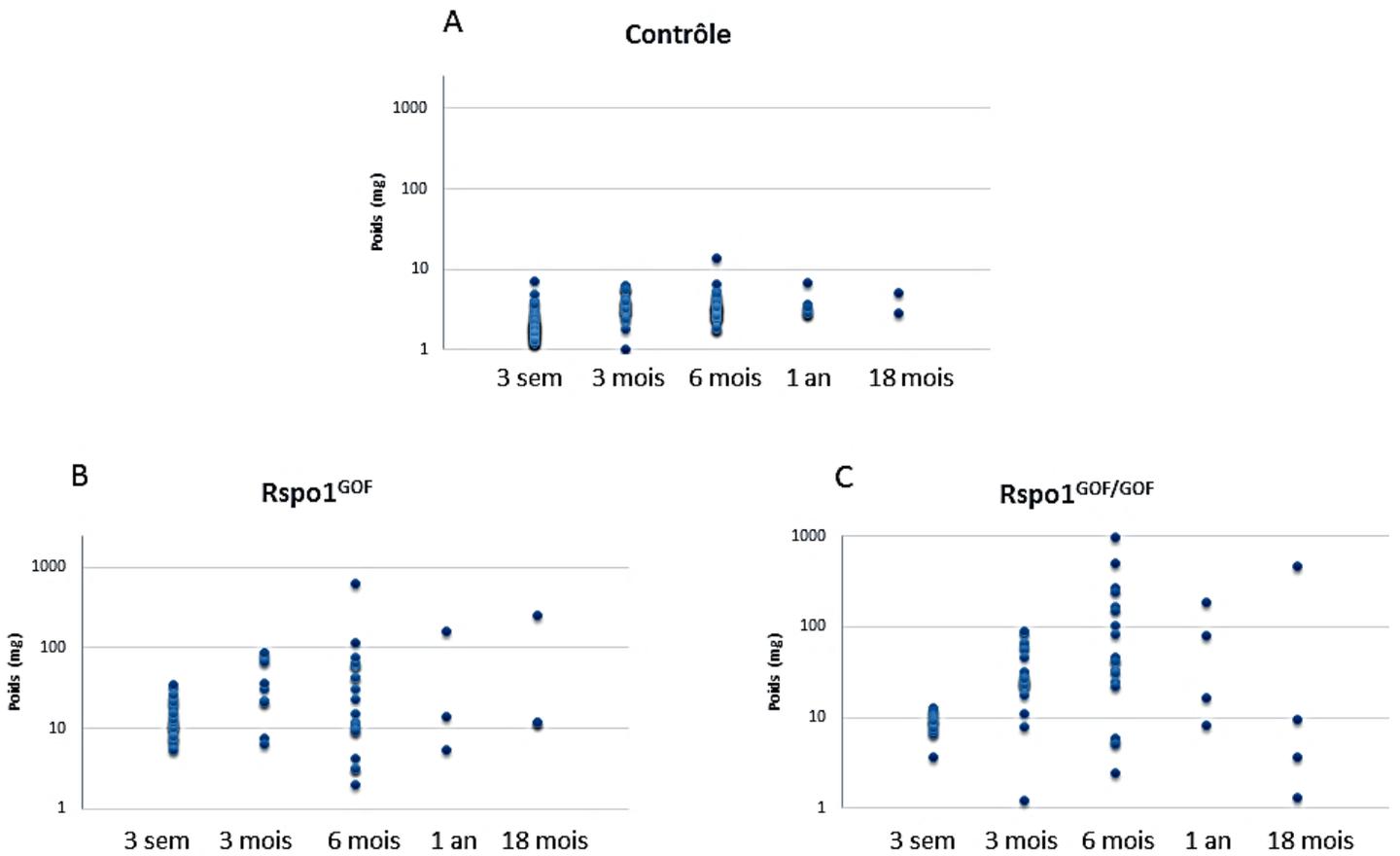
### Figure 3 : Activation de la voie de signalisation canonique Wnt/ $\beta$ -caténine.

A : Immunohistochimie dirigée contre la protéine  $\beta$ -caténine réalisée sur des coupes de glandes surrénales prélevées chez des souris gain de fonction ou contrôles âgés de 6 mois. Coloration Salmon Gal réalisée sur des coupes de glandes surrénales prélevées chez des souris gain de fonction ou contrôles ayant une cassette ax2LacZ âgées de 6 mois. Le marquage nucléaire de la  $\beta$ -caténine et la présence de coloration Salmon gal montrent une activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans la zone fasciculée chez les souris gain de fonction.

B : RT-Q-PCR réalisées sur des ARNs extraits de glandes surrénales prélevées chez des souris gain de fonction ou sauvages âgées de 6 mois et quantifiant le niveau d'expression du gène *Lef1* normalisé par rapport à l'expression du gène *Hprt*. Les souris gain de fonction homozygotes expriment 300 fois plus le gène *Lef1* que les souris contrôles (n=4, p<0.05).

Au niveau phénotypique, les souris gain de fonction montrent une hyperplasie souvent bilatérale des glandes surrénales et ceci est visible dès E18.5.

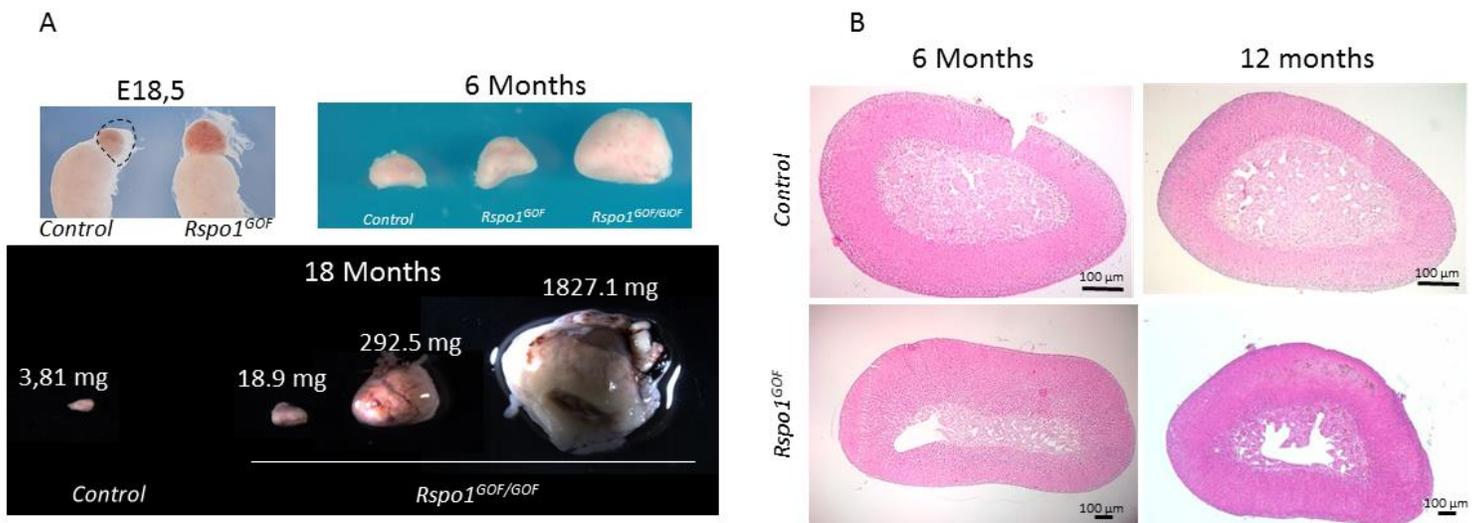
L'analyse cinétique du poids a révélé que les glandes surrénales de souris contrôles augmentent en taille jusqu'à 6 semaines puis maintiennent un poids stable durant toute la vie adulte (3,34mg  $\pm$  0,86). Au contraire, les souris avec 1 ou 2 copies (hétéro/ homozygote) du transgène actif révèlent une hyperplasie importante qui a tendance à s'aggraver avec l'âge. Il semblerait donc que les glandes surrénales des souris gain de fonction soient plus grosses dès la naissance et continuent ensuite de grandir pendant la vie adulte.



**Figure 4 : Hyperplasie surrénalienne chez les souris gain de fonction.**

Graphique représentant la cinétique du poids des glandes surrénales en mg normalisé par rapport au poids des souris sauvages (A) et gain de fonction hétérozygotes (B) et homozygotes (C). Noter que le poids des glandes surrénales des souris gain de fonction augmente de manière dépendante à l'âge.

Nous avons procédé à un examen macroscopique et histologique des glandes surrénales de souris contrôles, hétérozygotes et homozygotes à différents âges. L'augmentation de taille semble dépendre à la fois de l'âge et du dosage en transgène puisque les glandes surrénales de souris homozygotes sont plus grosses que celle de souris hétérozygotes (fig.5A). A partir de 1 an, certaines souris développent des tumeurs qui peuvent atteindre 1,8g (fig.5A). L'analyse histologique par coloration hématoxyline et éosine montre que bien que la taille des glandes soit supérieure, leur structure est maintenue (fig.5B).



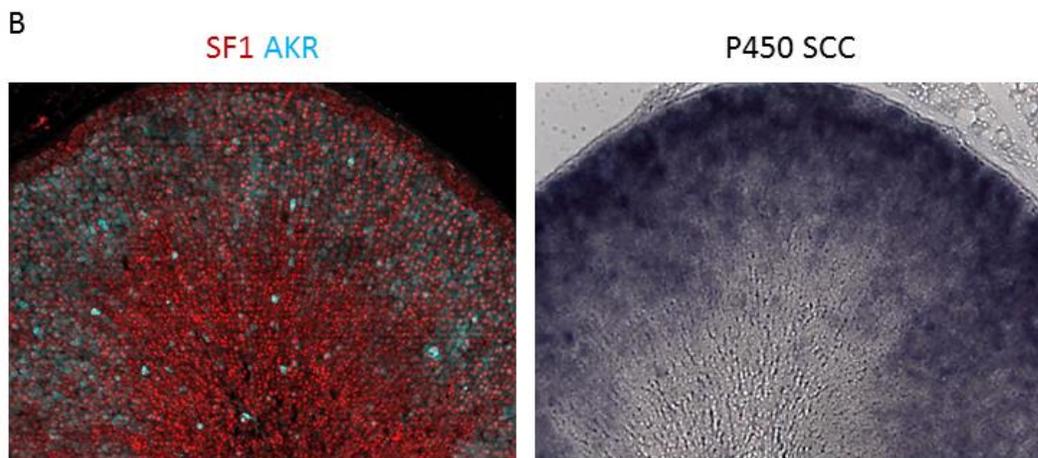
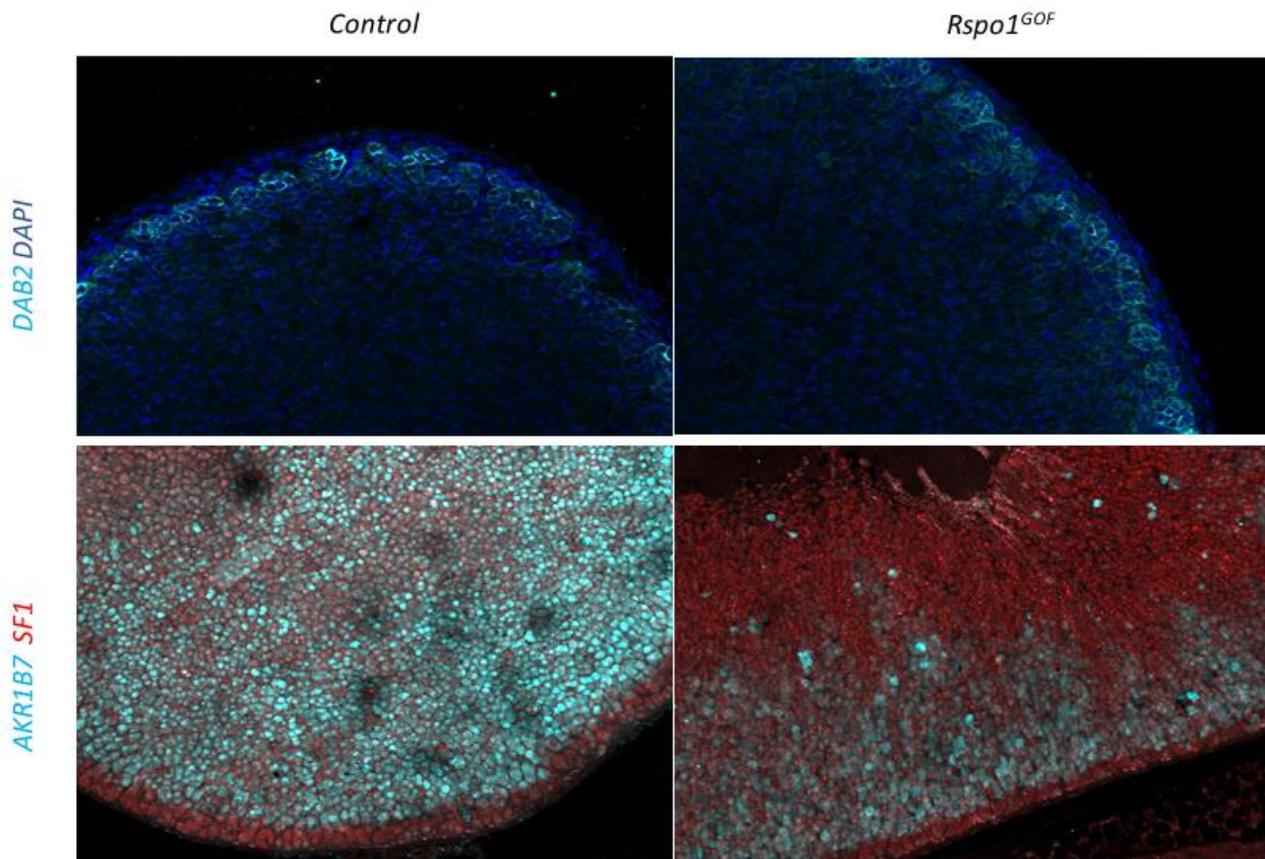
**Figure 5 : Caractérisation morphologique et structurale.**

A : Vue macroscopique des glandes surrénales de souris sauvages et gain de fonction à 18 jours et demi de développement, 6 mois et 18 mois. Les animaux homozygotes sont plus affectés que les hétérozygotes.

B : Analyse histologique des coupes de glandes surrénales de souris sauvages, et gain de fonction âgées de 6 mois et 1 an.

Pour aller plus loin dans l'analyse structurale et fonctionnelle, nous avons ensuite réalisé des colorations par immunofluorescence pour vérifier l'expression de certaines protéines marquant les différentes zones (fig.6A). L'expression de la protéine DAB2, marqueur de la zone glomérulée étant inchangée nous pouvons suggérer que cette zone n'est pas affectée. De plus, contrairement à ce qui a été observé dans l'étude de (Berthon et al., 2010) où une forme stable de la  $\beta$ -caténine est exprimée dans la zone fasciculée, nous n'observons pas dans ce modèle d'extension de la zone glomérulée dans la zone fasciculée. Cependant, le marquage de la protéine AKRB17 dans la zone fasciculée montre une perte d'expression dans la partie interne de celle-ci (fig.6A).

Pour vérifier la fonctionnalité de ces glandes, nous avons également réalisé des hybridations *in situ* dirigées contre un gène spécifique de la stéroïdogénèse : *P450scc* (fig.6B). Ces résultats confirment la présence d'enzymes stéroïdogéniques et suggèrent donc que la glande est fonctionnelle (fig.6B). Mais la zone fasciculée interne bien qu'exprimant SF1 n'exprime plus les enzymes de la stéroïdogénèse.

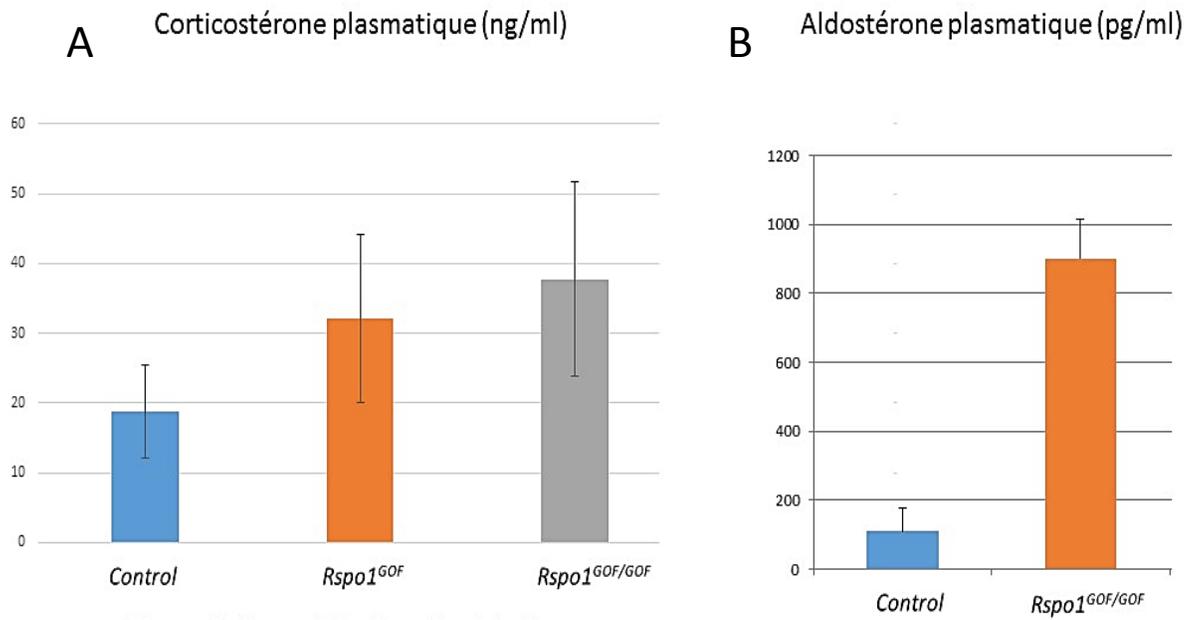


**Figure 6 : Etude de la zonation des glandes surrénales GOF.**

A : Colorations par Immunofluorescence dirigés contre les protéines AKR1B7, SF1 et DAB2 réalisés sur des coupes de glandes surrénales de souris sauvages ou gain de fonction âgées de 6 mois.

B : Colorations par Immunofluorescence dirigés contre les protéines AKR1B7 et SF1 et hybridation in situ dirigés contre l'ARNm du gène *P450scc* réalisés sur des sections consécutives de glandes surrénales de souris gain de fonction âgées de 6 mois.

Au niveau physiologique nous avons ensuite mesuré les taux plasmatiques de cortisol (fig.7A) et d'aldostérone (fig.7B). Bien que ceux-ci montrent une forte augmentation chez les souris gain de fonction comparées aux souris sauvages, ces résultats ne sont pas significatifs en raison d'une trop grande variabilité. Ces mesures doivent donc être refaites dans de meilleures conditions et en évitant toute source de stress pour les souris.

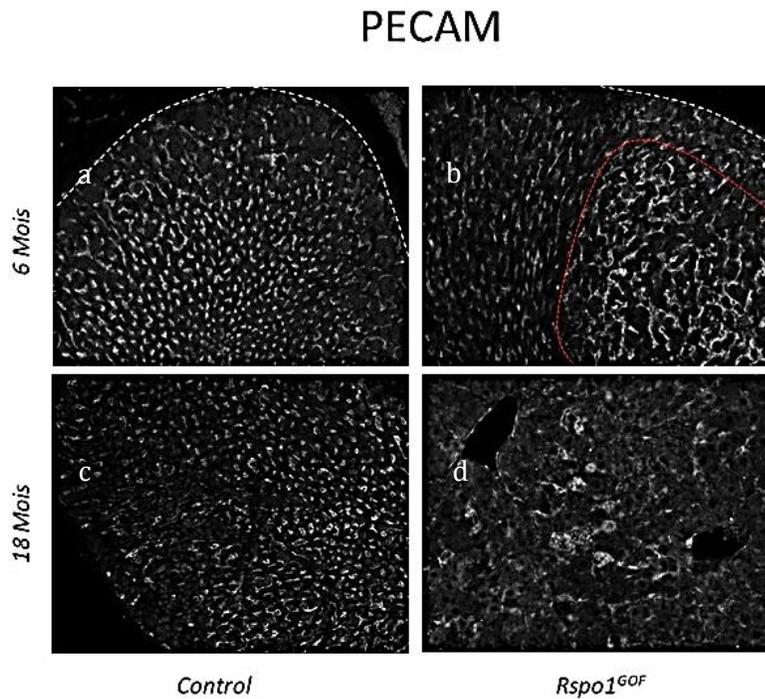


**Figure 7 : Caractérisation physiologique.**

A : Taux plasmatiques de corticostérone (ng/ml) de souris sauvages ou gain de fonction âgée de 6 mois (n=5).  
 B : Taux plasmatiques d'Aldostérone (pg/ml) de souris sauvages ou gain de fonction âgée de 6 mois (n=7).

La glande surrénale est un organe endocrinien, elle doit donc avoir un riche réseau vasculaire pour l'acheminement des hormones. Nous avons voulu vérifier si ce réseau était affecté par l'expression du gène *Rspo1*. Pour cela nous avons réalisé des colorations en immunofluorescence permettant de visualiser le réseau vasculaire (anticorps dirigés contre la protéine PECAM) dans notre modèle gain de fonction (fig. 8). L'analyse de souris âgées de 6 mois montre la présence de zones où les vaisseaux

sont plus nombreux et anarchiques (fig. 8). Chez les souris gain de fonction de 18 mois ayant développé des tumeurs, nous pouvons noter la présence de gros vaisseaux dilatés (fig.9d). L'expression ectopique du gène *Rspo1* a donc une incidence sur le réseau vasculaire de la glande surrénale.



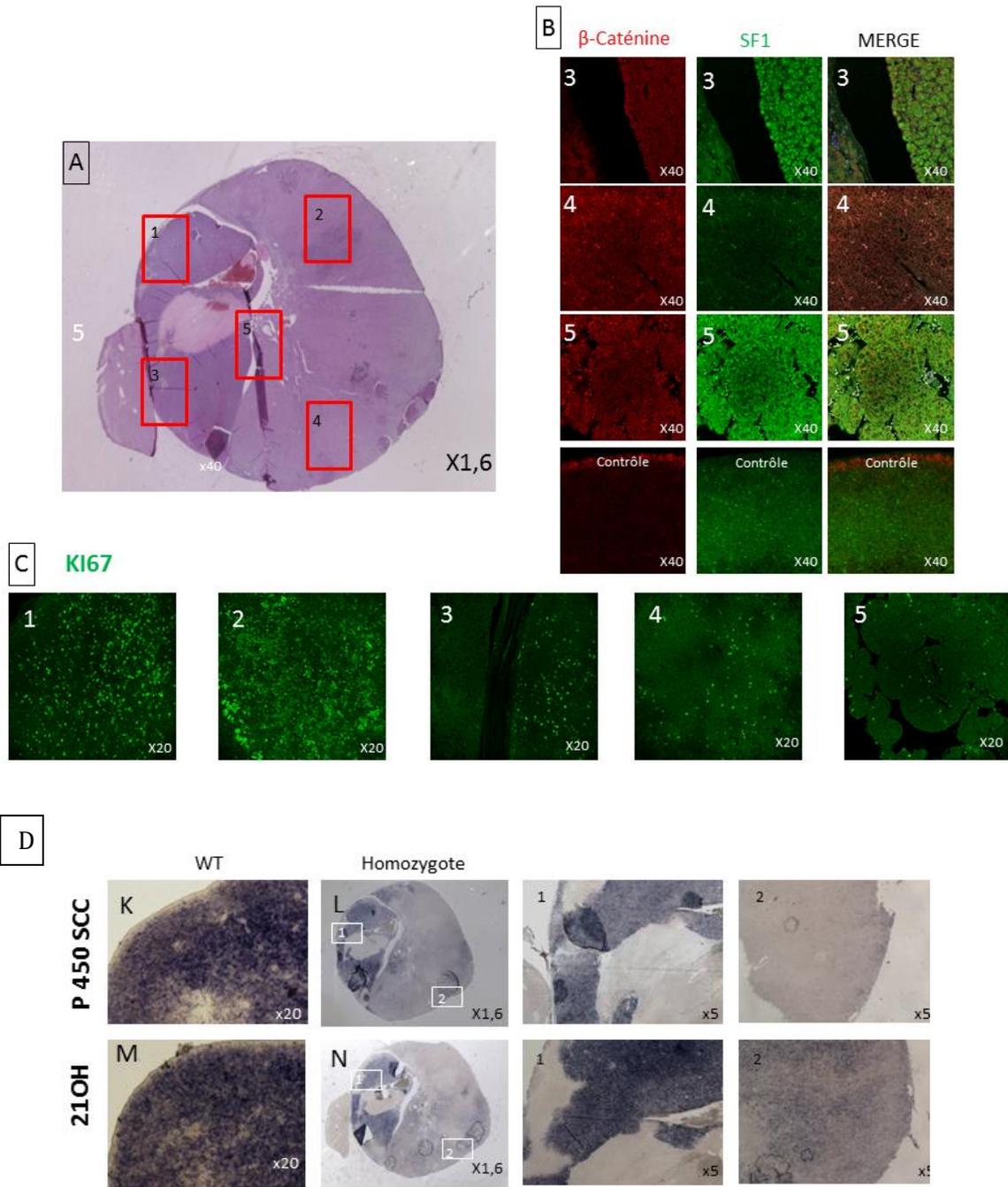
**Figure 8 : Etude de la vascularisation des glandes surrénales des souris GOF.**

Immunofluorescences réalisées sur des glandes surrénales de souris sauvages ou gain de fonction âgées de 6 mois (a, b) ou de 18 mois (c, d) avec un anticorps dirigé contre la protéine PECAM.

A partir de 1 an, les souris gain de fonction développent des tumeurs surrenaliennes. Afin de mieux caractériser ces tumeurs, nous avons réalisé des analyses histologiques et fonctionnelles. La coloration histologique (fig. 9A) montre une grande hétérogénéité dans les tissus. De plus, l'analyse de l'expression des enzymes stéroïdogéniques a révélé une totale désorganisation de la glande avec des zones stéroïdogéniques et non stéroïdogéniques disséminées de manière aléatoire (fig. 9D). Une analyse par immunofluorescence avec des anticorps dirigés contre la protéine SF1 révèle qu'une large proportion de la tumeur ne produit plus cette protéine (fig. 9B, zone 4).

L'expression ectopique de *Rspo1* est supposée conduire à la stabilisation de la  $\beta$ -caténine. Pour déterminer si c'est le cas dans la tumeur, nous avons réalisé une immunofluorescence avec des anticorps dirigés contre cette protéine. Bien que dans les glandes contrôles, l'expression de la  $\beta$ -caténine soit restreinte à la zone glomérulée, les échantillons de tumeurs montrent une expression forte et étendue.

Finalement, une analyse de la prolifération par marquage immunofluorescent de la protéine KI67 montre que celle-ci est très élevée bien que le pourcentage soit variable entre les différentes zones (fig. 9C).



**Figure 9 : caractérisation des tumeurs.**

A : Coloration Hématoxyline/Eosine, les différents cadres représentent les zones montrées dans les figures suivantes. Noter l'hétérogénéité tissulaire.

B : Immunofluorescence réalisée avec des anticorps dirigés contre les protéines SF1 et  $\beta$ -caténine. La protéine SF1 n'est pas exprimée dans la zone 4 alors que la  $\beta$ -caténine est exprimée partout.

C : Immunofluorescence réalisée sur les zones 1, 2, 3, 4 et 5 des coupes de la tumeur avec un anticorps dirigé contre la protéine KI67 (marqueur de prolifération). Noter la prolifération massive bien que différente selon les zones.

D : Hybridations *in situ* réalisées sur des coupes de glandes surrénales de souris sauvages ou gain de fonction âgées de 18 mois. Les sondes sont dirigées contre les ARNm des protéines 21 Hydroxylase et P450SCC. Noter la présence de zones stéroïdogéniques et non-stéroïdogéniques

# III. Discussion

Les protéines Rspodin sont une famille de protéines suscitant l'intérêt de nombreux chercheurs de par leur action agoniste sur la voie de signalisation WNT/ $\beta$ -caténine. Celle-ci joue un rôle très important dans le développement et l'homéostasie des glandes surrénales.

Mais quel est le rôle des protéines R-spondin et plus spécifiquement de RSPO1 dans ces processus?

Nous avons démontré dans ce projet que les souris exprimant de manière ectopique le gène *Rspo1* dans le cortex surrénalien présentaient un phénotype d'hyperplasie des glandes surrénales.

Une telle augmentation de taille peut être due soit à une augmentation de la prolifération soit à une diminution de l'apoptose. L'effet prolifératif de RSPO1 par l'intermédiaire de la voie  $\beta$ -caténine a déjà été démontré dans l'épithélium intestinal (Kim et al., 2005). Pourtant une étude préliminaire de la prolifération dans notre modèle ne montre pas de différences significatives. Le stade le plus précoce que nous avons analysé étant E18.5 et les glandes surrénales GOF étant déjà beaucoup plus grosses à ce stade-là, on pourrait alors se demander si une prolifération massive ne se ferait pas plus tôt au cours du développement embryonnaire. Par ailleurs, on observe que la taille des glandes surrénales de souris gain de fonction continue à augmenter au cours de la vie adulte ce qui n'est pas le cas chez les souris sauvages. Des analyses de l'apoptose ont été réalisées mais ne montrent aucune différence entre les souris contrôles et les souris GOF. Cela suggère que bien que nous n'ayons pas pu la détecter, la prolifération doit être plus importante chez les souris GOF et qu'il faudrait répéter ces analyses afin d'obtenir des résultats significatifs. Il faudrait également pouvoir déterminer avec précision quels sont les différents types cellulaires affectés ? s'agit-il de cellules souches/progénitrices déjà connues tels que celles exprimant SHH ou CYP11B2 ? ou bien s'agit-il de cellules de la zone fasciculée ?

Un phénotype similaire à celui de nos souris gain de fonction a été obtenu avec des souris ayant une mutation stabilisatrice de la protéine  $\beta$ -caténine dans le cortex surrénalien (modèle appelé  $\Delta$ cat) (Berthon et al., 2010). Mais dans ce modèle, on observe une extension de la zone glomérulée dans la zone fasciculée, ce qui n'est pas le cas de nos souris gain de fonction.

Notre étude présentée en partie 1 des résultats montre que la protéine RSPO3 et la voie WNT/ $\beta$ -caténine sont déterminantes pour la formation et le maintien de la zone glomérulée. Il est donc logique qu'une augmentation de cette voie puisse changer le devenir des cellules fasciculées. Mais pourquoi n'est-ce pas le cas dans notre modèle gain de fonction ? Nous savons que la protéine RSPO1 bien qu'étant capable d'entraîner une activation de la voie WNT/ $\beta$ -caténine, n'est pas la plus efficace des R-spondin (Kazanskaya et al., 2004). De plus, la figure 3 de la partie 2 des résultats montre que bien que la voie WNT/ $\beta$ -caténine soit activée dans la zone fasciculée, son niveau d'activation est moindre que dans la zone glomérulée.. Il pourrait donc seulement s'agir d'un problème de niveau d'activation de la voie, celle-ci n'étant pas assez forte pour entraîner un changement d'identité des cellules fasciculées dans notre modèle. Alors que dans le modèle  $\Delta$ cat de (Berthon et al., 2010), la voie est très fortement active.

Par ailleurs, il est étonnant d'observer en comparant encore ces 2 modèles que dans notre modèle gain de fonction les tumeurs apparaissent plus tôt et sont plus grosses. Il semblerait donc que bien que ce niveau d'activation soit plus faible il est plus efficace pour entraîner la prolifération. Mais dans notre modèle, le gène *Rspo1* est également exprimé dans la zone glomérulée, ce qui n'est pas le cas dans le modèle  $\Delta$ cat où une CRE uniquement exprimée dans la zone fasciculée est utilisée. Les cellules de la zone glomérulée seraient donc peut être plus affectées au niveau de la prolifération, ce qui semble logique puisque cette zone abrite différentes populations de cellules progénitrices.

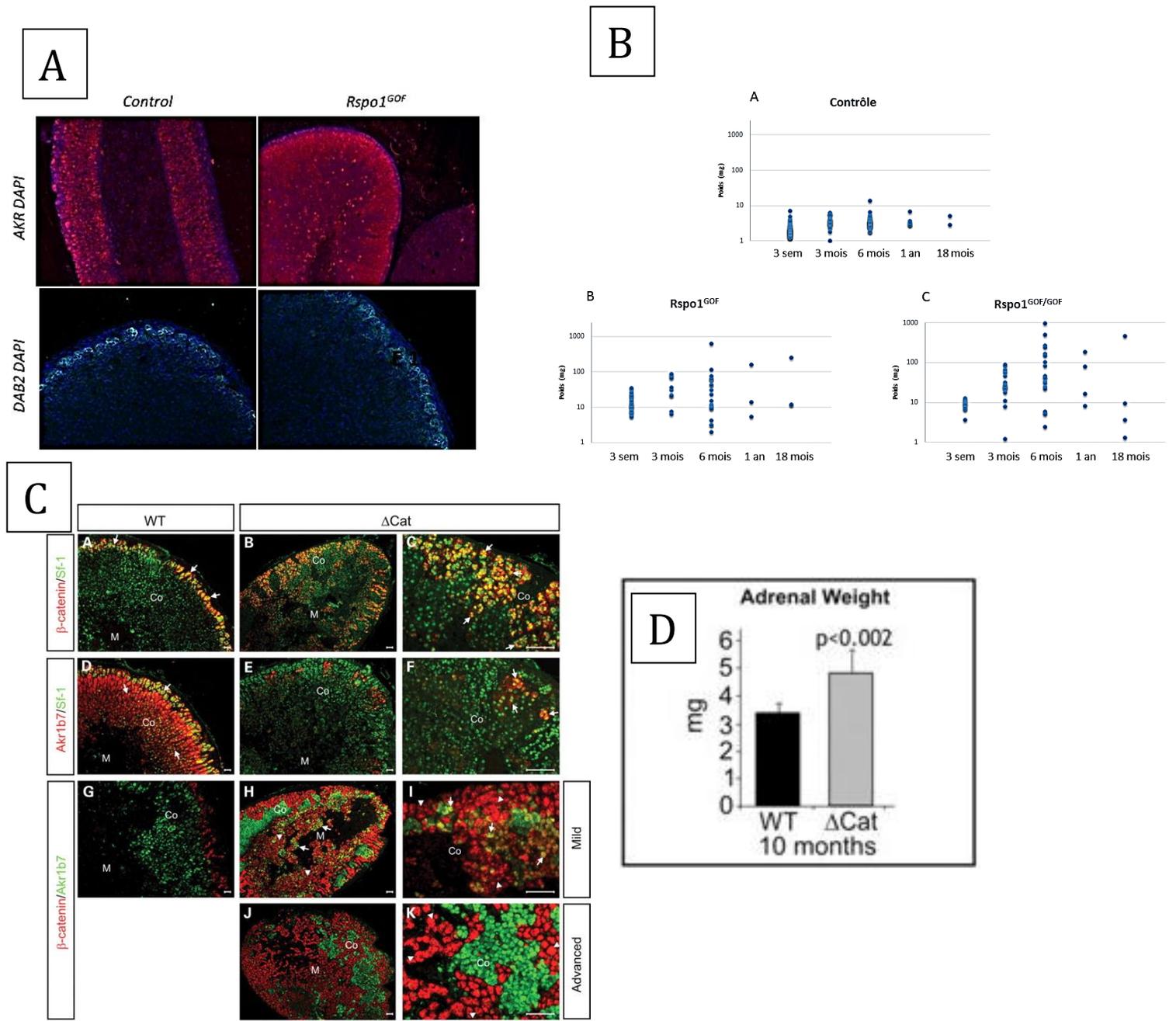


Figure 1 : Comparaison des modèles d'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine  $\Delta$ cat et gain de fonction.

A : Colorations par Immunofluorescence dirigées contre les protéines AKR1B7 et DAB2 réalisés sur des coupes de glandes surrénales de souris sauvages ou gain de fonction âgées de 6 mois.

B : Graphique représentant la cinétique du poids des glandes surrénales en mg de souris sauvages(A) et gain de fonction hétérozygotes (B) et homozygotes (C). Noter que le poids des glandes surrénales des souris gain de fonction augmente de manière dépendante à l'âge.

C : (A-C) Co-immunohistochimie pour  $\beta$ -caténine (rouge) et SF-1 (vert) sur des sections de glandes surrénales de souris WT et  $\Delta$ cat âgées de 10 mois. (D-F) Co-immunohistochimie pour AKR1B7 (rouge) et SF-1 (vert) sur des sections de glandes surrénales de souris WT et  $\Delta$ cat âgées de 10 mois. (G-K) Co-immunohistochimie pour  $\beta$ -caténine (rouge) et AKR1B7 (vert) sur des sections de glandes surrénales de souris WT et  $\Delta$ cat âgées de 10 mois. Panneau tiré de (Berthon et al., 2010)

D : Poids de glandes surrénales de souris WT et  $\Delta$ cat âgées de 10 mois.

Noter que dans le modèle  $\Delta$ cat on observe une extension de la zone glomérulée au dépend de la zone fasciculée, et que ce n'est pas le cas dans le modèle gain de fonction. On peut également observer que la taille des glandes surrénales est beaucoup plus importante dans le modèle gain de fonction que dans le modèle  $\Delta$ cat. Panneau tiré de (Berthon et al., 2010)

La caractérisation physiologique de glandes surrénales de notre modèle gain de fonction bien que non significative montre une tendance à l'augmentation de sécrétion des hormones stéroïdiennes. Ce qui semble logique puisque les glandes surrénales semblent plus grosses. Ces tests seraient néanmoins à refaire dans des moindres conditions de stress pour les souris afin de diminuer la variabilité et les valider.

Nous pouvons néanmoins discuter le fait qu'une partie des cellules de la zone fasciculée interne n'exprime plus les gènes de la stéroïdogénèse (voir figure 6 partie 2 des résultats). Nous pourrions penser qu'une régulation hypothalamique suite à un taux hormonal trop élevé en serait à l'origine. Une étude plus approfondie de la physiologie des animaux serait donc nécessaire à la compréhension de ces mécanismes et pourrait aider à comprendre certaines pathologies d'hypersécrétions des hormones stéroïdiennes.

Bien que le gène *Rspo1* ne soit pas exprimé dans les cellules endothéliales, la vascularisation des glandes surrénales est affectée par son expression dans les cellules stéroïdogéniques juxtaposées. En effet on observe dans les glandes surrénales de souris GOF une désorganisation du réseau vasculaire et celle-ci est encore plus marquée dans les tumeurs. Sachant que le gène *Rspo3* est exprimé dans le tissu endothélial et qu'il a un rôle majeur dans la vascularisation (Scholz et al., 2016), on peut imaginer que le gène *Rspo1* par redondance fonctionnelle puisse aussi avoir un effet et expliquer le phénotype observé chez les souris GOF.

Le rôle de *RSPO1* en tant que gène permettant l'hyperplasie de l'organe sans modification de structure nous permet d'envisager d'éventuelles applications thérapeutiques dans le traitement d'hypoplasie des glandes surrénales comme on peut en observer dans certaines formes de syndrome d'Addison. Il a d'ailleurs été suggéré par Kim et collègues d'exploiter l'effet prolifératif de la *RSPO1* pour contrer les effets secondaires apoptotiques de la chimiothérapie sur le système digestif (Kim et al., 2005). Mais le fait qu'une longue exposition à la *RSPO1* puisse causer des tumeurs démontre clairement qu'un éventuel traitement potentiel devra être soigneusement contrôlé.

D'ailleurs l'apparition de tumeurs dans notre modèle démontre l'effet oncogène important de RSPO1. De telles observations suggèrent un rôle pour RSPO1 dans la cancérogenèse des glandes surrénales chez des patients humains. Pourtant des analyses ont été réalisées sur un panel de patients souffrants de cancers surrénaux et n'ont pas révélé d'augmentation du niveau d'expression de *Rspo1* dans les tissus tumoraux.

De manière plus générale, l'activité oncogène de RSPO1 dans d'autres tissus serait possible puisque son domaine d'expression n'est pas restreint uniquement à la capsule surrénale. D'ailleurs un effet oncogène de RSPO1 a été également démontré dans l'ovaire en utilisant le même modèle de souris gain de fonction (De Cian et al., 2016). Notre modèle de souris *Rosa26 : Rspo1* pourrait donc être tout à fait approprié pour l'étude de la surexpression de *Rspo1* dans d'autres tissus après croisement avec des souris exprimant divers types de recombinaise CRE.

# Conclusion

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes donc intéressés à la compréhension des mécanismes aboutissant à la zonation et à l'homéostasie des glandes surrénales. Et plus particulièrement au rôle de la capsule et des gènes de la famille *R-spondin*.

Nous avons d'abord démontré que seuls les gènes *Rspo1* et *Rspo3* étaient exprimés dans la glande surrénale et ceci uniquement dans la capsule.

Mais la capsule étant composée de plusieurs populations cellulaires différentes nous avons montré que le gène *Rspo1* était exprimé par les cellules exprimant le facteur de transcription WT1 (situé dans le mésothélium) alors que le gène *Rspo3* était exprimé par les cellules exprimant le facteur de transcription GLI1.

La délétion du gène *Rspo3* dans la capsule a montré que celui-ci est nécessaire à la fois à la mise en place de la zonation de la glande lors du développement embryonnaire mais également à son maintien tout au long de la vie. En effet, le gène *Rspo3* induit l'activation des voies Wnt/ $\beta$ -caténine et SHH dans les cellules de la zone glomérulée. Celle-ci vont alors activer l'expression de *Gli1* dans les cellules capsulaires. Ces cellules vont alors pouvoir proliférer et former le cortex définitif lors du développement embryonnaire. Ensuite, chez l'adulte les cellules capsulaires exprimant *Rspo3* vont permettre le maintien de l'activation des voies SHH et Wnt/ $\beta$ -caténine, permettant ainsi le maintien de la zone glomérulée. Le gène *Rspo3* est également essentiel au maintien de l'homéostasie chez l'adulte. Il a en effet été montré que la zone glomérulée était un réservoir de cellules progénitrices puisqu'elles sont capables de se diviser et de se différencier pour ensuite migrer dans la zone fasciculée et se différencier en cellules fasciculées. Mais en l'absence de *Rspo3*, les cellules de la zone glomérulée perdent l'activation des voies Wnt/ $\beta$ -caténine et SHH et se différencient en cellules fasciculées. La régénération n'est alors plus possible et le cortex va finir par s'atrophier.

En ce qui concerne le gène *Rspo1*, nous avons démontré qu'il n'était pas nécessaire au développement et à l'homéostasie surrénalienne. Par contre son expression ectopique dans les cellules corticales montre l'importance de la régulation de ce gène puisqu'elle entraîne une hyperplasie surrénalienne et la formation de tumeurs.

Les gènes *R-spondin* exprimés dans la capsule surrénalienne ont donc un rôle majeur dans le développement, la zonation et le maintien de l'homéostasie de la glande surrénale. Ceci montre donc que contrairement à ce que l'on pensait la capsule n'a pas seulement un rôle structural. Elle agit comme un centre de signalisation via les gènes *R-spondin* et participe activement à la fonction de

l'organe.

Ceci n'est pas valable uniquement pour la glande surrénale puisqu'il a également été démontré que ce système était le même dans le foie (Rocha et al., 2015) et qu'on pourrait l'imaginer facilement ailleurs puisque les gènes de la famille *R-spondin* sont exprimés dans le mésothélium de nombreux organes.

# Bibliographie

Anderson, D.J., and Axel, R. (1986). A bipotential neuroendocrine precursor whose choice of cell fate is determined by NGF and glucocorticoids. *Cell* 47, 1079–1090.

Anderson, D.J., Carnahan, J.F., Michelsohn, A., and Patterson, P.H. (1991). Antibody markers identify a common progenitor to sympathetic neurons and chromaffin cells in vivo and reveal the timing of commitment to neuronal differentiation in the sympathoadrenal lineage. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 11, 3507–3519.

Aza-Blanc, P., Ramírez-Weber, F.A., Laget, M.P., Schwartz, C., and Kornberg, T.B. (1997). Proteolysis that is inhibited by hedgehog targets Cubitus interruptus protein to the nucleus and converts it to a repressor. *Cell* 89, 1043–1053.

Aza-Blanc, P., Lin, H.Y., Ruiz i Altaba, A., and Kornberg, T.B. (2000). Expression of the vertebrate Gli proteins in *Drosophila* reveals a distribution of activator and repressor activities. *Dev. Camb. Engl.* 127, 4293–4301.

Babu, P.S., Bavers, D.L., Beuschlein, F., Shah, S., Jeffs, B., Jameson, J.L., and Hammer, G.D. (2002). Interaction between Dax-1 and steroidogenic factor-1 in vivo: increased adrenal responsiveness to ACTH in the absence of Dax-1. *Endocrinology* 143, 665–673.

Bandiera, R., Vidal, V.P.I., Motamedi, F.J., Clarkson, M., Sahut-Barnola, I., von Gise, A., Pu, W.T., Hohenstein, P., Martinez, A., and Schedl, A. (2013). WT1 Maintains Adrenal-Gonadal Primordium Identity and Marks a Population of AGP-like Progenitors within the Adrenal Gland. *Dev. Cell* 27, 5–18.

Bandiera, R., Sacco, S., Vidal, V.P.I., Chaboissier, M.-C., and Schedl, A. (2015). Steroidogenic organ development and homeostasis: A WT1-centric view. *Mol. Cell. Endocrinol.* 408, 145–155.

Bergmann, C., Senderek, J., Anhof, D., Thiel, C.T., Ekici, A.B., Poblete-Gutierrez, P., van Steensel, M., Seelow, D., Nürnberg, G., Schild, H.H., et al. (2006). Mutations in the gene encoding the Wnt-signaling component R-spondin 4 (RSPO4) cause autosomal recessive anonychia. *Am. J. Hum. Genet.* 79, 1105–1109.

Berthon, A., Sahut-Barnola, I., Lambert-Langlais, S., de Joussineau, C., Damon-Soubeyrand, C., Louiset, E., Taketo, M.M., Tissier, F., Bertherat, J., Lefrancois-Martinez, A.M., et al. (2010). Constitutive -catenin activation induces adrenal hyperplasia and promotes adrenal cancer development. *Hum. Mol. Genet.* 19, 1561–1576.

Bland, M.L., Desclozeaux, M., and Ingraham, H.A. (2003). Tissue growth and remodeling of the embryonic and adult adrenal gland. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 995, 59–72.

Cadiou, E., Neff, M.W., Quignon, P., Walsh, K., Chase, K., Parker, H.G., Vonholdt, B.M., Rhue, A., Boyko, A., Byers, A., et al. (2009). Coat variation in the domestic dog is governed by variants in three genes. *Science* 326, 150–153.

Cambier, L., Plate, M., Sucov, H.M., and Pashmforoush, M. (2014). Nkx2-5 regulates cardiac growth through modulation of Wnt signaling by R-spondin3. *Dev. Camb. Engl.* 141, 2959–2971.

Chassot, A.-A., Ranc, F., Gregoire, E.P., Roepers-Gajadien, H.L., Taketo, M.M., Camerino, G., de Rooij, D.G., Schedl, A., and Chaboissier, M.-C. (2008). Activation of beta-catenin signaling by Rspo1 controls differentiation of the mammalian ovary. *Hum. Mol. Genet.* 17, 1264–1277.

- Chen, Y., and Jiang, J. (2013). Decoding the phosphorylation code in Hedgehog signal transduction. *Cell Res.* *23*, 186–200.
- Chiang C1, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corden JL, Westphal H, Beachy PA. (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature*.
- Chida, D., Nakagawa, S., Nagai, S., Sagara, H., Katsumata, H., Imaki, T., Suzuki, H., Mitani, F., Ogishima, T., Shimizu, C., et al. (2007). Melanocortin 2 receptor is required for adrenal gland development, steroidogenesis, and neonatal gluconeogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 18205–18210.
- Clipsham, R., and McCabe, E.R.B. (2003). DAX1 and its network partners: exploring complexity in development. *Mol. Genet. Metab.* *80*, 81–120.
- De Cian, M.-C., Pauper, E., Bandiera, R., Vidal, V.P.I., Sacco, S., Gregoire, E.P., Chassot, A.-A., Panzolini, C., Wilhelm, D., Pailhoux, E., et al. (2016). Amplification of R-spondin1 signaling induces granulosa cell fate defects and cancers in mouse adult ovary. *Oncogene*.
- Denef, N., Neubüser, D., Perez, L., and Cohen, S.M. (2000). Hedgehog induces opposite changes in turnover and subcellular localization of patched and smoothed. *Cell* *102*, 521–531.
- Drelon, C., Berthon, A., Mathieu, M., Martinez, A., and Val, P. (2015). Adrenal cortex tissue homeostasis and zonation: A WNT perspective. *Mol. Cell. Endocrinol.* *408*, 156–164.
- Espiard, S., and Bertherat, J. (2015). The genetics of adrenocortical tumors. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* *44*, 311–334.
- Freedman, B.D., Kempna, P.B., Carlone, D.L., Shah, M.S., Guagliardo, N.A., Barrett, P.Q., Gomez-Sanchez, C.E., Majzoub, J.A., and Breault, D.T. (2013). Adrenocortical zonation results from lineage conversion of differentiated zona glomerulosa cells. *Dev. Cell* *26*, 666–673.
- Hu, M.C., Chou, S.J., Huang, Y.Y., Hsu, N.C., Li, H., and Chung, B.C. (1999). Tissue-specific, hormonal, and developmental regulation of SCC-LacZ expression in transgenic mice leads to adrenocortical zone characterization. *Endocrinology* *140*, 5609–5618.
- Huang, C.-C.J., Miyagawa, S., Matsumaru, D., Parker, K.L., and Yao, H.H.-C. (2010). Progenitor cell expansion and organ size of mouse adrenal is regulated by sonic hedgehog. *Endocrinology* *151*, 1119–1128.
- Ingham, P.W., Taylor, A.M., and Nakano, Y. (1991). Role of the *Drosophila* patched gene in positional signalling. *Nature* *353*, 184–187.
- Jiang, J., and Hui, C.-C. (2008). Hedgehog signaling in development and cancer. *Dev. Cell* *15*, 801–812.
- Kazanskaya, O., Glinka, A., del Barco Barrantes, I., Stannek, P., Niehrs, C., and Wu, W. (2004). R-Spondin2 is a secreted activator of Wnt/beta-catenin signaling and is required for *Xenopus* myogenesis. *Dev. Cell* *7*, 525–534.
- Kazanskaya, O., Ohkawara, B., Heroult, M., Wu, W., Maltry, N., Augustin, H.G., and Niehrs, C. (2008). The Wnt signaling regulator R-spondin 3 promotes angioblast and vascular development. *Dev. Camb. Engl.* *135*, 3655–3664.

- Kim, A.C., Reuter, A.L., Zubair, M., Else, T., Serecky, K., Bingham, N.C., Lavery, G.G., Parker, K.L., and Hammer, G.D. (2008). Targeted disruption of beta-catenin in Sf1-expressing cells impairs development and maintenance of the adrenal cortex. *Dev. Camb. Engl.* *135*, 2593–2602.
- King, P., Paul, A., and Laufer, E. (2009). Shh signaling regulates adrenocortical development and identifies progenitors of steroidogenic lineages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 21185–21190.
- de Lau, W., Peng, W.C., Gros, P., and Clevers, H. (2014). The R-spondin/Lgr5/Rnf43 module: regulator of Wnt signal strength. *Genes Dev.* *28*, 305–316.
- de Lau, W.B.M., Snel, B., and Clevers, H.C. (2012). The R-spondin protein family. *Genome Biol.* *13*, 242.
- Lien, W.-H., and Fuchs, E. (2014). Wnt some lose some: transcriptional governance of stem cells by Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Genes Dev.* *28*, 1517–1532.
- Luo, X., Ikeda, Y., and Parker, K. (1994). *Cell* *77*, 481–490.
- Mizusaki, H., Kawabe, K., Mukai, T., Ariyoshi, E., Kasahara, M., Yoshioka, H., Swain, A., and Morohashi, K.-I. (2003). Dax-1 (dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome, gene 1) gene transcription is regulated by wnt4 in the female developing gonad. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *17*, 507–519.
- Nam, J.-S., Turcotte, T.J., and Yoon, J.K. (2007). Dynamic expression of R-spondin family genes in mouse development. *Gene Expr. Patterns GEP* *7*, 306–312.
- Novoselova, T.V., Jackson, D., Campbell, D.C., Clark, A.J.L., and Chan, L.F. (2013). Melanocortin receptor accessory proteins in adrenal gland physiology and beyond. *J. Endocrinol.* *217*, R1-11.
- Nüsslein-Volhard, C., and Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* *287*, 795–801.
- Ohkawara, B., Glinka, A., and Niehrs, C. (2011). Rspo3 binds syndecan 4 and induces Wnt/PCP signaling via clathrin-mediated endocytosis to promote morphogenesis. *Dev. Cell* *20*, 303–314.
- Park, H.L., Bai, C., Platt, K.A., Matisse, M.P., Beeghly, A., Hui, C.C., Nakashima, M., and Joyner, A.L. (2000). Mouse Gli1 mutants are viable but have defects in SHH signaling in combination with a Gli2 mutation. *Dev. Camb. Engl.* *127*, 1593–1605.
- Parma, P., Radi, O., Vidal, V., Chaboissier, M.C., Dellambra, E., Valentini, S., Guerra, L., Schedl, A., and Camerino, G. (2006). R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nat. Genet.* *38*, 1304–1309.
- Pihlajoki, M., Dörner, J., Cochran, R.S., Heikinheimo, M., and Wilson, D.B. (2015). Adrenocortical zonation, renewal, and remodeling. *Cell. Endocrinol.* *6*, 27.
- Pitetti, J.-L., Calvel, P., Romero, Y., Conne, B., Truong, V., Papaioannou, M.D., Schaad, O., Docquier, M., Herrera, P.L., Wilhelm, D., et al. (2013). Insulin and IGF1 receptors are essential for XX and XY gonadal differentiation and adrenal development in mice. *PLoS Genet.* *9*, e1003160.
- Rocha, A.S., Vidal, V., Mertz, M., Kendall, T.J., Charlet, A., Okamoto, H., and Schedl, A. (2015). The Angiocrine Factor R-spondin3 Is a Key Determinant of Liver Zonation. *Cell Rep.* *13*, 1757–1764.

Roessler, E., Belloni, E., Gaudenz, K., Jay, P., Berta, P., Scherer, S.W., Tsui, L.C., and Muenke, M. (1996). Mutations in the human Sonic Hedgehog gene cause holoprosencephaly. *Nat. Genet.* *14*, 357–360.

Sadovsky, Y., Crawford, P.A., Woodson, K.G., Polish, J.A., Clements, M.A., Tourtellotte, L.M., Simburger, K., and Milbrandt, J. (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*, 10939–10943.

Sahut-Barnola, I., de Joussineau, C., Val, P., Lambert-Langlais, S., Damon, C., Lefrançois-Martinez, A.-M., Pointud, J.-C., Marceau, G., Sapin, V., Tissier, F., et al. (2010). Cushing's syndrome and fetal features resurgence in adrenal cortex-specific Prkar1a knockout mice. *PLoS Genet.* *6*, e1000980.

Scholz, B., Korn, C., Wojtarowicz, J., Mogler, C., Augustin, I., Boutros, M., Niehrs, C., and Augustin, H.G. (2016). Endothelial RSP03 Controls Vascular Stability and Pruning through Non-canonical WNT/Ca(2+)/NFAT Signaling. *Dev. Cell* *36*, 79–93.

Stone, D.M., Hynes, M., Armanini, M., Swanson, T.A., Gu, Q., Johnson, R.L., Scott, M.P., Pennica, D., Goddard, A., Phillips, H., et al. (1996). The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. *Nature* *384*, 129–134.

Sundararajan, S., Wakamiya, M., Behringer, R.R., and Rivera-Pérez, J.A. (2012). A fast and sensitive alternative for  $\beta$ -galactosidase detection in mouse embryos. *Dev. Camb. Engl.* *139*, 4484–4490.

Svärd, J., Heby-Henricson, K., Henricson, K.H., Persson-Lek, M., Rozell, B., Lauth, M., Bergström, A., Ericson, J., Toftgård, R., and Teglund, S. (2006). Genetic elimination of Suppressor of fused reveals an essential repressor function in the mammalian Hedgehog signaling pathway. *Dev. Cell* *10*, 187–197.

Tevosian, S.G., Jiménez, E., Hatch, H.M., Jiang, T., Morse, D.A., Fox, S.C., and Padua, M.B. (2015). Adrenal Development in Mice Requires GATA4 and GATA6 Transcription Factors. *Endocrinology* *156*, 2503–2517.

Val, P., Martinez-Barbera, J.-P., and Swain, A. (2007). Adrenal development is initiated by Cited2 and Wt1 through modulation of Sf-1 dosage. *Dev. Camb. Engl.* *134*, 2349–2358.

Walczak, E.M., Kuick, R., Finco, I., Bohin, N., Hrycaj, S.M., Wellik, D.M., and Hammer, G.D. (2014). Wnt signaling inhibits adrenal steroidogenesis by cell-autonomous and non-cell-autonomous mechanisms. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *28*, 1471–1486.

Wood, M.A., Acharya, A., Finco, I., Swonger, J.M., Elston, M.J., Tallquist, M.D., and Hammer, G.D. (2013). Fetal adrenal capsular cells serve as progenitor cells for steroidogenic and stromal adrenocortical cell lineages in *M. musculus*. *Dev. Camb. Engl.* *140*, 4522–4532.

Zanaria, E., Muscatelli, F., Bardoni, B., Strom, T.M., Guioli, S., Guo, W., Lalli, E., Moser, C., Walker, A.P., and McCabe, E.R. (1994). An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. *Nature* *372*, 635–641.

# Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier Andreas Schedl pour m'avoir laissé la chance de réaliser ma thèse au sein de son équipe. Merci pour toutes les discussions, pour ta patience et pour cette environnement chaleureux et stimulant que tu as su créer au sein de ton équipe.

Je tiens également à remercier tous les membres du jury, le président Thomas Lamonerie ainsi que mes rapporteurs Bruno Ragazzon, Fabien Le Grand et Serge Nef pour avoir accepté de lire ma thèse et d'être présents aujourd'hui pour la juger.

Des remerciements spéciaux vont à Valérie Vidal et Roberto Bandiera pour m'avoir tout appris, supporté toutes mes questions et sans qui cette thèse n'aurait pas pu être réalisé. Merci à vous 2.

Un grand merci, également à tous les membres de mon équipe et de Marie-Christine Chaboissier (ancien et présent). Vous avez ma été seconde famille et vous me manquez tous beaucoup : Fariba, Yasmine, Filippo, Aurélie, Valerie, Jonathan, Amandine, Elodie, Ana, Eva et tous les autres.

Un grand merci également à Antoine Martinez pour son soutien et son expertise scientifique qui m'ont énormément aidé tout au long de ma thèse.

Et pour finir, je remercie ma petite famille, mon mari Guillaume et mes 2 enfants qui sont ma force et mon soutien dans la vie. Je vous aime.

Pour conclure, je dirais que cette thèse a été plus qu'un simple travail de recherche mais une expérience de vie où j'ai rencontré des gens formidables que je n'oublierai jamais. En plus de ça, pendant ces quatre années, je me suis mariée et ait eu un 2ème enfant et je suis ravie d'avoir partagé tout ça avec vous tous.