HAL
open science

Mécanismes moléculaires régulés par la méthyltransférase EZH2 dans les corticosurrénalomes

Houda Tabbal

To cite this version:

Houda Tabbal. Mécanismes moléculaires régulés par la méthyltransférase EZH2 dans les corticosurrénalomes. Physiologie [q-bio.TO]. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2018. Français. NNT : 2018CLFAC081 . tel-02170160

HAL Id: tel-02170160

https://theses.hal.science/tel-02170160

Submitted on 1 Jul 2019

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 CLERMONT AUVERGNE

ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE, SANTE, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT

Thèse présentée à l'Université Clermont Auvergne
Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

(Spécialité : Génétique, Physiologie, Pathologie, Nutrition, Microbiologie, Santé, Innovation)

Présentée et soutenue publiquement par

Houda TABBAL

Le 15 Novembre 2018

Mécanismes moléculaires régulés par la méthyltransférase EZH2 dans les corticosurrénalomes

Examinatrice :	Dr DOGHMAN Mabrouka	IPCM, Nice
Rapporteurs :	Pr LEFEBVRE HERVE	CHU, Rouen
	Dr FAVIER Judith	HEGP, Paris
Directeur de thèse :	Dr VAL Pierre, Laboratoire	GReD, Clermont-Ferrand

Laboratoire GReD – UMR-CNRS 6293 INSERM U1103 – Université Clermont-Auvergne

Equipe « Pathophysiologie moléculaire des tissus surrénaux et endocriniens »

To my protective angels My Mother & My Father,

This thesis is dedicated to your souls

I hold you tightly within my heart &I love you endlessly...

Maybe Heaven needed you more than I do...

Remerciements

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance au **Professeur Hervé Lefèbvre** et au **Docteur Judith Favier** pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail et je remercie très sincèrement **le Docteur Mabrouka Doghman** d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du laboratoire Génétique Reproduction et Développement (GReD) de Clermont-Ferrand, unité mixte de recherche CNRS 6293, INSERM U1103 et Clermont Université, au sein de l'équipe « Pathophysiologie moléculaire des tissus surrénaux et endocriniens », sous la direction du Dr Pierre Val.
Les trois premières années de ce doctorat ont été financées par l'association libanaise Azm et Saadé – Liban. L'obtention d'une aide individuelle de la Ligue Nationale contre le Cancer a permis d'effectuer une quatrième année.

Une partie de ces travaux a fait l'objet d'un article en cours de publication

Tabbal H , Septier A, Mathieu M, Drelon C, Rodriguez S, Dumontet T, Batisse-Lignier M, Tauveron I, Pointud JC, Sahut-Barnola I, Ragazzon B, Assié G, Bertherat J, Lefrançois-Martinez AM, Martinez A, Val P

EZH2 stimulates expression of genes involved in adrenocortical carcinoma progression (Article 1)

Les articles suivants sont présentés en annexe

Drelon C, Berthon A, Sahut-Barnola I, Mathieu M, Dumontet T, Rodriguez S, Batisse-Ligner M, **Tabbal H**, Tauveron I, Lefrançois-Martinez A-M, Martinez A & Val P. (2016a)

PKA inhibits WNT signalling in adrenal cortex zonation and prevents malignant tumour developpement.

Nat. Commun. 7, 12751. (Article 2)

Drelon C, Mathieu M, Berthon A, Ragazzon B, Kuick R, **Tabbal H**, Septier A, Rodriguez S, Batisse-Ligner M, Sahut-Barnola I, Dumontet T, Pointud J-C, Lefrançois-Martinez A-M,
Baron S, Giordano J. T, Bertherat J, Martinez A & Val P.

EZH2 is overexpressed in adrenocortical carcinoma and is associated with disease progression.

Hum. Mol. Genet. 25, 2789-2800. (Article 3)

Mathieu M, Drelon C, Rodriguez S, **Tabbal H**, Septier A, Dumontet T, Berthon A, Sahut- Barnola I, Damon-Soubeyrand C, Batisse-Ligner M, Pointud J-C, Kerdivel G, Calméjane MA, Boeva V, Tauveron I, Lefrançois-Martinez A-M, Martinez A & Val P.
Steroidogenic differentiation and PKA signaling are programmed by histone methyltransferase EZH2 in the adrenal cortex (Article 4).

En révision à PNAS (Proceedings of the National Academy of Sciences)

Une partie de ces travaux a été présentée aux congrès suivants :

Communications orales à des congrès avec comité de lecture

35ème Congrès de la Société Française d'Endocrinologie, Nancy, France, Septembre 2018. Mécanismes moléculaires régulés par la méthyltransférase EZH2 dans le corticosurrénalome.

16th ENS@T meeting, Paris, France, Novembre 2017. Mode of action and targets of the methyltransferase EZH2 in drenocortical carcinomas.

20ème Journées de l'Ecole Doctorale SVSAE, Clermont-Ferrand, France, Mai 2017.
Mécanismes moléculaires régulés par la méthyltransférase EZH2 dans le corticosurrénalome. *Prix CLARA de la meilleure communication ora*le

Comete Network, Paris, France, Novembre 2016. Contrôle de l'expression du facteur proapoptotique Nov/CCN3 dans le corticosurrénalome.

Communications affichées

Adrenal Cortex Conference, Munich, Allemagne, Juin 2018. Mode of action and targets of the methyltransferase EZH2 in adrenocortical carcinomas.

Cancéropôle Lyon-Auvergne-Rhône-Alpes CLARA, Lyon, France, Avril 2017. Nov/CCN3 is a negative target of EZH2 in adrenocortical carcinoma.

33ème Congrès de la Société Française d'Endocrinologie, Bordeaux, France, Octobre 2016. Mécanismes moléculaires régulés par la méthyltransférase EZH2 dans le corticosurrénalome.

Résumé

Les cortico-surrénalomes (CCS) sont considérés comme des tumeurs malignes endocriniennes rares, associées à un pronostic sombre. Les trois mécanismes moléculaires les plus fréquemment altérés dans les CCS comprennent les mutations inactivatrices du gène suppresseur de tumeur TP53, la surexpression de IGF-II et l'activation constitutive de la voie de signalisation Wnt/ß-caténine. En utilisant des modèles de souris transgéniques, nous avons montré que ces altérations, même combinées, ne sont pas suffisantes pour permettre la progression maligne.

Nous avons précédemment identifié l'histone méthyltransférase EZH2 comme le modificateur d'histone le plus dérégulé dans les CCS. Nous avons également montré que sa surexpression est associée à une progression tumorale et à un mauvais pronostic. Cependant, les mécanismes sous-jacents de cette agressivité sont largement inconnus. Dans cette étude, nous avons cherché à identifier les gènes cibles de EZH2 dans les CCS, qui sont soient activés, soient réprimés.

Ainsi, nous avons effectué une analyse bio-informatique des données du transcriptome de trois cohortes de patients porteurs de CCS. L'analyse montre une forte corrélation entre la surexpression de EZH2 et les gènes régulés positivement, suggérant un rôle majeur d'inducteur transcriptionnel de EZH2 dans les CCS. Nous avons montré que cette activité positive repose sur une interaction entre EZH2 et E2F1, qui entraîne la surexpression de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et la mitose tels que RRM2, PTTG1 et PRC1/ASE1. Nous avons montré que l'inhibition de RRM2 par ARN interférent ou traitement pharmacologique avec le GW8510 inhibe la croissance cellulaire, la capacité à combler les blessures, la croissance clonogénique, la migration et induit l'apoptose des cellules H295R en culture.

En revanche, l'expression du facteur pro-apoptotique NOV/CCN3 est diminuée dans les CCS, ce qui est corrélé au développement de tumeurs agressives. Nos analyses moléculaires montrent que l'inhibition de EZH2 augmente l'expression de NOV/CCN3, suggérant que la surexpression de EZH2 pourrait favoriser la progression maligne des CCS en inhibant les stimulateurs de l'apoptose. Le facteur NOV a déjà été identifié comme cible négative du

récepteur nucléaire SF1 dans les cellules du CCS, bien que les mécanismes moléculaires à l'origine de cette inhibition n'aient pas été identifiés. De manière intéressante, dans le cancer de la prostate, l'expression de NOV est inhibée par le récepteur des androgènes AR, grâce au recrutement de EZH2 qui pose la marque répressive H3K27me3. Nous avons pu identifier une coopération similaire entre SF1 et EZH2 pour réprimer l'expression de NOV et bloquer ainsi l'apoptose dans les CCS.

Au total, ces résultats identifient SF1 et E2F1 comme deux partenaires indépendants de EZH2, induisant la répression de facteurs pro-apoptotiques et l'activation des gènes du cycle cellulaire respectivement, conduisant ainsi à l'agressivité des CCS.

Mots clés : Corticosurrénalome, EZH2, E2F1, dérégulation du cycle cellulaire, SF1, complexe PRC2, apoptose.

Abstract

Adrenocortical carcinomas (ACC) are regarded as rare endocrine malignancies associated with dismal prognosis. The three common molecular mechanisms predominantly altered in ACC include inactivating mutations of the TP53 tumor suppressor gene, overexpression of IGF-II and constitutive activation of the Wnt/ß-catenin signaling pathway. Using transgenic mouse models, we have shown that these alterations, even when combined together, were not sufficient to induce malignant progression.

We previously identified the histone methyltransferase EZH2 as the most deregulated histone modifier in ACC. We have also shown that its overexpression is associated with tumor progression and poor prognosis. Yet, the mechanisms underlying this aggressiveness are largely unknown. Here, we aimed to identify EZH2 target genes in ACC, which are either activated or repressed.

Thus, we conducted a bio-informatics analysis of transcriptome data from three cohorts of ACC patients. The analysis showed a strong correlation between highly expressed EZH2 and positively regulated genes suggesting a major role of 'transcriptional inducer' for EZH2 in ACC. We have shown that this positive activity relies on an interaction between EZH2 and E2F1 that results in the upregulation of genes implicated in cell cycle regulation and mitosis such as RRM2, PTTG1 and PRC1/ASE1. We showed that Inhibition of RRM2 by RNA interference or pharmacological treatment with GW8510 inhibits cellular growth, wound healing, clonogenic growth, migration and induces apoptosis of H295R cells in culture.

In contrast, expression of the pro-apoptotic factor NOV/CCN3 is decreased in ACC, which is correlated with development of aggressive tumours. Our molecular analyses show that EZH2 inhibition increases expression of NOV/CCN3, suggesting that EZH2 overexpression may also favour malignant progression in ACC by inhibition of apoptosis stimulators. NOV has previously been identified as a negative target of the nuclear receptor SF1 in ACC cells, although the molecular mechanisms underlying this inhibition were unidentified. Interestingly, in prostate cancer, NOV expression is inhibited by the androgen receptor, through recruitment of EZH2 and deposition of the H3K27me3 mark.

We have been able to identify a similar cooperation between SF1 and EZH2 to suppress NOV expression and block apoptosis in ACC.

Altogether, these findings identifiy SF1 and E2F1 as two independent partners of EZH2, inducing repression of proapoptotic factors, and activation of cell cycle genes respectively, thus leading to aggressiveness of ACC.

Key words: Adrenocortical carcinoma, EZH2, E2F1, cell cycle dysregulation, SF1, PRC2 complex, apoptosis.

Abréviations

<R>	: Statut de résection
20αHSD	: 20α hydroxy stéroïde déshydrogénase
3βHSD	: 3β-HydroxySteroid Deshydrogenase
A677G	: Glycine
ACBD3	: Acyl-Coenzyme A Binding Domain containing 3
ACE	: Angiotensin Converting Enzyme
ACS	: Adénomes cortico-surrénaliens
ACTH	: AdrenoCorticoTropic Hormone
Ad4BP	: Adrenal Binding Protein
AdKO	: Adrenal cortex specific Knock Out
AdTag	: Souris exprimant l'antigène T du virus simien 40 sous le contrôle du promoteur Akr1b7
AEBP2	: Adipocyte Enhancer Binding Protein 2
AKAP	: A-kinase anchor protein
AKAP13	: AKAP-Lbc
Akr1b7	: Aldo Keto Reductase ; MVDP mouse vas deferens protein
AMPc	: Adénosine MonoPhosphate cyclique
AP-1	: Activator Protein 1
APA	: Adénomes producteurs d'aldostérone
APC	: Adenomatous Polyposis Coli
ARMC5	: Armadillo repeat containing 5
ARNnc	: ARN non codant
AT1R	: AngioTensin Receptor 1
ATP	: Adénosine TriPhosphate
ATP1A1	: ATPase Na+/K+ Transporting Subunit Alpha 1
ATP3B3	: ATPase Plasma Membrane Ca2+ Transporting 3
ATPase Ca2+	: Pompe calcique
AVP	: Arginine VasoPressin
BAP1	: BRCA1 Associated Protein 1
BCL2	: B-Cell Lymphoma 2
BCL-xL	: B-Cell Lymphoma 2 extra large
Birc5	: Baculoviral IAP repeat-containing protein 5/ Survivin
BUB1	: budding uninhibited by benzimidazoles 1

BUB1B	: Budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolg beta
C/EBPs	: CCAAT/Enhancer-Binding Proteins
C10orf12	: Gm340 chez la souris
CAMK	: Calmodulines Ca2+/CalModulin-dependent protein Kinase
CBP	: CRE Binding Protein
CCN family	: Cysteine-rich protein 61 (Cyr61; also known as CCN1), Connective tissue growth factor (CTGF; also known as CCN2) and Nephroblastoma overexpressed protein (Nov; also known as CCN3)
CCS	: Corticosurrénalomes
CDK1 et 2	: cyclin dependant Kinase 1 and 2
CDKN1	: Cyclin-Dependant Kinase Inhibitor 1
CDKN2A	: cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A
CIITA	: Class II Major Histocompatibility Complex Transactivator
CIMP	: CpG island methylator phenotype
CMH II	: Complexe majeur d'histocompatibilité II
CNC	: Complexe de Carney
CNV	: Copy number variation
CoC	: Clusters of clusters
CRE	: cAMP Respond Element
CREB	: cAMP Respond Element Binding Protein
CREM	: CRE Modulator
CRH	: Corticotrophine Releasing Hormone
CSE	: Cellules souches embryonnaires
CSI	: Cellules souches intestinalis
CSM	: Cellules souches mésenchymateuses
Ctgf	: Connective Tissue Growth Factor
CTNNB1	: Gène de la ß-caténine
CYB5	: cytochrome b5
CYP11A1	: Cytochrome P450 Cholesterol Side Chain Clivage ou P450SCC
CYP11B1	: Cytochrome P450 11ß hydroxylase ou P450c11ß
CYP11B2	: Cytochrome P450 aldostérone synthase ou P450c11AS
CYP17	: Cytochrome P450 17 hydroxylase ou P450c17
CYP21	: Cytochrome P450 21-hydroxylase ou P450c21
Cytb5	: Cytochrome b5
Cα, Cß, Cγ et Prkx	: sous-unités catalytiques

DAG	: Diacylglycerol
DHEA	: DeHydroEpiAndrosterone
DHEAS	: Déhydroépiandrostérone sulfaté
DHT	: DiHydroTestosterone
DLC1	: Deleted in Liver Cancer 1
DLG7	: Discs Large homolog 7
DNMT	: DNA methyltransferases
dNTP	: Déoxyribonucléotides
DOT1L	: Disruptor of telomeric silencing 1-like, histoneH3K79 methyltransferase
dRing	: Sex combs extra (Sce)
DZNep	: Inhibiteur de donneurs de méthyl SAM
EBD	: EED Binding Domain
EED	: Embryonic Ectoderm Development
EloA	: Elongine A
ENS@T	: European Netwok for the Study of Adrenal Tmours
EPOP	: Elongin BC and Polycomb Repressive Complex 2 Associated Potein ; C17orf96, esPRC2p48 ou E130012A19Rik
EPZ	:Epizyme
EZH2	: Enhancer of Zeste Homolog 2
FGD	: Familial glucocorticoid deficiency
GATA	: Gata4 et Gata6
GIP	: Gastric inhibitory polypeptide
GSK	: GalxoSmithKline
GTP	: Guanosine TriPhopshate
H3K27me3	: tri-méthylation de la lysine 27 de l'histone H3
H3K4	: la lysine 4 de l'histone H3
HCS	: Hyperplasie congénitale des surrénales
HDAC	: Histones déacétylases
HDAC9	: Histone Deacetylase 9
HDL	: High density Lipoprotein
HE	: Hématoxyline-éosine
HKMT	: Histones lysines méthyltransférases
HMG-CoA	: Hydroxyméthylglutaryl-CoA
HMT	: Histones méthyltransférase

Hox : Homeobox
HPA : Axe hypothalamo-hypophysaire
HSD : Hydroxystéroïdes Déshydrogénases
HSD3B2 : Hydroxy-Delta-5-Steroid Dehydrogenase 3 Beta- And Steroid Delta-Isomerase 2
IGF1 : Insulin-like Growth Factor 1
IGF2 : Insulin-like Growth Factor 2
IGFBP : Insulin-like Growth Factor Binding Protein
IGF-IIR : Insulin-like Growth Factor II Receptor
IGF-IR : Insulin-like Growth Factor I Receptor
IncRNA : Longs ARN non codants
IP3 : Inositol Triphosphate
IRS : Insulin Receptor Substrat
JARID2 : Jumonji- and AT-rich interaction domain (ARID)-domain-containing
KCNJ5 : Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily J Member 5
KCNQ1 : potassium voltage-gated channel subfamily Q member 1
ki67 : Index de proliferation
Kir3.4 : Potassium channel, inwardly rectifying
LAL : Lipase Acide Lysosomiale
LDL : Low density lipoprotein
LDLR : Low-Density Lipoprotein Receptor
LFS : Syndrome de Li-Fraumeni
lincRNA : large intergenic noncoding RNA
LIT1 : ou KCNQ 1OT1, KCNQ1 opposite strand/antisense transcript 1
LOH : Loss of heterozygosity
MAM : Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
MC2R : MelanoCortin 2 Receptor
MDM2 : Murine Double Minute 2 oncogene
MEF : Mouse Embryonic Fibroblast
miRNA : mirco-ARN
MMP : Matrix metalloproteinases
MRAP : Melanocortin 2 Receptor Accessory Protein
MSMB : MicroSeMinoprotein Beta
mTOR : Mammalian target of rapamycin

mTORC1	: mammalian Target Of Rapamycin Complex 1
Nem1	: Néoplasie endocrinien de type 1
NOV	: Nephroblastoma Overexpressed
NPC1	: Niemann-Pick disease, type C1
NPC2	: Niemann-Pick disease, type C2
NR4A1	: Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A Member 1
NR4A2	: Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A Member 2
NR5A1f	: Nuclear Receptor subfamily 5, groupe A, member 1
NRSE	: Neuron-Restrictive Silencer Element
NRSF/REST	: Neuron-Restrictive Silencer Factor/ RE1-Silencing Transcription Factor
NTP	: Ribonucléotides
NURR	: Nuclear Receptor Related
p16INK4A	: CDNK2a, inhibiteur de CDK
P450	: Enzymes cytochromes ou CYP
P450c17	: Cytochrome P450 17 hydroxylase ou CYP17
P450c21	: Cytochrome P450 21- hydroxylase ou CYP21
P450scc	: Enzymes de clivage du cholestérol
PAG	: Primordium Adréno Gonadique
PBMAH	: Primary Bilateral Macronodular Adrenal Hyperplasia
PBR	: Peripheral Benzodiazepine Receptor
Pc	: Chromodomaine de Polycomb
PcG	: Groupe Polycomb
Pcl	: Polycomb like
PCL1	: PHD Finger protein 1 ou Phf1
PCL2	: Metal response element binding transcription factor 2 ou Mtf2
PCL3	: PHD finger protein 19 ou Phf19
PDE	: Phosphodiestérases
PDE8B et PDE11A	: Phosphodiestérases
PDX1	: Pancreatic and Duodenal Homeobox 1
PGF2α	: Prostaglandine F2 α
PH	: Polyhomeotic
PHO	: Pleiohomeotic
PHOL	: Pleiohomeotic-Like
PI3K	: Phosphatidyl Inositol 3-Kinase

PINK1	: PTEN Induced Putative kinase 1
PIP2	: Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
PKA	: Protein Kinase A
PKA-I	: sous-unité de RIα ou RIβ
PKA-II	: sous-unité RIIα ou RIIβ
PLC	: Phospholipase C
PNMT	: Phenylethanolamine N-methyltransferase
POMC	: Pro-OpioMélanoCortine
PPNAD	: Primary Pigmented Nodular Adrenal disease
PRC1, PRC2, PhoRC	: Pho-repressive Complex
PRC1/ASE1:	: Protein Regulator of Cytokenesis 1/ Anaphase Spindle Elongation protein 1
PRC2	: Polycomb Repressive Complex 2
PR-DUB	: Polycomb Repressive DeUBiquitinase
PRE	: Polycomb Responsive Elements
PRKACA	: Protein Kinase CAMP-Dependent Catalytic Alpha
PRKAR1A	: Protein Kinase CAMP-Dependent Type I Regulatory Subunit Alpha
PRMT	: Protein Arginine MethylTransferase
pS21-EZH2	: EZH2 phosphorylé sur sa sérine 21
Psc	: Posterior sex combs
PSP94	: Prostatic secretory protein 94
PTTG1	:Pituitary Tumor Transforming 1
PUMA	: P53 upregulated modulator of apoptosis
RAF1	: Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase
RAPTOR	: Regulatory Associated Protein of mTOR
RBAP48	: RBBP4, Retinoblastoma binding protein 48
Rbp2	: Retinol Binding Protein 2
RhoGAP	: Rho GTPase-activating protein
RIα, RIβ, RIIα et RIIβ	: Sous-unités régulatrices
RORα	: Retinoic acid-related Orphan nuclear Receptor α
RR	: Ribonucléotide Réductase
RRM1 et RRM2	: Ribonucleotide Reductase regulatory subunit M1 and M2
RSPO1-3	: R-SPONDINS
S21	: Sérine 21
SAH	: S-adénosyl-L-homocystéine

SAM	: S-adénosylméthionine
Scm	: Sex combs on midleg
SCP2	: Sterol Carrier Protein 2
SF-1	: Steroidogenic factor 1
SFRP2	: Secreted Frizzled Related Protein
shARN	: Short hairpin RNA
SNAREf	: Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor
SOAT1 et ACAT1	: Enzyme Sterol-O-Acyl Transferase 1
SRA	: système rénine-angiotensine
SR-B1	: Scavenger Receptor class B type I
sRNA	: Petits ARN non codants
SRSF2	: Serine/Arginine-Rich Splicing Factor 2
StAR	: Steroidogenic Acute Regulatory protein
StarD	: StAR related lipid transfer Domain containing
STAT3	: Signal transducer and activator of transcription 3
SULT2A1	: Sulfotransferase family cytosolic 2A DHEA-preferring member 1
SUZ12	: Uppressor of Zeste 12
TASK	: TWIK-related Acid Sensitive K+
TERT	: telomerase reverse transcriptase
Tgfbi	: Transforming Growth Factor Beta Induced
TH	: Tyrosine Hydroxylase
Thr350	: Thréonine 350
TIMP	: Tissue Inhibitors of metalloproteinases
TrxG	: Groupe trithorax
TSPO	: Translocator Protein
TSPO	: Translocator Protein
Ub	: Ubiquitine
VASH1	: Vasohibin 1
VAV1	: Vav Guanine Nucleotide Exchange Factor 1
VDAC	: Voltage-dependent anion channel
WDB	: WD40 binding domain
WT1	: Wilms Tumour 1
Y641	: Résidu tyrosine
YY1	: Ying Yang 1

ZF	: Zone Fasciculée
ZG	: Zone Glomérulée
ZNRF3	: Zing and Ring Finger 3
ZR	: Zone Reticulée

Introduction bibliographique

Table des matières

I.Les glandes surrénales 1

A. Anatomie de la glande surrénale 1

1. La capsule surrénalienne 1
2. Le cortex surrénalien 2
3. La médullosurrénale 4
4. Interactions fonctionnelles entre le cortex et la médulla 4

B. Origine embryonnaire de la surrénale et rôle du récepteur nucléaire SF1 6

C. Stéroïdogenèse surrénalienne 7

1. Le cholestérol : précurseur de tous les stéroïdes 8
2. Import du cholestérol 8
3. Synthèse de novo du cholesterol 10
   a. Transport intracellulaire du cholestérol 10
   b. Transport mitochondrial du cholestérol 12
4. Synthèse des stéroïdes 13
5. Régulation de la stéroïdogénèse 14
   a. Régulation de la production d'aldostérone 15
   b. Régulation de la synthèse des glucocorticoïdes 16
   c. Régulation de la synthèse d'androgènes 19
      - Conclusion 20

II.Les tumeurs du cortex surrénalien 19

A. Les tumeurs bénignes 21

1. Les adénomes cortico-surrénaliens 21
   a. Les adénomes producteurs de cortisol 21
   b. Les adénomes producteurs d'aldostérone 23
2. Les hyperplasies cortico-surrénaliennes 25
   a. Les hyperplasies micronodulaires pigmentées 25

b. Les hyperplasies macronodulaires bilatérales 25

B. Les corticosurrénalomes 27

1. Epidémiologie 28
2. Diagnostic 28
3. Traitements 29
4. Physipathologie des voies de signalisation les plus altérées dans les CCS 32
   a. P53 32
      i. Régulation de P53 32
      ii. P53 dans les CCS 33
   b. Voie Wnt-βcaténine 34
      i. Régulation de la voie Wnt-βcaténine 34
      ii. Intervention de la voie Wnt β-caténine dans les CCS 35
   c. IGF2 37
      i. Signalisation IGF2 38
      ii. IGF2 et CCS 39
   d. Autres altérations génétiques 40
5. Anomalies moléculaires au niveau des CCS 41
   a. Altérations chromosomiques 41
   b. Transcriptome 42
      - miRNA 43
   c. Méthylome 44

C. Corticosurrénalomes de l'enfant 46

a. TP53 et CCS infantiles 46
b. Wnt/β-caténine et CCS infantiles 47
c. IGF2 et CCS infantiles 47
d. Altérations chromosomiques et rôle de l'amplification du locus codant SF1 47
e. Transcriptome 49
   - miRNA 50
   - Conclusion 50

III.EZH2 : Une protéine aux activités multiples 52

A. Notion d'épigénétique 52

B. Les modifications post-traductionnelles des histones 53

- La méthylation des histones 54

C. EZH2 et complexe PRC2 55

1. Complexe PRC2 et ses composants 56
2. Recrutement du complexe PRC2 58
   a. Rôle des PCLs 58
   b. Rôle de JARID2 59
   c. Rôle de YY1 60
   d. Les longs ARN non codants 61
   e. Rôle des sous-unités accessoires EPOP et C10orf12 63
3. Fonctions du complexe PRC2 64
   a. Activité histone méthyltransférase 64
   b. Recrutement d'enzymes de remodelage de la chromatine 66
   c. Méthylation directe de protéines 67
4. Complexe PRC1 68

D. Rôle de EZH2 dans la physiopathologie 69

1. Implications physiologiques dans le développement 69
   a. Rôle de EZH2 dans le développement et la régénération tissulaire 69
   b. Rôle de EZH2 dans les cellules souches 71
   c. Rôle de EZH2 dans la différenciation zonale 72
2. Implications pathologiques de EZH2 dans la tumorigenèse 73
   a. Surexpression de EZH2 dans les cancers et pronostic 74
   b. Rôle répresseur de EZH2 au travers du complexe PRC2 74
   c. EZH2 comme activateur transcriptionnel 77
      i. Rôle activateur dans le cancer de la prostate résistant à la castration 77
      ii. Rôle activateur dans le cancer du sein 78
      iii. Interactions avec la signalisation JAK/STAT 79

iv. Fonctions cytoplasmiques de EZH2 80

3. Mutations de EZH2 et développement tumoral 81

4. EZH2, promoteur ou inhibiteur de la progression tumorale ? 83

5. Cibler EZH2/PRC2 dans les cancers 86

a. Inhibition de EZH2 86

b. Inhibition du complexe PRC2 87

IV. Présentation du projet de recherche 89

Résultats 91

Résultats complémentaires 92

Discussion et perspectives 106

I. EZH2 agit majoritairement comme activateur transcriptionnel dans le CCS 109

II. NOV/CCN3, une cible négative de EZH2 dans le CCS 119

III. Rôle potentiel de NRSF/REST dans l'interaction EZH2/SF1 121

IV. Conclusion 125

V. Le dilemme toujours présent : EZH2 activateur ou inhibiteur de la progression des CCS 126

Annexes 130

Références bibliographiques 131

Introduction bibliographique

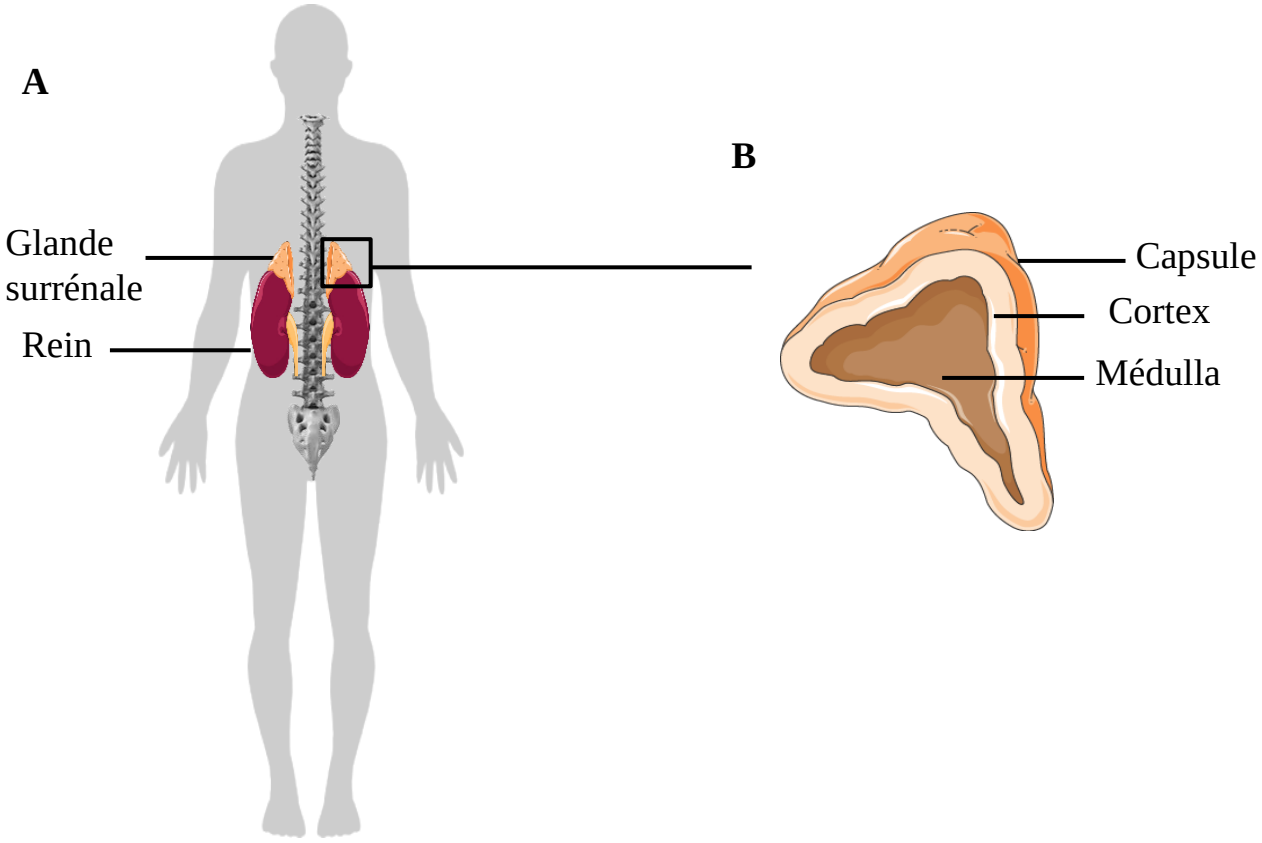


Figure 1: Localisation anatomique et structure des surrénales.
A. Schéma montrant Les glandes surrénales situées sur le pôle supérieur de chacun des reins, de part et d'autre de la colonne vertébrale.
B. Schéma d'une coupe transversale d'une surrénale humaine. Elle est constituée de deux parties aux origines embryologiques et aux fonctions différentes, la médulla au centre et le cortex en périphérie, le tout enveloppé par la capsule.

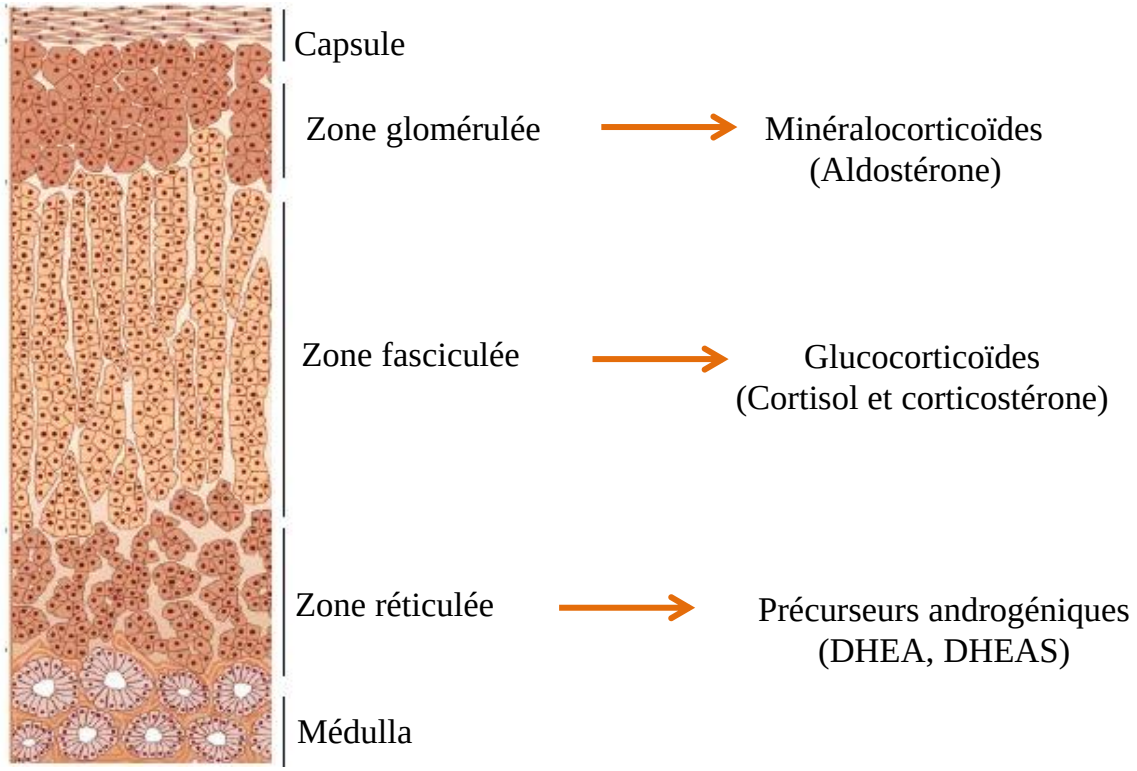


Figure 2: Organisation zonée du cortex surrénalien.
A. Représentation schématique des trois zones.
B. Située juste sous la capsule, la **zone glomérulée** produit les minéralocorticoïdes notamment l'aldostérone. La **zone fasciculée** quant à elle, produit les glucocorticoïdes (cortisol chez l'Homme et corticostérone chez les rongeurs). La **zone réticulée** produit des précurseurs d'androgènes, DHEA et son dérivé sulfaté DHEAS principalement.

I. Les glandes surrénales

A. Anatomie de la glande surrénale

Les glandes surrénales sont des glandes endocrines situées sur le pôle supérieur de chacun des reins, de part et d'autre de la colonne vertébrale. De forme pyramidale aplatie chez l'homme, elles ne sont pas parfaitement symétriques (Figure 1A).

Elles sont enrobées par la capsule, fine couche de tissu conjonctif enveloppant le parenchyme glandulaire. Le parenchyme glandulaire est, à son tour, constitué de deux tissus aux origines embryonnaires et aux fonctions physiologiques distinctes : La corticosurrénale (ou cortex surrénalien) située en périphérie, et englobant la médullosurrénale (ou médulla) située au centre de la glande (Figure 1B).

1. La capsule surrénalienne

La capsule conjonctive de la glande surrénale est formée de quelques couches de cellules allongées fibroblastiques et myofibroblastiques, dont l'origine à l'heure actuelle n'est pas complétement définie. Des études suggèrent qu'elles pourraient être dérivées du mésenchyme adjacent (Bandiera et al., 2013; Mesiano and Jaffe, 1997) mais également se différencier à partir de cellules progénitrices surrénaliennes (Wood et al., 2013). Au niveau de la capsule, différentes artères surrénaliennes se ramifient. La capsule assure des fonctions diverses : elle constitue un centre de stockage des populations de progéniteurs surrénaliens et contribue ainsi au remplacement des cellules endommagées. Elle est également fondamentale pour le maintien de la zonation de la corticosurrénale au cours de la vie (Vidal et al., 2016).

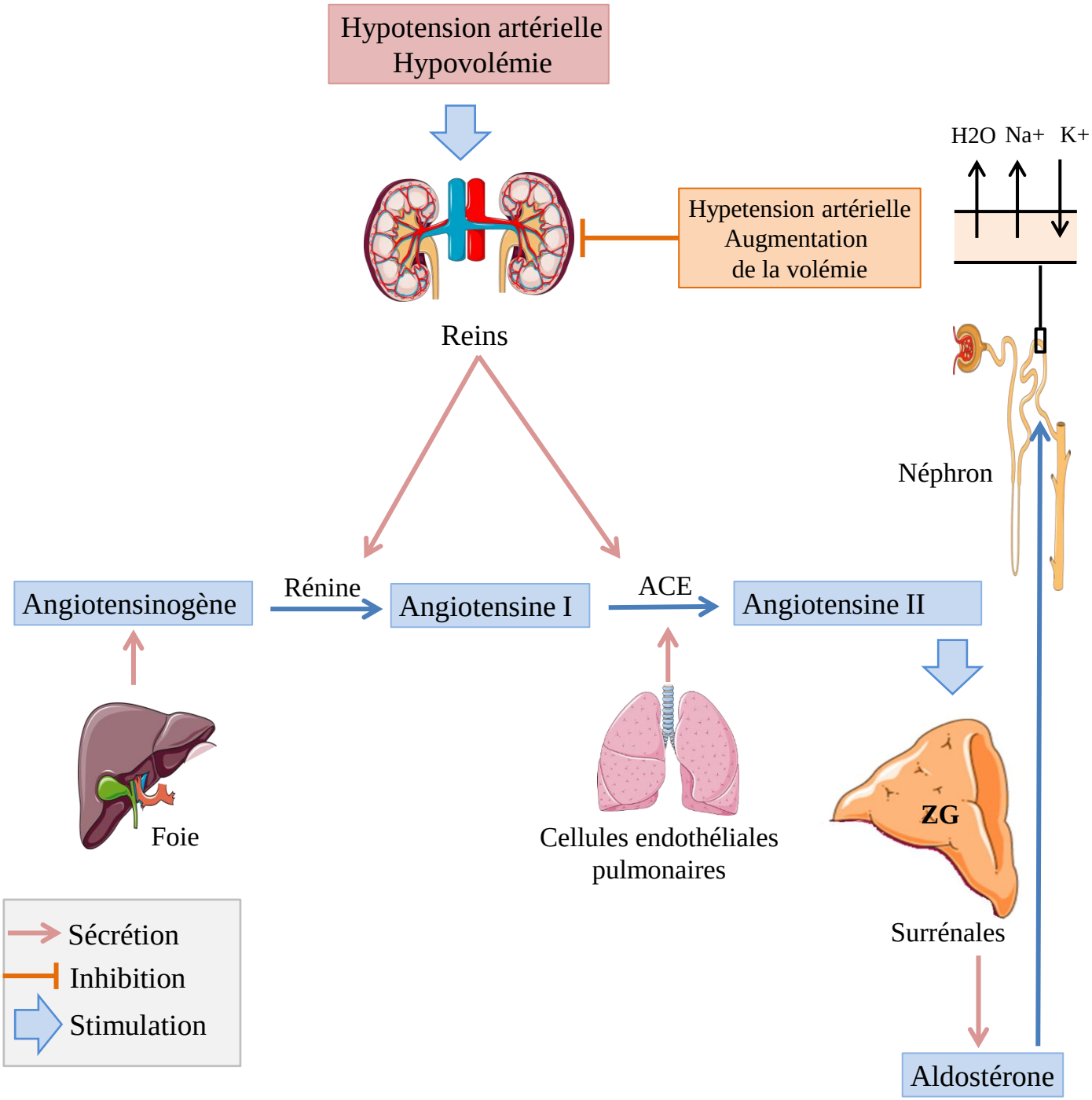


Figure 3: Représentation du système rénine-angiotensine-aldostérone.
Synthétisée suite à une hypertension artérielle par l'appareil juxtaglomérulaire du rein, le rénine permet le clivage de l'angiotensinogène, produit par les cellules hépatiques, en angiotensine I. L'angiotensine I sera à son tour clivée en angiotensine II par l'enzyme de conversion (ACE), produite au niveau des cellules endothéliales pulmonaires. L'angiotensine II ainsi générée lie son récepteur à la surface des cellules de la zone glomérulée (ZG) du cortex surrénalien, ce qui entraine la sécrétion de l'aldostérone par ces dernières. L'aldostérone agit au niveau des tubules distaux du rein pour favoriser la réabsorption de sodium et la rétention d'eau et en revanche l'élimination du potassium. Ces échanges permettent une augmentation de la volémie et donc de la pression artérielle, qui en retour inhibe La libération de rénine.

2. Le cortex surrénalien

Représentant jusqu'à 90% de la glande surrénale chez l'homme, le cortex surrénalien constitue une source fondamentale d'hormones stéroïdiennes à l'égard des gonades avec lesquelles il partage une même origine embryonnaire : 'Le primordium adrénogonadique'. Le modèle standard de zonation de la cortico-surrénale en trois zones concentriques se base sur des différences morphologiques et fonctionnelles, propres à chaque zone (Figure 2).

La **zone glomérulée** (ZG), la zone la plus externe du cortex située directement sous la capsule, est organisée en cellules assemblées en grappes d'où l'appellation de 'glomérules'. Elle représente environ 15% du cortex et est responsable de la synthèse d'aldostérone grâce à l'activité de l'Aldostérone Synthase ou CYP11B2, dont l'expression est restreinte aux cellules de cette zone. La sécrétion d'aldostérone s'effectue sous le contrôle du système rénine-angiotensine. Le système hormonal aldostérone-rénine-angiotensine permet de maintenir la pression artérielle, la volémie plasmatique, ainsi que l'équilibre sodium/potassium. Ce maintien est établi de la manière suivante : en cas d'hypotension artérielle ou d'une hyponatrémie (baisse de la concentration en sodium), la rénine est sécrétée par les cellules juxtaglomérulaires rénales. La libération de la rénine dans la circulation va assurer le clivage de l'angiotensinogène (libéré par le foie) en angiotensine I. L'Angiotensin Converting Enzyme (ACE, produite par les poumons), clive l'angiotensine I en angiotensine II qui à son tour, stimule la synthèse des minéralocorticoïdes en se liant à son récepteur. L'aldostérone agit en suite au niveau des tubes contournés distaux pour permettre aux reins, d'une part, la réabsorption de l'eau et du sodium urinaire et, d'autre part, la sécrétion de potassium dans l'urine, augmentant ainsi la pression artérielle (Figure 3).

La **zone fasciculée** (ZF), zone majeure du cortex présentant 75-80% de sa totalité, est située sous la zone glomérulée. Elle est définie par une organisation des cellules en cordons. Les cellules de cette zone sont responsables de la sécrétion de glucocorticoïdes (Cortisol chez l'homme et corticostérone chez les rongeurs).

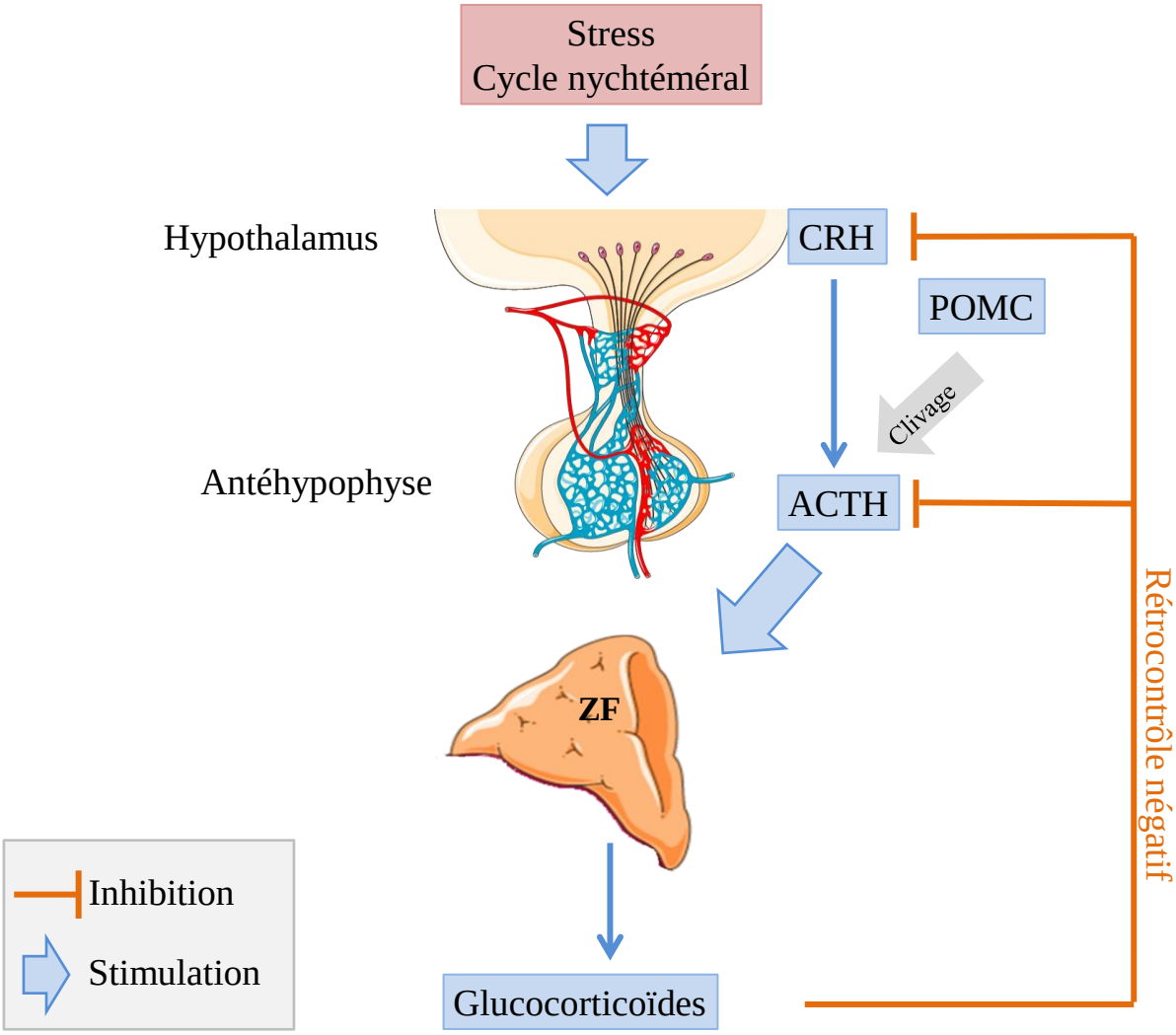


Figure 4: Représentation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien.
Sous l'effet d'un stress, l'hypothalamus libère la CRH qui à son tour, induit la production d'ACTH, après clivage du précurseur POMC produit par l'hypophyse antérieure. Libérée dans le sang, l'ACTH va stimuler la production de glucocorticoïdes par la zone fasciculée du cortex surrénalien. En retour, les glucocorticoïdes vont agir négativement sur leur propre synthèse, en diminuant la transcription du gène CRH et en inhibant la sécrétion d'ACTH par la glande pituitaire.

La libération des glucocorticoïdes est effectuée grâce à l'activité de l'enzyme terminale de la synthèse des glucocorticoïdes CYP11B1, dont l'expression est restreinte aux cellules de la fasciculée. La synthèse des glucocorticoïdes est essentiellement sous le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire. Suite à des neurostimulations, la CRH (Corticotrophine Releasing Hormone) et l'AVP (Arginine Vaso-Pressine) sont synthétisées et libérées par l'hypothalamus. Cette libération stimule la sécrétion de l'ACTH par la glande pituitaire antérieure. L'AVP toute seule n'a pas d'action, elle potentialise l'effet de la CRH, le régulateur principal de l'ACTH. L'ACTH est le produit du clivage de la POMC (Pro-OpioMélanoCortine). Les glucocorticoïdes agissent sur leur propre synthèse, en exerçant un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion d'ACTH, la transcription du gène *POMC* et du récepteur à la CRH, au niveau hypophysaire. Au niveau de l'hypothalamus, les glucocorticoïdes vont inhiber la transcription du gène *CRH* (Aguilera, 2011)(Figure 4).

Les glucocorticoïdes interviennent dans l'adaptation de l'organisme en situation de stress. Ils régulent notamment le métabolisme énergétique à tous les niveaux, en augmentant la production de glucose, la sensibilité du tissu adipeux aux agents lipolytiques et le catabolisme protéique. Ils exercent un effet inhibiteur sur l'activité hypophysaire thyréotrope, somatotrope et gonadotrope. Ils ont également une action immunosuppressive et anti-inflammatoire largement utilisée en pharmacologie.

La **zone réticulée** (ZR), zone la plus interne du cortex, est caractérisée par une organisation de cellules arrangées d'une façon réticulaire. La ZR, retrouvée chez l'être humain et les grands primates, apparait au moment de l'adrénarche (Entre 7 et 10 ans). Elle constitue la source de précurseurs androgéniques : la déhydroépiandrostérone (DHEA) et son dérivé sulfaté (DHEAS). Ces précurseurs peuvent être convertis dans les tissus périphériques en testotestérone et son métabolite, l'androstanolone (nommé aussi 5α-dihydrotestostérone). Etant la source unique d'androgènes chez la femme, la zone réticulée est relativement négligeable chez l'homme, en comparaison avec les testicules. Chez la souris, le cortex surrénalien est composé d'une ZG et d'une ZF, en absence de ZR. Par contre, il existe une zone X à la jonction cortico-médullaire qui involue au

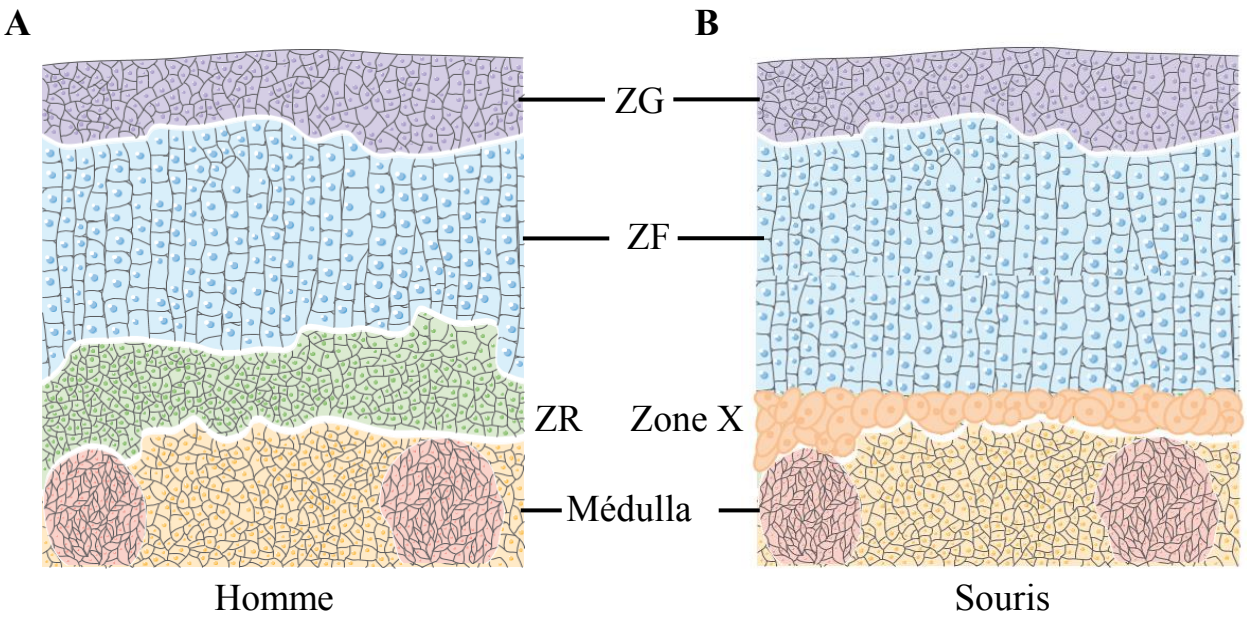


Figure 5 : Comparaisons anatomiques et structurales des surrénales chez l'Homme et la souris.
ZG: Zone Glomérulée
ZF: Zone Fasciculée
ZR: Zone Réticulée

moment de la maturité sexuelle chez le mâle (vers 40 jours après la naissance) et lors de la première gestation chez la femelle. Cette zone correspond à une réminiscence transitoire de la zone foetale et présente une expression spécifique de la 20αHSD (20α hydroxy stéroïde déshydrogénase (Figure 5). Malgré sa position entre ZF et médulla, la zone X n'est pas l'équivalent fonctionnel de la ZR.

3. La médullosurrénale

La médullosurrénale, ou médulla, dérivant de la crête neurale, est située au centre de la glande. Elle est constituée de cellules chromaffines. Qualifiées de cellules neuroendocrines, ces cellules n'agissent pas sur leurs organes cibles via des synapses, mais libèrent principalement les catécholamines dans la circulation sanguine, agissant ainsi à distance sur leurs cellules cibles, via le récepteur adrénergique.

Les catécholamines (Adrénaline et Noradrénaline) sont sécrétées suite à la stimulation nerveuse splanchnique (système nerveux autonome innervant les viscères de l'abdomen et du pelvis) et sont considérées comme des médiateurs importants de la réponse rapide au stress aigu. En effet, elles augmentent le métabolisme du glucose, en induisant la glycogénolyse hépatique et la lipolyse, contrôlent le rythme cardiaque, stimulent la vasoconstriction (avec hypertension artérielle) et l'activité cérébrale.

4. Interactions fonctionnelles entre le cortex et la médulla

Au niveau surrénalien, des interactions existent entre les cellules corticales et les cellules chromaffines. Ces interactions jouent un rôle critique dans la physiologie et la physiopathologie de la glande surrénale. Les systèmes corticosurrénaliens et médullosurrénaliens sont donc intimement liés sur les plans anatomique et fonctionnel (Bornstein et al., 1991, 1994).

En effet, la migration et la différenciation des cellules précurseurs neuroectodermiques en cellules chromaffines s'effectuent sous l'influence des stéroïdes surrénaliens (Doupe et al., 1985; Ehrhart-Bornstein et al., 1997). De

plus, les glucocorticoïdes, essentiels à la survie des cellules de la médulla (Huang et al., 2012; Kim et al., 2008a), augmentent la transcription et l'activité de l'enzyme PNMT (Phenylethanolamine N-methyltransferase)(Evinger et al., 1992; Wong et al., 1992), ainsi que de la tyrosine hydroxylase (TH)(Fossom et al., 1992; Goodman et al., 1978; Harlan, 1988), enzymes indispensables pour la conversion de la noradrénaline en adrénaline. A noter que l'expression de la TH est aussi stimulée par la DHEA (Charalampopoulos et al., 2005; Chung et al., 2011; Sicard et al., 2007; Ziegler et al., 2008). Les androgènes et les facteurs de croissance corticaux peuvent aussi agir sur la prolifération et la différenciation des cellules chromaffines adultes (Sicard et al., 2007) ainsi que progénitrices (Chung et al., 2011). De plus, des altérations de la migration, du développement et de structure des cellules chromaffines, associées à une altération de la synthèse des catécholamines ont pu être observées chez les patients atteints d'insuffisance corticosurrénalienne, engendrée par une hyperplasie congénitale des surrénales (HCS) (Bornstein et al., 1999; Merke and Bornstein, 2005).

D'une manière réciproque, la libération et la synthèse des hormones stéroïdes par le cortex est stimulée par les catécholamines ainsi que les neuropeptides produits par les cellules chromaffines (Ehrhart-Bornstein et al., 1998; Haidan et al., 1998; Nussdorfer, 1996). Chez la souris, dans le cas d'un stress aigu, la PGF2α (Prostaglandine F2 α), libérée par le cortex surrénalien, agit d'une manière paracrine au niveau des cellules chromaffines pour inhiber la sécrétion de catécholamines, limitant ainsi la production de glucocorticoïdes (Lambert-Langlais et al., 2009). Au-delà de l'activité endocrine, l'organisation correcte du cortex dépend de l'existence des cellules de la médulla. En effet, leur absence dans un modèle murin n'altère pas la mise en place du cortex, mais son organisation en cordons est perdue (Britsch et al., 1998). L'interdépendance des deux tissus pourrait également dépendre de cellules progénitrices communes, caractérisées par l'expression de la nestine et qui pourraient donner naissance à des cellules chromaffines et stéroïdogènes (Steenblock et al., 2017).

Bien que cortex et médulla soient considérés comme des entités fonctionnelles aux origines embryonnaires, aux propriétés biochimiques et aux régulations

distinctes, les mécanismes venant d'être décrits contribuent à assurer les fonctions de la glande en tant qu'unité fonctionnelle.

B. Origine embryonnaire de la surrénale et rôle du récepteur nucléaire SF1

Le cortex surrénalien et les gonades se développent à partir d'un épaississement de l'épithélium coelomique dénommé « primordium adréno gonadique (PAG) » identifiable chez l'Homme à partir de 4 semaines de gestation et 9.5-10 jours embryonnaires chez la souris (Hatano et al., 1996). Le PAG est identifiable et caractérisé par l'expression du récepteur nucléaire Sf1 (Steroidogenic factor 1 ou Ad4BP, Adrenal Binding Protein ou NR5A1, Nuclear Receptor subfamily 5, groupe A, member 1) (Hatano et al., 1996; Ikeda et al., 1994; Luo et al., 1994). Sf1 est un facteur de transcription capable de se fixer sur des séquences spécifiques contenues dans les promoteurs de plusieurs gènes codants des enzymes clés de la stéroïdogenèse (Honda et al., 1993; Lala et al., 1992; Morohashi et al., 1992, 1993). Son expression dans le PAG est initiée par le facteur de transcription WT1 (Wilms Tumour 1) (Moore et al., 1998).

Les souris invalidées pour SF1, présentent une absence totale des surrénales et des gonades à la naissance, conduisant à une létalité précoce des animaux. En effet, l'agénésie surrénalienne est à l'origine d'un déficit en glucocorticoïdes, ce qui ne permet pas la survie des petits au-delà de quelques jours (Luo et al., 1994; Sadovsky et al., 1995). L'absence de surrénales et de gonades à la naissance est causée par une apoptose massive des cellules à partir de E11 (Bland et al., 2004; Luo et al., 1994). Bien que les mécanismes mis en jeu ne soient pas clairement identifiés, ce phénomène apoptotique pourrait impliquer l'action répressive de Sf1 sur l'expression du facteur pro-apoptotique NOV (Nephroblastoma OVerexpressed) (Doghman et al., 2007a) appartenant à la famille CCN. Les souris hétérozygotes (*Sf1+/-*) ont un phénotype plus modéré que les souris homozygotes, mais présentent un défaut de développement surrénalien et de la fonction stéroïdogène. En revanche, le développement des gonades est normal. Ces données soulignent que, dans ce contexte, la surrénale en développement est plus sensible au dosage de Sf1 que les gonades (Babu et al., 2002; Bland et al.,

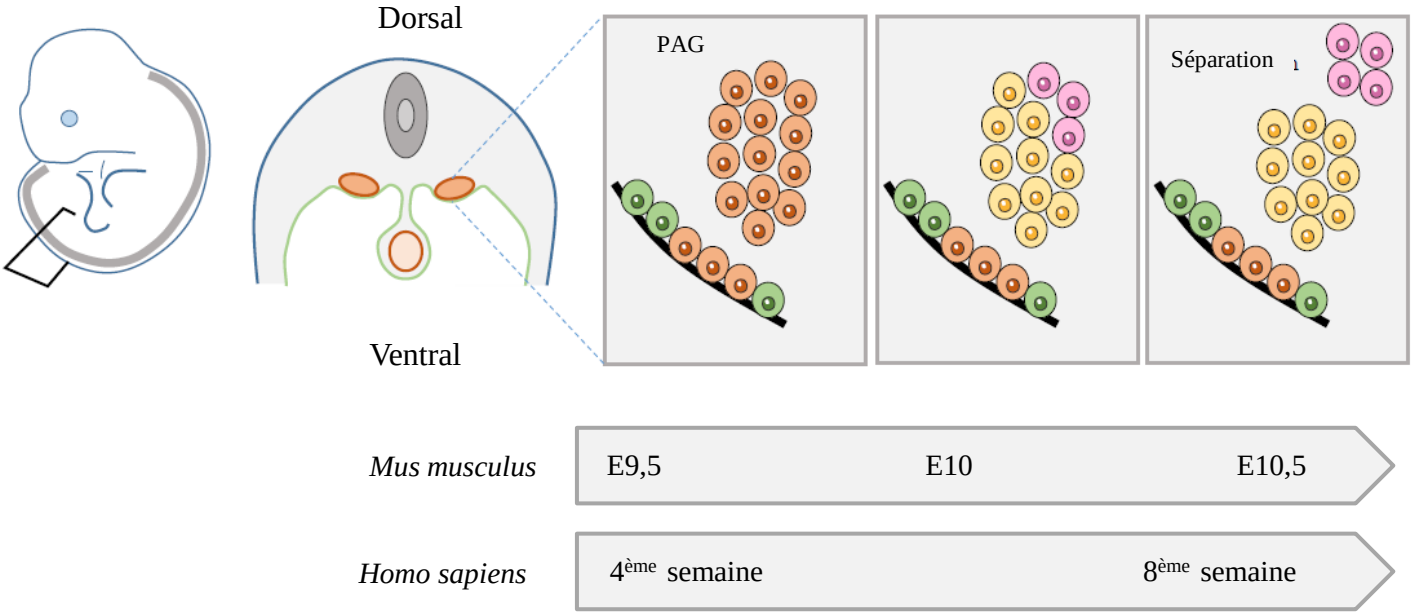


Figure 6 : Organogenèse précoce de la surrénale murine.
Section transversale au niveau du tronc d'un embryon de souris au stade E9.5. L'épithélium coelomique (vert) en prolifération conduit à l'émergence d'une population cellulaire caractérisée par l'expression de SF1 : le primordium adrénogonadique (PAG) (orange). L'expression de SF1 dans le PAG est initiée par le facteur de transcription WT1. *Adapté d'après Svingen and Koopman, 2013 et* King et al., 2009.
En gris foncé : moelle épinière, en rouge : aorte dorsale, en rose : ébauche surrénalienne, en jaune : ébauche gonadique.
PAG : primordium adrénogonadique, E : embryonic day, WT1 : Wilms Tumour 1.

2004). En accord avec ces résultats, la surexpression de SF1 chez des embryons mutants *Sf1-/-* conduit à un sauvetage du phénotype gonadique mais pas surrénalien, indiquant que le développement de l'ébauche surrénalienne nécessite un dosage de Sf1 plus élevé que celui de l'ébauche gonadique (Fatchiyah et al., 2006). Cette augmentation de dosage est le résultat de l'interaction de WT1 et du cofacteur CITED2 sur les régions régulatrices de SF1 (Val et al., 2007). Au sein du PAG, la population exprimant des niveaux élevés de SF1, migre en région rostrale pour constituer le primordium surrénalien, tandis que la population cellulaire exprimant de plus faibles taux de SF1 migre en région caudale pour former le primordium gonadique (33 jours de gestation chez l'Homme et E10.5 chez la souris) (Figure 6). L'ensemble de ces données souligne l'importance du dosage de l'activité de ce facteur dans la spécification du lignage surrénalo-gonadique.

Chez l'Homme, la mutation de SF1 a été pour la première fois décrite chez un patient présentant une réversion sexuelle et une insuffisance surrénalienne complète (Achermann et al., 1999). Toutefois, l'étude d'une plus grande cohorte de patients porteurs de mutations de SF1 indique que celles-ci sont associées à une large variété de défauts du développement sexuel, mais restent incomplètement associées à une insuffisance surrénalienne (Ferraz-de-Souza et al., 2009). La plupart des mutations sont hétérozygotes, indiquant que la perte de fonction de SF1 pourrait ne pas être compatible avec la vie chez l'Homme. Il a toutefois été rapporté le cas d'un patient présentant une mutation homozygote conduisant à une diminution de l'activité transcriptionnelle de SF1 et à une insuffisance surrénalienne (Achermann et al., 2002). L'hétérogénéité des phénotypes suite aux mutations de SF1, souligne la complexité de ses fonctions transcriptionnelles.

C. Stéroïdogenèse surrénalienne

La stéroïdogenèse est un processus complexe enzymatique au cours duquel le cholestérol est converti en hormones stéroïdes biologiquement actives. Afin de

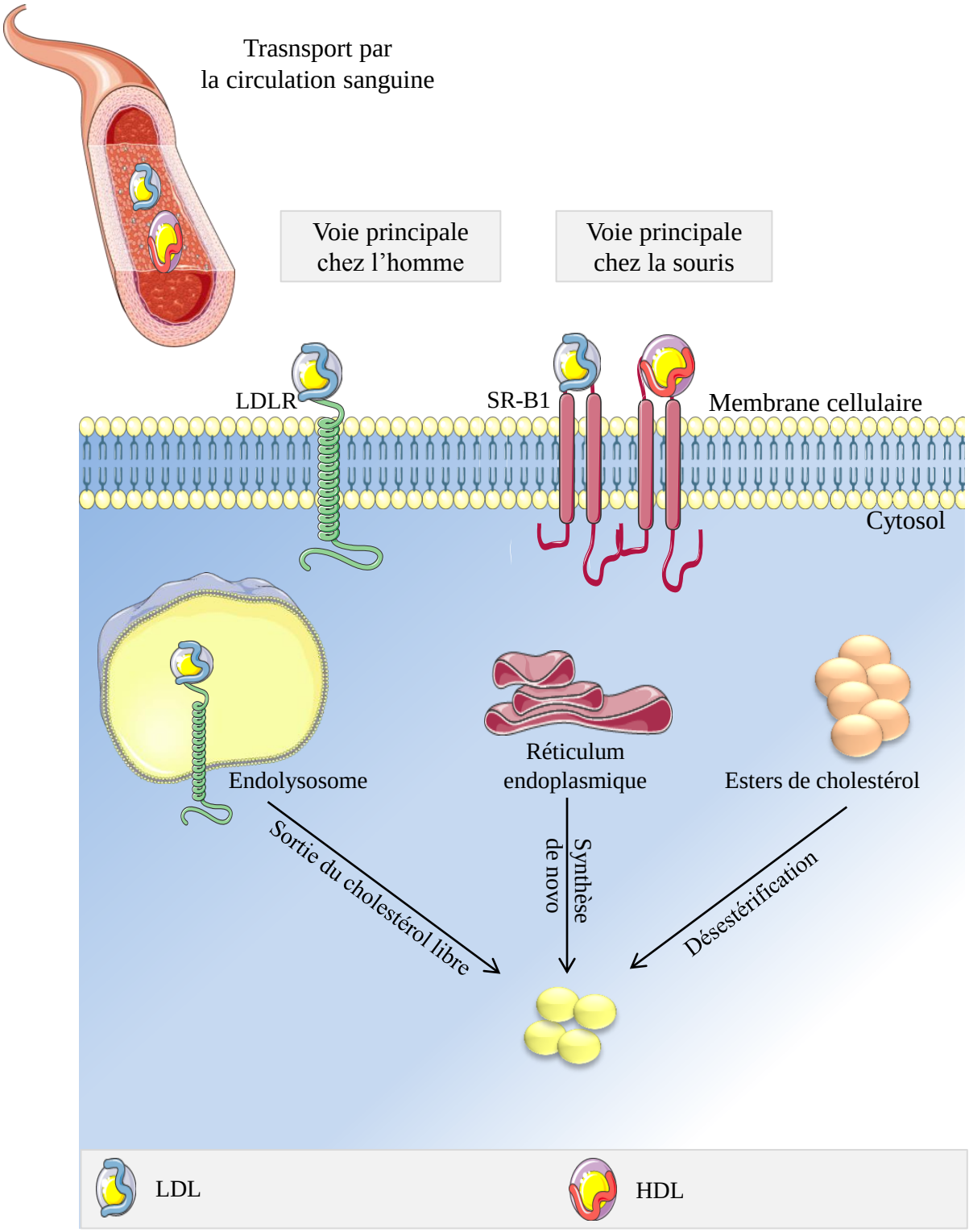


Figure 7: Sources potentielles de cholestérol.
Le transport sanguin du cholestérol, molécule hydrophobe, est assuré par les lipoprotéines LDL et HDL. Le cholestérol libre intracellulaire peut provenir de la synthèse de novo dans le réticulum endoplasmique ou du stockage d'ester de cholestérol sous forme de gouttelettes lipidiques.

LDLR: Low-Density Lipoprotein Receptor
SR-B1: Scavenger Receptor class B type 1

réaliser la stéroïdogenèse, les sources potentielles de cholestérol pouvant être utilisées par les cellules du cortex sont les suivantes (Figure 7) :

- L'absorption des lipoprotéines circulantes : LDL (Low density lipoprotein) par endocytose grâce au récepteur LDL-R et HDL (High density lipoprotein) par l'intermédiaire du récepteur SR-B1 (Scavenger Receptor class B type I). Le cholestérol dérivé de ces lipoprotéines constitue une source importante pour la stéroïdogenèse surrénalienne.
- La synthèse *de novo* intracellulaire qui s'effectue au niveau du réticulum endoplasmique.
- Le catabolisme intracellulaire des esters de cholestérol stockés dans des gouttelettes lipidiques (Miller and Bose, 2011).
-

1. Le cholestérol : précurseur de tous les stéroïdes

Le cholestérol est le précurseur commun de la synthèse de tous les stéroïdes produits et libérés par les différentes zones du cortex (aldostérone, cortisol/corticostérone et DHEA/DHEAS). Appartenant à la famille des stérols, le cholestérol est formé de 4 cycles carbonés notés A, B, C et D et possède un groupement hydroxyle (-OH) permettant son estérification par un acide gras (On parle alors d'ester de cholestérol ou de stéride). Autre que les hormones stéroïdiennes, Le cholestérol constitue un composant majeur des membranes cellulaires animales et un précurseur de nombreuses molécules telles que la vitamine D3 et les sels biliaires, entre autres.

2. Import du cholestérol

Deux principales sources de cholestérol sont à la base de la synthèse des hormones stéroïdes : l'apport exogène provenant de l'alimentation et le cholestérol stocké par le foie. Etant hydrophobe, le transport de ce composé est effectué dans le plasma par des lipoprotéines HDL (High Density Lipoprotein) et LDL (Low Density Lipoprotein) (Gwynne and Hess, 1980; Higashijima et al.,

1987). La contribution des HDL et LDL pour le transport du cholestérol au niveau des cellules surrénaliennes diffère selon les espèces :

Chez l'homme, les LDL sont la majeure source de cholestérol (Higashijima et al., 1987; Liu et al., 2000; Martin et al., 1999). Ils sont captés à la membrane plasmique par le récepteur au LDL, LDLR (Low Density Lipoprotein Receptor). Le complexe LDL/LDLR est internalisé par endocytose et les vésicules ainsi formées, fusionnent avec les lysosomes, formant alors les endolysosomes où la LAL (Lipase Acide Lysosomiale) assure l'hydroxylation du cholestérol esterifié. Le LDLR sera ensuite recyclé (Brown and Goldstein, 1986).

Des études de phénotype des souris déficientes pour le LDLR révèlent que le rôle de ce dernier est négligeable dans l'apport des esters de cholestérol essentiels pour la synthèse des hormones surrénaliennes, même dans le cas d'un stress aigu (Kraemer et al., 2007). Au contraire, l'invalidation de SR-B1 est associée à un épuisement des stocks d'esters de cholestérol et par conséquent, à une diminution de la sécrétion de glucocorticoïdes lors d'un jeûne prolongé (Hoekstra et al., 2008, 2009). Ces résultats montrent que les rongeurs utilisent préférentiellement les HDL pour la délivrance du cholestérol au niveau cellulaire (Gwynne and Hess, 1980), grâce au récepteur SR-B1 (Scanvenger Receptor class B type 1) (Swarnakar et al., 1999). A la différence de LDLR, ce récepteur n'est pas internalisé au sein de la cellule (Acton et al., 1994; Brown and Goldstein, 1986).

Compte tenu de l'ensemble de ces données, on peut s'interroger sur l'importance des mécanismes d'import du cholestérol dans l'étiologie de certaines pathologies surrénaliennes telles que l'hypercorticisme ou, à l'inverse, l'insuffisance surrénalienne. Les patients atteints du syndrome de Bassen-Kornzweig, caractérisé par des taux de LDL bas, présentent une cortisolémie basale normale et une sécrétion de cortisol, en réponse à l'ACTH légèrement diminuée (Illingworth et al., 1982). En revanche, des données récentes indiquent que chez la souris et chez l'Homme, la diminution des taux plasmatiques de HDL est associée à une diminution des concentrations en stéroïdes (Bochem et al., 2013; Hoekstra et al., 2013).

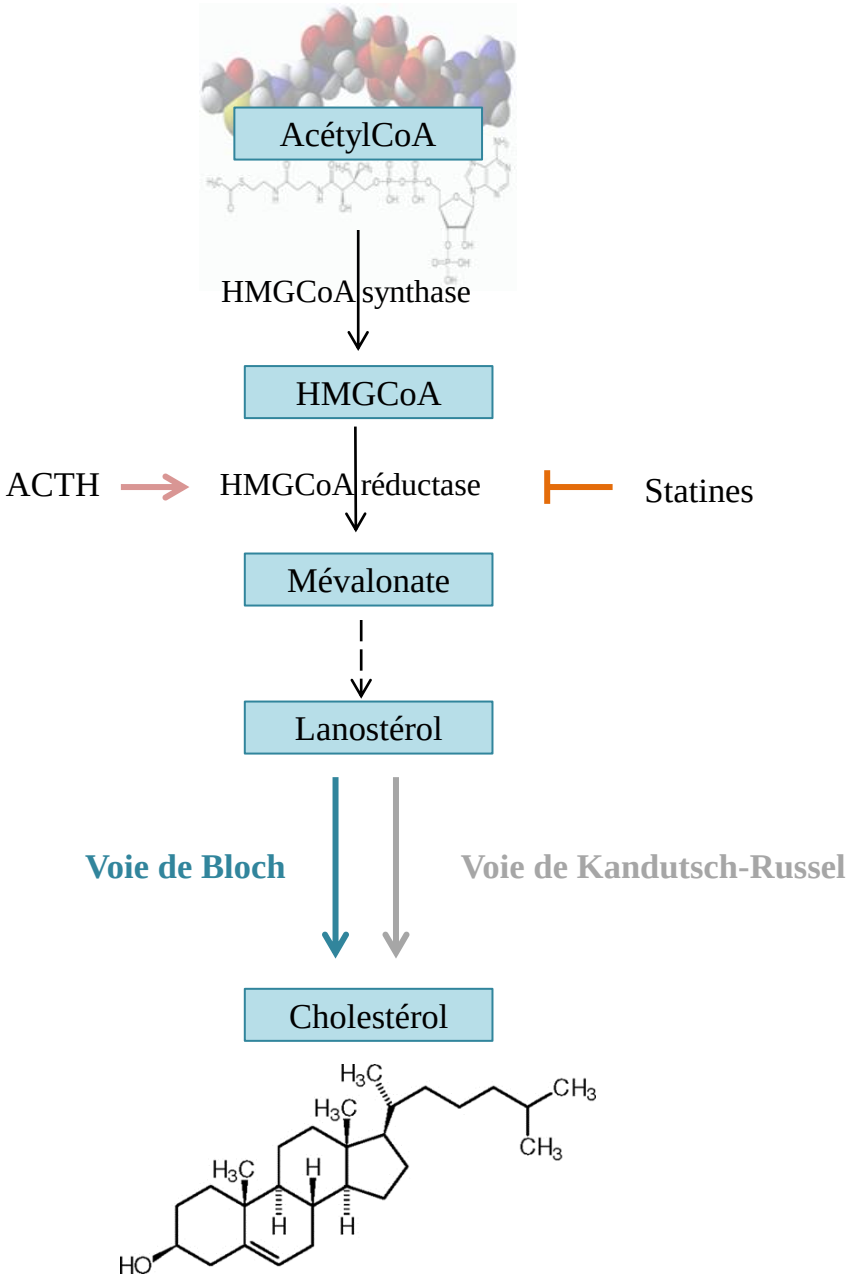


Figure 8: Voie de biosynthèse de cholestérol.
Schéma simplifié de la synthèse *de novo* de cholestérol. L'enzyme limitante de cette voie est l'HMGCoA réductase, ciblée par des traitements hypocholestérolémiants comme les statines.

3. Synthèse de novo du cholesterol

Le stockage au niveau hépatique du cholestérol, apporté par l'alimentation, représente 75% des besoins nécessaires au bon fonctionnement des cellules. Afin de répondre à un besoin accru en stéroïdes, les cellules corticosurrénaliennes disposent d'une capacité de synthèse du cholestérol *de novo* à partir de l'acétate (Rainey et al., 1986; Tóth et al., 1990). Cette synthèse qui se déroule au niveau réticulum endoplasmique, utilise la voie du mévalonate (Bloch, 1965) (Figure 8).

Trois molécules d'acétate se condensent (2- acétyl-CoA et 1 acétoacétyl-CoA) en hydroxy-méthyl-glutarate (HMG-CoA), qui à son tour, sera réduit en mévalonate grâce à l'enzyme hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase (HMGCoA réductase). Considérée comme l'enzyme limitante de la réaction, la HMGCoA réductase est fréquemment ciblée par des traitements hypocholestérolémiants tels que les statines (Jasińska et al., 2007). Au niveau de la surrénale, l'expression de cette enzyme est contrôlée par l'ACTH (Rainey et al., 1986). Une fois synthétisé, le mélavonate est converti en squalène par l'intermédiaire de la squalène synthase. Le squalène est ensuite transformé en lanostérol, le produit final de la voie du mévalonate. Le lanostérol alimente ensuite deux voies de synthèse qui partagent les mêmes enzymes pour produire le cholestérol, soit à partir du desmostérol par la voie de Bloch (Bloch, 1965), soit à partir du 7-dehydrocholestérol par la voie de Kandutsch-Russell (Kandutsch and Russell, 1960).

Au niveau de la surrénale fœtale, la synthèse de novo représente, en plus des LDL plasmatiques, une source importante de précurseurs stéroïdes. Chez l'adulte, cette source semble être primordiale en cas de stress, dans le but de répondre à une demande accrue en stéroïdes. Le fait que l'expression d'un certain nombre d'enzymes impliquées dans la voie du mévalonate est stimulable par l'ACTH soutient cette hypothèse (Menzies et al., 2017).

a. Transport intracellulaire du cholestérol

Après son entrée dans la cellule ou sa synthèse dans le réticulum endoplasmique, le cholestérol est transporté jusqu'à la mitochondrie. Au niveau de la membrane interne de cet organite aura lieu la première étape de la stéroïdogenèse. Le cholestérol est transporté dans la cellule par des moyens vésiculaires (i.e. médiée par des membranes) (Holthuis and Levine, 2005) (Holthuis and Levine, 2005) et non vésiculaires (impliquant la fixation de protéines) (Lev, 2010 ; Miller and Bose, 2011 ; Prinz, 2010).

Les mécanismes permettant au cholestérol de sortir des endosomes ne sont pas complètement élucidés, ils impliquent les protéines NPC1 (Niemann-Pick disease, type C1) et NPC2 (Niemann-Pick disease, type C2) et semblent reposer sur l'action de protéines capables de transférer des lipides (Midzak and Papadopoulos, 2014).

Le cholestérol libre sera alors exporté (Midzak and Papadopoulos, 2014) et transporté jusqu'à la mitochondrie sous forme de gouttelettes lipidiques ou à l'aide de transporteurs protéiques. Parmi ces transporteurs, les protéines StarD (StAR related lipid transfer Domain containing) sont capables de promouvoir la stéroïdogenèse en fixant le cholestérol et en stimulant son transfert à partir des vésicules riches en stérols vers des membranes acceptrices (Alpy and Tomasetto, 2014; Clark, 2012; Soccio and Breslow, 2003; Watari et al., 1997). Au niveau du cortex surrénalien, les protéines SCP2 (Sterol Carrier Protein 2) assurent le transport du cholestérol contenu dans des gouttelettes lipidiques vers la mitochondrie (Chanderbhan et al., 1986; Vahouny et al., 1983). La superfamille des protéines SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor) forme un complexe protéique retrouvé dans les membranes intracellulaires des gouttelettes lipidiques (Südhof and Rothman, 2009). Une majorité de ces protéines est fortement exprimée dans les cellules stéroïdogènes surrénaliennes (Grant et al., 1999; Steegmaier et al., 2000). Leur rôle serait de promouvoir les interactions entre les gouttelettes lipidiques et la mitochondrie, facilitant ainsi le transport du cholestérol vers cette-dernière (Lin et al., 2016).

Des éléments du cytosquelette, comme les microfilaments ou les microtubules, peuvent également être impliqués dans la stéroïdogenèse, via leur rôle dans le transport du cholestérol. En effet, il a été montré, dans des cellules

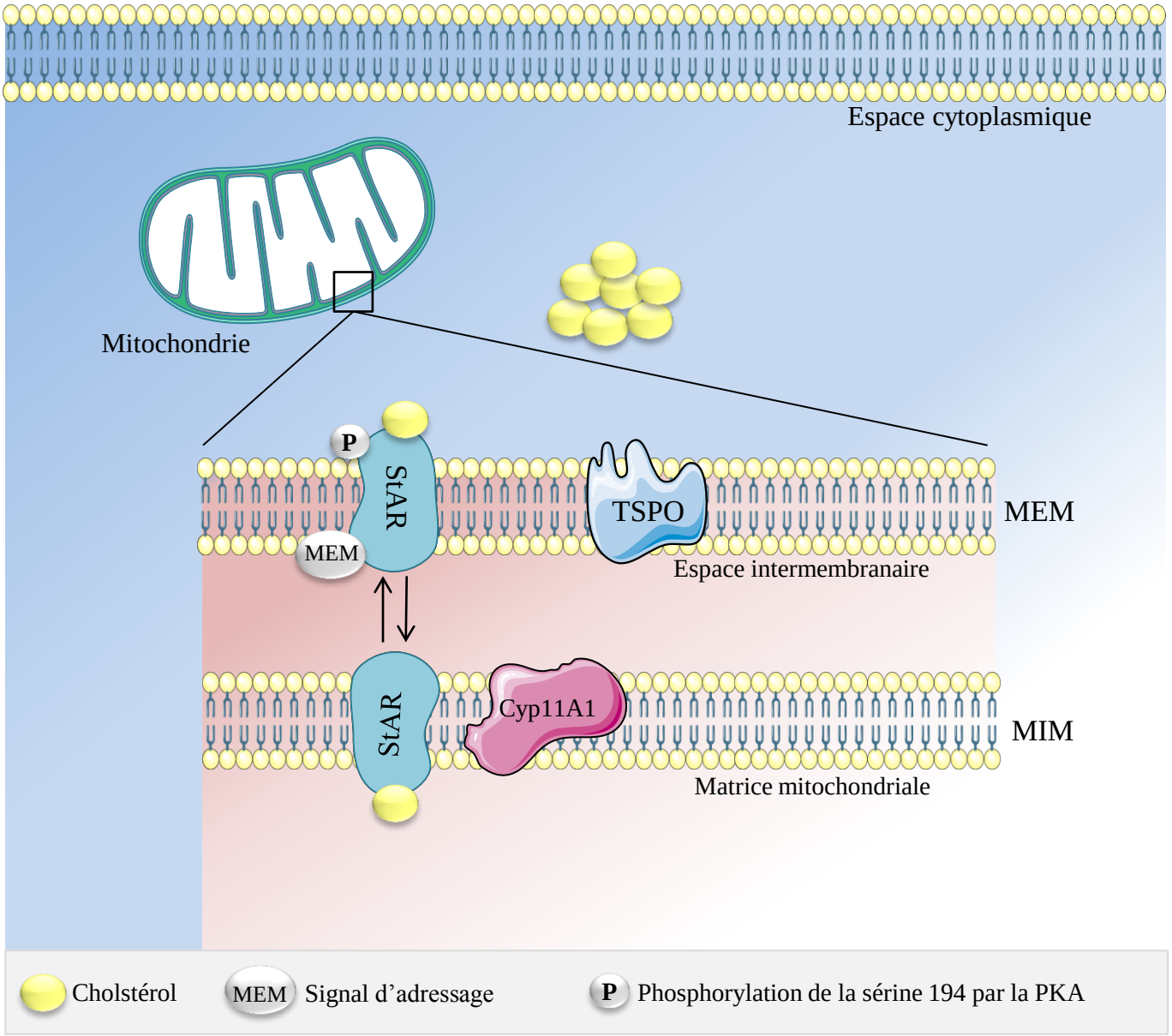


Figure 9: Transport du cholestérol à la membrane interne de la mitochondrie.
La protéine StAR présente un peptide étant un signal d'adressage à la MEM. En changeant de conformation, StAR migre jusqu'à la matrice mitochondriale en passant par la MIM. Stimulée *via* la phosphorylation par la PKA, StAR change de conformation, et migre jusqu'à la matrice mitochondriale en passant par la MIM. L'implication dans le transport mitochondrial du cholestérol de la protéine PBR/TSPO est remise en cause par de récentes études in vivo.

MEM: Membrane Externe Mitochondriale
MIM: Membrane Interne Mitochondriale

corticales murines (cellules Y1), que les gouttelettes lipidiques étaient capables de se déplacer le long des microtubules (Nan et al., 2006).

b. Transport mitochondrial du cholestérol

Arrivé à la mitochondrie, le transfert du cholestérol de la membrane externe vers la membrane interne mitochondriale est une étape cruciale dans l'initiation de la stéroïdogenèse puisque les enzymes de clivage du cholestérol (P450scc) sont localisées dans la membrane interne. Comme l'espace intermembranaire mitochondrial est aqueux, il est nécessaire pour le cholestérol, hydrophobe, d'être transporté jusqu'à la membrane interne (Figure 9). Il est admis que cette étape est une étape limitante de la stéroïdogenèse (Stocco, 2001). La protéine StAR (Steroidogenic Acute Regulatory protein) est impliquée dans ce transport. Elle est exprimée dans les tissus rénaux et stéroïdogènes (surrénales et gonades) (Sugawara et al., 1997). StAR a été identifiée dans les cellules testiculaires de Leydig MA-10 où sa surexpression induit une augmentation de la stéroïdogenèse (Clark and Weber, 1994). L'intervention de StAR dans la synthèse des stéroïdes a été confirmée dans un modèle murin où son invalidation conduit à une mortalité périnatale causée par une déficience en glucocorticoïdes, associée à la présence de nombreux dépôts lipidiques et à une forte désorganisation de la surrénale (Caron et al., 1997; Hasegawa et al., 2000). Ce phénotype est similaire à celui des patients porteurs d'une mutation du gène *StAR* et présentant ainsi une hyperplasie lipoïde de la surrénale. L'absence de StAR empêche le transport du cholestérol dans la mitochondrie, contribuant à une diminution marquée de la stéroïdogenèse. Le cholestérol va alors s'accumuler au sein de la cellule provoquant ainsi des dommages cellulaires importants (Bose et al., 1996).

La transcription de StAR dans les cellules stéroïdogènes est activée rapidement par les hormones trophiques de la surrénale (ACTH et angiotensine II). Suite à un stress aigu, StAR est également stimulée via une phosphorylation d'un résidu sérine (sérine 194 chez l'homme et 195 chez la souris), par la PKA (Protéine Kinase A) (Arakane et al., 1997).

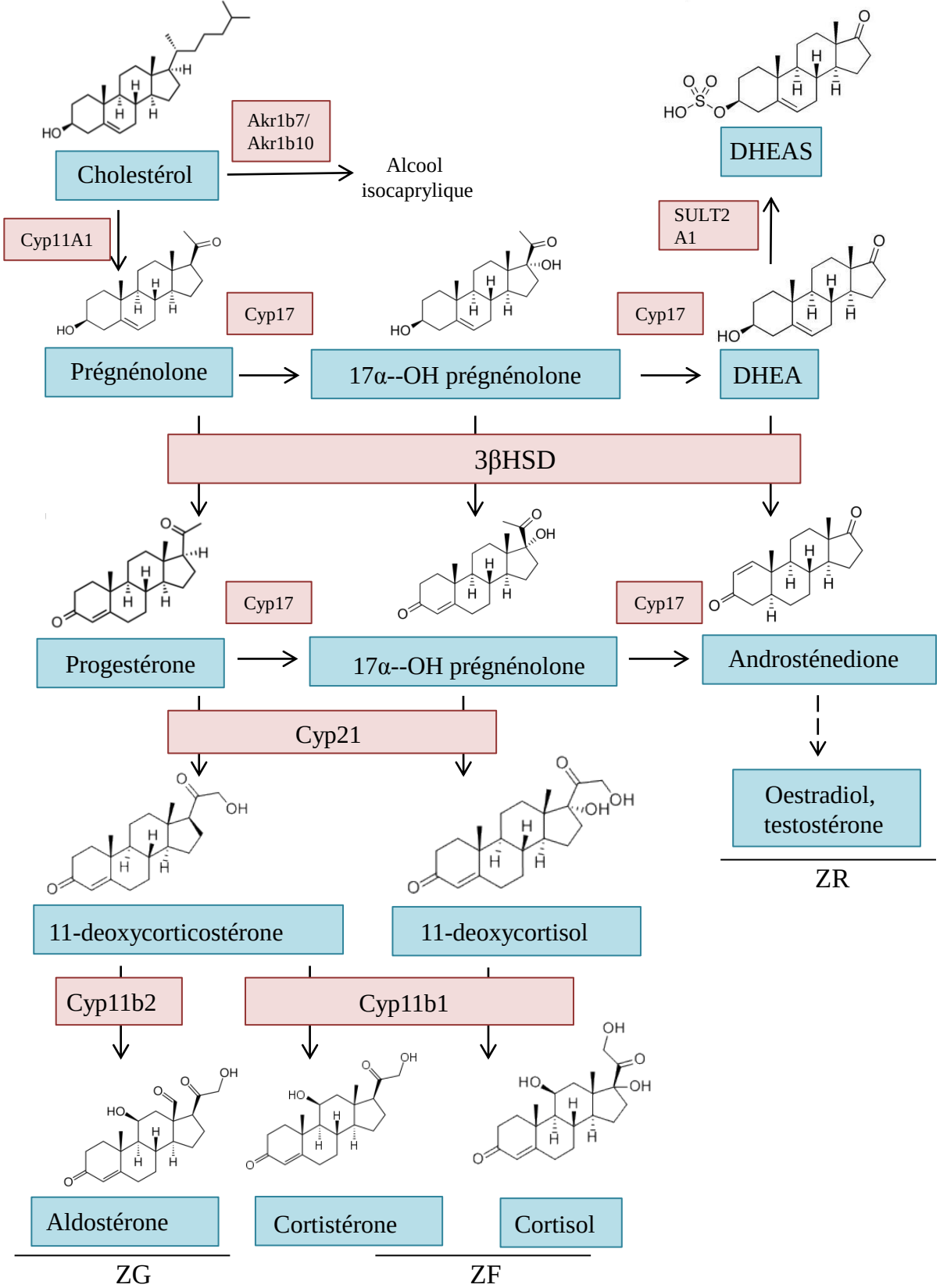


Figure 10: Voie de biosynthèse des stéroïdes.
Le clivage du cholestérol en prégnénolone génère un aldéhyde toxique pris en charge par Akr1b10 chez l'Homme et Akr1b7 chez la souris. Certaines enzymes agissent au niveau mitochondrial, d'autres au niveau du réticulum endoplasmique. Chez l'Homme, l'aldostérone est produite au sein de la ZG, le cortisol au niveau de la ZF et les précurseurs d'androgènes dans la ZR.

Un deuxième acteur, la protéine PBR (Peripheral Benzodiazepine Receptor) ou TSPO (Translocator Protein) a longtemps été considérée comme un transporteur du cholestérol au travers des membranes mitochondriales. Cependant, des études *in vivo* récentes montrent que l'absence de PBR n'affecte ni la stéroidogenèse gonadique et surrénalienne, ni la morphologie de la glande surrénale (Morohaku et al., 2014; Tu et al., 2014). Ces données remettent donc en cause le rôle de PBR dans la stéroïdogenèse, suggérant que StAR est bien la seule protéine impliquée dans le transfert du cholestérol vers la membrane interne de la mitochondrie.

4. Synthèse des stéroïdes

Après son transport dans la mitochondrie, le cholestérol subit une série d'hydroxylations, catalysées par les enzymes cytochromes P450 (ou CYP) et les enzymes hydroxystéroïde déshydrogénases (HSD). Chez l'Homme, cinq enzymes de type cytochrome P450, localisées au niveau mitochondrial, interviennent dans la stéroïdogenèse surrénalienne. Elles sont codées par les gènes *CYP11A1*, *CYP11B1*, *CYP11B2*, *CYP17A1* et *CYP21A2* (Figure 10). Les enzymes de type 2 et les HSD, quant à elles, sont localisées au niveau du réticulum endoplasmique (Miller, 2005). Au sein du cortex surrénalien, les profils d'expression tissulaire des gènes codant ces enzymes sont différents, permettant une synthèse tissu- et même zone-spécifique.

Lors de la première étape, le cholestérol est pris en charge par l'enzyme P450SCC (CYP11A1) au niveau de la membrane interne de la mitochondrie. CYP11A1 clive la chaine latérale du cholestérol, produisant ainsi l'isocaproaldéhyde et la prégnénolone qui est le précurseur de tous les stéroïdes. La prégnénolone est ensuite convertie en progestérone par la 3ßHSD (3ß-HydroxySteroid Deshydrogenase), localisée au niveau du réticulum endoplasmique. La progestérone est à son tour, hydroxylée en déoxycorticostérone par le cytochrome P450 21- hydroxylase (P450c21 ou CYP21).

L'ensemble de ces étapes mentionnées est commun à toutes les zones du cortex surrénalien. Selon le tissu dans lequel elle est produite, la déoxycorticostérone sera ensuite convertie par des enzymes différentes, contribuant ainsi à la synthèse des différents stéroïdes.

Au niveau de la zone glomérulée, la cytochrome P450 aldostérone synthase (P450c11AS ou CYP11B2) aboutit à la synthèse d'aldostérone, alors qu'au niveau de la zone fasciculée, la cytochrome P450 11 hydroxylase (P450c11 ou CYP11B1) permet la formation du cortisol chez l'Homme et de la corticostérone chez la souris. Cette différence, accompagnée de l'absence de production d'androgènes chez les rongeurs, est due à l'absence d'expression de la cytochrome P450 17 hydroxylase (P450c17 ou CYP17) dans le cortex surrénalien adulte des rongeurs (Keeney et al., 1995). Cette dernière possède deux activités enzymatiques : une activité 17α-hydroxylase permettant la production de cortisol dans la zone fasciculée, et une activité 17,20-lyase, favorisée dans la zone réticulée et permettant la production de DHEA et de son dérivé sulfaté (Rainey and Nakamura, 2008). La sulfatation de la DHEA est effectuée grâce à l'enzyme SULT2A1 (Sulfotransferase family cytosolic 2A DHEA-preferring member 1), majoritairement exprimée par les cellules de la zone réticulée (Rainey and Nakamura, 2008). Le choix de l'une ou l'autre des activités de CYP17 est contrôlé *par* le cytochrome b5 (CYB5) (Auchus et al., 1998). Les précurseurs d'androgènes pourront ensuite servir de substrat à la formation de testostérone ou d'oestradiol dans les tissus génitaux (Pelletier, 2008; Rosenfield, 2005) et adipeux (Paatela et al., 2016).

5. Régulation de la stéroïdogénèse

La synthèse des stéroïdes surrénaliens est contrôlée par les hormones trophiques de la surrénale. Le système rénine-angiotensine (SRA) contrôle la synthèse d'aldostérone ; l'axe hypothalamo-hypophysaire (HPA) contrôle la synthèse des glucocorticoïdes.

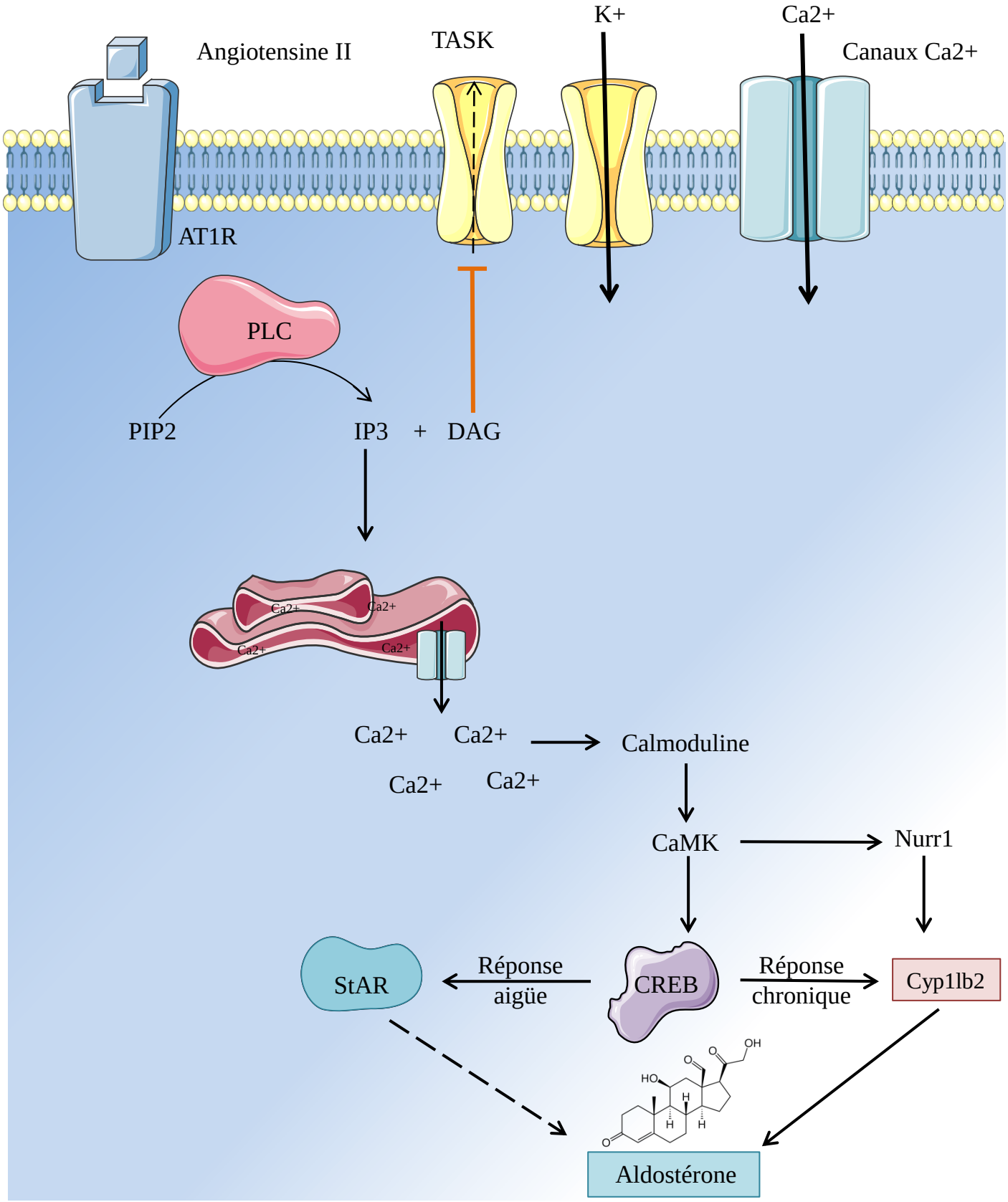


Figure 11 : Régulation de la synthèse d'aldostérone par l'angiotensine II et le K+.
Suite à la fixation d'angiotensine II sur son récepteur, la PLC activée, permet la production d'IP3 et de DAG. Le DAG inhibe les canaux potassiques TASK. L'IP3, à son tour, stimule la sortie de calcium du réticulum endoplasmique. L'augmentation de la concentration calcique permet l'activation des CaMKs qui assurent l'activation de *StAR* (réponse aigüe), et de *CYP11B2* (réponse chronique) avec l'implication des facteur de transcription NURRs, augmentant ainsi les taux d'aldostérone.

AT1R : Angiotensin receptor
CaMK : Calmodulin dependent kinase
DAG : Diacylglycérol
PLC : Phospholipase C
TASK : TWIK-related acid sensitive K

a. *Régulation de la production d'aldostérone*

Après sa synthèse par les cellules de la zone glomérulée, l'aldostérone est majoritairement transportée dans le sang par l'albumine (Zipser et al., 1976). Ses fonctions principales de maintien de la volémie plasmatique et de la pression artérielle sont le résultat de la réabsorption du sodium et de la sécrétion de potassium dans l'urine, au niveau des tubes contournés distaux rénaux. Trois facteurs contrôlent la production de cette hormone : l'angiotensine II, la concentration sérique en potassium (K+) et l'ACTH. Alors que l'effet de l'ACTH est limité sur une courte durée, l'angiotensine II et le K+ induisent à la fois une réponse rapide et à plus long terme.

Lors de la réponse rapide, l'angiotensine II agit via son récepteur AT1R (AngioTensin Receptor 1), récepteur à sept domaines transmembranaires couplés à une protéine G. Cette liaison permet à la sous-unité Gq de la protéine G d'activer la phospholipase C (PLC). La PLC assure ensuite la transformation du PIP2 (phosphatidylinositol 4,5-biphosphate) en DAG (diacylglycerol) et IP3 (inositol triphosphate). D'une part, l'IP3 mobilise le calcium du réticulum endoplasmique, augmentant ainsi la concentration de calcium intracellulaire. D'autre part, le DAG inhibe les canaux TASK (TWIK-related Acid Sensitive K+), ce qui induit un influx de calcium à travers la membrane, par l'intermédiaire de canaux calciques voltage-dépendants (Barrett et al., 1989). D'une manière similaire, l'augmentation des concentrations plasmatiques de potassium induit une dépolarisation membranaire, suivie d'un influx de calcium (Spät and Hunyady, 2004). En se liant aux calmodulines, le calcium active des kinases dépendantes des calmodulines (CAMK) qui, à leur tour, phosphorylent différents facteurs de transcription impliqués dans la transcription de gènes de la biosynthèse des stéroïdes, notamment le facteur de transcription CREB (cAMP respond element binding protein). Cette phosphorylation induit la liaison de CREB sur ses éléments de réponse CRE (cAMP respond element) et le recrutement de co-activateurs permettant la transcription de *StAR* (Figure 11). Ceci permet le transfert du cholestérol vers la membrane interne de la mitochondrie, induisant la synthèse d'aldostérone. L'ACTH peut également

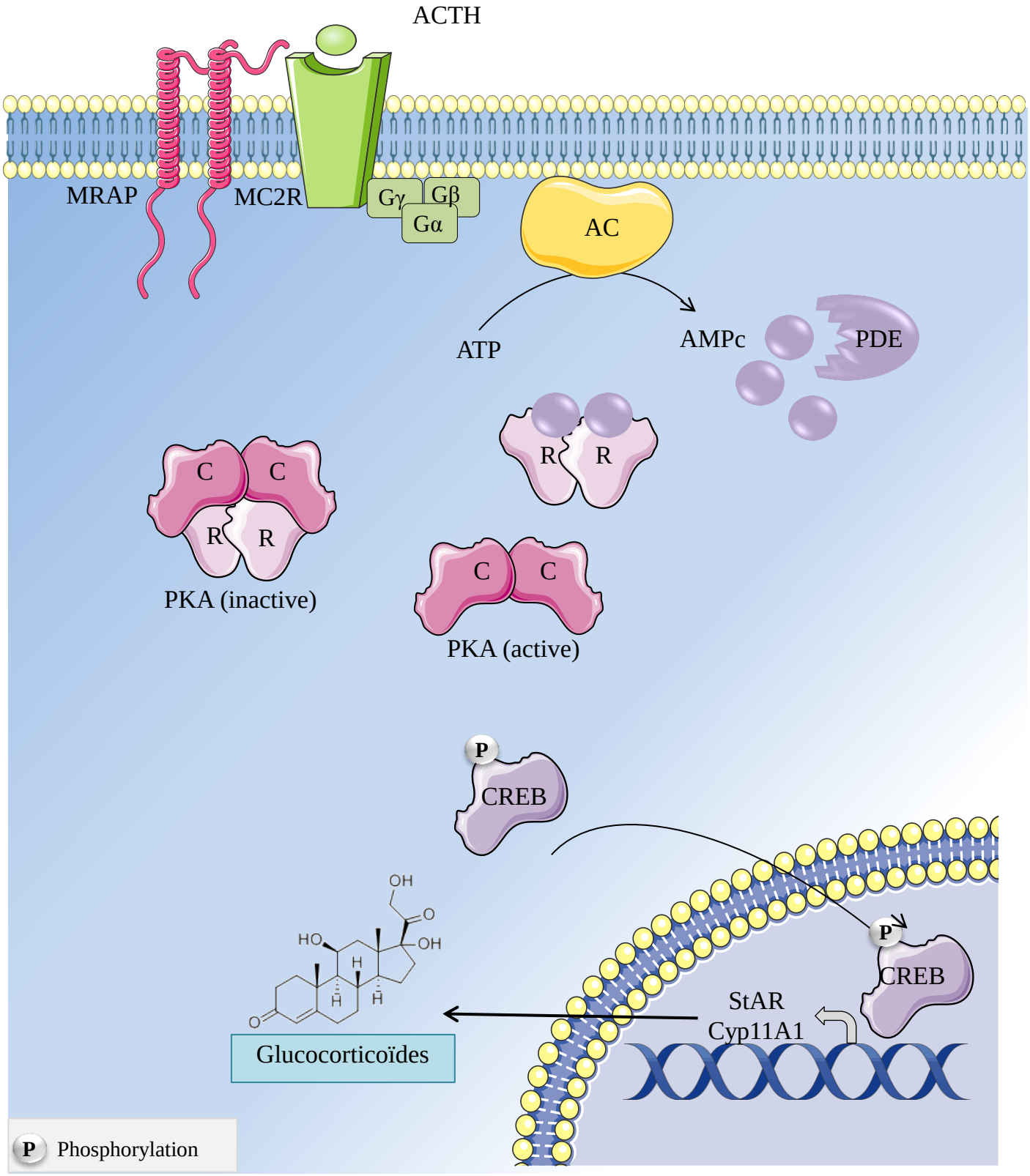


Figure 12 : Régulation de la synthèse de glucocorticoïdes par l'ACTH.
La liaison de l'ACTH à son récepteur MC2R permet l'activation de la sous-unité Gα de la protéine G associée à ce récepteur qui va activer l'adénylate cyclase (AC) qui produit de l'AMPc à partir d'ATP. La fixation de l'AMPc sur les sous-unités régulatrices (R) de la PKA, entraine leur dissociation des sous-unités catalytiques. Ceci leur permet de phosphoryler le facteur de transcription CREB, qui va activer la transcription de gènes impliqués dans la production de glucocorticoïdes.
CREB phosphorylé se fixe sur ses éléments de réponse et induit la transcription de ses gènes cibles, impliqués dans la synthèse des glucocorticoïdes.
L'activité de la PKA peut entre autres, être contrôlée par des phosphodiestérases (PDE)

stimuler cette réponse rapide en induisant l'augmentation de la transcription de *StAR* et sa phosphorylation (Daidoh et al., 1995).

La réponse tardive ou chronique, contrairement à la réponse rapide dont l'effet dure quelques heures, correspond à une stimulation prolongée de plusieurs heures à plusieurs jours. Les changements induits alors par l'angiotensine II et le potassium sont plus drastiques, avec une hypertrophie et une hyperplasie des cellules, menant à un élargissement de la zone glomérulée (Dierks et al., 2010; McEwan et al., 1999). Elle assure ce contrôle en agissant sur la transcription des enzymes de la stéroïdogenèse et en particulier *Cyp11b2* (Hattangady et al., 2012; Manna et al., 2009) mais également du gène codant le récepteur à l'angiotensine II, *AT1r* (Wang and Du, 1995). En plus du facteur de transcription CREB, les facteurs NURRs (NURR1 et NUR77) sont impliqués dans cette régulation chronique (Bassett et al., 2004).

b. Régulation de la synthèse des glucocorticoïdes

La synthèse des glucocorticoïdes (cortisol chez l'Homme et corticostérone chez les rongeurs) par les cellules de la zone fasciculée est finement régulée par l'axe hypothalamohypophysaire (HPA) (Figure 12). L'ACTH produit par l'hypophyse agit *via* son récepteur MC2R, provoquant l'activation de la PKA, ce qui aboutit à la transcription des gènes de la stéroïdogenèse. L'ACTH permet d'une part, de contrôler les variations diurnales des niveaux de cortisol plasmatique et, d'autre part, d'augmenter rapidement la production de cortisol en situation de stress émotionnel ou physique.

Suite à des stimuli nerveux, la CRH (Corticotropin Realeasing Hormone) est libérée par l'hypothalamus. La CRH à son tour, stimule la production de POMC (Pro-OpioMélanoCortine) par les cellules corticotropes de la glande pituitaire. Le clivage protéolytique de POMC conduit à la libération d'ACTH. L'ACTH permet d'une part, de contrôler les variations diurnes des niveaux de cortisol plasmatique et, d'autre part, d'augmenter rapidement la sécrétion de cortisol en situation de stress émotionnel ou physique. Au niveau des cellules surrénaliennes, l'ACTH se lie au récepteur transmembranaire MC2R

(MelanoCortin 2 Receptor), essentiellement exprimé au niveau du cortex surrénalien. Ce récepteur, provoque l'activation de la voie de signalisation AMPc/PKA (Novoselova et al., 2013; Zhu and Birnbaumer, 1996) qui conduit à la transcription des gènes de la stéroïdogenèse.

Les patients porteurs d'une mutation du gène *MC2R* responsable d'une résistance à l'ACTH présentent une insuffisance en glucocorticoïdes à l'origine du syndrome (FGD : familial glucocorticoid deficiency) (Clark et al., 1993). Des mutations du gène *MRAP* (Melanocortin 2 Receptor Accessory Protein), petite protéine transmembranaire essentielle pour l'adressage de MC2R à la membrane plasmique, ont également été mises en évidence chez les patients atteints de FGD (Metherell et al., 2005).

Le récepteur MC2R est couplé à une protéine G à 7 domaines transmembranaires. La protéine G, elle-même, est composée de trois sous-unités: α, ß, γ. La liaison de l'ACTH à son récepteur induit un changement de conformation de celui-ci, permettant à la sous-unité Gα de fixer du GTP (Guanosine TriPhopshate). Gα est alors active. Elle se dissocie des sous-unité Gß et Gγ et stimule l'adénylate cyclase qui à son tour transforme l'ATP (Adénosine TriPhosphate) en AMPc, un messager secondaire, activateur de la PKA (Sunahara et al., 1996). Les concentrations intracellulaires d'AMPc sont finement régulées par les PDEs (Phosphodiestérases) qui assurent l'hydrolyse de l'AMPc afin d'inhiber la voie AMPc/PKA (Soderling and Beavo, 2000; Taskén and Aandahl, 2004).

La PKA est une sérine thréonine kinase impliquée dans la prolifération, la différenciation et d'autres processus cellulaires. Elle est composée de quatre sous-unités: deux sous-unités régulatrices, chacune liée à une sous-unité catalytique. Il existe quatre sous-unités régulatrices, RIα, RIß, RIIα et RIIß, et quatre sous-unités catalytiques, Cα, Cß, Cγ et Prkx. Selon le type de sous-unités régulatrices mis en jeu, deux isoformes de PKA sont décrites : PKA-I (sous-unité de RIα ou RIß) et PKA-II (sous-unité RIIα ou RIIß). Les sous-unités régulatrices possèdent une affinité différente pour les molécules d'AMPc : l'holoenzyme de type I présente plus d'affinité que celle de type II. Au-delà de la composition de l'holoenzyme, la localisation cellulaire de la PKA joue un rôle important dans les

choix des substrats phosphorylés. Ce contrôle de localisation est réalisé par les protéines d'ancrage AKAP (Akinase anchor protein) associées aux sous-unités régulatrices de la PKA (Wong and Scott, 2004). L'ensemble de ces mécanismes de régulation et l'expression différentielle en fonction des types cellulaires des sous-unités de la PKA, assurent une diversité et une spécificité de réponse à l'AMPc (Taskén and Aandahl, 2004).

Dans la surrénale, les deux isoformes PKA-I et PKA-II sont exprimées. Cependant, il semble y avoir une expression différentielle en fonction des zones du cortex (Weigand et al., 2017). La liaison de molécules d'AMPc aux sous-unités régulatrices de la PKA, permet de libérer les sous-unités catalytiques (Mcknight et al., 1988). Une fois libérées, les sous-unités catalytiques sont alors capables de phosphoryler de nombreux facteurs de transcription impliqués dans l'expression des enzymes de la stéroïdogenèse. Parmi ses cibles, la PKA peut phosphoryler CREB sur sa sérine 133, entrainant la fixation de CREB sur des éléments de réponse CRE et le recrutement du co-activateur CBP (CRE Binding Protein) (Terzolo et al., 2007). Les éléments CRE sont retrouvés dans le promoteur de certains gènes de la stéroïdogenèse, notamment du transporteur de cholestérol *StAR* dont l'expression est stimulée par l'activation de la PKA. Il existe d'autres combinaisons de facteurs de transcription qui agissent sur un gène donné en réponse à l'AMPc. Parmi ces facteurs on retrouve par exemple, Sf1 (Steroidogenic Factor 1), CREM (CRE Modulator), C/EBPs (CCAAT/Enhancer-Binding Proteins) et AP-1 (Activator Protein 1). En réponse au système ACTH/AMPc, ils vont agir sur l'expression de certains gènes de la stéroïdogenèse impliqués dans la production de glucocorticoïdes tels que *CYP11A1* (Ahlgren et al., 1999; Hoekstra et al., 2013) et *Akr1b7* dont l'expression est régulée par le facteur de transcription Sp1 (Selective promoter factor 1). Le récepteur nucléaire orphelin Sf1 va lui réguler l'expression de *CYP11A1*, *CYP11B1, CYP21* et *Akr1b7* (Val et al., 2003).

La localisation intra-cellulaire de la PKA joue un rôle important dans le choix des substrats phosphorylés. Le contrôle de cette localisation est assuré par les protéines d'ancrage AKAP (A-Kinase Anchor Protein), associées aux sous-unités régulatrices de la PKA. Il existe une multitude d'AKAP exprimées de manière

différente selon le tissu considéré, et localisées de manière spécifique au sein de la cellule (Wong and Scott, 2004). Dans les cellules corticosurrénaliennes, la protéine ACBD3 (Acyl-Coenzyme A Binding Domain containing 3) est fortement exprimée. ACBD3 est une AKAP qui permet de cibler un pool d'enzyme PKA à la mitochondrie afin de réguler le transport du cholestérol (Li et al., 2001). De même, l'AKAP13 (ou AKAP-Lbc) est exprimée dans les cellules corticosurrénaliennes dans lesquelles elle stimule la production de glucocorticoïdes (Escajadillo and Sewer, 2014). OPA1 est une AKAP qui est exprimée à proximité des mitochondries dans les cellules H295R. Son invalidation induit une réduction de la production d'aldostérone (Fülöp et al., 2013). Ces données indiquent que les AKAP participent également au contrôle de la stéroïdogenèse, afin de permettre une régulation fine de la synthèse de glucocorticoïdes par les cellules de la zone fasciculée du cortex surrénalien.

c. *Régulation de la synthèse d'androgènes*

La zone réticulée, essentiellement retrouvée chez les primates, est la source de précurseurs d'androgènes (DHEA et son dérivé sulfaté DHEA-S). Elle produit également de faibles quantités de glucocorticoïdes. Les androgènes peuvent ensuite être convertis en testostérone et DHT au niveau des tissus périphériques. La régulation de la sécrétion des androgènes surrénaliens reste à ce jour moins caractérisée que celle des autres hormones.

Des études suggèrent que le cortisol et l'ACTH jouent un rôle dans le contrôle de leur sécrétion. En effet, il existe une corrélation entre les variations du taux de cortisol au cours du rythme circadien et la concentration des androgènes surrénaliens (Hatano et al., 1996) . Des cofacteurs comme le cytochrome b5 favorisent la sécrétion d'androgènes en stimulant CYP17 (Storbeck et al., 2013). Certaines études soulignent l'importance de la phosphorylation de CYP17 par les acteurs de la signalisation Rock/Rho augmentant l'activité 17, 20 lyase (Tee et al., 2008).

- *Conclusion*

Emotionnels (peur, colère…) ou physiques (détresse respiratoire, hypovolémie…), les facteurs de stress amènent l'hypothalamus à activer d'une part, le cortex surrénalien, par l'intermédiaire de signaux hormonaux et d'autre part la médulla, par l'intermédiaire d'influx nerveux sympathiques. Dans les cellules du cortex surrénalien, le messager de l'axe hypothalamo-hypophysaire, l'ACTH, exerce des actions multiples et coordonnées sur les fonctions endocrines en agissant sur la stéroïdogenèse et sur la biodisponibilité du cholestérol (import, transport, biosynthèse endogène). Ce contrôle est effectué par l'intermédiaire de la PKA, considérée comme la signalisation effectrice.

L'axe HPA, permet la synthèse rapide des glucocorticoïdes et, dans une moindre mesure, celle des minéralocorticoïdes. Le contrôle du transport semble être un point clé additionnel dans la réponse au stress permise par l'axe HPA. L'adaptation correcte des fonctions surrénaliennes est centrale dans la réponse au stress et, comme tout système intégré, le rétrocontrôle négatif exercé par les glucocorticoïdes sur la production d'ACTH permet à l'axe HPA d'assurer un retour à l'homéostasie.

II. Les tumeurs du cortex surrénalien

Les tumeurs de la cortico-surrénale sont des tumeurs assez hétérogènes. Elles présentent des caractéristiques distinctes cliniques, morphologiques ainsi que moléculaires (Mete et al., 2018). Elles peuvent être unilatérales ou bilatérales et sont classées sous deux catégories, les adénomes (tumeurs bénignes ou hyperplasies) et les carcinomes (tumeurs malignes). Qu'elle soit bénigne ou maligne, la tumeur peut être soit silencieuse, *i.e* ne produisant pas un excès d'hormones, soit fonctionnelle, sécrétant une ou plusieurs hormones cortico-surrénaliennes en excès. Selon l'hormone sécrétée en excès, les tumeurs sécrétantes sont à l'origine de trois syndromes : syndrome de Cushing (excès de glucocorticoïdes), syndrome de Conn (excès d'aldostérone) et syndrome virilisant (excès d'androgène). La majorité des tumeurs est non-sécrétante et bénigne (Kerkhofs et al., 2015; Latronico and Chrousos, 1997).

A. Les tumeurs bénignes

1. Les adénomes cortico-surrénaliens

Les adénomes représentent 80% des tumeurs du cortex surrénalien. Dans la population générale, la prévalence des adénomes cortico-surrénaliens (ACS) est de 1 à 7% (Vezzosi et al., 2010). Ils sont majoritairement non-sécrétants et unilatéraux. Environ 5% des ACS sont à l'origine d'une sécrétion de cortisol, plus rarement, 1 à 3% sont à l'origine d'une hypersécrétion d'aldostérone (Boland et al., 2008; Mansmann et al., 2004).

a. Les adénomes producteurs de cortisol

Les tumeurs bénignes unilatérales sont la cause la plus fréquente des Cushing surrénaliens (Lerario et al., 2014). Introduit par le scientifique Harvey Cushing d'où son appellation, ce syndrome est caractérisé par un excès de production de cortisol. Une de ses principales manifestations cliniques est le

développement rapide d'une obésité centrale ou facio-tronculaire (Loriaux, 2017). La cause principale de ce syndrome est iatrogène, liée à une exposition chronique aux glucocorticoïdes pour leurs actions anti-inflammatoires et immunosuppressives (Lacroix et al., 2015). Il existe deux causes de Cushing endogène. La plus fréquente est la présence d'un adénome hypophysaire sécrétant de l'ACTH (80-85%) qui conduit à une hyperactivité endocrine de la zone fasciculée, associée avec un hypercortisolisme. On parle alors de Cushing dépendant de l'ACTH ou de maladie de Cushing. Rarement, la maladie de Cushing peut aussi résulter d'une sécrétion extra-hypophysaire d'ACTH par des tumeurs telles que des cancers du poumon à petites cellules (Araujo Castro et al., 2018).

La deuxième cause de Cushing endogène (15-20%), appelé syndrome de Cushing est lié à une hyperactivité autonome de la surrénale (indépendante de l'ACTH), causée par des hyperplasies ou des tumeurs (adénomes ou carcinomes) de la cortico-surrénale (Guaraldi and Salvatori, 2012). Dans ce cas, les principales altérations moléculaires décrites conduisent à une activation de la voie de signalisation AMPc/PKA conduisant à une hypersécrétion de cortisol. Les mutations les plus fréquentes dans les adénomes cortisoliques (37-65,5%), sont des mutations somatiques du gène *PRKACA* codant la sous unité catalytique (Cα) de la PKA (Beuschlein et al., 2014; Cao et al., 2014; Sato et al., 2014). Cette mutation induit la substitution d'une leucine en arginine en position 206 (L206R) (Beuschlein et al., 2014; Goh et al., 2014; Sato et al., 2014). La substitution L206R pourrait altérer l'interaction de la sous-unité catalytique avec la sous-unité régulatrice. Afin de valider cette hypothèse, des expériences d'immunoprécipitation ont été réalisées après expression de la forme mutante de Cα, en culture cellulaire. Alors que Cao et ses collaborateurs n'ont pas montré de perte d'interaction Cα/sous-unité régulatrice, celle-ci a été mise en évidence par les deux autres équipes ayant réalisé ces expériences (Cao et al., 2014; Goh et al., 2014; Sato et al., 2014). Dans tous les cas, une augmentation de l'activité de la PKA pouvant expliquer l'augmentation de l'activité endocrine de ces tumeurs a été démontrée. Toutefois, le rôle de l'augmentation d'activité de la voie PKA dans l'augmentation de prolifération à l'origine de la formation des adénomes est

difficile à établir. En effet, les études sur l'action mitogène de la signalisation ACTH/PKA montrent alternativement des effets positifs (Lotfi and Armelin, 1998; Pignatelli et al., 2002) ou négatifs (Mattos et al., 2011) sur la prolifération, sans pour autant fournir d'explications à ces résultats contradictoires. Des études *in vivo* sont donc requises pour déterminer l'implication des mutations activatrices de la sous-unité Cα dans le développement des adénomes cortisoliques.

b. Les adénomes producteurs d'aldostérone

Les adénomes producteurs d'aldostérone (APA) sont la seconde cause d'hyperaldostéronisme primaire (Fagugli and Taglioni, 2011). L'hyperaldostéronisme primaire est caractérisé par une dérégulation de la synthèse d'aldostérone, d'origine surrénalienne, conduisant à une hypertension artérielle sévère et une hypokaliémie fréquente (Mete et al., 2018).

Les mécanismes moléculaires à l'origine du développement des adénomes producteurs d'aldostérone ne sont pas totalement élucidés. Des mutations somatiques ont été identifiées dans le gène *KCNJ5*, codant le canal potassique Kir3.4 (Boulkroun et al., 2012; Choi et al., 2011). Ces mutations sont retrouvées dans 34% des APA (129/380 APA) (Boulkroun et al., 2012). Des analyses in vitro ont permis de montrer que ces mutations sont à l'origine d'une perte de sélectivité de ces canaux pour le potassium (Choi et al., 2011). Ainsi les canaux mutés permettent l'entrée de sodium, entrainant une dépolarisation de la membrane à l'origine de l'activation des canaux calciques. L'accumulation de calcium intracellulaire résultante, active la cascade de signalisation aboutissant à la transcription des enzymes de synthèse d'aldostérone. Des mutations ont également été identifiées dans les gènes codant des ATPases de type P, *ATP1A1* et *ATP2B3* présentes dans 5.2% (16/380 APA) et 1.6% (5/380 APA) des APA respectivement (Beuschlein et al., 2013). ATP1A1 code une sous-unité α (sous unité catalytique) d'une ATPase Na+/K+ (pompe sodium-potassium). L'hydrolyse d'ATP permet à ATP1A1 l'échange de sodium cytoplasmique contre du potassium extracellulaire (Al-Salameh et al., 2014). Les analyses in vitro ont montré que les mutants du gène *ATP1A1* présentent une perte de l'activité de pompe et une

réduction de l'affinité pour le potassium (Beuschlein et al., 2013). Cela entraine une dépolarisation de la membrane, suivie d'une ouverture des canaux calciques. ATP2B3 code pour une ATPase Ca2+ (pompe calcique), essentielle pour la sortie du calcium intracellulaire (Al-Salameh et al., 2014). Ces mutations seraient donc à l'origine d'un défaut d'excrétion de calcium. Ainsi, les mutations touchant les gènes *ATP1A1* et *ATP2B3* entrainent une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire, conduisant à une hyperaldostéronemie. L'ensemble de ces mutations (KCNJ5, ATP1A1 et ATP2B3) représente environ 40% des APA.

Une activation de la voie Wnt/ß-caténine est détectée dans 70% des APA (33/47 APA). Cette activation est associée soit à une diminution de l'expression de SFRP2 (Secreted Frizzled Related Protein) (Berthon et al., 2014), un inhibiteur de la signalisation Wnt/ß-caténine, soit à des mutations activatrices de CTNNB1 (Åkerström et al., 2016). In vivo, l'activation constitutive de la ß-caténine est capable de stimuler la prolifération cellulaire et de conduire à la formation de tumeurs productrices d'aldostérone (Berthon et al., 2010), confirmant l'implication de cette voie dans l'étiologie de l'hyperaldostéronisme primaire. D'un point de vue mécanistique, la ß-caténine est capable de stimuler directement ou par l'intermédiaire des facteurs NURR1 et NUR77 la transcription de AT1R et CYP11B2, induisant une production accrue d'aldostérone (Berthon et al., 2014). Ces résultats suggèrent que l'activation constitutive de la signalisation ß-caténine, pourrait conduire au développement d'une partie des APA. De plus, l'effet proliferatif de l'activation de la □-caténine pourrait expliquer le développement des adénomes alors que les mutations de KCNJ5 et l'influx de calcium s'opposent à la prolifération des cellules corticosurrénaliennes. Ainsi, le développement des APA pourrait être un processus multi-étapes nécessitant à la fois une dérégulation des flux ioniques et une activation de voies pro-proliferatives, telles que la voie WNT.

2. Les hyperplasies cortico-surrénaliennes

a. *Les hyperplasies micronodulaires pigmentées*

Les hyperplasies micronodulaires pigmentées (Primary Pigmented Nodular Adrenal disease ou PPNAD) sont une rare étiologie du syndrome de Cushing indépendant de l'ACTH. Les deux surrénales sont atteintes et sont caractérisées par la présence de nombreux nodules pigmentés. Le PPNAD peut être sporadique ou observé dans le cadre du complexe de Carney (CNC), un syndrome multi-néoplasique caractérisé par une hyperactivité endocrine (Korpaisarn et al., 2017). La prévalence du PPNAD chez les patients touchés par le CNC est de 60% approximativement (Stratakis, 2000).

Une mutation au niveau du gène *PRKAR1A* est détectée chez 73% des patients atteints du CNC, ce gène codant la sous-unité régulatrice RIα de la PKA (Groussin et al., 2002; Kirschner et al., 2000; Tirosh et al., 2017). Les souris AdKO, invalidées pour cette sous-unité, spécifiquement dans la surrénale (Dumontet et al., 2018; Sahut-Barnola et al., 2010a) développent un syndrome de Cushing indépendant de l'ACTH. Toutefois, cet hypercorticisme ne résulte pas du développement de micronodules, mais d'une hyperplasie corticale associée à l'émergence d'une zone « réticulée-like » dans la partie interne du cortex. Cette zone est dérivée des cellules définitives du cortex, exprime l'ensemble des marqueurs caractéristiques de la réticulée dont le Cytb5 et Cyp17 et produit à la fois de la corticostérone, du cortisol et de la DHEA (Dumontet et al., 2018). Les 27% de cas restants peuvent être causés par des mutations dans les gènes codant les phosphodiestérases *PDE8B* et *PDE11A*, également impliquées dans l'inhibition de la signalisation AMPc/PKA (Almeida and Stratakis, 2010).

b. *Les hyperplasies macronodulaires bilatérales*

Les hyperplasies macronodulaires bilatérales (Primary bilateral macronodular adrenal hyperplasia ou PBMAH) sont des causes très rares du syndrome de Cushing endogène (moins de 2%) (Jin et al., 2018; Lacroix, 2009). Elles sont caractérisées par la présence de plusieurs macronodules bilatéraux.

Dans certains cas, les PBMAH peuvent être asymétriques et parfois unilatérales (Bonnet-Serrano and Bertherat, 2018). Les PBMAH étaient connues sous le nom d'AIMAH (ACTH-independant macronodular adrenal hyperplasia), une appellation devenue rapidement obsolète après la mise en évidence d'une synthèse intra-surrénalienne de l'hormone corticotrope, en partie responsable de l'hypercorticisme indépendant de l'ACTH hypophysaire (Louiset et al., 2013; Yu et al., 2018). Au-delà de la production intrasurrénalienne d'ACTH, ces hyperplasies sont aussi caractérisées par une expression anormale de récepteurs couplés aux protéines G. Ainsi, des récepteurs tels que le récepteur GIP (Gastric inhibitory polypeptide) normalement absent du cortex surrénalien, sont exprimés dans certaines de ces hyperplasies, conduisant à un Cushing dépendant de l'alimentation. On retrouve également d'autres récepteurs comme le récepteur LH/HCG responsable d'un syndrome de Cushing gravidique et post-ménopausique (Lacroix et al., 1999), les récepteurs à la vasopressine, aux catécholamines, à la sérotonine 5-HT , à l'angiotensine II (ang II) et au glucagon (Gagliardi et al., 2009; Hofland et al., 2013; Lee et al., 2005; Lefebvre et al., 1998; Libé et al., 2010; Miyamura et al., 2002; Vezzosi et al., 2007). Ces récepteurs ectopiques et eutopiques, présents dans 70% à 87% des PBMAH (Hofland et al., 2013; Libé et al., 2010), permettent la synthèse de cortisol en mimant la signalisation intracellulaire déclenchée par la liaison de l'ACTH à MC2R (Lacroix et al., 2010).

Des altérations des acteurs de la voie cAMP/PKA ont été également observées au sein des PBMAH avec notamment des mutations germinales inhibitrices (délétions) de PDE11A qui sont retrouvés avec une prévalence de 24% à 28% (Libé et al., 2008; Vezzosi et al., 2012).

Des approches génomiques récentes ont identifié des mutations inactivatrices d'un gène suppresseur de tumeur dans cette hyperplasie : *ARMC5* (Armadillo repeat containing 5) (Assié et al., 2013; Bourdeau et al., 2016; Suzuki et al., 2015). L'analyse par séquençage direct a mis en évidence des mutations inactivatrices chez 55% des patients. Ces altérations somatiques, variables suivant les nodules (Albiger et al., 2017; Espiard et al., 2015) sont associées à des altérations germinales chez l'ensemble des patients testés. Alors que les patients

présentent une hypersécrétion de cortisol, l'inactivation de ARMC5 in vitro par des siARN conduit à une diminution d'expression des enzymes de la stéroïdogenèse qui est cohérente avec la diminution d'expression de ces enzymes dans les PBMAH (Antonini et al., 2006). Ces résultats indiquent que l'hyperactivité endocrine ne peut pas résulter d'une augmentation de l'activité de stéroïdogenèse par unité cellulaire. Alors que la protéine ARMC5 sauvage est capable d'induire l'apoptose des cellules H295R, les formes mutantes trouvées chez les patients ont perdu cette capacité (Assié et al., 2013). Ceci suggère que l'augmentation d'activité endocrine résulte d'une augmentation du nombre de cellules plutôt que de leur activité individuelle. En accord avec cette hypothèse, les patients porteurs de mutations ARMC5 présentent des nodules plus larges et plus nombreux en comparaison avec les patients non mutés (Albiger et al., 2017; Espiard et al., 2015). Chez les souris KO ARMC5, des analyses ont montré que ces dernières présentaient des surrénales plus grosses dépourvues de nodules et une hypersécrétion de glucocorticoïdes (Berthon et al., 2017; Hu et al., 2017).

D'autres gènes peuvent être impliqués dans ces pathologies telles que DOT1L et HDAC9. Codant pour une méthyltransférase et une histone déacetylase respectivement, ces deux gènes induisent alors des modifications au niveau des histones et de la chromatine, dérégulant ainsi la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire (Cao et al., 2014).

B. Les corticosurrénalomes

Les cancers de la corticosurrénale ou corticosurrénalomes (CCS), sont des tumeurs agressives de mauvais pronostic avec un taux de survie à 5 ans inférieur à 15% pour les patients métastatiques (80% des patients) (Libé, 2015). Les tumeurs peuvent être bilatérales dans 2 à 10% des cas, mais il est difficile de savoir si la masse controlatérale est une tumeur indépendante ou une métastase de la tumeur originaire de l'autre surrénale (Nikoleishvili et al., 2018). Le traitement actuel des CCS repose sur la chirurgie de la tumeur primaire. Toutefois, seuls les patients présentant une résection R0 ont de bonnes chances de survie. Pour les autres, le seul traitement de référence validé repose sur

Critères histologiques	Poids du critère	Somme des poids
Grade nucléaire III ou IV *	1	
Mitoses ≥ 6 pour 50 champs à x 400	1	
Présence de mitoses atypiques	1	
Architecture diffuse >33% surface	1	Score de Weiss <3: tumeur bénigne
Cellules claires ≤25%	1	
Présence de zones de nécrose confluentes	1	Score de Weiss ≥3: tumeur maligne
Invasion veineuse	1	
Invasion sinusoïdale	1	
Infiltration capsulaire	1	

Figure 13: Score de Weiss.
*Grade nucléaire
I : Noyau arrondi d'environ 10µm de diamètre, nucléole absent ou peu visible
II : Noyau arrondi un peu irrégulier de 15µm de diamètre, nucléole visible mais petit
III : Noyau très irrégulier d'environ 20µm de diamètre avec nucléole large et proéminent
IV : Noyau multilobé de plus de 20µm de diamètre avec nucléole proéminent et chromatine irrégulière.

l'utilisation d'un agent adrénolytique, le mitotane en monothérapie ou associé à des chimiothérapies lourdes. Ces approches n'ont malheureusement aucun effet thérapeutique à long terme (Libé, 2015).

1. Epidémiologie

Le CCS est une tumeur extrêmement rare avec une incidence estimée entre 0,7 et 2 par million d'habitants par an (Allolio and Fassnacht, 2006; Fassnacht et al., 2013). Les CCS surviennent à tous les âges avec un pic d'incidence observé entre 40-50 ans (Fassnacht and Allolio, 2009a). L'incidence est plus élevée chez les femmes avec un sexe ratio de 1,5-2,5/1. Un pic d'incidence est également présent chez l'enfant. Ce pic d'incidence dans l'enfance peut être expliqué par l'occurrence d'une mutation germinale p.R337H du gène *TP53* fréquemment retrouvé chez les enfants vivant dans le Sud du Brésil (Figueiredo et al., 2006; Pianovski et al., 2006). En dehors des prédispositions génétiques, aucun facteur de risque n'a été clairement identifié.

2. Diagnostic

Afin d'établir une base adéquate pour les décisions de traitement, les rapports pathologiques de diagnostic se basent sur le score de Weiss, le statut de résection <R> et l'index de prolifération ki67.

L'analyse histologique de la tumeur permet de de classer les tumeurs surrénaliennes selon leur potentiel malin et leur agressivité. Cette discrimination repose sur le Score de Weiss (Figure 13). Ce score est basé sur 9 critères histologiques. La présence de 3 ou plus de ses critères évoque la malignité de la tumeur (Lau and Weiss, 2009). Une ambiguïté persiste pour des scores de 2 ou 3. Quelques cas de tumeurs ayant un score égal à 3 présentaient un comportement bénin.

Au niveau des CCS non métastatiques, la résection R0 reste la seule intervention garantissant un meilleur pronostic (Bilimoria et al., 2008). Une résection incomplète microscopique (R1) ou macroscopique (R2) sont associées à

Stade	
I	Tumeur localisée de moins de 5cm
II	Tumeur localisée de plus de 5cm
III	Quelle que soit la taille de la tumeur, présence de ganglions métastatiques et/ou d'une infiltration atteignant les organes de voisinage (tissu adipeux, veine cave, veine rénale)
IV	Quelle que soit la taille de la tumeur, présence de métastases à distance

Figure 14: Classification ENSAT.

des taux de survie assez faibles, 20 et 15% respectivement (Bilimoria et al., 2008).

L'index de prolifération nucléaire Ki67, peut permettre de distinguer une tumeur bénigne d'une tumeur maligne. Il est quasi nul dans les surrénales saines et les adénomes mais élevé dans les CCS. Un index de prolifération Ki67 >5% est associé à un risque de récidive plus élevé (Beuschlein et al., 2015).

D'une manière similaire, la surexpression de certains acteurs du cycle cellulaire tels que la cycline E, la cycline D1, et p27 est corrélée à la malignité et au mauvais pronostic des tumeurs surrénaliennes (Pereira et al., 2013; Tissier et al., 2004). Dans de rares cas où l'analyse en coloration hématoxyline-éosine (HE) n'est pas suffisante pour un bon diagnostic, l'expression de certains marqueurs peut alors être étudiée. Les CCS expriment typiquement SF-1 (steroidogenic factor 1), un marqueur spécifique du cortex surrénalien, dont la surexpression protéique a été corrélée à un mauvais pronostic (Duregon et al., 2013).

Bien que le score de Weiss reste actuellement le gold standard pour classer ces tumeurs, l'utilisation de nouveaux marqueurs et notamment de l'index de prolifération et la cycline E permettent d'affiner le diagnostic et de prédire le "potentiel de malignité".

La classification ENSAT (European Netwok for the Study of Adrenal Tmours) de 2008 définit 4 stades reposant sur la taille de la tumeur et l'existence de métastases (Fassnacht and Allolio, 2009a). Cette classification se base sur des critères pronostiques permettant de différencier les CCS. Ainsi, la survie spécifique à 5 ans est comprise entre 66 et 82% pour le stade I, 58 et 64% pour le stade II, 24 et 50% pour le stade III et 0 et 17% pour le stade IV (Libé, 2015) (Figure 14).

3. Traitements

La résection chirurgicale «complète» R0 de la tumeur primitive est le seul traitement curatif du CCS. Le statut R0 présente une meilleure survie globale à 5 ans par rapport au statut R1 ou R2 (50% vs 20% vs 15%) (Bilimoria et al., 2008). Malgré une résection complète, le risque de récidive reste important,

notamment en cas d'index de prolifération Ki67 élevé et/ou de stade III (Baudin and Endocrine Tumor Board of Gustave Roussy, 2015; Bellantone et al., 1997). Une thérapie adjuvante au mitotane a pour objectif de diminuer ce risque. Le mitotane est un dérivé d'insecticide (le DichloroDiphenylTrichloroethane ou DDT) qui a un effet cytostatique sur les cellules cortico-surrénaliennes.

Plusieurs études rétrospectives démontrent que le mitotane allonge significativement la survie sans progression et la survie globale des patients porteur d'un CCS avec résection chirurgicale complète (Terzolo et al., 2007). Compte tenu de l'activité adrénolytique du mitotane, un traitement par glucocorticoïdes (hydrocortisone) doit être administré pour éviter l'insuffisance surrénalienne aigue. L'association à un traitement par minéralocorticoïdes peut parfois être nécessaire. L'inconvénient de ce traitement est qu'il doit être surveillé par des dosages de mitotanémie. En effet, l'efficacité thérapeutique cytotoxique est obtenue pour un taux plasmatique > 14 mg/l (Hermsen et al., 2011). Ses effets secondaires nombreux, digestifs, neurologiques, ophtalmologiques, et biologiques nécessitent une surveillance.

Le mode d'action du mitotane reste mal compris, mais plusieurs études désignent la mitochondrie comme organite cible (Hescot et al., 2013; Poli et al., 2013). Ce composé adrénolytique exerce un effet inhibiteur sur la stéroïdogenèse en inhibant les enzymes CYP11A1, CYP11B1 et CYP11B2 (Hescot et al., 2013). Bien que certaines études ne montrent pas la diminution de l'expression des gènes codant pour les enzymes mitochondriales, d'autres indiquent une suppression de différents gènes tels que *HSD3B1*, *HSD3B2* et *CYP21A2* (Zsippai et al., 2012), *CYP11A1* et *CYP17A* (Lehmann et al., 2013), ainsi que *StAR*, *CYP11A1*, *HSD3B2*, et *CYP11B2* dans la lignée H295R (Hescot et al., 2013). Ces résultats offrent une hypothèse sur les causes potentielles de l'inhibition de la stéroïdogénèse suite à un traitement avec le mitotane mais restent difficiles à concilier.

Poli et al, ont montré que cet agent lipophile inhibe l'expression de VDAC (voltage-dependent anion channel) (Poli et al., 2013). Les VDAC (VDAC1, VDAC2 et VDAC3) sont des protéines qui forment des pores dans la membrane externe des mitochondries de tous les eucaryotes d'où leur nom de « porines ». Il assurent

la stabilisation de StAR, permettant ainsi le transport mitochondrial du cholestérol (Bose et al., 2008) ce qui offre une autre hypothèse sur les mécanismes par lesquels le mitotane pourrait inhiber la synthèse des stéroïdes. Plus particulièrement VDAC1, une des isoformes de cette famille, est considéré comme facteur pro-apoptotique en augmentant la perméabilité de la mitochondrie au flux calcique (De Stefani et al., 2012). Plus récemment, l'équipe de Sbiera et al. a montré que le mitotane inhibe la synthèse du cholestérol en inhibant l'enzyme Sterol-O-Acyl Transferase 1 (SOAT1/ACAT1). Cet inhibition engendre un stress au niveau du réticulum endoplasmique, dû à une accumulation des lipides et résulte ainsi en une apoptose des cellules (Sbiera et al., 2015).

Récemment, il a également été montré que le mitotane était capable d'altérer les MAMs (Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes) qui sont des structures constituant des points de contact entre le réticulum endoplasmique et la mitochondrie. (Doghman-Bouguerra and Lalli, 2017 ; Hescot et al., 2017). Cette altération est associée à une diminution d'expression de protéines localisées dans les MAMs telles que ACAT1 et du transporteur putatif du cholestérol, TSPO, pouvant conduire à une augmentation intracellulaire de cholestérol intracellulaire libre. Le mitotane réduit également les interactions entre la mitochondrie et le réticulum endoplasmique. L'ensemble de ces actions pourrait induire un stress réticulaire, qui pourrait participer à l'induction de l'apoptose (Hescot et al., 2017).

Pour les CCS métastatiques qui sont non résécables dans 50% des cas, la chirurgie R0 n'est pas envisageable. Le traitement par mitotane est donc recommandé chez les patients avec un CCS stade III "avancé" avec une résection incomplète (R1 ou R2) ou stade IV (Baudin et al., 2015, Beruti et al., 2012). Une stratégie thérapeutique utilisant du mitotane et les chimiothérapies étoposide (inhibiteur de la topoisomérase II), platine (agent alkylant de l'ADN induisant la mort cellulaire), plus ou moins doxorubicine (antibiotique cytotoxique, agent intercalant au niveau de l'ADN) (Berruti et al., 1998) ou streptozotocine (agent alkylant de l'ADN) (Fassnacht et al., 2011) est associée aux meilleurs taux de réponse dans le traitement des CCS avancés. Toutefois, une étude sur une large

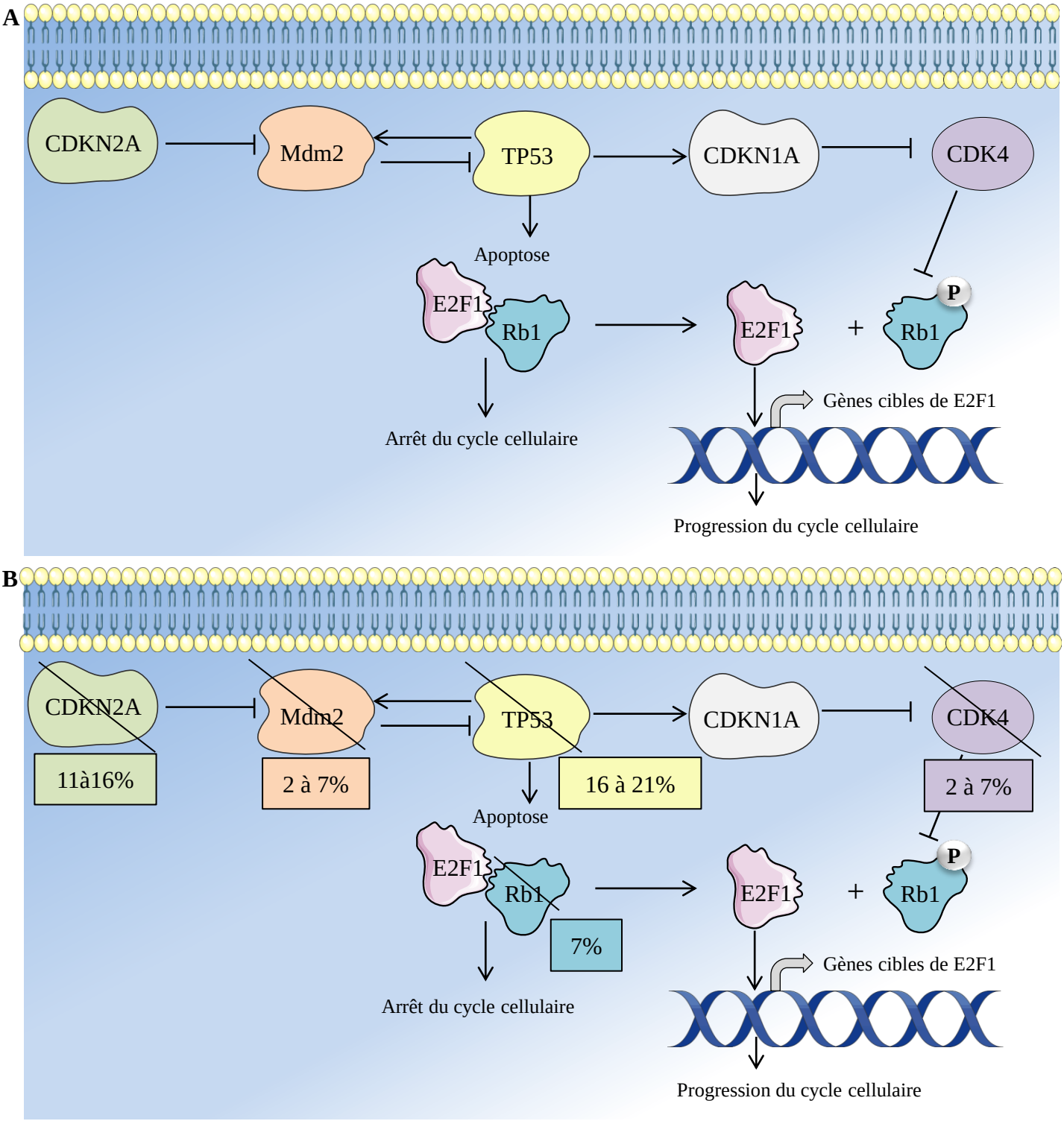


Figure 15: Voie de Signalisation p53.

A. En condition physiologique normale, la protéine P53 est rapidement dégradée par l'ubiquitine E3 ligase MDM2, qui cible sa dégradation par le protéasome. En condition de stress, MDM2 ne pourra plus lier P53. Cette dernière sera libérée, induit l'apoptose d'une part et agit comme facteur de transcription d'autre part, activant p21 (codé par CDKN1A) et entraînant ainsi l'arrêt du cycle cellulaire. P21 inhibe CDK4, qui d'habitude, inactive Rb en induisant sa phosphrylation, libérant ainsi le facteur de transcription E2F.

B. Altérations génétiques de la voie de signalisation p53 dans les CCS. Elles peuvent être soit des mutations inactivatrices de TP53, de CDKN2A, de Rb, soit des amplifications de MDM2 ou de CDK4.

cohorte a montré que le taux de réponse objective n'est que de 23,2% (35/151) avec une survie globale de 14,8 mois et une survie sans progression de 5 mois (Fassnacht et al., 2012). Il est donc nécessaire d'identifier les altérations conduisant au développement des CCS, afin de pouvoir développer des thérapies plus efficaces.

4. Physipathologie des voies de signalisation les plus altérées dans les CCS

a. *P53*

i. Régulation de P53

Le gène *TP53* code le suppresseur de tumeur p53 qui est inactivé ou altéré dans 50 à 55% des cancers humains. P53 est un facteur de transcription régulant un nombre important de gènes permettant aux cellules de répondre à différents types de stress et altérations (Riley et al., 2008). Ainsi, ce processus peut avoir plusieurs conséquences selon la sévérité des altérations comme l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, la sénescence ou encore l'apoptose (Riley et al., 2008).

En condition normale, la protéine p53 est présente en faible quantité et dispose d'une demi-vie courte. Cette régulation de p53 est assurée par une ubiquitine E3 ligase, MDM2 (Murine Double Minute 2 oncogene). MDM2 interagit avec p53 et permet sa translocation dans le cytoplasme (monoubiquitination) ou sa dégradation par le protéasome (polyubiquitination) (Lee and Gu, 2010). Dans des conditions de stress, la liaison p53 MDM2 est abolie, p53 est stabilisée et peut alors activer la transcription de nombreux gènes cibles impliqués dans différents processus cellulaires comme l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose (Riley et al., 2008). L'arrêt du cycle implique l'activation de p21 (codé par le gène *CDKN1*) par p53. P21 inhibe à son tour CDK4, impliquée dans des mécanismes d'inactivation de Rb. L'inactivation de Rb libère le facteur de transcription E2F1, entrainant l'activation de gènes cibles associés à la progression du cycle cellulaire. CDKN2A prévient la dégradation de p53 en codant pour les protéines ARF (Figure 15a).

ii. P53 dans les CCS

Les CCS peuvent survenir dans le cadre de syndromes héréditaires, tels que le syndrome de Li-Fraumeni (LFS). Le syndrome Li-Fraumeni se caractérise par une prédisposition génétique au cancer, rare mais assez dramatique. Il se transmet selon un mode autosomique dominant, et se manifeste par la survenue précoce de tumeurs malignes telles que les ostéo-sarcomes, les sarcomes des tissus mous, les cancers, les leucémies, les tumeurs cérébrales et les corticosurrénalomes (Bougeard et al., 2008; Mai et al., 2016; Malkin et al., 1990). Les mutations germinales de TP53 sont retrouvées dans 70% des familles LFS.
Des mutations *de novo* de TP53 ont également une prévalence de 7 à 20% selon les études (Wasserman *et al.* 2012, Mai *et al.* 2016). La prévalence des mutations germinales de TP53 est moins fréquente dans les CCS adultes (3,9% à 5.8%) (Espiard et al., 2015) par rapport aux CCS infantiles (50% à 90%) (Wasserman et al., 2015). Des altérations de TP53 ont été aussi identifiées au niveau somatique dans les CCS. Une perte d'hétérozygotie au locus 17p13 est très fréquente, observée dans 85% des CCS sporadiques mais dans moins de 15% des ACS (Gicquel et al., 2001; Soon et al., 2008). Toutefois, seulement 33% à 44% de ces CCS présentant une perte d'hétérozygotie au locus 17p13 sont touchés par une mutation du gène *TP53*, suggérant que *TP53* n'est pas le seul gène suppresseur de tumeur au niveau de ce locus (Libè et al., 2007). Dans l'ensemble des CCS, les mutations du gène *TP53* sont retrouvées dans environ 16% à 21% des tumeurs (Assié et al., 2014; Zheng et al., 2016) (Figure 15b). Les tumeurs présentant les mutations TP53 ont un phénotype plus sévère, un stade plus avancé de progression tumorale, ainsi qu'une faible survie globale sans récidive. Ces données suggèrent que p53 n'est pas un acteur majeur de l'initiation de la tumorigénèse cortico-surrénalienne mais qu'il agirait plutôt pour favoriser la progression et l'agressivité de ces tumeurs.

Des altérations d'autres acteurs de la voie de signalisation p53 sont retrouvées au niveau des CCS. PTTG1, codant pour la sécurine, un inhibiteur de TP53, est surexprimé dans 84% des CCS et sa surexpression a été associée à un mauvais pronostic (Demeure et al., 2013a). La perte de la protéine

rétinoblastome pRb est retrouvée dans 27% des CCS agressifs (Ragazzon et al., 2014) et 7% des patients de deux larges cohortes, présentaient des mutations de RB1 (Assié et al., 2014; Zheng et al., 2016). Des mutations inactivatrices ou des délétions de CDKN2A (retrouvées dans 11 à 16% des CCS), ainsi que des amplifications de CDK4 et de MDM2 (détectées dans 2 à 7% des cas) sont à l'origine des altérations de la signalisation p53 dans 33% à 45% des CCS (Assié et al., 2014; Zheng et al., 2016).

Afin d'évaluer le potentiel oncogénique de P53 dans la corticosurrénale, nous avons développé dans l'équipe, un modèle de tumorigenèse surrénalienne agressive. Ces souris expriment l'antigène T du virus simien 40 sous le contrôle du promoteur de *Akr1b7*, permettant son expression dans le cortex à partir de E13.5 (Ragazzon et al., 2006). Le pouvoir oncogénique de SV40 réside dans la capacité de l'AgT à séquestrer et inhiber p53 et Rb. Nous avons pu montrer que cette inhibition, conduit au développement progressif de CCS qui forment des métastases pulmonaires et hépatiques à partir de 6 à 8 mois (Batisse-Lignier et al., 2017). A ce jour, ces souris qui confirment l'implication de P53/Rb dans le développement du CCS, constituent le seul modèle murin de CCS métastatique.

b. Voie Wnt-ßcaténine

i. Régulation de la voie Wnt-ßcaténine

La signalisation Wnt-ßcaténine est une voie de signalisation impliquée dans de nombreux processus cellulaires tels que la prolifération ou la différenciation (MacDonald et al., 2009). Dans la surrénale adulte, elle est particulièrement impliquée dans l'établissement de la zonation fonctionnelle du cortex (Berthon et al., 2010; Drelon et al., 2016a) et dans la régulation de l'homéostasie du pool de progéniteurs et du renouvellement au travers de RSPO3 (Kim et al., 2008; Vidal et al., 2016).

L'activation de cette voie de signalisation est contrôlée par les ligands glycoprotéiques Wnt. On distingue la voie non canonique, impliquée, entre autres, dans l'établissement de la polarité planaire et dans la migration cellulaire (Clark, 2012; Gao et al., 2012) et la voie canonique (Niehrs, 2012), impliquant la

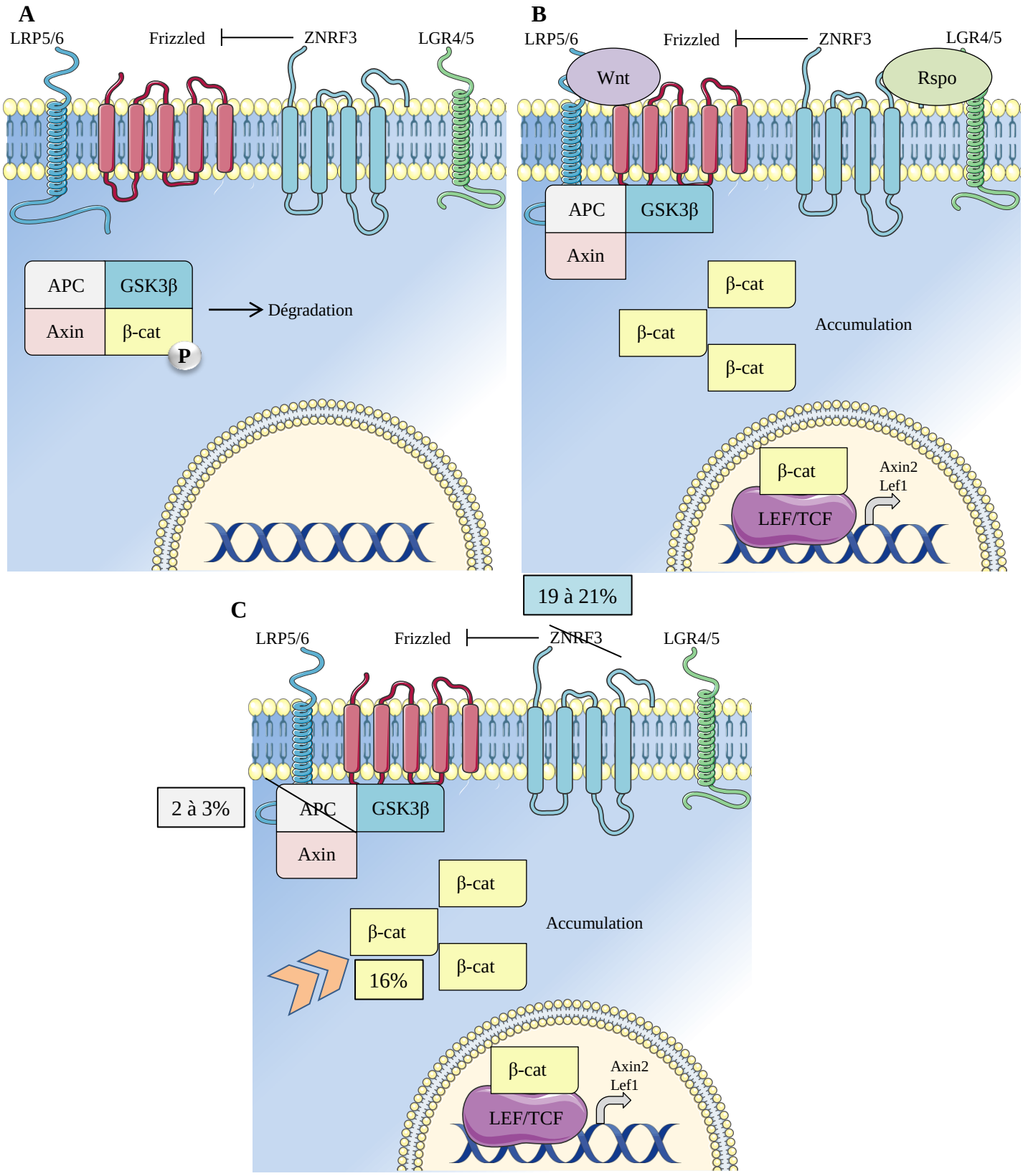


Figure 16: Voie de Signalisation Wnt/β-caténine.

A. En absence de ligands Wnt extracellulaires, le complexe de destruction empêche la β-caténine de s'accumuler, celle-ci étant phosphorylée, ubiquitinylée et dégradée par le protéasome. L'E3 ligase ZNRF3 ubiquitinyle Frizzled qui est dégradé par le protéasome.

B. En présence de ligands Wnt ou de Rspo, le complexe de destruction est recruté à la membrane, le récepteur Frizzled n'est plus dégradé et la b-caténine s'accumule dans le cytoplasme et le noyau, pour permettre la transcription de ses gènes cibles.

C. Altérations génétiques de la voie de signalisation Wnt/β-caténine dans les CCS, qui peuvent être soit des mutations activatrices de CTNNB1, soit des mutations inactivatrices de ZNRF3 ou de APC.

stabilisation de la ß-caténine et la transcription de ses gènes cibles. En absence de ligands Wnt extracellulaires, le pool de ß-caténine est maintenu à un faible niveau cytoplasmique grâce au complexe de destruction, composé de Axin/APC/Gsk3ß. Au sein de ce complexe, la ß-caténine est phosphorylée puis dégradée par le protéasome (Aberle et al., 1997). La fixation du ligand Wnt sur son récepteur Frizzled (Fzd) induit le recrutement du complexe de destruction au niveau du corécepteur membranaire LRP5/6. La ß-caténine s'accumule dans le cytoplasme et peut être dirigée vers le noyau. Elle interagit alors avec les facteurs de transcription LEF/TCF pour permettre la transcription de ses gènes cibles tels que l'*Axin2*, *Lef1* et *Birc5* (Figure 16b). Les E3 ubiquitines ligases membranaires ZNRF3 et RNF43, produites en réponse à l'activation de la voie WNT, induisent l'ubiquitinylation de Frizzled qui est dégradé par le protéasome (Figure 16a). Ceci conduit à une inhibition de la signalisation WNT dans une boucle de rétroaction. L'effet inhibiteur de ZNRF3 et RNF43 peut être neutralisé par les R-SPONDINS (RSPO1-3) en réponse à leur liaison aux récepteurs membranaires LGR4-6 (Barker et al., 2013; Hao et al., 2012; Lau et al., 2014).

ii. Intervention de la voie Wnt ß-caténine dans les CCS

Initialement décrite dans les polyposes familiales adénomateuses résultant de mutations de APC (Half et al., 2009), l'activation constitutive de la voie WNT/□-caténine est associée au développement de nombreux cancers (Ford et al., 2016; Half et al., 2009).

Une accumulation nucléocytoplasmique de la ß-caténine a été observée dans les tumeurs surrénaliennes, au niveau des adénomes (38% à 51%) et des carcinomes avec une prévalence de 39% (Bonnet et al., 2011; Gaujoux et al., 2011; Tissier et al., 2005). Cette accumulation anormale de la ß-caténine est associée à une surexpression des gènes cibles de la voie wnt/ß-caténine tels que *BIRC5*, *PTTG1*, *AXIN2* et *LGR5* au niveau des CCS (Assie et al., 2012). L'activation de la signalisation Wnt est corrélée à un mauvais pronostic (Gaujoux et al., 2011; Ragazzon et al., 2010), suggérant un rôle moteur de la voie dans la tumorigenèse du CCS.

Dans les CCS, les mutations somatiques du gène *APC* à l'origine de l'activation de la voie Wnt/ß-caténine sont rares (2% à 3%) (Assie et al., 2012; Zheng et al., 2016), suggérant l'intervention d'altérations d'autres acteurs de la voie. En effet, des mutations somatiques activatrices de la ß-caténine ont été trouvées avec une prévalence de 16% dans les CCS (Figure 16c) (Assie et al., 2012; Gaujoux et al., 2011; Zheng et al., 2016). Ces mutations touchent plus spécifiquement la sérine 45 de l'exon 3 du gène *CTNNB1*, au niveau du site consensus de phosphorylation par GSK3ß (Tissier et al., 2005). L'activation de la signalisation Wnt/ß-caténine trouvée chez 26% des patients en absence des mutations précitées, suggérait l'existence d'autres altérations (Gaujoux et al., 2011). L'analyse des gènes codant les protéines du complexe de destruction de la ß-caténine (*WTX*, *AXIN2*, *AXIN1*) n'as pas révélé d'altérations (Gaujoux et al., 2011; Guimier et al., 2013), à l'exception d'une délétion au niveau de l'exon 7 du gène *Axin2* qui a été identifiée dans un seul CCS parmi 6 (Chapman et al., 2011) et dans un seul CCS parmi 49 dans une étude menée par Guimier et al (Guimier et al., 2013). Plus récemment, des études OMICs ont identifié des altérations de ZNRF3 dans deux larges cohortes de CCS avec une prévalence de 21% (Assié et al., 2014) et de 19% (Zheng et al., 2016). Ces altérations consistent en des délétions homozygotes bialléliques ou des mutations hétérozygotes, souvent associées à des pertes d'hétérozygotie. Le transcriptome des tumeurs présentant des mutations de ZNRF3 montre une activation des gènes cibles de la voie ß-caténine mais cette activation reste plus légère que celle observée au niveau des tumeurs mutées pour CTNNB1. La sous expression de ZNRF3 a également été décrite dans le carcinome colorectal (Bond et al., 2016) et celui de la glande thyroïde (Qiu et al., 2016).

L'ensemble de ces données suggère un rôle clé de la voie de signalisation WNT/ß-caténine dans la tumorigenèse du CCS. En effet, les modèles murins d'activation constitutive de la ß-caténine développent des tumeurs surrénaliennes initialement bénignes, évoluant dans de rares cas et tardivement en carcinomes, suggérant l'intervention d'autres altérations aboutissant à l'agressivité de ces tumeurs (Berthon et al., 2010; Drelon et al., 2012; Heaton et al., 2012). De manière intéressante, nous avons également observé une activation spontanée de

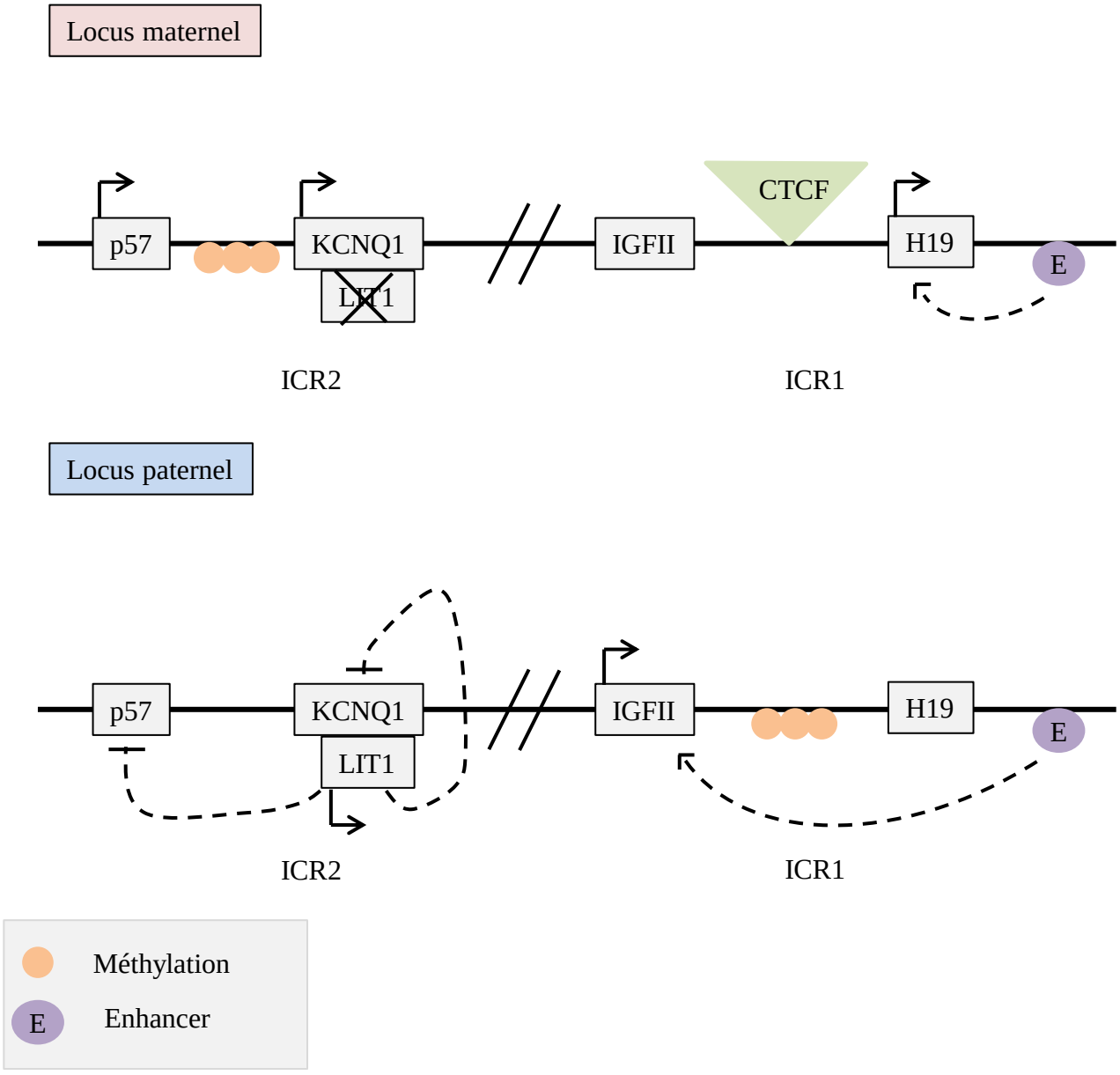


Figure 17: Organisation du locus11p15.5 chez l'Homme.
La région 11p15 est soumise à empreinte parentale et se divise en deux régions: ICR1 et ICR2. Ces deux régions sont inversement méthylées sur les allèles maternel et paternel. ICR1 n'est pas méthylé au locus maternel et recrute les protéines CTCF, bloquant l'action des enhancers sur IGF2. Au locus paternel, ICR1 est méthylé et ne lie pas CTCF. Les enhancers peuvent alors activer la transcription de IGF2. Au niveau de ICR2, le promoteur de LIT1 est méthylé au locus maternel, bloquant son expression, et les gènes p57kip2 et KCNQ1 s'expriment à partir de ce locus. Au locus paternel, LIT1 s'exprime et réprime l'expression de p57kip2 et KCNQ1. p57Kip2 code une protéine inhibitrice du cycle cellulaire. KCNQ1 code un canal potassique.

la voie Wnt ß-caténine dans notre modèle de souris surexprimant l'AgT de SV40 (Batisse-Lignier et al., 2017). Celle-ci précède l'apparition de métastases, suggérant qu'elle pourrait être impliquée dans la transition maligne. Le mécanisme reliant l'inhibition de P53 et Rb par l'AgT à l'activation de la voie WNT n'est pas caractérisé. Toutefois, nous avons observé une diminution significative de l'expression de Znrf3 qui pourrait jouer un rôle moteur dans ce phénomène.

L'ensemble de ces résultats souligne le rôle clé de la voie WNT/ß-caténine dans la tumorigenèse surrénalienne, même si la faible pénétrance du phénotype des modèles murins suggère la nécessité d'altérations secondaires pour favoriser la transition maligne.

c. *IGF2*

IGF1 et 2 sont deux facteurs de croissance ayant une structure proche de l'insuline, sécrétés chez l'homme par le foie et le tractus intestinal. La signalisation IGF est constituée des deux ligands IGF1 et IGF2 et de trois récepteurs membranaires : le récepteur à l'insuline (IR), IGF-1R, IGF-2R et six protéines de liaison IGF Binding Protein (IGFBP), capables de moduler l'action des IGF. IGF-IIR est un récepteur transmembranaire qui intervient dans l'internalisation et la dégradation de IGF2, permettant donc la régulation de la concentration de IGF2 circulant (Hassan, 2003). Six IGFBP ont été identifiés, chacun liant les IGF1 et 2 avec une affinité plus importante que IGF-IR. Chaque IGFBP présente un profil d'expression et des activités de modulation des IGF1 et 2 distincts. Les IGFBP sont donc d'importants modulateurs de l'action et de la disponibilité de IGF1 et de IGF2 (Chao and D'Amore, 2008; Clemmons, 1997).

La région génomique (11p15.5) contenant le gène *IGF2* est une région soumise à l'empreinte parentale (Figure 17). L'empreinte parentale est un mécanisme par lequel un gène est exprimé à partir d'un seul des deux allèles, en fonction de son origine parentale. La région génique 11p15.5 se divise en deux domaines contenant les gènes *IGF2*, *H19* (code un ARN non traduit), *KCNQ1* (code un canal potassique), *LIT1* (code un long ARN non-codant) et P57Kip2 (code

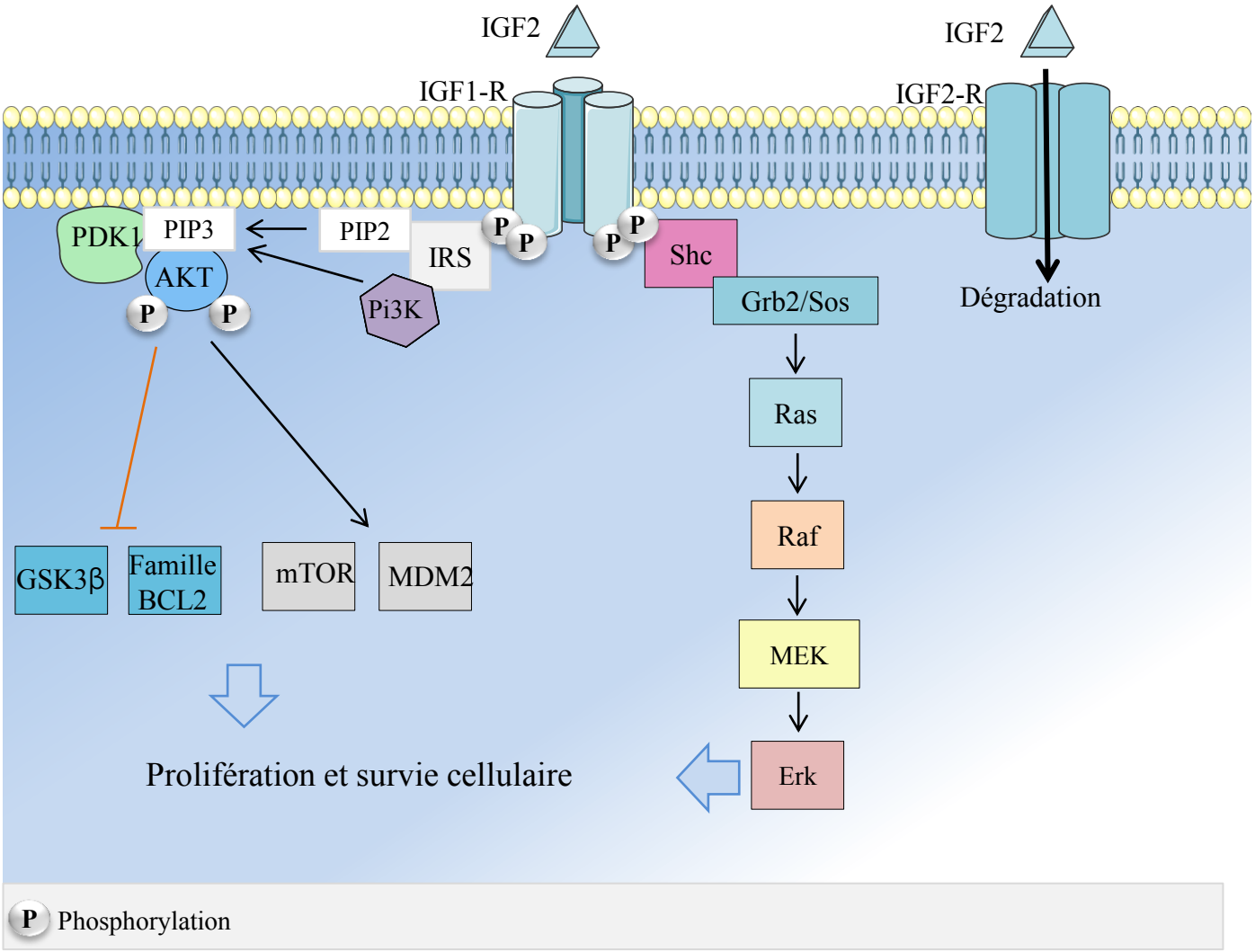


Figure 18: Voie de signalisation IGFII.
IGF2 est un facteur de croissance pouvant se lier aux deux récepteurs IGFIR et IGFIIR. IGFIR est un récepteur sans activité kinase. La liaison de IGF2 à ce récepteur induit sa dégradation par les lysosomes. IGFIR est un récepteur tyrosine kinase. La liaison de IGF2 a ce récepteur induit l'autophosphorylation de la partie cytoplasmique du récepteur. Les résidus phosphorylés recrutent des protéines adaptatrices, IRS et Shc à leur tour phosphorylées. IRS recrute PI3K qui à son tour, convertit PIP2 en PIP3. PIP3 interagit avec PDK1 et AKT. Cette co-localisation permet à PDK1 de phosphoryler et d'activer AKT. AKT agit sur de nombreuses cibles pour favoriser la prolifération et inhiber l'apoptose. Shc va permettre le recrutement d'autres protéines adaptatrices, Grb2/SOS qui vont activer Ras. Ras va permettre l'activation de la voie MAP Kinase, impliquée dans la prolifération.

une protéine inhibitrice du cycle cellulaire). L'expression de ces gènes dépend de l'origine parentale des allèles : *IGF2* et *LIT1* sont exprimés à partir de l'allèle paternel alors que *H19*, *KCNQ1* et *P57Kip2* sont exprimés à partir de l'allèle maternel. Cette régulation de l'expression est le résultat de méthylations différentielles des centres d'empreinte (Imprinting Control Region ou ICR) (Biliya and Bulla, 2010). Comme *IGF2*, *IGF-IIR* est un gène soumis à l'empreinte. Cependant, à l'inverse de *IGF2*, *IGF-IIR* est préférentiellement exprimé à partir de l'allèle maternel (Bergman et al., 2013).

Au cours du développement, chez l'Homme et la souris, IGF2 est exprimé dans la plupart des tissus puis son expression est réprimée rapidement après la naissance. Dans la surrénale, IGF2 est plus fortement exprimé dans l'ensemble du cortex, alors que IGF1 (Insulin-like Growth Factor 1) est restreint à la capsule (Else et al., 2014). L'expression de IGF2 diminue dans la surrénale adulte (Walczak and Hammer, 2015). Ainsi le rôle de IGF2 sur le développement surrénalien prédomine durant la vie foetale (Mesiano et al., 1993) alors que IGF1 agit principalement en postnatal. Au niveau des cellules du cortex surrénalien humain foetales et adultes, IGF1 et IGF2 stimulent également la stéroïdogenèse, et plus particulièrement la synthèse des androgènes, en réponse à l'ACTH (Mesiano and Jaffe, 1997).

i. Signalisation IGF2

La signalisation IGF2 passe par IGF-IR (Insulin-like Growth Factor I Receptor), un récepteur tyrosine kinase de la famille des récepteurs à l'insuline (Figure 18). Ce récepteur est également capable de lier IGF1. La liaison du ligand à IGF-IR induit le changement de conformation du récepteur, son autophosphorylation et le recrutement des protéines IRS (Insulin Receptor Substrat) et de la protéine adaptatrice Shc. La phosphorylation de ces protéines par le récepteur, permet le recrutement de Grb2/SOS et de PI3K (Phosphatidyl Inositol 3-Kinase), conduisant à l'activation des voies MAPK et PI3K/AKT (Samani et al., 2007). Les activités biologiques de IGF2 sont modulées par l'association avec des protéines comme IGF-IIR (Insulin-like Growth Factor II

Receptor) ou par les IGFBP (Insulin-like Growth Factor Binding Protein). La voie PI3K/AKT régule la croissance et la prolifération cellulaire, notamment en activant une enzyme intracellulaire à activité sérine-thréonine kinase nommée mTOR (mammalian target of rapamycin) qui contrôle la synthèse protéique, l'apoptose et le cycle cellulaire (Laplante and Sabatini, 2012).

ii. IGF2 et CCS

L'analyse des profils d'expression génique dans les tumeurs cortico-surrénaliennes a montré une surexpression de IGF2 dans 80 à 90% des CCS sporadiques (Gicquel et al., 1997; Giordano et al., 2003) mais dans moins de 10% des ACS (Gicquel et al., 1997). Cette surexpression de IGF2 dans les CCS sporadiques est due à une perte de l'allèle maternel avec duplication de l'allèle paternel (unidisomie uniparentale paternelle), mais aussi à des modifications du profil d'empreinte (Gicquel et al., 1997; Ragazzon et al., 2011). Outre IGF2, d'autres composants du système IGF peuvent être altérés dans les tumeurs corticosurrénaliennes, tels que le récepteur IGF-IR (Guillaud-Bataille et al., 2014). Ainsi IGF2 et d'autres acteurs de la signalisation IGF sont altérés dans les CCS, suggérant un rôle de cette voie de signalisation dans la tumorigenèse cortico-surrénalienne. Cependant, la surexpression de IGF2 seule (Weber et al., 1999) ou associée à l'activation constitutive de la voie WNT, ne conduit pas à la formation de tumeurs malignes de la corticosurrénale dans des modèles de souris transgéniques (Drelon et al., 2012; Heaton et al., 2012). Les antagonistes de IGF-IR induisent une diminution de la prolifération des cellules cortico-surrénaliennes humaines H295R en culture et en xénogreffes (Barlaskar et al., 2009). Cependant, les résultats des études de phase III menées chez l'homme sont décevants (Fassnacht and Allolio, 2009b), en accord avec l'absence d'effet oncogénique de IGF2 chez la souris (Drelon et al., 2012; Heaton et al., 2012).

L'ensemble de ces résultats suggère que la surexpression de IGF2 n'est pas un évènement initiateur, mais qu'elle pourrait participer à la progression tumorale corticosurrénalienne en présence d'autres altérations. Il est également

intéressant de noter que le locus 11p15, contient aussi les gènes *H19* et *CDKN1C* soumis à l'empreinte et dont l'expression est diminuée dans le CCS (Gao et al., 2012). La diminution d'expression de ces gènes et en particulier de l'inhibiteur du cycle P57KIP2, codé par CDKN1C pourrait également participer au processus de tumorigenèse.

d. Autres altérations génétiques

Le néoplasie endocrine de type 1 ou Nem1 est un syndrome génétique dominant rare, défini par une mutation du gène *Nem1* localisé au niveau du locus 11q3. Elle est caractérisée par une prédisposition aux tumeurs, affectant les tissus endocrines et non endocrines. Les tumeurs endocrines les plus fréquentes sont l'hyperparathyroïdie primaire (95%), les tumeurs neuroendocrines entéro-pancréatiques (50%) et les adénomes hypophysaires. (40%). 20% des patients atteints de ce syndrome, présentent des hyperplasies au niveau de la surrénale, 10% parmi eux développent de vraies tumeurs surrénaliennes. Les CCS représentent 14% de ces tumeurs (Gatta-Cherifi et al., 2012), suggérant un rôle potentiel de NEM1 dans l'oncogenèse cortico-surrénalienne. En accord avec cette hypothèse, des mutations somatiques de Nem1 ont été également décrites dans 7% des CCS dans les cohortes ENS@T et TCGA (Assié et al., 2014; Zheng et al., 2016).

Des mutations inactivatrices de PRKAR1A, présentes chez la majorité des patients atteints de CNC, ont été identifiées au niveau somatique chez des patients atteints de CCS (Zheng et al., 2016). Toutefois, le rôle causal de ces altérations dans le développement du CCS reste à définir, d'autant que chez la souris, l'inactivation de PRKAR1A est associée à une répression de la tumorigenèse agressive, induite par l'activation de la voie WNT (Drelon et al., 2016a).

Les approches OMICS ont également identifié des altérations de gènes impliqués dans la maintenance des télomères. En effet, alors que dans une large cohorte de CCS, 73% des tumeurs présentaient des télomères plus courts (Zheng et al., 2016), une amplification du gène *TERT* (codant pour une télomérase) a été

identifiée avec une prévalence de 15% (Juhlin et al., 2015; Zheng et al., 2016). D'autres mutations touchant les gènes *DAXX* et *ATRX*, impliqués dans la prolongation alternative des télomères ou ALT (alternative lengthening of telomeres) ont été trouvées dans 10% des CCS (Assié et al., 2014; Zheng et al., 2016). Le rôle pathogénique de ces altérations reste à définir.

5. Anomalies moléculaires au niveau des CCS

a. Altérations chromosomiques

Les gains et les pertes chromosomiques sont fréquents dans la tumorigénèse. Les analyses par CGH (Comparative genomic hybridization) et plus récemment par SNP ont permis d'identifier ces altérations au niveau des CCS. Les variations de nombre de copies (Copy number variation ou CNV) sont différentes et beaucoup plus fréquents dans les carcinomes que dans les adénomes. Les principaux gains chromosomiques concernent les chromosomes 5, 7, 12, 16, 19 et 20 alors que les pertes touchent principalement le chromosome 22. La prévalence des pertes d'hétérozygotie (LOH : loss of heterozygosity) neutres en copies est de plus de 90% dans les CCS (Ronchi et al., 2013) avec une prévalence de plus de 82% des LOH touchant le locus 11p15, codant pour IGF2. Dans la cohorte ENS@T (European network for the Study of Adrenal Tumors) (Assié et al., 2014), les analyses SNP ont révélé des amplifications des gènes *TERT* (5p15.33) et *CDK4* (12q14) d'une part, et des délétions homozygotes des gènes *CDKN2A* (9p21.3), *RB1* (13q14), *ZNRF3* (22q12.1) ainsi que des locus 3q13.1 et 4q34.3. Ces deux locus codent pour des longs ARN non-codants LOC285194 and LINC00290 respectivement. Leur implication dans les cancers est de plus en plus étudiée. L'analyse de la cohorte TCGA a révélé un sous-groupe de CCS caractérisé par la présence de nombreuses altérations chromosomiques (d'où l'appellation : 'noisy' phenotype) associées à un mauvais pronostic. Cette analyse a aussi révélé une propriété unique d'un sous-ensemble de CCS qui montrent un développement séquentiel allant de l'hypodiploïdie (ploïdie ≤ 1.6) à la polyploïdie (Zheng et al., 2016).

b. Transcriptome

Les analyses des profils d'expression génique ont permis d'identifier des marqueurs moléculaires utiles au diagnostic de CCS. En effet, les différentes études ont montré une nette ségrégation entre les adénomes et les carcinomes (Assié et al., 2010). Les adénomes se caractérisent par une forte expression des gènes impliqués dans la stéroïdogenèse (de Fraipont et al., 2005). Dans les carcinomes, les gènes surexprimés comparativement aux adénomes sont (de Fraipont et al., 2005; Giordano et al., 2003; de Reyniès et al., 2009):

- Les facteurs de croissance et principalement IGF2, ainsi que leurs récepteurs,
- Les gènes impliqués dans la prolifération cellulaire et notamment la transition G1-S et G2-M, principalement les gènes codant pour des cyclines.

L'analyse transcriptomique a également permis de classifier les tumeurs selon leur pronostic et d'identifier deux sous-groupes de CCS: le groupe C1A (20% de survie à 5 ans) et le groupe C1B (91% de survie à 5 ans) (Giordano et al., 2003; de Reyniès et al., 2009). Dans le groupe C1A de mauvais pronostic, les gènes surexprimés sont impliqués dans la transcription ou dans la régulation du cycle cellulaire, alors que les gènes surexprimés dans le groupe C1B sont impliqués dans le métabolisme, la différenciation cellulaire, l'apoptose et le transport intracellulaire. De plus, Ragazzon et al. ont mis en évidence une corrélation entre le pronostic des tumeurs et les mutations des gènes *TP53* et *CTNNB1*. En effet, les mutations inactivatrices de *TP53* et activatrices de *CTNNB1* et/ou une localisation nucléaire de P53 et ß-caténine sont retrouvées dans le sous-groupe des tumeurs de mauvais pronostic (C1A). Enfin, 32,2% des tumeurs du cluster C1A ne présentent aucune mutation ou immunohistochimie anormale pour P53 et ß-caténine (Ragazzon et al., 2010).

Au-delà de la caractérisation moléculaire des CCS, les analyses de transcriptome ont permis d'identifier des marqueurs dont l'expression est associée au pronostic. En effet, l'expression combinée des gènes *DLG7* (discs, large homolog 7) et *PINK1* (PTEN induced putative kinase 1) est prédictive d'une

survie sans récidive, particulièrement utile pour les tumeurs avec un score de Weiss intermédiaire (de Reyniès et al., 2009) . Au sein des CCS, l'expression combinée de *BUB1B* (budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolg beta) et *PINK1* est fortement prédictive de la survie globale (de Reyniès et al., 2009). *DLG7* et *BUB1* codent pour des protéines qui participent à la régulation du cycle cellulaire et *PINK1* code pour une protéine jouant un rôle dans l'homéostasie mitochondriale. Si leur expression semble avoir un intérêt pronostic, elle n'a pas de rationnel physiopathologique à l'heure actuelle.

- *miRNA*

Les micro-ARN sont de courts acides ribonucléiques non codants, d'une taille approximative de 22 nucléotides. Leur rôle est essentiel dans la régulation post-transcriptionnelle des gènes. La dérégulation des miRNA peut aboutir à l'inhibition de gènes suppresseurs de tumeurs et/ou la stimulation de certains oncogènes. Dans les CCS, une sous-expression de miR-335 et de miR-195 et une surexpression de miR-483-5p ont été décrites (Chabre et al., 2013, 2013; Patel et al., 2013; Patterson et al., 2011; Schmitz et al., 2011; Soon et al., 2009). Un taux élevé de miR-483-5p, et de faibles concentrations de miR-195 ont été associés à un mauvais pronostic (Chabre et al., 2013). Des expérimentations réalisées *in vitro* sur des cellules H295R montrent que l'inhibition de miR-483-3p ou mi-R483-5p et la stimulation de miR-195 et miR-497 ralentissent la prolifération cellulaire et induisent l'apoptose cellulaire (Özata et al., 2011). miR-483-5p suscite beaucoup d'intérêt à cause de sa localisation dans le second intron du gène du facteur de croissance IGF2 soumis à empreinte parentale et fortement surexprimé dans près de 90 % des CCS. Son rôle oncogénique et pro-métastatique a récemment été décrit dans l'adénocarcinome du poumon où son expression est activée par la voie de signalisation Wnt/ß-caténine (Song et al., 2014). Le rôle oncogénique de miR-483-3p pourrait être lié à sa capacité à réguler négativement l'expression du gène pro apoptotique *PUMA* (P53 upregulated modulator of apoptosis) (Özata et al., 2011).

Au-delà du rôle potentiel des miRNAs dans la physiopathologie du CCS, certains auteurs ont également étudié l'intérêt diagnostique et pronostique du dosage plasmatique des miRNA circulants. Ainsi, il a été démontré une augmentation significative de l'expression des miR-100, miR-181, miR-184, miR-210, miR-483 dans le plasma (rapporté à l'expression d'un miRNA de référence miR-16) des patients atteints d'un carcinome par comparaison à ceux porteurs d'un adénome (Szabó et al., 2014). De plus, un taux plasmatique élevé de miR-483-5p ou inversement, un faible taux de miR-195 sont associés à un mauvais pronostic (Chabre et al., 2013). Bien que prometteurs, ces résultats ont été obtenus sur un nombre limité d'échantillons et restent à confirmer à plus grande échelle sur des cohortes indépendantes.

Plus récemment, les miRNA ont été proposés comme des agents thérapeutiques potentiels dans le CCS. En effet, miR-7 cible des oncogènes tels que RAF1, mTOR ou CDK1. L'administration de miR-7 réduit la croissance tumorale dans un modèle murin de xénogreffes H295R (Glover et al., 2015).

c. *Méthylome*

Les dérégulations des facteurs épigénétiques sont fréquemment présentes dans les cancers. Elles incluent les modifications post-traductionnelles des histones (acétylation, méthylation), les profils de méthylation de l'ADN, ainsi que les micro-ARN (miRNA) non codants. La méthylation de l'ADN est effectuée par des enzymes nommées DNMT (DNA methyltransferases). Ces dernières additionnent un groupement méthyl au niveau de la cytosine des nucléotides CpG. L'existence d'une association entre les modifications de méthylation de l'ADN et la tumorigenèse a été démontrée dans plusieurs cancers tels que le cancer de sein, de l'ovaire et du colon. Celle-ci est due à l'hyperméthylation des promoteurs de gènes suppresseurs de tumeurs et l'hypométhylation d'autres, entrainant une dérégulation et une transformation cellulaire (Kulis and Esteller, 2010).

Plusieurs travaux se sont intéressés au profil de méthylation des CCS. La comparaison du niveau de méthylation de 27 578 ilôts CpG dans 6 surrénales

normales, 27 adénomes et 15 carcinomes a démontré une hyperméthylation dans les CCS, de certains gènes suppresseurs de tumeurs, impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire ou l'apoptose tels que *CDKN2A*, *GATA4*, *DLEC1*, *HDAC10*, *PYCARD* et *SCGB3A1* (Fonseca et al., 2012). Une deuxième étude a montré une corrélation négative entre le niveau de méthylation et le niveau d'expression des gènes. Parmi ces gènes, *H19* et d'autres gènes suppresseurs de tumeurs. Dans cette étude, les CCS hyperméthylés ont été classés en deux groupes : un groupe fortement méthylé (CIMP-high) (CIMP, CpG island methylator phenotype) et un autre faiblement méthylé (CIMP-low). Le degré de méthylation semble directement corrélé avec un mauvais pronostic (Barreau et al., 2013). Plus récemment, Assié et al. confirment l'existence de sous-groupes de CCS selon leur profil de méthylation et leur association avec le pronostic (Assié et al., 2014). Le profil de méthylation et celui des miRNA recouvrent de manière approximative les clusters C1A et C1B. Le niveau de méthylation semble donc être directement corrélé à un mauvais pronostic et à un taux de survie globale et sans récidive plus faibles (Barreau et al., 2013; Jouinot et al., 2017).

Zheng et ses collaborateurs ont adopté une approche différente pour la classification moléculaire des CCS. Leur clustering non supervisé résulte en différents groupes selon différents critères : 6 groupes selon l'expression des miRNA, 3 groupes selon le niveau de méthylation de l'ADN, 3 groupes selon l'expression protéique et 3 groupes selon le nombre de copies de gènes (Zheng et al., 2016). A l'exception du clustering basé sur l'expression des miRNA, les analyses des clusters résultent en des classifications avec des différences significatives de pronostic. Ils ont ensuite intégré les sous-ensembles de CCS identifiés par le nombre de copies d'ADN, la méthylation de l'ADN, l'expression de l'ARNm et les plateformes d'expression de miARN afin d'obtenir des CoC (clusters of clusters). Combinés, les classifications moléculaires ont convergé en trois sous-types de CoC : CoC I, CoC II et CoC III.

En comparant les groupes CoC avec les groupes C1A/C1B, la majorité des CoC I ont été classifié comme C1B alors que les groupes CoC II et CoC III ont été attribués au groupe C1A. Les taux de progression de la maladie étaient de 7%, 56% et 96% pour les groupes CoC I, II et III respectivement (Zheng et al., 2016).

Ces résultats soulignent de nouveau l'intérêt du taux de méthylation qui pourra servir comme facteur de pronostic.

C. Corticosurrénalomes de l'enfant

Les CCS infantiles ont une prévalence très faible (0,2 à 0,3/ million enfants/an). Les carcinomes représentent 80% à 90% des tumeurs corticosurrénaliennes infantiles et sont majoritairement fonctionnels d'un point de vue hormonal (Kulshrestha and Suman, 2018). Le diagnostic est établi chez 60% des enfants avant l'âge de 4 ans et chez 12% pendant la première année postnatale. Ces manifestations précoces suggèrent une émergence de ces tumeurs au cours du développement embryonnaire surrénalien (Michalkiewicz et al., 2004). Les CCS pédiatriques sont le plus souvent trouvés dans le contexte du syndrome de Li-Fraumeni et du syndrome de Beckwith-Wiedemann.

a. TP53 et CCS infantiles

Comme déjà mentionné, le syndrome de Li-Fraumeni se caractérise par des mutations germinales du suppresseur de tumeurs p53. Dans le sud du Brésil, l'incidence des CCS infantiles est remarquablement élevée (15 fois plus élevée que le reste du monde) (Faria and Almeida, 2012; Wasserman et al., 2015). Ceci est dû +spécifiquement à la mutation p.R337H de TP53 (présente chez 98% des enfants atteints de CCS dans cette région) également associée à d'autres types de cancer dans le spectre du syndrome de Li-Fraumeni. La mutation germinale p.R337H est également trouvée chez 78% des enfants présentant des CCS sporadiques (Faria and Almeida, 2012; Lalli and Figueiredo, 2015). R337 est une région conservée dans le domaine C-terminal d'oligomérisation de p53. Le remplacement d'un résidu arginine par un résidu histidine entraine une déstabilisation de p53 (Latronico et al., 2001), en particulier à des niveaux de pH élevés, potentiellement rencontrés dans la surrénale au cours du développement post-natal (DiGiammarino et al., 2002).

b. Wnt/ß-caténine et CCS infantiles

Des mutations somatiques de la voie ß-caténine (CTNNB1) ont été identifiées dans 3 tumeurs parmis 37 (8%) dans les deux cohortes combinées WGS (whole genome sequencing) et WES (whole exome sequencing). Une troisième cohorte indépendante, ciblant des séquencages de l'exon 3 du gène *CTNNB1*, a révélé dix mutations somatiques de plus dans les 34 tumeurs de corticosurrénalome pédiatrique. Cette étude a donc détecté la présence de mutations du gène *CTNNB1* dans 13 tumeurs parmis 37 ce qui constitue un pourcentage relativement élevé. D'une manière intéressante, ces mutations existaient plus particulièrement dans les tumeurs ne présentant pas des mutations germinales de TP53 (Pinto et al., 2015).

c. IGF2 et CCS infantiles

La surexpression de IGF2, déclenchée par la perte d'hétérozygotie de 11p15 et associée au syndrome de Beckwith-Wiedemann est retrouvée dans certaines tumeurs bénignes et malignes de la corticosurrénale. D'une manière similaire, IGF2 est fortement exprimé dans la surrénale fœtale où il joue un rôle important dans la régulation de la prolifération et la synthèse des stéroïdes. Au niveau des CCS infantiles, une surexpression du récepteur IGF1R est démontrée et associée à la malignité de ces tumeurs. En revanche, des modèles de souris transgéniques de surexpression de IGF2, présentent des hyperplasies sans progression vers la tumorigénèse (Drelon et al., 2012; Heaton et al., 2012). Ces altérations sont donc insuffisantes pour expliquer la progression maligne du CCS, même si elles pourraient permettre le développement de tumeurs bénignes.

d. Altérations chromosomiques et rôle de l'amplification du locus codant SF1

Une des altérations les plus communes dans les CCS de l'enfant est le gain /l'amplification de la région 9q34. Cette altération est observée dans la quasi-totalité des CCS infantiles, et dans quelques cas de CCS adultes. Une

amplification d'une région voisine, la région 9q33.3, a été également décrite dans les CCS pédiatriques (Figueiredo et al., 1999). La région 9q34 contient le gène *NR5A1* codant pour le facteur de transcription SF1, essentiel pour le développement et la différenciation de la corticosurrénale (Lalli and Figueiredo, 2015). Une amplification de NR5A1 et une surexpression de SF1 ont été détectées chez la majorité des enfants atteints de CCS au Brésil (Almeida and Stratakis, 2010; Figueiredo et al., 2006; Pianovski et al., 2006). D'une manière intéressante, la protéine SF1 était surexprimée même dans des cas ne présentant pas une amplification du gène *NR5A1*, suggérant l'intervention d'autres mécanismes transcriptionnels ou post-traductionnels à l'origine de cette surexpression. Ceci s'applique aussi à certains CCS adultes où la surexpression de SF1 peut également servir comme facteur de pronostic (Lalli and Figueiredo, 2015).

En exploitant une lignée cellulaire qui surexprime SF1 en réponse à la Doxycyline (H295-TR/SF1), Doghman et al. ont montré qu'une augmentation de dosage de SF1 est suffisante pour augmenter les capacités de prolifération des cellules de CCS tout en diminuant l'apoptose. A l'inverse, Le knock-down de SF1 en utilisant des ARN intérférents ou le blocage de l'activité transcriptionnelle de SF1 avec des composants tels que les isoquinolinones, est suffisant pour renverser les effets de la surexpression de SF1 sur la prolifération des H295R (Doghman et al., 2010a). L'ensemble de ces données in vitro suggère que SF1 pourrait participer à la pathogenèse du CCS. Conformément à cette hypothèse, des souris transgéniques surexprimant SF1 développent des hyperplasies qui progressent en tumeurs. Un nombre élevé de mitoses est détecté au niveau du cortex surrénalien de ces souris alors qu'elles sont absentes chez les souris contrôles (Doghman et al., 2007b). D'un point de vue moléculaire, la surexpression de SF1 module l'expression génique de plusieurs sets de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et des stéroïdes, l'apoptose, le cycle cellulaire ainsi que l'adhésion cellulaire (Doghman et al., 2007b). Parmi les gènes impliqués dans le contrôle de l'apoptose, l'analyse en microarray a montré que le gène *NOV/CCN3* est un des gènes les plus significativement sous-exprimé dans les CCS infantiles et adultes en comparaison avec les surrénales saines (Doghman et al., 2007a). Dans les CCS adultes, son expression est plus faible

dans les carcinomes par rapport aux adénomes et se trouve associée à un mauvais pronostic (Martinerie et al., 2001). Dans les cellules H295R-TR/SF1, l'augmentation de dosage de SF1 est suffisante pour réprimer NOV et des analyses de transfections transitoires ont montré que NOV est une cible négative directe de SF1 (Doghman et al., 2007a). Ces données suggèrent que l'un des modes d'actions de SF1 dans la pathogenèse du CCS pourrait reposer sur l'inhibition de ce facteur pro-apoptotique.

D'une manière surprenante, l'expression de certains gènes impliqués dans la réponse immunitaire est également altérée chez les souris surexprimant SF1. Conformément à ces observations, des analyses de microarray sur les CCS infantiles montrent que l'expression de certains gènes impliqués dans la réponse immunitaire permet de distinguer adénomes et carcinomes. Ces résultats suggèrent que la réponse immunitaire peut moduler la progression et l'agressivité des CCS et que le dosage de SF1 peut avoir un rôle dans cette régulation (Doghman et al., 2007b).

e. Transcriptome

En cohérence avec la perte d'hétérozygotie du locus 11p15 avec perte de l'allèle maternel, *IGF2* est le gène le plus surexprimé dans les CCS infantiles (Faria and Almeida, 2012), alors que les gènes exprimés à partir de l'allèle maternel (*KCNQ1*, *CDKN1C*) voient leur expression diminuer (Rosati et al., 2008; Wilkin et al., 2000). L'expression de NR4A1 et NR4A2, deux régulateurs transcriptionnels de l'enzyme HSD3B2 (Hydroxy-Delta-5-Steroid Dehydrogenase 3 Beta- And Steroid Delta-Isomerase 2), est également diminuée dans ces CCS. HSD3B2 est une enzyme stéroïdogène, impliquée dans la production de cortisol et d'aldostérone dans la surrénale adulte. L'expression de cette dernière est, en conséquence, fortement diminuée (Doghman et al., 2007b). Ces résultats sont cohérents avec le profil des patients présentant également une sous-expression de HSD3B2.

	CCS Adultes	CCS infantiles
Age moyen au diagnostic	40 à 50 ans	3 à 4 ans
Prévalence	0,7 à 2 cas/million/an	Monde entier: 0,3 cas/million/an Sud du Brésil: 3 à 4,2 cas/million/an
Présentation clinique	Syndrome de Cushing ou hypertension	Virilisation dans la majorité des cas; elle peut être associée au syndrome de Cushing
Mutations génomiques les plus fréquentes	Complexe	Perte d'hétérozygotie 11p15 Gain 9q33-34 Perte 4q34
Syndromes génétiques: Syndrome de LF Syndrome de BW Mutations germinales R337H	Mutations germinales sporadiques de TP53 Pas commun <20%	 >50% Oui >93%
Mécanismes moléculaires intervenant		
o IGF2	Oui	Oui
o P53/Rb	Oui (mutations TP53)	Oui (mutations TP53/CDKN2A/RB1)
o β-caténine	Oui (mutationsCTNNB1)	Oui(mutations CTNNB1/ZNRF3)
o Remodelage de la chromatine	Oui (mutations ATRX)	Oui(mutations ATRX/TERT/ALT)
Pertinence du pronostic du:		
o Score de Weiss	Elevé	Bas
o Index Ki67	Elevé	Inconnu
Pertinence du pronostic de :		
o Mutations TP53	Oui (somatiques)	Non (germinales)
o Surexpression de IGFII	Oui	Non
o Surexpression de SF1	Oui	Non
o Sous-expression de Nov	Oui	Non

Figure 19: Comparaison entre les CCS adultes et les CCS pédiatriques.
Adapté d'après Lalli et al., 2015

- *miRNA*

Une forte diminution des microRNA miR-99a et miR-100 est détectée au niveau des corticosurrénlomes de l'enfant. miR-99a et mi-R100 ciblent les ARNm codant pour IGF-1R, mTOR et RAPTOR (mTOR-associated protein raptor) qui sont des acteurs de la voie de signalisation IGF-1R/mTOR. L'inhibition de la signalisation IGF-1R-mTOR par un agent pharmacologique, l'Everolimus, résulte en une diminution de la prolifération des cellules H295R in vitro et in vivo (Doghman et al., 2010b). Le miR-483-3p surexprimé chez l'adulte est également surexprimé dans les tumeurs de l'enfant. Ces miRNA pourraient donc être utilisés comme marqueurs diagnostiques/pronostiques dans les CCS de l'enfant, comme chez l'adulte (Chabre et al., 2013; Szabó et al., 2014).

- *Conclusion*

Les corticosurrénalomes de l'adulte et de l'enfant sont des tumeurs rares et agressives. Bien que les rapports pathologiques de diagnostic se basent sur le score de Weiss chez l'adulte, la pertinence de ce dernier dans les tumeurs de l'enfant reste faible. Contrairement aux CCS adultes, les CCS infantiles sont souvent associés aux syndromes de Beckwith Wiedman et Li-Fraumeni, toujours avec la présence de mutations R337H de TP53 qui est présente dans plus de 90% des cas de CCS pédiatriques du Sud du Brésil. Les mécanismes moléculaires intervenant impliquent toujours IGF2, TP53 ainsi que la ß-caténine et des gènes de remodelage de la chromatine telles que *ATRX*, *TERT* et *ALT*. (Assié et al., 2014; Pinto et al., 2015) . La surexpression de SF1 est détectée dans la majorité des cas de CCS infantiles du Sud du Brésil et n'est pas associée à la malignité des tumeurs. Au contraire, cette surexpression, moins fréquente dans les CCS adultes, présente un mauvais facteur de pronostic (Figure 19). Le développement de modèles animaux d'activation constitutive de la voie WNT/□-caténine (Berthon et al., 2010), de surexpression de IGF2 (Drelon et al., 2012; Heaton et al., 2012) ou de SF1 (Doghman et al., 2007a) a mis en évidence le rôle de ces altérations dans l'initiation tumorale. Toutefois des altérations secondaires

semblent requises pour l'acquisition de caractéristiques de malignité. Afin d'identifier de nouveaux facteurs d'agressivité, nous avons conduit une analyse du transcriptome de CCS adultes de trois cohortes de patients. Cette analyse a mis en évidence une surexpression de l'histone méthyltransférase EZH2, un facteur épigénétique majeur, dans les CCS (Drelon et al., 2016b). Cette surexpression est associée au mauvais pronostic des patients. Elle est également retrouvée dans les CCS qui se développent dans les souris surexprimant l'AgT de SV40 (Batisse-Lignier et al., 2017; Ragazzon et al., 2006), suggérant un rôle moteur dans l'acquisition de caractéristiques agressives.

III. EZH2 : Une protéine aux activités multiples

A. Notion d'épigénétique

«Entre le génotype et le phénotype existent des mécanismes complexes de développement», disait le généticien et embryologiste Conrad Waddington (1905-1975) en 1942 (Waddington, 1942). Waddington est à l'origine du terme « épigénétique ». Cette appellation a été suggérée pour nommer la discipline qui étudie l'interaction entre les gènes et leur environnement et qui est à l'origine du phénotype.

Les premières règles de l'hérédité génétique ont été découvertes par Gregor Mendel (1822-1884). Ces règles expliquent comment certains caractères héréditaires se maintiennent à la descendance. Il était couramment accepté que la diversité génétique soit la seule source de variabilité phénotypique. Ce n'est qu'à la fin du XXème siècle que le terme épigénétique s'est répandu, notamment dans les sciences médicales. Actuellement, l'épigénétique est définie par l'étude des modifications héritables et réversibles de l'expression des gènes sans faire appel à des changements de la séquence d'ADN ni de modifications du nombre de copies d'un gène (Bird, 2007; Richards, 2006).

La chromatine est la structure nucléo-protéique sous laquelle se présente l'ADN. Elle a été mise en évidence en 1882 par Walther Flemming (1843-1905) (Flemming, 1882). L'unité de base de la chromatine est le nucléosome qui à son tour est composé d'un octamère d'histones (2 histones H2A, 2 histones H2B, 2 histones H3 et 2 histones H4). L'ADN s'enroule autour des nucléosomes sur une longueur de 147 pb environ. Les nucléosomes sont reliés entre eux par une séquence d'ADN dite « linker » sur laquelle se fixe l'histone H1 afin de stabiliser la chromatine au cours de la compaction (Olins and Olins, 1974).

Le degré de compaction de l'ADN joue un rôle primordial dans la régulation de l'expression génique. Il détermine l'accessibilité de la machinerie transcriptionnelle à l'ADN et constitue l'un des mécanismes clefs du contrôle de l'expression des gènes. On distingue classiquement deux types de chromatine en

fonction de critères structuraux et fonctionnels : L'euchromatine, qui consiste en un ADN actif, de structure globalement décondensée et permissive à la transcription. Elle correspond à des zones riches en gènes, où ceux-ci sont actifs et transcrits. L'hétérochromatine, quant à elle, correspond à des régions d'ADN condensées, pauvres en gènes et consiste en un ADN principalement transcriptionnellement inactif.

Cette compaction est surtout contrôlée par les porteurs de l'information épigénétique (Luger, 2006; Strahl and Allis, 2000). Ces supports de l'information épigénétique interviennent surtout dans la régulation de la structure chromatinienne et les modifications chimiques de l'ADN. Les deux bases moléculaires de l'épigénétique les plus étudiées sont : la modification covalente de l'ADN via la méthylation des cytosines et les modifications des histones, incluant les variants d'histones et leurs modifications post-traductionnelles qui seront notre centre d'intérêt.

B. Les modifications post-traductionnelles des histones

Les histones, protéines constituant le nucléosome, sont composées d'une partie C-terminale globulaire qui correspond au corps de la protéine et d'une partie N-terminale correspondant à la queue de l'histone (Luger et al., 1997). Elles sont soumises à des modifications post-traductionnelles au niveau des résidus de leurs queues N-terminales sortantes. L'acétylation des lysines, la méthylation des lysines et des arginines (mono, di ou tri), la phosphorylation des sérines et des thréonines, l'ubiquitinylation, la sumoylation et l'ADP ribosylation sont les différentes classes de modifications des histones identifiées jusqu'à présent (Kouzarides, 2007). Ces modifications peuvent jouer un rôle « d'activation » ou bien « de répression » en fonction de leur localisation sur un acide aminé particulier et de l'emplacement des histones mêmes, sur la séquence d'ADN. Dans ce qui suit, on va se focaliser sur la méthylation des histones.

- *La méthylation des histones*

La méthylation des histones peut avoir lieu au niveau des lysines et des arginines. Les lysines peuvent être mono-, di- ou tri-méthylées alors que les arginines ne peuvent être que mono- ou diméthylées (Lan and Shi, 2009; Ng et al., 2009). Les résidus lysines et arginines d'une même histone ou d'histones différentes peuvent être méthylés simultanément. Cela génère une grande diversité fonctionnelle pour chaque résidu méthylé, certaines méthylations entraînant une activation de la transcription tandis que d'autres entrainent plutôt une répression (Jenuwein and Allis, 2001; Kiefer, 2007; Zhang and Reinberg,2001).

La méthylation de H3K4 (la lysine 4 de l'histone H3), H3K36 et H3K79 est associée à une activation transcriptionnelle des gènes, alors que les marques H3K27me3 (tri-méthylation de la lysine 27 de l'histone H3) et H4K20me1 sont associées à des gènes réprimés (Martin and Zhang, 2005; Upadhyay and Cheng, 2011). Cependant, le rôle des marques H3K9me3, H3K27me1 et H4K20me1 n'est pas clairement élucidé puisqu'elles ont d'abord été associées à des gènes réprimés, alors que d'autres études montrent qu'elles sont retrouvées sur des gènes actifs (Vakoc et al., 2006; Wiencke et al., 2008). Ces modifications chimiques sont catalysées par des enzymes relativement conservées chez les eucaryotes, les histones méthyltransférases (HMTs) (Zhang and Reinberg, 2001). Les différentes combinaisons de ces modifications forment le « code des histones », qui à son tour, déterminera l'état chromatinien autour d'un locus ou d'un gène (Wang et al., 2009).

L'arginine est méthylée par les PRMTs (Protein Arginine MethylTransferases). Ces méthylations impactent la régulation de la transcription génique et peuvent jouer un rôle essentiel dans le contrôle de la pose d'autres marques d'histones (Guccione et al., 2007; Huang et al., 2005; Litt et al., 2009).

La lysine est méthylée par des HKMTs (histones lysines méthyltransférases). La première histone lysine méthyltransférase qui a été décrite chez l'homme est SUV39H1 qui cible H3K9 (Rea et al., 2000). Ces enzymes, à l'exception de DOT1

(Min et al., 2003), sont caractérisées par la présence d'un domaine SET (Su(var), Enhancer of zeste, Trithorax) responsable de leur activité catalytique (Xiao et al., 2003). Dans notre projet, la marque qui nous intéresse, est la triméthylation de H3K27 (H3K27me3). Cette marque est associée à des processus divers tels que l'inactivation du chromosome X, l'inactivation des gènes homéotiques, la plasticité des cellules souches, la différenciation, la prolifération et le maintien de l'identité cellulaire (Carelli et al.; Margueron and Reinberg, 2011; Samani et al., 2007). Chez l'Homme, la protéine à domaine SET responsable de la déposition de cette marque est EZH2 (Enhancer of Zeste Homolog 2). Cette enzyme appartient au complexe PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2) (Margueron and Reinberg, 2011).

C. EZH2 et complexe PRC2

Les protéines du groupe Polycomb (PcG) et trithorax (TrxG) forment un système épigénétique fortement conservé au cours de l'évolution. Elles ont été initialement découvertes chez *Drosophlia melanogaster* pour leurs rôles antagonistes respectivement dans le maintien de l'état transcriptionnel réprimé ou actif des gènes homéotiques, à travers les différents stades du développement. Depuis, des progrès substantiels ont été accomplis qui permettent d'établir que les protéines du PcG et TrxG contrôlent une importante fraction du génome et sont des régulateurs cruciaux de la différenciation et de la programmation génomique. Le rôle des Polycomb est conservé chez les vertébrés. Actuellement, quatre complexes polycomb ont été identifiés : PRC1, PRC2, PhoRC (Pho-repressive Complex) et PR-DUB (Polycomb Repressive DeUBiquitinase) (Klymenko et al., 2006; Margueron and Reinberg, 2011; Scheuermann et al., 2010; Simon and Kingston, 2009). PRC1 et PRC2 sont bien identifiés et caractérisés chez les mammifères. Les homologues de PhoRC et de PR-DUB semblent être YY1 (Ying Yang 1) (Brown et al., 1998) et BAP1 (BRCA1 Associated Protein 1), respectivement. Le complexe PRC2 sera notre centre d'intérêt pour ce qui suit.

1. Complexe PRC2 et ses composants

Le complexe PRC2 est le complexe le plus conservé. Il a été identifié dans tous les règnes du vivant, chez les champignons, les plantes et les animaux, avec la même fonction principale connue pour ce complexe, à savoir la triméthylation de H3K27 (Köhler and Villar, 2008; Schuettengruber et al., 2007). Ainsi, les protéines de PRC2 pourraient avoir une fonction ancestrale conservée au cours de l'évolution. Chez l'Homme, ce complexe est constitué de quatre composants fondamentaux : EZH2 (Enhancer of Zeste 2) (Margueron and Reinberg, 2011), EED (Embryonic Ectoderm Development), SUZ12 (SUppressor of Zeste 12) et RBAP48 (RBBP4 ; Retinoblastoma binding protein 48).

EZH2. EZH2 constitue le composant clé du complexe PRC2 ayant la capacité de méthyler l'histone H3 sur la lysine 27, créant ainsi une marque d'histone répressive (Cao and Zhang, 2004). EZH2 a été initialement identifiée comme une protéine associée au proto-oncogène VAV dans le lymphome. Le gène codant EZH2 est localisé au niveau du chromosome 7q35, il renferme 20 exons codant pour 746 acides aminés (Cardoso et al., 2000). EZH2 n'est capable de méthyler H3K27 que lorsqu'elle est associée aux protéines du complexe, chacun de ses quatre composants contribuant à la liaison et à la méthylation des nucléosomes (Czermin et al., 2002; Müller et al., 2002). Lorsque EZH2 est isolé, son domaine SET, responsable de son activité catalytique, adopte une conformation catalytiquement inactive, empêchant à la fois la liaison du donneur de méthyl SAM (S-adénosylméthionine) et de substrats tels que les queues d'histones (Antonysamy et al., 2013; Wu et al., 2013). Ces données soulignent l'importance de l'interaction entre EZH2 et les autres sous-unités du complexe PRC2.

EED. La protéine EED est indispensable à la formation et à la fonction du complexe PRC2 (Montgomery et al., 2005). EED se lie à la queue des histones triméthylées au niveau de la lysine, entrainant une activation allostérique de EZH2. La mutation d'Esc, l'orthologue de EED chez la drosophile, empêche la reconnaissance de H3K27 et inhibe le complexe PRC2, ce qui résulte en une

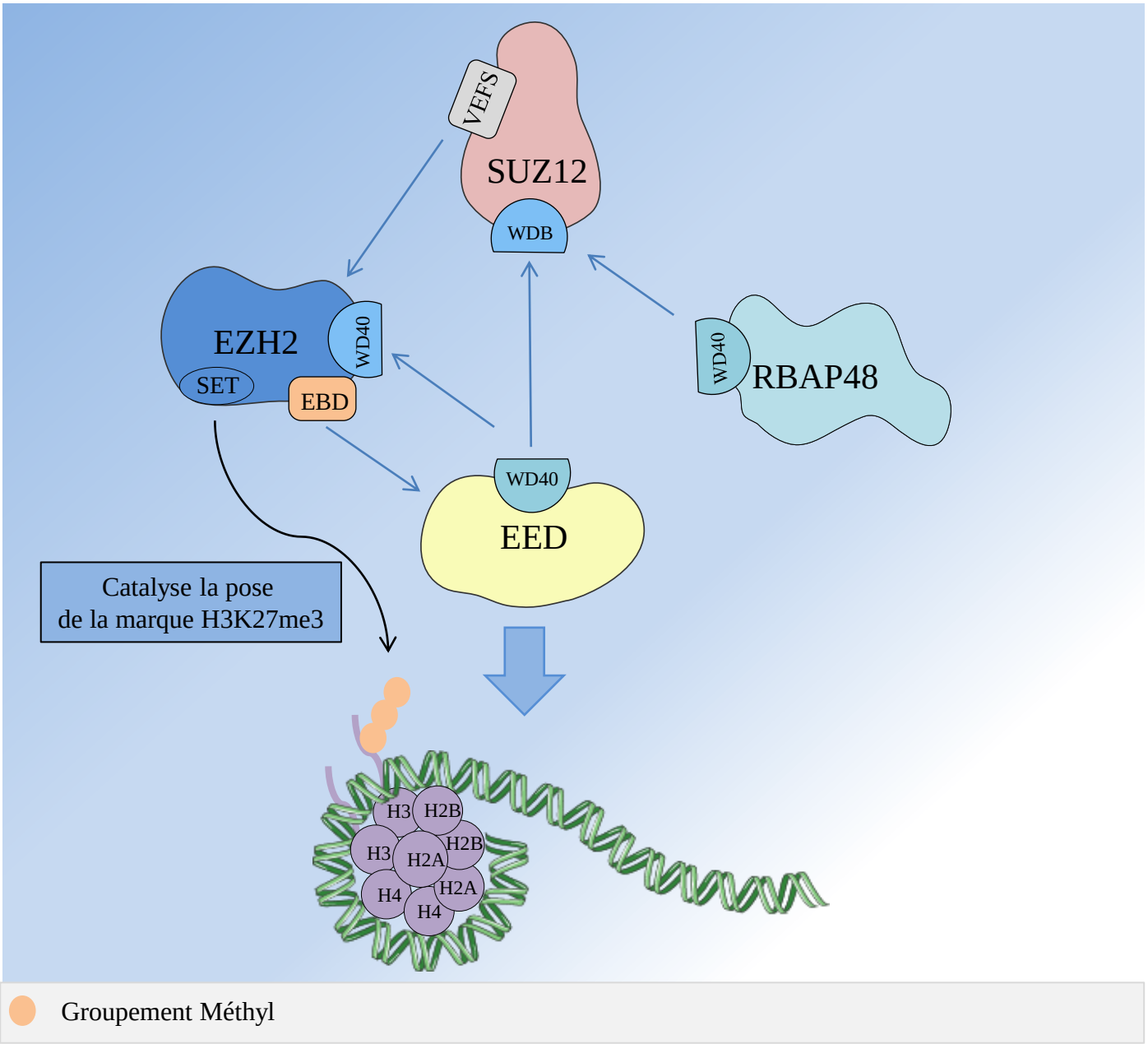


Figure 20: Structure du complexe PRC2 et ses interactions.
Le coeur du complexe PRC2 est composé de quatre protéines : EED (Embryonic Ectoderm Development), SUZ12 (SUppressor of Zeste 12), RBAP48 (RBBP4 ; Retinoblastoma binding protein 48) et EZH2 (Enhancer of Zeste 2) qui porte l'activité catalytique du complexe, permettant la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3) *via* son domaine SET (Su(var), Enhancer of zeste, Trithorax).
Le motif EBD (Eed Binding Domain) de EZH2 permet son interaction avec EED. De même, le domaine VEFS (VRN2-EMF2-FIS2- Su(z)12) de SUZ12 permet son interaction avec EZH2. EED présente un motif WD40 pouvant se lier aux domaines WDB (WD40 binding domain) de EZH2 et probablement de SUZ12, et pouvant reconnaître la marque H3K27me3. Ceci participe au recrutement du complexe au niveau de cette marque. Comme EED, RBAP48 possède un motif WD40 lui permettant d'interagir avec SUZ12 ou H4 et de reconnaître H3K27me3.

diminution de la marque H3K27 (Margueron et al., 2009). Le motif EBD (EED Binding Domain) permettant l'interaction avec EED, a été identifié au niveau de EZH2 (Han et al., 2007). De plus, la séquence d'acides aminés de EED renferme des motifs répétés WD40 qui permettent la reconnaissance et la liaison physique de lysines méthylées. Grâce à ces motifs, EED reconnaît préférentiellement les marques H3K27me3 et permet l'adressage de EZH2 au niveau de ces zones (Margueron et al., 2009). EZH2 à son tour, présente un motif WDB (WD40 binding domain) suggérant un autre niveau d'interaction avec EED, *via* ces domaines WD40 (Tan et al., 2014).

SUZ12. La protéine SUZ12 est requise pour l'activité et la stabilisation du complexe PRC2 (Pasini et al., 2004). Elle contient une séquence hautement conservée chez les eucaryotes, la boite VEFS, dont la fonction est d'assurer une liaison stable entre SUZ12 et EZH2. La délétion totale de ce domaine empêche l'assemblage du complexe PRC2 (Yamamoto et al., 2004). Cependant, des mutations ponctuelles touchant cette boite, conduisent à une perte de l'activité histone méthyltransférase tout en conservant l'assemblage du complexe (Ketel et al., 2005). Un domaine de liaison WDB est retrouvé dans la séquence de SUZ12, suggérant une interaction avec les protéines contenant les motifs répétés WD40 (Tan et al., 2014).

RBAP48. La protéine RBAP48 contient des motifs répétés WD40 (Martínez-Balbás et al., 1998a; Song et al., 2008). Ces motifs permettent à RBAP48 la création de deux sites de liaison grâce à leur conformation tridimensionnelle. Le premier site de liaison permet la fixation des premiers acides aminés de la queue de l'histone H3, alors que le deuxième interagit soit avec une histone H4, soit avec une portion N-terminale de SUZ12. L'interaction du deuxième site avec l'un ou l'autre est exclusive, la fixation de l'un empêchant la fixation de l'autre. RBAP48 peut se lier à l'extrémité de de la queue de H3 et à SUZ12 qui à son tour, sera liée à EZH2 (J Nowak et al., 2011; Schmitges et al., 2011).

Structure du complexe PRC2. La conformation du complexe PRC2 a été mise en évidence par cristallographie chez le champignon Chaetomium thermophilum. Jiao et Liu montrent que la partie N-terminale de EZH2 entoure les domaines

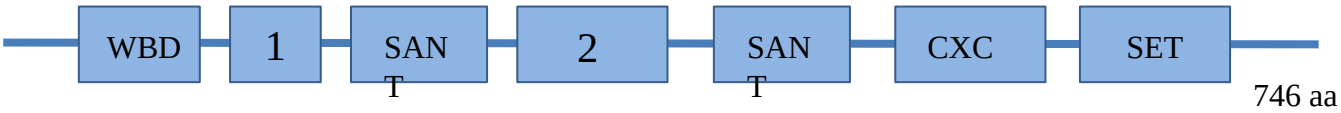


Figure 21 : Organisation protéique de EZH2 chez les mammifères.
EZH2 est composé septdifférents domaines. Le domaine 1 est un élément qui se lie à PHF1 alors que le domaine 2 contient une région se liant à SUZ12. Les domaines SANT permettent l'interaction des protéines de remodelage de la chromatine avec les histones. Le domaine SET possède l'activité méthyltransférase. CXC correspond à cysteine-rich domain. *Adapté d'après Tan et al, 2013.*

WD40 de EED et que sa partie C-terminale contenant le domaine SET forme un arrangement compact à la surface de SUZ 12 (Jiao and Liu, 2015) (Figure 20, 21).

Il a été montré il y a une dizaine d'années que PRC2 contient plusieurs autres protéines comme AEBP2 (Adipocyte Enhancer Binding Protein 2), Pcl (Polycomb like) (Nekrasov et al., 2007) et JARID2 (Landeira et al., 2010; Pasini et al., 2010). Ces facteurs ne semblent pas indispensables pour l'activité enzymatique de PRC2, mais interagissent avec plusieurs composants de ce complexe pour stimuler son activité enzymatique (Peng et al., 2009). Néanmoins, leur présence semble requise pour augmenter l'efficacité du marquage H3K27me3 par PRC2 et, en conséquence, pour augmenter la répression PRC2-dépendante (Li et al., 2010; Margueron and Reinberg, 2011). AEBP2, Pcl et JARID2 peuvent aussi jouer un rôle de recruteurs du complexe PRC2 (Margueron and Reinberg, 2011).

2. Recrutement du complexe PRC2

Etant donné que les principales composantes du complexe PRC2 ne possèdent pas un domaine spécifique de liaison à la chromatine, ces dernières doivent compter sur d'autres acteurs capables de reconnaitre des séquences spécifiques d'ADN.

a. Rôle des PCLs

Trois protéines PCL ont été identifiées : PCL1 (ou Phf1 ; PHD Finger protein 1), PCL2 (ou Mtf2 ; Metal response element binding transcription factor 2) et PCL3 (ou Phf19 ; PHD finger protein 19). Chaque PCL contient trois domaines de reconnaissance et de fixation à des lysines méthylées : un domaine Tudor et deux doigts PHD (Plant HomeoDomain) (Holoch and Margueron, 2017). Les études montrent que Pcl1 ne semble pas jouer un rôle dans le recrutement du complexe PRC2 (Cao et al., 2008). En revanche, dans les cellules embryonnaires souches de souris, un rôle essentiel de Pcl2 et Pcl3 a été démontré dans le recrutement du complexe au niveau de certaines de ses séquences cibles (Ballaré et al., 2012; Brien et al., 2012; Walker et al., 2010). Malgré leur fonction commune, il semble

que Pcl2 et Pcl3 n'agissent pas de la même manière. Pcl2 utilise ses domaines PHD pour cibler la chromatine, alors que Pcl3 semble utiliser son domaine Tudor (Casanova et al., 2011; Hunkapiller et al., 2012). En effet, Pcl2 par le biais de ses domaines PHD permet le recrutement de PRC2 afin d'inactiver l'un des deux chromosomes X alors que Pcl3 semble cibler *via* son domaine Tudor, la marque H3K36me3 associée habituellement à une région transcriptionnellement active, qu'il faudrait alors réprimer (Cai et al., 2013; Musselman et al., 2012). Les différentes combinaisons de PCL utilisées pourraient donc permettre le ciblage du complexe PRC2 au niveau de différents loci à travers le génome.

b. Rôle de JARID2

JARID2 (Jumonji- and AT-rich interaction domain (ARID)-domain-containing) est une protéine qui appartient à la famille Jumonji. Les protéines de cette famille catalysent la déméthylation des histones. La partie C-terminale de JARID2 renferme un domaine ARID qui peut se lier à l'ADN (Li et al., 2010), tandis que la partie N-terminale permet la liaison avec les nucléosomes (Son et al., 2013). Une interaction entre JARID2 et EZH2 était le sujet de discussion dans de nombreuses études (Landeira et al., 2010; Pasini et al., 2010; Peng et al., 2009). Il a été démontré que JARID2, avec sa partie N-terminale, stimule légèrement l'activité enzymatique de PRC2- EZH2, au niveau des nucléosomes. JARID2 est capable de se lier à des séquences d'ADN riches en GC (Li et al., 2010), or Ku et al., ont démontré une présence de PRC2 au niveau des ilots CpG, suggérant alors un rôle de JARID2 comme lien entre PRC2 et ses séquences nucléotidiques cibles (Ku et al., 2008). De plus, dans les cellules souches embryonnaires, il a été révélé que JARID2 régule la liaison de PRC2 à certains de ces gènes cibles (Pasini et al., 2010). L'ensemble de ces résultats concourent à attribuer un rôle important de JARID2 dans le recrutement du complexe PRC2. A noter qu'au niveau de la glande surrénale, une forte expression de JARID2 a été montrée (selon « The human protein Atlas »), suggérant son rôle important dans la régulation de l'activité de PRC2 dans ces glandes.

c. *Rôle de YY1*

Chez les mammifères, les séquences cibles du complexe PRC2 enrichies en îlots CpG, ne se présentent pas sous forme d'un élément de réponse consensus. Chez la Drosophile, les complexes PRC sont recrutés à des séquences spécifiques d'ADN, les « Polycomb Responsive Elements » (PRE) (Levine et al., 2004; Ringrose and Paro, 2004). Il est important de souligner que le PRE est un élément et pas simplement une séquence de nucléotides tels que celles qui sont normalement suffisantes pour le recrutement de facteurs de transcription. Les PREs bien caractérisés à ce jour contiennent des séquences d'ADN reconnues par divers facteurs, comme PHO (Pleiohomeotic) et PHOL (Pleiohomeotic-like). Ces facteurs colocalisent avec les protéines du PcG et plusieurs de leurs sites consensus ont été montrés comme nécessaires au recrutement des protéines du PcG sur ces PRE (Müller and Kassis, 2006). Remarquablement, PHO et PHOL ont été caractérisées comme des protéines appartenant au PcG chez la Drosophile et sont les seuls facteurs de transcription impliqués dans le recrutement des protéines du PcG chez la Drosophile, qui sont conservés chez les mammifères. YY1 est l'orthologue mammifère de PHO. Des études ont pu démontrer que YY1 permet le recrutement de protéines polycomb au niveau de l'ADN, entrainant la déacétylation de l'histone H3 et la méthylation de H3K27 chez la Drosophile (Srinivasan et al., 2005). Chez la souris, l'inhibition de YY1 par des ARN interférents, a permis de montrer que YY1 est requis pour permettre le recrutement de Ezh2 au niveau du promoteur du gène de la myosine (Caretti et al., 2004). Le facteur de transcription YY1 peut donc recruter le complexe polycomb au niveau de séquences spécifiques d'ADN, entrainant une répression transcriptionnelle *via* la méthylation de H3K27. Cependant, l'analyse du génome humain n'a pas pu montrer de colocalisation claire entre les gènes cibles de YY1 et ceux des complexes Polycomb (Xi et al., 2007). Un PRE contenant un site de liaison de YY1 a été identifié entre les locus HOXD11 et HOXD12 dans les cellules souches embryonnaires (Woo et al., 2010). Bien que le site de liaison de YY1 contribue à la répression de ce locus, il n'est pourtant pas essentiel, suggérant que d'autres facteurs pourraient être impliqués dans sa régulation.

Plus récemment, des études ont mis en évidence le rôle d'un lincRNA (large intergenic noncoding RNA) issu de la transcription du promoteur de YY1 dans des cellules myoblastiques murines. Son rôle apparait dans l'inhibition du recrutement du complexe YY1/PRC2 au niveau de séquences cibles, permettant alors leur expression. Cette fonction des lincRNA-YY1 est retrouvée dans des cellules musculaires humaines (Zhou et al., 2015).
Au niveau de la glande surrénale, YY1 en s'associant avec la protéine CREM, permet l'augmentation de l'expression de *StAR* en réponse à une stimulation par l'angiotensine II (Meier and Clark, 2012). Des résultats contraires sont observables suite à l'exposition prénatale à la nicotine qui conduit à une inhibition de *StAR* par le biais du recrutement de YY1 au niveau du promoteur de *StAR* (Liu et al., 2016). Les effets antagonistes du recrutement de YY1 nécessitent des études plus approfondies de ses fonctions exactes.
Concernant les PREs, les séquences d'ADN qui les constituent semblent contenir la plupart des informations nécessaires pour le recrutement des protéines du PcG. Etant donné qu'aucune signature définitive d'une PRE n'a été identifiée, le scénario le plus probable est que les protéines du PcG peuvent être recrutées de plusieurs façons, par différentes combinaisons protéiques.

d. Les longs ARN non codants

La découverte d'une interaction entre les complexes PcG et les ARNnc (ARN non codant) représente un mécanisme potentiel pour le recrutement spécifique des protéines du PcG. Selon leur taille, les ARN non codants sont classés en petits ARN non codants (sRNA) et longs ARN non codants (lncRNA). Les longs ARN non codants sont impliqués dans divers processus biologiques parmi lesquels guider le complexe PRC2 à la chromatine (Kretz and Meister, 2014). Une étude montre que 20% des lncRNA lient le complexe PRC2. L'inhibition de ces derniers avec des siRNA, conduit à des changements de l'expression de nombreux gènes, principalement ceux qui sont normalement réprimés par PRC2. Les locus de ces gènes peuvent être distants des lncRNA suggérant un mécanisme de régulation en trans (Khalil et al., 2009). Des dérégulations des lncRNA sont

retrouvées dans plusieurs types de cancer pouvant expliquer le recrutement anormal de EZH2 au niveau des gènes cibles (Berteaux et al., 2005; Hibi et al., 1996; Ma et al., 2010; Pasmant et al., 2011) . Des séquences communes aux ARN se liant à PRC2 et conservées dans l'évolution ont été identifiées par Tu et al. (Tu et al., 2017).

H19. H19 est le premier lncRNA mis en lumière. Son expression est dérégulée dans les cancers (Yoshimura et al., 2018), notamment de la vessie et de la glande surrénale. Dans le cancer de la vessie, H19 et EZH2 activent la voie Wnt/ ß-caténine favorisant ainsi la migration par inhibition de la E-cadhérine (Luo et al., 2013). Dans le corticosurrénalome, H19 est fortement sous-exprimé. En effet, le gène codant pour H19 appartient à la région génomique 11p15 soumise à l'empreinte parentale. Cette région renferme un domaine contenant le gène *IGF2* qui n'est exprimé qu'à partir de l'allèle paternel et qui est fortement surexprimé dans les CCS suite à la mise en place d'une unidisomie uniparentale paternelle. Ce remaniement et la méthylation du promoteur de H19 expliquent la forte sous expression de H19 qui est normalement exprimé à partir de l'allèle maternel (Gao et al., 2002). Quel impact cette faible expression de H19 peut avoir dans le recrutement de EZH2 dans le CCS, reste à déterminer.

Xist. L'inactivation du chromosome X est initiée par l'expression de Xist, qui va tapisser entièrement un des deux chromosomes X, le rendant presque entièrement inactif d'un point de vue transcriptionnel (Maenner et al., 2010). Xist induit une forte altération de la structure chromatinienne du chromosome X, notamment en stimulant la méthylation de H3K27 (Zhao et al., 2008) par le biais d'une interaction directe avec le complexe PRC2 (Kohlmaier et al., 2004; Maenner et al., 2010).

HOTAIR. HOTAIR est transcrit à partir du locus HOXD du chromosome 12. Il induit le recrutement du complexe PRC2 au niveau du locus HOXC sur le chromosome 2 (action en trans) (Khalil et al., 2009; Rinn et al., 2007). Une surexpression de HOTAIR et SUZ12 a été décrite dans le cancer colorectal (Kogo et al., 2011). Le complexe PRC2 et HOTAIR, en reprogrammant l'organisation de la chromatine peuvent promouvoir des métastases dans les cancers du côlon et du sein, en inhibant l'expression des gènes suppresseurs de métastases (Gupta et al.,

2010). HOTAIR possède également la capacité de contrôler l'expression des gènes, indépendamment du complexe PRC2 (Portoso et al., 2017), suggérant l'existence d'autres partenaires pas encore identifiés.

e. Rôle des sous-unités accessoires EPOP et C10orf12

La protéine EPOP (Elongin BC and Polycomb Repressive Complex 2 Associated Potein ; C17orf96, esPRC2p48 ou E130012A19Rik) permet l'association du complexe PRC2 à l'élongine. Chez les mammifères, les élongines sont des protéines associées à l'ARN polymerase II, qui stimulent l'élongation de la transcription (Reines et al., 1996). La partie N-terminale de EPOP renferme une BC box lui permettant d'interagir avec l'élongine BC, alors que sa partie C-terminale, contient un domaine de liaison avec le complexe PRC2. L'association de EPOP-Elongine BC avec le complexe PRC2, permet la régulation transcriptionnelle fine des séquences cibles du complexe. Toutefois, EPOP ne semble pas posséder de domaine de liaison à la chromatine. Elle ne pourra donc pas permettre directement le recrutement du complexe au niveau de séquences cibles particulières mais va plutôt empêcher, en se fixant sur la sous-unité SUZ12 du complexe, l'association JARID2-PRC2 et donc le recrutement du complexe par JARID2 (Beringer et al., 2016). C10orf12 (ou Gm340 chez la souris) est la sous-unité accessoire de PRC2 la moins étudiée. Sa liaison avec le complexe PRC2 est mutuellement exclusive de la liaison d'EPOP sur PRC2 (Alekseyenko et al., 2014). En utilisant un gène rapporteur luciférase dans des cellules humaines HEK293, des analyses de ChIP ont montré que C10orf12 est capable de recruter le complexe PRC2 à la chromatine, conduisant à la pose de la marque H3K27me3 et donc à la répression transcriptionnelle de ce gène rapporteur (Hauri et al., 2016).

3. Fonctions du complexe PRC2

a. Activité histone méthyltransférase

Le complexe PRC2 contient la seule activité enzymatique connue actuellement, capable de di- et tri-méthyler H3K27. En effet, même si la di-méthylation de H3K27 ne semble pas avoir une action directe sur la régulation génique via les protéines du PcG, elle constitue un produit intermédiaire qui sert de substrat pour la formation successive de H3K27me3 (Zee et al., 2010). La di-méthylation pourrait aussi empêcher l'acétylation de H3K27.

Le composant clé du complexe PRC2 est EZH2, la protéine à domaine SET E(Z) qui méthyle l'histone H3 sur la lysine 27, formant ainsi une marque d'histone répressive (Cao and Zhang, 2004). Toutefois, cette activité est abolie quand EZH2 est dissociée de ses partenaires EED et SUZ12. Cela est dû à la conformation d'autoinhibition qui est adoptée par le domaine SET en absence de l'association avec EED et SUZ12.

EED est capable de reconnaitre et de fixer des marques d'histones telles que H3K27me3. Une haute affinité de liaison existe entre cette dernière et la sous-unité EED, ce qui induit l'activation de PRC2, stimulant la propagation de cette modification d'histones à travers la chromatine (Cao and Zhang, 2004; Wu et al., 2013). L'invalidation de EED entraîne une diminution drastique de l'activité histone méthyltransférase de PRC2 (Ketel et al., 2005; Nekrasov et al., 2005). Au contraire, cette activité est augmentée en présence de peptides H3K27me3 (Margueron et al., 2009). Plusieurs isoformes d'EED existent chez l'Homme. Elles résultent de l'utilisation de différents sites d'initiation de traduction en partant du même ARNm. L'incorporation de l'une ou l'autre des isoformes dans le complexe, module la spécificité de ce dernier (pour H1K26 plutôt que H3K27 par exemple). EED influence non seulement l'activité catalytique du complexe PRC2 mais aussi le choix de son substrat (Kuzmichev et al., 2004).

La sous-unité SUZ12 est essentielle pour l'activité du complexe PRC2 mais les mécanismes expliquant son caractère essentiel ne sont pas encore caractérisés (Cao and Zhang, 2004; Pasini et al., 2004). SUZ12 pourrait jouer un rôle dans la liaison du complexe aux nucléosomes et dans l'inhibition du complexe dans un

contexte de liaison à des marques histones actives (Nekrasov et al., 2005; Schmitges et al., 2011). RBAP48 semble contribuer faiblement à l'activité méthyltransférase de PRC2 (Tan et al., 2014) en jouant un rôle dans la séquestration puis le relâchement de l'histone H3 (Schmitges et al., 2011). RBAP48 peut également se retrouver dans d'autres complexes de remodelage de la chromatine comme NuRD chez l'Homme et NURF-55 chez la drosophile (Lejon et al., 2011; Martínez-Balbás et al., 1998b).

Après l'assemblage et le recrutement du complexe PRC2 au niveau de ses séquences cibles, la protéine EZH2, grâce à son domaine SET, catalyse le transfert de groupements méthyl à partir d'un donneur universel de méthyl, le S-adénosyl-L-méthionine (SAM), produisant alors un S-adénosyl-L-homocystéine (SAH) (Copeland et al., 2009). Ce domaine est capable dans le contexte du complexe, de réussir trois réactions de transfert de méthyl successives, afin de permettre la pose de la marque H3K27me3. Le domaine SET de EZH2 est le seul de sa catégorie capable de catalyser une triméthylation. Ce qui le distingue est la présence d'un résidu tyrosine (Y641) qui détermine la configuration de la poche de liaison au résidu lysine substrat (Collins et al., 2005; Couture et al., 2008). Des mutations somatiques de Y641 (remplacement de Y641 par l'histidine) ont été associées avec le développement de lymphomes (Morin et al., 2010). En revanche, des mutations somatiques entrainant un gain de fonction de favorisent l'activité de triméthylation de EZH2 tout en diminuant celle de monométhylation (Yap et al., 2011).

Des études ont montré que l'activité de EZH2 peut être contrôlée par sa phosphorylation, notamment par les CDK1 et 2 (cyclin dependant Kinase) au niveau de la thréonine 350 (Thr350), un motif conservé entre les espèces. Des cellules porteuses d'une forme EZH2 phospho-déficiente pour ces résidus présentent une multiplication cellulaire réduite, ce qui montre que cette phosphorylation est importante pour la prolifération (Chen et al., 2010; Wu and Zhang, 2011). La forme phosphorylée d'EZH2 a une demi-vie plus courte que la forme non phosphorylée, suggérant que EZH2 pourrait agir de façon dynamique dans la régulation de la prolifération cellulaire, (Wu and Zhang, 2011).

En plus d'EZH2, l'Homme et la souris expriment la protéine EZH1. Ces deux protéines partagent 65% d'identité entre leur séquence d'acides aminés. Quant à leur domaine SET, il est identique à 94%. Leurs gènes présentent toutefois des profils d'expression différents. EZH1 est exprimé de façon ubiquitaire, préférentiellement dans les tissus peu prolifératifs, alors que l'expression de EZH2 est associée aux tissus en prolifération. Les complexes PRC2 contenant l'un ou l'autre de ces homologues (PRC2-EZH2/PRC2-EZH1) peuvent catalyser la méthylation de H3K27. Toutefois, les complexes portant EZH1 présentent une plus faible activité histone méthyltransférase que les complexes PRC2-EZH2. En effet, l'invalidation de EZH1 n'affecte globalement pas les niveaux de H3K27me3 alors que celle de EZH2 est suffisante pour provoquer une forte diminution de la marque. A l'exception de EZH1, l'expression des composants de PRC2 est régulée par la voie de signalisation pRB-E2F, et est donc associée à la prolifération cellulaire (Bracken et al., 2003; Margueron et al., 2008).

Ces données suggèrent une spécialisation des complexes PRC2-EZH2 et PRC2-EZH1 qui possèderaient des fonctions non-redondantes.

b. Recrutement d'enzymes de remodelage de la chromatine

Outre ses fonctions dans la répression génique, le complexe PRC2 peut servir de plateforme de recrutement pour d'autres enzymes telles que les ADN méthyltransférases (DNMT), les déméthylases et les histones déacétylases (Ai et al., 2017; Pasini et al., 2008; Viré et al., 2006).

Des expériences de ChIP montrent une fixation des DNMT au niveau de gènes cibles de EZH2, qui est dépendante de la présence d'EZH2 (Viré et al., 2006). Cette activité pourrait renforcer la répression transcriptionnelle de ces gènes, en induisant la méthylation des cytosines de l'ADN des gènes cibles de EZH2.

Dans les cellules embryonnaires souches murines, une interaction a été démontrée entre PRC2 et la déméthylase Rbp2 (Retinol Binding Protein 2). Cette dernière catalyse la déméthylation de H3K4 qui inhibe l'activation des gènes et joue donc un rôle agoniste de H3K27me3, la méthylation de H3K4 étant un

stimulateur de l'activation des gènes (Pasini et al., 2008; Schwartz and Pirrotta, 2008). Le complexe PRC2 en plus de son activité histone méthyltransférase, est donc impliqué dans la coordination d'autres modifications d'histones.

De même, il a été montré que la sous-unité EED peut permettre le recrutement d'histones déacétylases (HDAC). Les HDAC répriment la transcription en retirant les marques activatrices de la queue des histones (van der Vlag and Otte, 1999). Une étude récente suggère que le rôle de EED pourrait être indépendant de H3K27me3 dans des cellules cardiaques murines. En effet, la surexpression de certains gènes suite à l'invalidation de *Eed* dans ces cellules, n'est pas corrélée à une perte de H3K27me3. De plus, la surexpression de HDAC dans ces souris KO Eed rétablit l'expression de ces gènes et la fonction cardiaque (Ai et al., 2017). Dans tous les cas, le recrutement de ces enzymes répressives va provoquer une compaction supplémentaire de la chromatine et donc une répression de la transcription.

c. Méthylation directe de protéines

Des études ont pu mettre en lumière la méthylation de certaines protéines directement par le complexe PRC2. Des analyses *in vivo* ont montré qu'au niveau cardiaque, le facteur de transcription GATA4, impliqué dans le développement de nombreux tissus, peut être méthylé par EZH2 au sein du complexe PRC2. La méthylation de GATA4 résulte en une perte de son potentiel transcriptionnel (He et al., 2012). L'Elongine A (EloA) peut également être méthylée par PRC2. EloA est un facteur permettant l'élongation de la transcription par l'ARN polymerase II. La méthylation de l'EloA va moduler négativement l'expression de certains gènes cibles (Ardehali et al., 2017). Ces données montrent un autre mécanisme de répression transcriptionnelle dépendante de PRC2, qui s'effectue par la méthylation directe de facteurs de transcription, afin d'atténuer leur activité transcriptionnelle.

Comme le complexe PRC2 est considéré comme un régulateur transcriptionnel, il semble raisonnable de lui attribuer une localisation nucléaire. Remarquablement, une localisation cytoplasmique de EZH2 a été retrouvée au

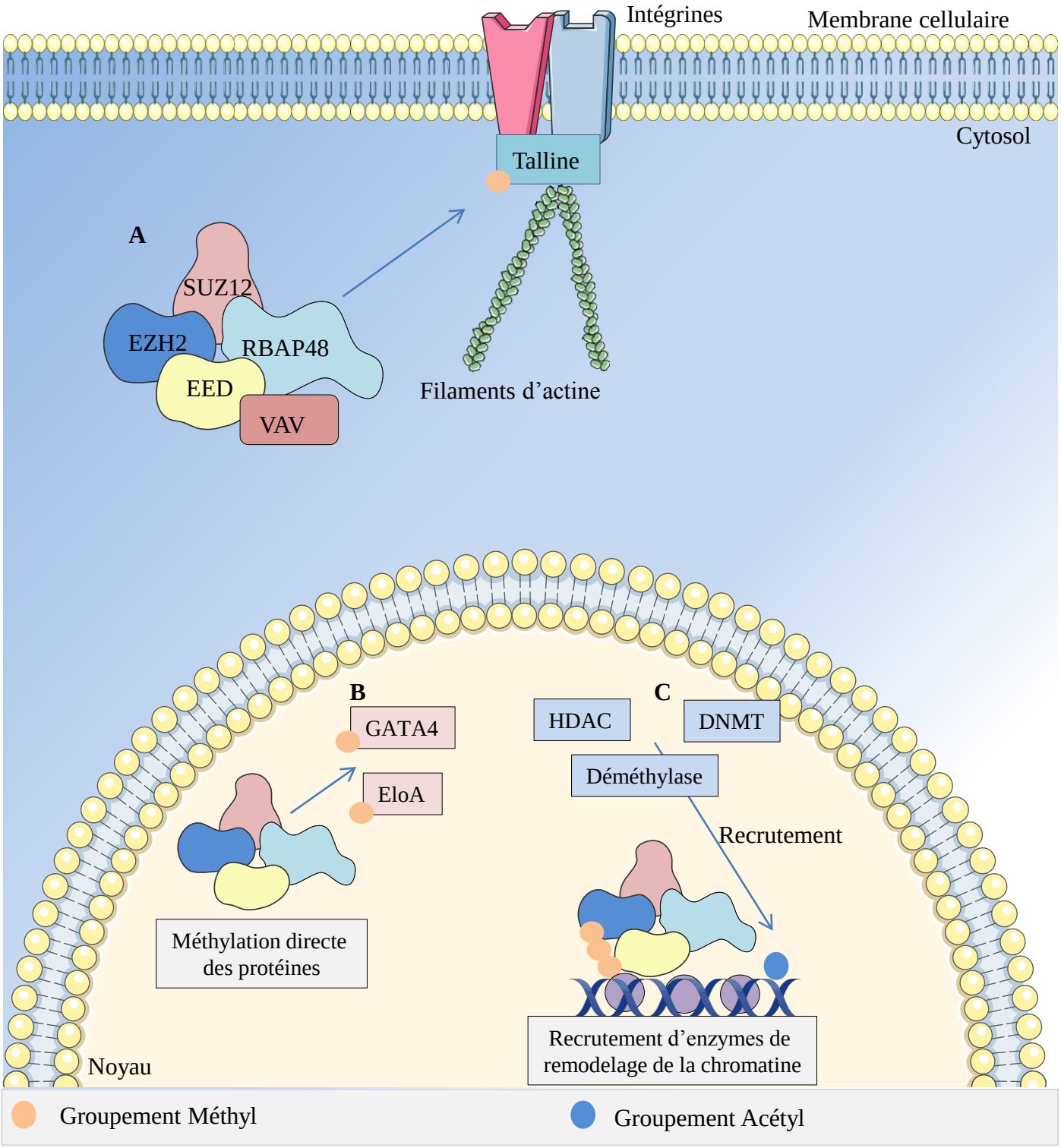


Figure 22: Les différentes activités du complexe PRC2.
L'activité canonique du complexe PRC2 est la tri-méthylation de H3K27. **A.** Lorsqu'il s'associe avec les protéines VAV, ce complexe peut agir au niveau cytoplasmique où il va méthyler des éléments du cytosquelette et permettre notamment la polymérisation de l'actine. En méthylant les talines, PRC2 diminue leur liaison avec les filaments d'actines et provoque le désassemblage des structures d'adhésion cellulaire. **B.** Certaines protéines peuvent directement être méthylées par PRC2. C'est le cas de l'élongine A (Elo A) et de GATA4, ce qui va avoir pour conséquence de réprimer leur activité transcriptionnelle. **C.** En plus déposer la marque répressive H3K27me3, EZH2 et le complexe PRC2 peuvent servir de plateforme de recrutement pour d'autres enzymes telles que des DNMT, des déméthylases qui vont pouvoir retirer des marques de méthylation activatrices, et des histone-déacétylases (HDAC), afin de renforcer la répression transcriptionnelle.

niveau des cellules embryonnaires humaines et murines. Dans ces dernières, il existe un complexe PRC2 potentiellement fonctionnel associé à la protéine VAV1 (Vav Guanine Nucleotide Exchange Factor 1), impliquée dans la polymérisation de l'actine (Su et al., 2005). En empêchant l'association de EZH2 et de VAV1, l'effet de EZH2 sur le cytosquelette est bloqué, suggérant alors que les protéines VAV contrôlent l'interaction de la fraction cytoplasmique de PRC2 avec le cytosquelette (Gunawan et al., 2015). Dans des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF, Mouse Embryonic Fibroblast), en invalidant EZH2, les auteurs ont montré que ce dernier est essentiel à la polymérisation de l'actine, indépendamment de possibles effets indirects *via* H3K27me3 dans le noyau. Toutefois, la protéine EZH2 mutée sur son domaine SET échoue à rétablir le phénotype, indiquant que l'activité méthyltransférase de EZH2 au sein de PRC2 est requise pour la polymérisation de l'actine (Su et al., 2005).
L'ensemble de ces données montre que le complexe PRC2 est impliqué dans de nombreux processus, allant d'une activité histone méthyltransférase jusqu'au recrutement et la régulation de l'activité d'autres protéines (Figure 22).

4. Complexe PRC1

La marque H3K27me3, typique de l'inactivation des gènes PcG-dépendants, est reconnue par le chromodomaine de Polycomb (Pc) (Cao and Zhang, 2004), une sous-unité du complexe PRC1. Chez la drosophile, le complexe PRC1 est composé de plusieurs protéines qui forment le coeur de PRC1: Pc, Polyhomeotic (PH), Posterior sex combs (Psc), Sex combs on midleg (Scm) et dRing (aussi connu sous le nom Sex combs extra (Sce)) (Shao et al., 1999). Chez les mammifères, chacun de ces gènes possède deux ou plusieurs orthologues : On compte en effet, cinq CBX (CBX 2, 4, 6, 7, 8), six PCGF (PCGF 1, 2, 3, 4, 5, 6), trois HPH (HPH 1, 2, 3) et deux protéines RING (RING 1, 2) (Klauke et al., 2013; O'Loghlen et al., 2012; Vandamme et al., 2011). Des analyses protéomiques ont révélé l'existence d'au moins six complexes PRC1 aux fonctions et aux localisations distinctes, permettant la régulation et le ciblage de différents groupes de gènes (Gao et al., 2012).

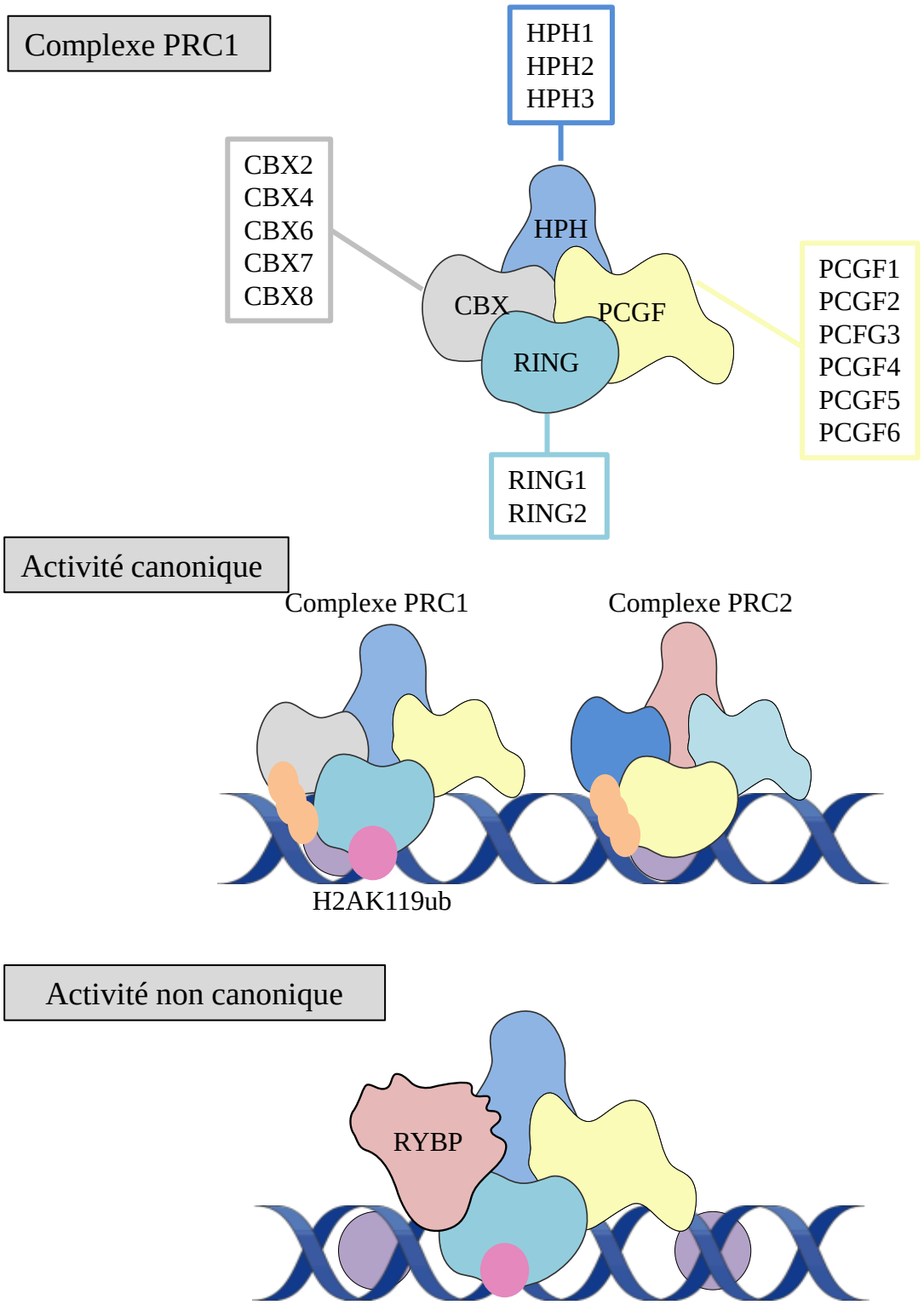


Figure 23: Composition et actions du complexe PRC1.
Il existe une grande hétérogénéité du complexe PRC1. En effet, il se compose de quatre sous-unités : CBX (ChromoBoX protein), PCGF (PolyComb Group Factor), HPH (Human Polyhomeotic Homolog), et une E3-ligase RING (Really Interesting New Gene) qui présentent plusieurs isoformes. On compte 5 CBX, 6 PCGF, 3 HPH et 2 RING, conférant une spécificité aux différents complexes formés. Une fois formé, le complexe PRC1 *via* sa sous-unité CBX, reconnaît la marque H3K27me3 déposée par le complexe PRC2, permettant à la sous-unité RING de PRC1 de catalyser la mono-ubiquitinylation de H2AK119 qui apporte un niveau supplémentaire de compaction à la chromatine. Toutefois, lorsque la sous-unité CBX de PRC1 est remplacée par RYBP (Ring1 and Yy1 Binding Protein), le complexe catalyse toujours la pose de H2AK119ub mais indépendamment de la reconnaissance préalable de H3K27me3 et donc de l'activité de PRC2.

Dans le complexe PRC1, la protéine des mammifères RING est une E3 ubiquitine ligase qui catalyse la mono-ubiquitylation de l'histone H2A sur la lysine 119 (H2AK119ub1), une marque d'histone associée à la répression transcriptionnelle (Wang et al., 2004).

Des études ont mis en évidence le fait que la sous-unité catalytique RING, pourrait également jouer un rôle dans l'activation de la transcription des gènes. En effet, l'inhibition de la sous-unité RING1B en utilisant des shARN (short hairpin RNA), induit à la fois une activation et une répression de l'expression génique (Pemberton et al., 2014). Des expériences de ChIP sequencing des sous-unités de PRC1 révèlent que l'activation de certains promoteurs est dépendante de la fixation de RING1B et de l'ARN polymérase II, suggérant que l'association de ces deux enzymes va permettre l'activation des gènes (Frangini et al., 2013).

L'ensemble de ces résultats montre que le complexe PRC1 présente donc une dualité d'action. D'une part, il va agir en aval du complexe PRC2, en reconnaissant sa marque répressive H3K27me3, afin de verrouiller la compaction de la chromatine et la répression des gènes grâce à l'ubiquitinylation de H2AK119. D'autre part, il a la capacité d'activer l'expression d'autres gènes cibles, indépendamment de PRC2 (Figure 23).

D. Rôle de EZH2 dans la physiopathologie

1. Implications physiologiques dans le développement

a. Rôle de EZH2 dans le développement et la régénération tissulaire

Par leur activité répressive ciblée, le complexe PRC2 et la méthyltransférase EZH2 sont capables de contrôler le devenir cellulaire, le développement embryonnaire, l'homéostasie des tissus adultes et la différenciation des cellules souches.

Au cours du développement embryonnaire EZH2 est impliqué dans l'expression spatiale correcte des gènes *HOX* (Jacobs and van Lohuizen, 2002). Elle est essentielle à la différenciation des cellules du trophectoderme (couche externe de la morula) et au maintien de la pluripotence des cellules de l'épiblaste (Erhardt et al., 2003). Au cours de la vie fœtale, EZH2 joue un rôle crucial dans le

développement cérébral et cardiaque. Au niveau cérébral, EZH2 par sa fonction canonique, stimule l'auto-renouvellement des progéniteurs du cortex cérébral et inhibe leur différenciation (Pereira et al., 2010). EZH2 inhibe aussi l'activité transcriptionnelle de GATA4, un acteur crucial du développement cardiaque. A noter que les facteurs GATA (Gata4 et Gata6) sont impliqués dans le développement de la surrénale (Tevosian et al., 2015). Nous avons montré que dans ce tissu, Ezh2 est capable de réprimer l'expression de Gata4 en posant la marque H3K27me3 sur ses régions régulatrices (Mathieu et al., en révision).

En ce qui concerne la régénération tissulaire, bien qu'aucun rôle de EZH2 dans le développement embryonnaire et la physiologie du pancréas n'ait été prouvé, l'expression de EZH2 augmente suite à la blessure et revient à la normale une fois que le tissu pancréatique est restauré. En parallèle, le niveau de H3K27me3 augmente transitoirement, alors qu'aucune altération d'expression n'est observée pour les autres sous-unités du complexe PRC2 ou EZH1. L'invalidation conditionnelle du domaine SET de EZH2 dans l'épithélium pancréatique à partir de E8.5 ne met en évidence aucun défaut de développement et de fonctionnement pancréatique démontrant qu'il n'est pas essentiel au développement du pancréas et à sa physiologie (Mallen-St Clair et al., 2012). Cependant, le pancréas de ces souris échoue à se régénérer suite à une blessure, même 3 semaines après son induction. La régénération pancréatique s'effectue en plusieurs étapes. Premièrement, les acini survivants se dédifférencient pour générer un épithélium métaplasique, exprimant le marqueur développemental précoce PDX1 (Pancreatic and Duodenal Homeobox 1), ensuite cet épithélium prolifère transitoirement et enfin il réactive un programme génique afin de se redifférencier. L'analyse des souris invalidées pour *Ezh2*, a montré que EZH2 n'est pas impliqué dans la dédifférenciation permettant la formation de l'épithélium métaplasique mais après, dans l'entrée de ces cellules en prolifération. L'invalidation de *Ezh2* empêche donc la recolonisation de la blessure. En effet, EZH2 est requis pour réprimer la transcription de *p16INK4A* (aussi appelé CDNK2A, inhibiteur de CDK) qui inhibe la prolifération et la re-différenciation des cellules (Mallen-St Clair et al., 2012). Dans les hépatocytes de souris, l'invalidation conjointe de EZH1 et EZH2, conduit au développement

spontané de nodules de régénération hépatique et à l'accumulation anormale de progéniteurs, alors que l'invalidation isolée d'un des deux gènes n'induit pas de phénotype. Suite à un traitement chronique au tétrachloride de carbone, un agent hépatotoxique, ou à une hépatectomie partielle, le foie des souris invalidées échoue à se régénérer. L'analyse du génome de ces souris, a en effet mis en évidence la perte de H3K27me3 sur une liste de 51 gènes impliqués dans la régulation de la fibrose, de la survie et de la prolifération cellulaire comme *Ctgf* (Connective Tissue Growth Factor), *Tgfbi* (Transforming Growth Factor Beta Induced) et *Cdkn2a* (Cyclin dependant kinase inhibitor 2a). Cela montre le rôle redondant de EZH1 et EZH2 dans l'homéostasie du foie mais aussi dans sa régénération et cela via la pose de la marque H3K27me3 (Bae et al., 2015).

b. Rôle de EZH2 dans les cellules souches

Les cellules souches embryonnaires (CSE) se caractérisent par une répression des gènes impliqués dans la différenciation. EZH2, au travers du complexe PRC2 intervient dans le maintien d'un état indifférencié des CSE. En effet, l'invalidation de EZH2 dans les CSE humaines entraine des défauts de prolifération, d'auto-renouvellement et de différenciation. Le fait que plusieurs programmes géniques s'expriment en même temps, empêche une différenciation harmonieuse (Collinson et al., 2016). Le déclin d'expression de EZH2 permet l'expression des gènes impliqués dans la différenciation cellulaire (Chou et al., 2011). Lors de la différenciation des CSE, le complexe PRC2 est relocalisé au niveau des promoteurs des gènes impliqués dans la différenciation dans le but de réprimer les gènes associés à la pluripotence. Une forte expression de EZH2 est également détectée dans les cellules souches adultes. En effet, EZH2 est capable de maintenir la pluripotence des cellules
souches adultes hématopoïétiques (De Haan and Gerrits, 2007), musculaires (myoblastes) (Caretti et al., 2004), et neurales (Sher et al., 2008).

Une des voies de signalisation majeure modulée par EZH2 est la voie Wnt/ß-caténine qui joue un rôle de régulateur critique de l'homéostasie des cellules souches. Dans les cellules souches mésenchymateuses (CSM), cette voie de

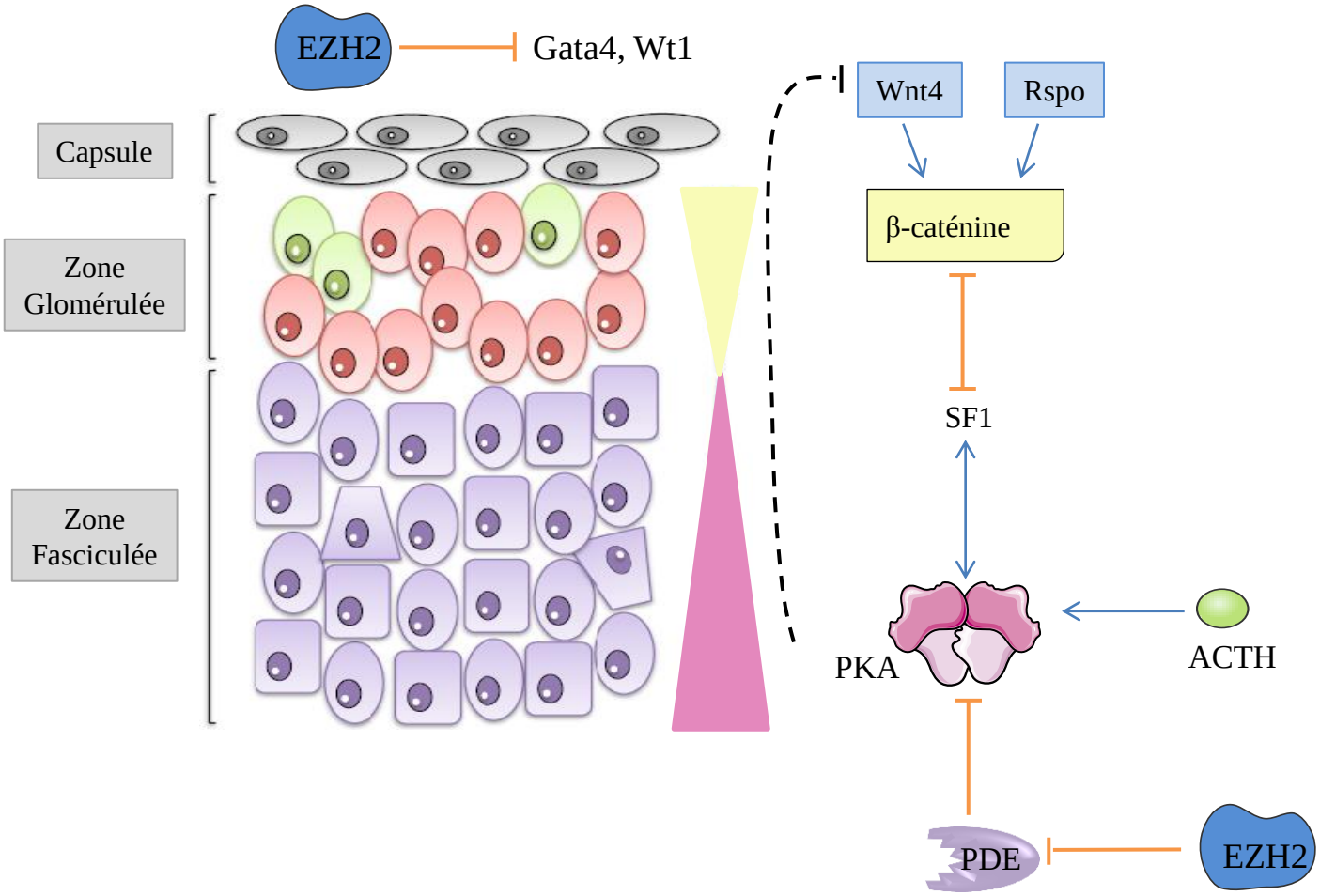


Figure 24 : Intervention de EZH2 dans les mécanismes de régulation de la zonation du cortex surrénalien.
La zonation s'effectue à partir des cellules progénitrices capsulaires et sous-capsulaires (en vert) qui se différencient en cellules de la zone glomérulée en réponse à la signalisation Rspo/Wnt4/β-caténine. Pour maintenir l'identité glomérulée, la β-caténine séquestre Sf1 afin d'inhiber la voie PKA. Lors de la migration centripète des cellules, la voie Wnt est progressivement moins stimulée par Wnt4 et Rspo. L'ACTH peut donc stimuler la voie de signalisation de la PKA qui va inhiber la voie Wnt/β-caténine, notamment par la répression de Wnt4 et éventuellement par l'activation de Sf1. EZH2 réprime l'expression d'inhibiteurs de la voie PKA, les PDE (phosphodiestérases), afin de permettre aux cellules de répondre de façon adéquate à l'ACTH. La zonation résulte donc d'un équilibre entre l'activation des voies Wnt et PKA dans les cellules au cours de leur migration. Cet équilibre est régulé par EZH2 . De plus, EZH2 maintient la différenciation des cellules stéroïdogènes en posant la marque H3K27me3 sur les promoteurs des gènes Gata4 et Wt1. Ceci prévient la dédifférenciation des cellules stéroïdogènes en cellules « progéniteur-like ».

signalisation inhibe la différenciation. EZH2, en inhibant les gènes codant les ligands WNT (*Wnt1*, *6*, *10* et *10b*), permet l'engagement des CSM vers la différenciation adipogénique (Ross et al., 2000; Wang et al., 2010). La différenciation des cellules souches intestinales (CSI) est également dépendante de la voie Wnt/ß-caténine (Kretzschmar and Clevers, 2017). Dans ces dernières, la fonction de EZH2 semble être compensée par EZH1, mais la perte de la totalité de l'activité du complexe PRC2 par l'invalidation de EED, conduit à une différenciation aberrante des cellules qui perdent leur fonction pluripotente (Kretzschmar and Clevers, 2017).

c. *Rôle de EZH2 dans la différenciation zonale*

Au-delà du contrôle de l'homéostasie des cellules souches et de leur différenciation, EZH2 intervient également dans l'acquisition de l'identité des cellules du cerveau en formation. Au cours du développement, le cerveau est constitué de trois vésicules cérébrales primitives : le prosencéphale, le mésencéphale et le rhombencéphale. La perte de EZH2 conduit à un changement d'identité des cellules du prosencéphale qui acquièrent une identité mésencéphalique. EZH2 maintient l'identité des différentes structures durant la croissance cérébrale, en réprimant des groupes de gènes, notamment des inhibiteurs de la voie Wnt, grâce à la pose de la marque H3K27me3. En effet, l'inhibition de cette signalisation conduit à une régression du mésencéphale, cohérente avec le phénotype observé en réponse à l'invalidation de Ezh2 (Zemke et al., 2015). EZH2 pourrait donc participer à la régulation de la zonation de certaines structures anatomiques. Dans le cadre du renouvellement physiologique du cortex surrénalien (Figure 24), des cellules progénitrices vont migrer vers l'intérieur de la glande et subir une différenciation successive en cellules de la zone glomérulée puis en fasciculée, après une étape de conversion de lignage. Ces dernières acquièrent une identité glomérulée puis fasciculée, après une étape de conversion orchestrée par l'équilibre entre l'activation des

voies WNT et PKA, selon la position des cellules au sein du cortex. La voie WNT impose une identité glomérulée, tandis que la voie PKA, en inhibant la voie WNT, impose une identité fasciculée (Drelon et al., 2016a). Dans l'équipe, nous avons pu mettre en évidence que EZH2 réprime l'expression d'inhibiteurs de la voie PKA, les PDE (phosphodiestérases), afin de permettre aux cellules de répondre de façon adéquate à l'ACTH. De fait, l'invalidation de Ezh2 induit une augmentation de l'expression des PDE, qui inhibent la voie PKA, empêchant la différenciation fasciculée au profit de l'identité glomérulée, provoquant ainsi une insuffisance primaire en glucocorticoïdes. De plus, l'invalidation de *Ezh2* conduit à une accumulation sous-capsulaire de cellules indifférenciées, caractérisées par l'expression de Gata4 et Wt1, deux marqueurs de progéniteurs capsulaires indifférenciés, normalement mobilisés en cas de stress tissulaire. Les analyses de ChIP montrent que Gata4 et Wt1 sont deux cibles directes de l'activité de Ezh2 via le complexe PRC2, suggérant que Ezh2 prévient la dédifférenciation des cellules stéroïdogènes en posant la marque H3K27me3 sur les promoteurs de ces gènes (Mathieu et al, en révision). L'ensemble de ces analyses met en évidence le rôle central de Ezh2 dans le maintien de l'homéostasie du cortex surrénalien en permettant une réponse optimale à la signalisation ACTH/AMPc/PKA et en prévenant la dédifférenciation des cellules stéroïdogènes engagées.

2. Implications pathologiques de EZH2 dans la tumorigenèse

Par sa fonction répressive, le complexe PRC2 est donc capable de contrôler de nombreux processus cellulaires tels que le renouvellement tissulaire, l'homéostasie des cellules souches et la différenciation, en contrôlant des voies de signalisation telles que la voie WNT. La dérégulation de ces processus et de ces voies de signalisation joue un rôle clé dans l'initiation et la progression tumorale. De fait, de nombreux travaux ont évalué le rôle des protéines PcG et de PRC2 dans la prolifération et le cancer. EZH2 fut pour la première fois montré comme fortement surexprimé dans les lymphomes. Son expression dans ces derniers était augmentée par rapport aux cellules saines et cette surexpression fut associée à un mauvais pronostic (Raaphorst et al., 2000). Depuis, la

surexpression de EZH2 a été mise en évidence dans de nombreux types de cancer, d'abord celui de la prostate et du sein (Kleer et al., 2003; Varambally et al., 2002), puis d'autres comme par exemple le poumon, le colon, la peau ou le foie (Simon and Lange, 2008). Notre équipe a montré une forte expression de EZH2 dans les carcinomes corticosurrénaliens par rapport aux adénomes et aux surrénales saines (Drelon et al., 2016b).

a. *Surexpression de EZH2 dans les cancers et pronostic*

Dans le cancer de la prostate, la surexpression de EZH2 est rare dans les premiers stades, mais beaucoup plus commune dans les stades tardifs, soulignant sa fonction potentielle dans la progression tumorale (Saramäki et al., 2006; Varambally et al., 2002). Le lien entre une surexpression de EZH2 et un pronostic péjoratif a été établi pour la première fois dans le cancer de la prostate métastatique hormono-résistant, avec une augmentation du risque de récidive après prostatectomie. Une surexpression de EZH2 au niveau protéique et transcriptionnel a été détectée dans les cancers du sein invasifs et métastatiques, en comparaison avec les tissus de sein normaux (Kleer et al., 2003). Cette surexpression, associée à un mauvais pronostic, était corrélée à un taux de survie plus faible et plus court. La perte d'expression de EZH2 était associée à une inhibition de la croissance des cellules tumorales, corroborant l'hypothèse précédemment formulée (Bracken et al., 2003; Cao and Zhang, 2004; Tang et al., 2004). Dans les corticosurrénalomes, la surexpression de EZH2 était associée à l'agressivité de ce cancer et à une survie plus courte chez les patients (Drelon et al., 2016b). Ces données suggèrent que la surexpression de EZH2 est liée à l'agressivité des tumeurs et se trouve associée à un mauvais pronostic.

b. *Rôle répresseur de EZH2 au travers du complexe PRC2*

Il a été mis en exergue qu'une surexpression de EZH2 ou des autres sous-unités de PRC2 était corrélée à une augmentation de la prolifération cellulaire, par défaut de différenciation, et ceci par stimulation directe du gène de fusion

Tissu	Gènes inhibés par le complexe PRC2	Conséquences
Prostate	○ TIMP. MSMB ○ DAB2IP, E-Cadherin ○ SLIT2, ADRB2	○ Dégradation MEC ○ Transition épithélio-mésenchymateuse Migration, invasion
Sein	○ CIITA ○ Rad51	○ Reconnaissance par le système immunitare ○ Réparation de l'ADN
Peau	○ p21/DCKN1A ○ Rap1GAP	○ Sénescence ○ Croissance et différenciation cellulaire
Poumons	JUB	Adhésion cellulaire
Ovaire	Vash1	Angiogénèse
Cellules souches	P16, p19	Différenciation cellulaire

Figure 25: Exemples de processus cellulaires altérés par l'augmentation de l'activité répressive de EZH2 au sein du complexe PRC2 dans le cancer.

impliqué dans le Sarcome d'Ewing (Feinberg et al., 2006). De nombreuses études démontrent expérimentalement, in vitro (Bracken et al., 2003) et in vivo (Chang et al., 2011; Li et al., 2009), que EZH2 est impliqué dans la stimulation de la prolifération cellulaire. En effet, EZH2 au sein du complexe PRC2 présente une activité oncogénique, conduisant au développement tumoral de certains tissus tels que le sein et la prostate mais aussi la vessie, le rein, le sang, le poumon, l'ovaire, l'utérus, les os et la peau (Comet et al., 2016). Dans ces cas, le complexe PRC2 va pouvoir cibler des gènes suppresseurs de tumeurs et réprimer leur expression, en catalysant la pose de la marque H3K27me3. De nombreux processus cellulaires différents peuvent être dérégulés par EZH2 (Figure 25). En effet, dans le cancer de la prostate, EZH2 inhibe le gène suppresseur de tumeur *PSP94* (Prostatic secretory protein 94) en occupant le promoteur de son gène, MSMB (MicroSeMinoprotein Beta) (Beke et al., 2007). Il induit l'agressivité de ces tumeurs en augmentant leurs capacités migratoires par l'inhibition de *SLIT2* et *ADRB2* d'une part, et en facilitant la transition épithélio-mésenchymateuse par l'inhibition de DAB2IP et de la E-cadhérine d'autre part (Deb et al., 2013; Tan et al., 2007). La dégradation de la matrice extracellulaire est une étape essentielle de l'initiation métastatique d'un cancer. Un équilibre entre l'action des MMPs (Matrix metalloproteinases) et de leurs inhibiteurs, les TIMPs (Tissue Inhibitors of metalloproteinases) détermine cette dégradation. EZH2 par l'inhibition de TIMP2 et TIMP3 au sein du complexe PRC2, favorise la dégradation de la matrice dans plusieurs lignées de cellules prostatiques humaines (LNCaP, PC3 et DU145). De fait, l'invalidation de EZH2 dans ces cellules réduit significativement leurs capacités migratoires et invasives (Shin and Kim, 2012) .

Dans les cancers du sein, plus précisément dans les cellules initiatrices, une séquence consensus de liaison au facteur de transcription HIF1α a été découverte au niveau du promoteur de EZH2. Dans un contexte hypoxique, HIF1α se fixe à cette séquence et stimule l'expression de EZH2. La surexpression de EZH2 inhibe celle des paralogues RAD51 (RAD51L1, RAD51L2, RAD51L3, XRCC2 et XRCC3), impliqués dans la réparation des cassures de l'ADN double brin, ce qui pourrait favoriser l'apparition de mutations (Chang et al., 2011). La surexpression de

EZH2 induit aussi une forte répression de gènes suppresseurs de tumeurs comme *FOXC1*, *CDKN1C* (*p57kip2*), *RUNX3* ou *RKIP*, impliqués dans le contrôle de la prolifération des cellules et dans leurs capacités d'invasion et de migration, permettant le développement de métastases (Deb et al., 2013). Le système immunitaire est également affecté dans ces tumeurs. Dans ces dernières, l'expression du gène *CIITA* est inhibée par EZH2. Le transactivateur CIITA (Class II Major Histocompatibility Complex Transactivator) contrôle l'activité du CMH II (complexe majeur d'histocompatibilité II) qui est une protéine localisée à la surface des cellule,s permettant la présentation extracellulaire de peptides nécessaire à l'activation des lymphocytes T et du système immunitaire. De cette manière, la forte expression de EZH2 permet aux cellules cancéreuses d'éviter la reconnaissance par les défenses immunitaires (Truax et al., 2012). Malgré ces résultats, Wassef et al., montrent que la dérégulation de l'expression de EZH2 dans le cancer du sein est une conséquence et non pas une cause du développement cancéreux (Wassef et al., 2015). En effet, en exploitant deux modèles murins de cancer de la prostate et un troisième de cancer de sein, ils ont démontré que EZH2 est dispensable pour le développement des tumeurs. L'invalidation de EZH2 dans ces différents modèles n'affectait pas la progression vers la tumorigénèse, mais au contraire, stimulait la tumorigénèse mammaire en favorisant l'invasion. Ces résultats in vivo montrent donc un rôle protecteur de EZH2 dans ce tissu, en contradiction avec certaines des données obtenues en culture cellulaire. Ces résultats démontrent la nécessité de modèles animaux afin d'évaluer la contribution de EZH2 à la tumorigenèse.

Dans les mélanomes, La surexpression de EZH2 assure l'inhibition de p21/CDKN1A. Cette inhibition permet aux cellules d'échapper à la sénescence (Fan et al., 2011). Dans les cancers de la tête et du cou à cellules squameuses, EZH2 triméthyle Rap1GAP. Normalement, Rap1GAP inhibe Rap1, un membre de la famille Ras dont la voie de signalisation contrôle la croissance et la différenciation cellulaire (Banerjee et al., 2012). Dans les cancers ovariens, la surexpression de EZH2 induit l'angiogénèse. Au niveau de ces tumeurs, EZH2 réduit l'expression de vash1 (Vasohibin 1) provoquant une augmentation de leur vascularisation et ainsi, de leur développement (Lu et al., 2010). Dans les cancers

hépatiques, la surexpression de EZH2 réprime l'expression de plusieurs miRNA comme miR-125b and miR-139 ainsi que DLC1 (Deleted in Liver Cancer 1). DLC1 est une Rho GTPase-activating protein (RhoGAP) responsable du contrôle de l'activité des fonctions RhoA, B, C et de CDC42. Son activité RhoGAP régule négativement les protéines Rho. Dans les cellules normales, la signalisation Rho permet un bon fonctionnement de plusieurs processus biologiques tels que la prolifération et le mouvement cellulaire. En inhibant le suppresseur de métastases DLC1, EZH2 facilite l'évolution de ces tumeurs vers un état plus agressif (Au et al., 2013).

c. *EZH2 comme activateur transcriptionnel*

Dans les exemples présentés ci-dessus, la surexpression de EZH2 conduit à l'augmentation de l'activité du complexe PRC2 qui va catalyser la pose de H3K27me3, réprimant ainsi l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs, impliqués dans divers processus cellulaires. Cependant, dans d'autres cas, EZH2 n'agit pas au sein du complexe et sa surexpression n'est alors pas forcément corrélée à des taux élevés de H3K27me3 (Cha et al., 2005).

i. Rôle activateur dans le cancer de la prostate résistant à la castration

La méthyltransférase EZH2 peut être régulée par diverses modifications post-traductionnelles. Une des plus importantes modifications que peut subir EZH2 est la phosphorylation de sa sérine 21 (S21). Celle-ci réduit l'activité histone méthyltransférase de EZH2 en diminuant son affinité pour l'histone H3 (Cha et al., 2005). Dans les cancers de la prostate résistants à la castration, la phosphorylation de EZH2 sur sa sérine 21 par AKT, activée suite à la perte de PTEN, mobilise EZH2 en dehors du complexe PRC2 pour agir comme un coactivateur du récepteur des androgènes. Cette fonction est associée à la liaison de EZH2 sur la chromatine de manière concomitante à AR, H3K4me3 (marque activatrice) mais pas H3K27me3. Ceci conduit à la surexpression d'un répertoire de gènes associés à la progression tumorale et dont l'expression dépend à la fois

de EZH2 et de AR (Xu et al., 2012). Dans ce même contexte tumoral, EZH2 peut interagir avec le facteur de transcription E2F1. EZH2 et E2F1 sont retrouvés colocalisés au niveau de sites chromatiniens ne portant pas la marque H3K27me3 et stimulent la transcription d'un répertoire particulier de gènes associés à la progression tumorale (Xu et al., 2016). Bien que ces données aient été obtenues dans les mêmes types cellulaires ayant permis de mettre en évidence le rôle coactivateur de EZH2 sur AR, les auteurs n'ont pas évalué l'implication de la phosphorylation de EZH2 dans son interaction avec E2F1. E2F1 étant lui-même un acteur clé de l'expression de EZH2 dans les fibroblastes embryonnaires (Bracken et Al., 2003) et dans le corticosurrénalome (Drelon et al., 2016b), on peut se poser la question de l'existence d'une boucle d'emballement impliquant ces deux facteurs et conduisant à la progression tumorale.

Toujours dans le cancer de la prostate résistant à la castration, EZH2 catalyse la mono-méthylation du suppresseur de tumeurs RORα (Retinoic acid-related Orphan nuclear Receptor α), qui permet de réduire les capacités de migration et d'invasion des cellules de cancer de la prostate androgéno-indépendant. Cette méthylation induit la reconnaissance de RORα par un complexe d'ubiquitinylation et sa dégradation, favorisant la progression tumorale (Lee et al., 2012).

ii. Rôle activateur dans le cancer du sein

Dans les cellules cancéreuses de sein, EZH2 augmente les niveaux d'expression de l'oncogène *c-Myc* et de la *cycline D1*, deux cibles du récepteur des oestrogènes (ER) et de la voie WNT (Shi et al., 2007). Dans les lignées cellulaires de cancer de sein MCF7 et MDA-MB-231, positives pour le récepteur des œstrogènes (ER positives), EZH2 induit la surexpression de c-myc et de la cycline D1, d'une manière dépendante de ER. L'utilisation d'un antagoniste de ER, le ICI182780, inhibe cette surexpression médiée par EZH2. Des analyses supplémentaires ont montré que le récepteur ER, EZH2 et la ß-caténine forment un complexe fonctionnel in vitro et in vivo. Des analyses de ChIP ont confirmé

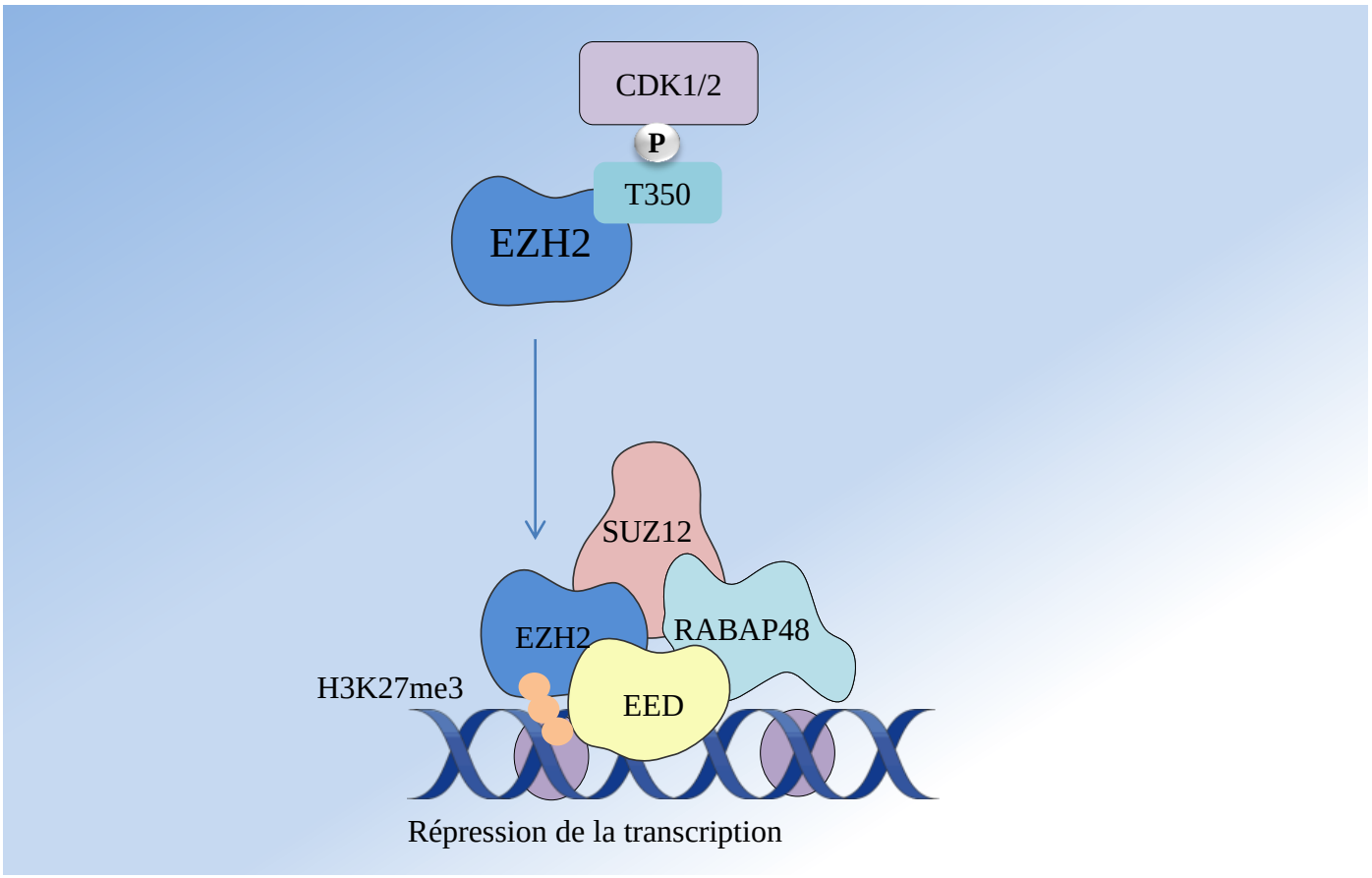


Figure 26: Activité répressive de EZH2.
La phosphorylation de la thréonine 350 de EZH2 par les CDK1/2 (Cyclin dependant kinase) est impliquée dans l'activation de son activité histone méthyltransférase au sein du complexe PRC2.

que ce complexe est recruté au niveau des promoteurs de c-Myc et de la cycline D1, pour induire leur expression.

Au-delà d'un rôle dépendant de ER, des données cliniques suggèrent que la surexpression de EZH2 est également impliquée dans la progression des cancers du sein triple négatifs. Dans ce contexte, EZH2 permettrait effectivement l'activation de la transcription de NOTCH1, en se fixant directement sur son promoteur, indépendamment de son activité catalytique méthyltransférase. La signalisation NOTCH activée augmentant le pool de cellules souches, la surexpression de EZH2 stimulerait la croissance tumorale (Gonzalez et al., 2014).

iii. Interactions avec la signalisation JAK/STAT dans le glioblastome et le lymphome

Dans les lymphomes, JAK3 phosphoryle EZH2 sur sa tyrosine 244, diminuant son activité méthyltransferase mais stimulant son interaction avec l'ARN polymérase II, afin de permettre l'expression d'oncogènes tels que *PSMD1*, *KRAS* et *MAPK15*, impliqués dans la progression du cycle cellulaire, la pluripotence des cellules et la réplication de l'ADN (Bracken et al., 2003; Yan et al., 2016).Toutefois, JAK3 peut aussi phosphoryler EZH2 sur sa tyrosine 641, provoquant sa dégradation en stimulant son ubiquitinylation par l'ubiquitine ligase ß-TrCP (Chen et al., 2010; Sahasrabuddhe et al., 2015; Wu and Zhang, 2011).

A l'inverse, dans les cellules de glioblastome, pS21-EZH2 méthyle le facteur de transcription STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3), cible de JAK3, provoquant ainsi son activation. STAT3 étant lui-même capable d'activer AKT, on peut suggérer que son activation par EZH2 conduise en cascade, à l'activation de la phosphorylation de la sérine 21 de EZH2 par AKT (Kim et al., 2013a), formant une boucle de rétroaction positive.

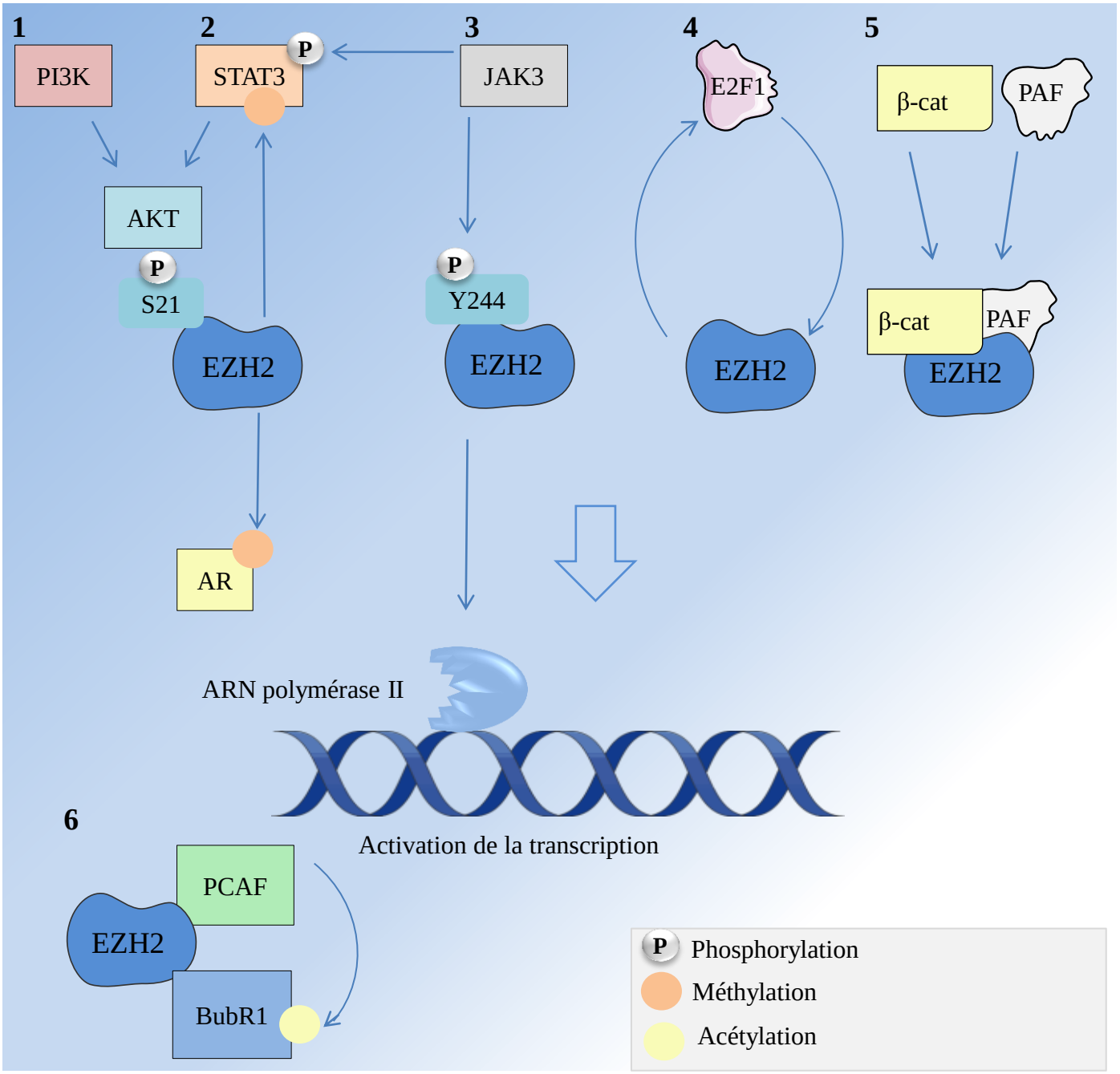


Figure 27: Activité de EZH2 en tant qu'activateur.
L'activité transcriptionnelle de EZH2 peut être déclenchée par la phosphorylation de sa sérine 21 par la kinase AKT, suite à l'activation de la voie PI3K-AKT **(1)**, permettant à EZH2 de méthyler le récepteur aux androgènes (AR) afin d'activer son activité transcriptionnelle. pS21-EZH2 méthyle également le facteur de transcription STAT3 **(2)**, provoquant son activation. STAT3 étant lui-même capable d'activer AKT, on peut imaginer que son activation par EZH2 conduise en cascade, à l'activation de la phosphorylation de la sérine 21 de EZH2 par AKT. JAK3 permet normalement l'activation des protéines STAT *via* leur phosphorylation. De même, JAK3 peut phosphoryler EZH2 sur sa tyrosine 244 **(3)** qui va alors s'associer à l'ARN polymérase II afin de stimuler la transcription de certains gènes. Le facteur de transcription E2F1 stimule l'expression de EZH2 qui peut s'associer en retour à E2F1 afin de stimuler la transcription de gènes **(4)**. Le complexe PAF–βcaténine-EZH2 est recruté au niveau des promoteurs de gènes cibles de la voie Wnt/βcaténine entrainant leur activation **(5).**
BubR1 est un point de contrôle de l'assemblage des kinétochores lors de la mitose. Afin de ne pas être dégradé précocement, il doit être acétylé par PCAF. Pour cela, EZH2 doit s'associer à ces protéines afin de les mettre en contact **(6)**.

iv. Fonctions cytoplasmiques de EZH2

En plus de leur présence dans le noyau, le complexe PRC2 et l'activité méthyltransférase de EZH2 sont retrouvés dans le cytoplasme des cellules et participent à la régulation du cytosquelette (Gunawan et al., 2015b; Su et al., 2005b). Une étude récente montre l'implication de EZH2 dans le point de contrôle qui s'assure de l'assemblage correct des kinétochores aux microtubules, permettant la séparation physique des chromatides sœurs ou des chromosomes homologues au cours de divisions cellulaires. Le point de contrôle inhibe l'anaphase tant que le cytosquelette n'est pas prêt à permettre la ségrégation correcte du matériel génétique aux pôles de la cellule. Ce point de contrôle est un complexe multi-protéique composé notamment de BubR1. Lorsque la cellule est prête, BubR1 est dégradé, et l'anaphase commence. L'acétylation de BubR1 par PCAF évite sa dégradation intempestive. Il semble que EZH2, indépendamment du complexe PRC2, puisse stabiliser BubR1 et donc le point de contrôle, en permettant l'interaction de PCAF avec BubR1 au niveau des kinétochores. En effet, la dérégulation de EZH2 conduit à des aneuploïdies et à des mauvais assemblages du fuseau mitotique. Cependant, cette nouvelle fonction de EZH2 est indépendante de son activité méthyltransférase. En effet, l'inhibition de cette activité par des inhibiteurs pharmacologiques comme le DZNep (inhibiteur de donneurs de méthyl SAM), n'a aucun effet sur la migration des chromosomes contrairement à l'inhibition de l'expression de EZH2 suite à l'injection de morpholinos dirigés contre EZH2 (Qu et al., 2016). Cette fonction de EZH2 protègerait donc des mésappariements chromosomiques et pourrait s'avérer intéressante dans le cas de cancers. La surexpression de EZH2 pourrait être une conséquence de ces cellules en forte prolifération afin de stabiliser au mieux leurs divisions cellulaires. Ces données sont à mettre en relation avec l'interaction de EZH2 avec VAV1 et les talines *via* son activité méthyltransférase et jouant donc un rôle dans l'organisation du cytosquelette (Gunawan et al., 2015b; Su et al., 2005b). Cette activité de EZH2, lorsqu'elle est dérégulée, peut conduire à une transformation néoplasique des cellules (Venkatesan et al., 2018). Il est intéressant de mentionner que dans les cellules de corticosurrénalome, la

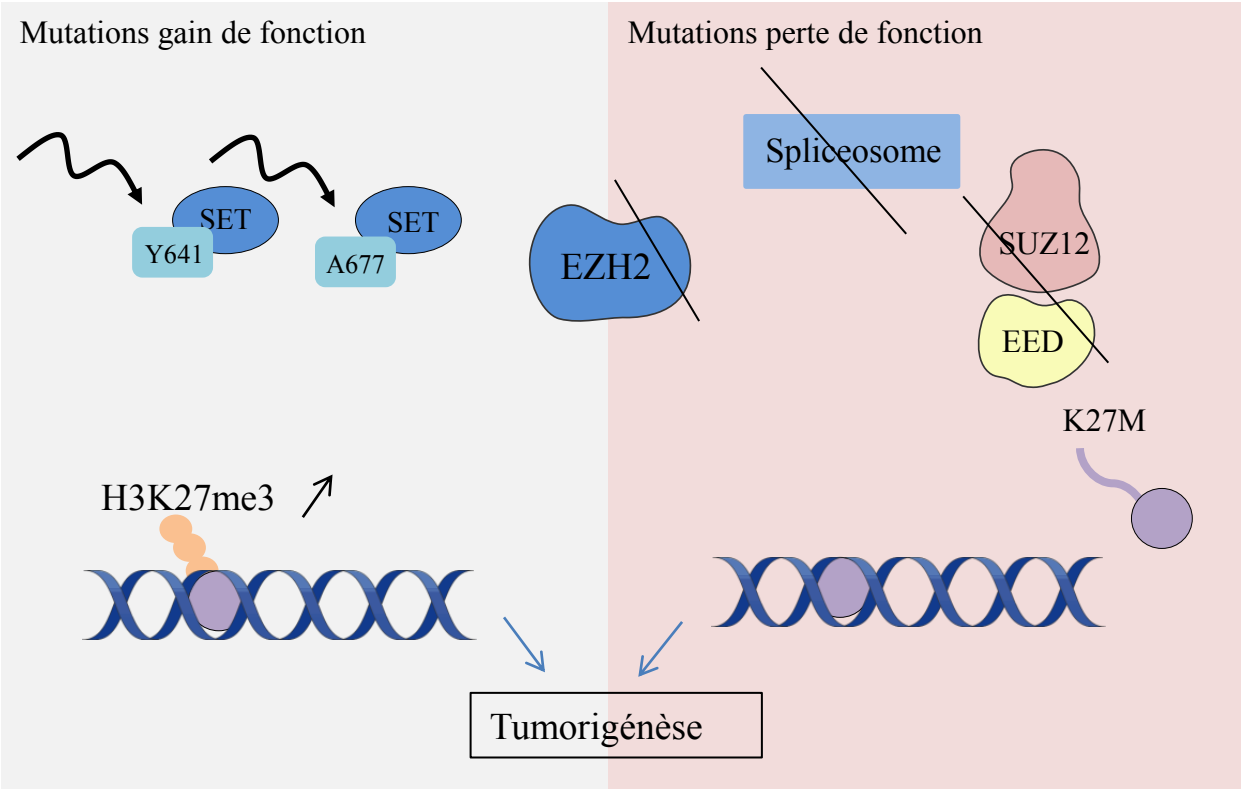


Figure 28: Différentes mutations peuvent conduire à une dérégulation de H3K27me3
Le développement de certains cancers est associé à des mutations ponctuelles n'affectant pas le niveau d'expression de *EZH2*.
Des mutations gain de fonction du domaine SET provoquent l'augmentation des taux de H3K27me3, principalement au niveau de la tyrosine 641 ou de l'alanine 677. Ces mutations stimulent les performances catalytiques de EZH2. A l'inverse, des mutations provoquent une perte de fonction du complexe PRC2, réprimant alors la pose de la marque H3K27me3. C'est le cas lorsque des mutations provoquent un décalage dans le cadre de lecture ou l'apparition d'un codon STOP dans la séquence de *EZH2*. Des mutations peuvent également conduire à une perte de H3K27me3 sans altérer *EZH2*. C'est le cas suite à une mutation du spliceosome, altérant l'épissage de *EZH2*, ou suite à des mutations au niveau d'autres sous-unités de PRC2 comme *Eed* ou *Suz12*. La mutation de la lysine 27 de H3 en méthionine, inhibe également l'activité du complexe PRC2 et se retrouve dans certains gliomes pédiatriques.

stimulation de VAV2 par SF1 augmente les capacités d'invasion (Ruggiero et al., 2017). EZH2 étant surepxrimé dans les corticosurrénalomes (Drelon et al., 2016b), on peut se poser la question d'une interaction fonctionnelle entre EZH2 et VAV2 dans ces tumeurs.

L'ensemble de ces données montre que la surexpression de EZH2 pourrait jouer un rôle global dans l'initiation et la progression tumorale, à la fois au travers du complexe PRC2, mais également comme activateur transcriptionnel (Figure 26, 27) et régulateur du cytosquelette.

3. Mutations de EZH2 et développement tumoral

EZH2 est surexprimée dans de nombreux cancers humains, mais la progression tumorale peut être liée à des mécanismes de type gain-de-fonction de EZH2 selon plusieurs scénarios. Un de ces scénarios correspond à la présence de mutations induisant l'augmentation de son activité catalytique (Figure 28).

Des mutations faux-sens somatiques touchant EZH2 ont été identifiées dans différents cancers. En effet, on retrouve plutôt des mutations de type gain de fonction du domaine SET de EZH2 dans les lymphomes et mélanomes, associées à une augmentation des taux de H3K27me3 (Morin et al., 2010; Sneeringer et al., 2010; Yu et al., 2017). Toutefois, des mutations perte de fonction de PRC2 peuvent également être observées dans certaines leucémies, désordres myéloprolifératifs ou tumeurs du système nerveux (Nikoloski et al., 2010; Raedt et al., 2014).

Les mutations gain de fonction résultent principalement d'une substitution au niveau du domaine catalytique SET, des résidus tyrosine (Y) 641 ou alanine (A) 677. La mutation Y641 diminue fortement la capacité du domaine SET à effectuer la toute première réaction de méthylation (me0 à me1) mais stimule les performances catalytiques pour les réactions suivantes (me1 à me2 et me2 à me3). C'est pourquoi l'allèle muté Y641 est toujours associé à un allèle de type sauvage dans les cellules malades. L'augmentation des taux de H3K27me3 dans ces tumeurs résulte en effet de l'activité combinée de l'enzyme normale, qui va dans un premier temps permettre la monométhylation de H3K27, et de la forme

mutée de EZH2, qui, en association avec la forme native, va catalyser fortement la mise en place de la marque H3K27me3. Le développement cancéreux est donc dépendant de la coordination enzymatique des formes normales et mutées de EZH2 (Sneeringer et al., 2010). C'est en analysant plus de 100 lignées de cellules cancéreuses que la mutation A677 de EZH2 fut identifiée comme étant capable d'augmenter les niveaux globaux de H3K27me3. Cette mutation est caractérisée par le remplacement de A677 par une glycine (A677G), ce qui augmente l'activité de méthylation de H3K27 par EZH2. Contrairement aux mutants Y641, qui perdent la capacité de méthyler H3K27me0, cette substitution A677G maintient les capacités d'utilisation des trois substrats de méthylation (H3K27me0, me1 et me2) et stimule l'activité de méthylation de H3K27me2. Dans ce cas-là, cette mutation dérégule la méthylation de H3K27 mais sans nécessité de coopération avec un allèle normal (McCabe et al., 2012).

Parallèlement aux gains de fonction, EZH2 est également la cible de mutations pouvant conduire à la perte de fonction de la protéine, suite à l'apparition d'un codon stop prématuré ou d'un décalage dans le cadre de lecture, notamment au sein du domaine catalytique SET (Abdel-Wahab et al., 2011; Nikoloski et al., 2010). Cependant des mutations intervenant au niveau d'autres acteurs peuvent également conduire à une perte de fonction de EZH2. En effet, des mutations d'un gène impliqué dans le spliceosome (*SRSF2* ; Serine/Arginine-Rich Splicing Factor 2) ont été associées à une altération de l'épissage de EZH2, conduisant à une diminution de H3K27me3, pouvant aboutir au développement de leucémies (Kim et al., 2015; Sneeringer et al., 2010). De même, des mutations d'autres sous-unités du complexe PRC2 comme SUZ12 et EED induisent la perte de fonction du complexe et sont retrouvées dans les leucémies lymphoblastiques aigües et les tumeurs malignes de la gaine des nerfs périphériques. Enfin, la mutation de la lysine 27 de H3 en méthionine inhibe l'activité du complexe PRC2 et se retrouve dans certains gliomes pédiatriques de haut grade (Wassef and Margueron, 2017).

Ces mutations fonctionnellement opposées aboutissent toutes à la progression cancéreuse suggérant qu'il existe une spécificité cellulaire du rôle de EZH2 et que

le dosage de EZH2 et de l'activité du complexe PRC2 est sans doute crucial pour le développement tumoral.

4. EZH2, promoteur ou inhibiteur de la progression tumorale ?

Même si de nombreux types de cancer surexpriment EZH2, les données présentées ci-dessus suggèrent qu'ils ne sont pas forcément tous tributaires de EZH2 pour croitre et que la surexpression de EZH2 pourrait même constituer une stratégie de défense contre le développement tumoral. De plus, EZH2 présente plusieurs modes d'action qui peuvent être mobilisés différemment selon le type de tumeur ou l'état d'avancement du processus tumoral. Dans le but de déterminer si EZH2 et le complexe PRC2 sont plutôt impliqués dans la promotion ou dans l'inhibition de la progression tumorale, de nombreux modèles d'études ont été développés, notamment des modèles animaux. Dans ces modèles, les stratégies adoptées par les expérimentateurs étaient d'invalider ou de surexprimer EZH2 ou d'autres sous-unités du complexe PRC2.

L'injection de cellules prostatiques humaines surexprimant EZH2 à des souris, a mis en évidence le rôle de EZH2 dans l'initiation de la tumorigenèse et dans la formation de métastases retrouvées au niveau des ganglions lymphatiques, du foie et de la rate. Ces expériences ont donc démontré un potentiel oncogénique de EZH2 au niveau prostatique. Ce potentiel passerait par l'inhibition de DAB2IP, entrainant l'activation des voies de signalisation Ras et NF-KappaB (Min et al., 2010). De même, le traitement par un inhibiteur de EZH2 (EPZ- 6438) d'un modèle murin de xénogreffes de cellules humaines de cancer du rein (G-401) a permis de démontrer que EZH2 est requis pour la prolifération cellulaire et la croissance de ces tumeurs rénales (Knutson et al., 2013). Un autre modèle de xénogreffe a été utilisé pour analyser l'effet de l'inhibition de EZH2 à l'aide de siARN sur des cellules de carcinomes ovariens humaines, injectées dans la cavité péritonéale de souris. Dans ce contexte, l'inhibition de EZH2 permet de réduire la prolifération et également de diminuer l'angiogenèse tumorale grâce à la réactivation d'un inhibiteur de l'angiogenèse, VASH1 (Lu et al., 2010).

L'ensemble de ces résultats confirme donc le rôle oncogénique de EZH2. Toutefois, d'autres expériences suggèrent une fonction opposée.

En effet, dans un modèle de souris développant des tumeurs du système nerveux et des poumons, suite à l'activation de la voie de signalisation Ras via l'invalidation génétique d'un inhibiteur de la voie, Nf1, les auteurs ont invalidé la sous-unité Suz12 de PRC2, causant une perte de la marque H3K27me3. De manière surprenante, l'inactivation de PRC2 diminue la survie de ces souris, qui développent plus rapidement des tumeurs (presque 3 fois plus vite), suggérant alors un rôle de suppresseur de tumeurs du complexe PRC2 (Raedt et al., 2014). De même, l'invalidation de Ezh2 dans le pancréas d'un modèle de souris exprimant une version mutée de KRas (KRASG12D) induisant des néoplasies pancréatiques, conduit à une accélération de l'apparition et à une aggravation de ces néoplasies. Dans le pancréas, EZH2 semble donc également jouer un rôle de suppresseur de tumeurs (Mallen-St Clair et al., 2012).

L'ensemble de ces données démontre bien l'existence d'une tissu-spécificité du rôle de EZH2 qui, d'un tissu à l'autre semble pouvoir jouer des rôles antagonistes. Dans un cas, EZH2 présente une fonction oncogénique alors que dans un autre, il agira plutôt comme un suppresseur de tumeur. Pourtant d'autres données suggèrent que les réalités sont bien plus complexes qu'il n'y paraît.

En effet, dans le sein par exemple, des modèles murins d'invalidation de Ezh2, montrent que son absence et que l'altération de l'activité du complexe PRC2, augmentent l'instabilité génomique et stimulent la tumorigenèse mammaire (Wassef et al., 2015). EZH2 aurait donc un rôle de protection de ce tissu. Pourtant, la xénogreffe de cellules tumorales mammaires surexprimant EZH2 dans des souris NodScid, a mis en évidence que EZH2 joue un rôle oncogénique et participe à la progression du cancer. Sa surexpression réduit la réparation des dommages ADN et provoque l'accumulation de défauts génomiques en dérégulant la signalisation RAF1-ERK-β-caténine (Chang et al., 2011). De même, dans le sang, l'invalidation de Ezh2 à l'aide d'une recombinase Cre située au locus ubiquitaire Rosa, dans un modèle de souris développant des leucémies myéloïdes aigües, suite à l'expression d'un gène de fusion MLL-AF9, atténue significativement la progression de la maladie. La perte de Ezh2 diminue

les niveaux de H3K27me3, permettant l'expression de gènes impliqués dans le développement et la différenciation des cellules. Ezh2 inhibe donc les programmes géniques de différenciation des cellules, assurant la maintenance de la pluripotence des cellules souches et augmentant leur potentiel cancérigène (Tanaka et al., 2012). Dans ce contexte, on peut donc supposer que Ezh2 agit comme un oncogène. Toutefois, l'invalidation de Ezh2, associée à une nette diminution des taux de H3K27me3, dans la moelle osseuse de souris induit le développement de leucémies (Simon et al., 2012), suggérant que dans le même contexte cellulaire, Ezh2 est potentiellement un suppresseur de tumeurs. Au sein d'un même tissu, EZH2 semble donc pouvoir également présenter deux fonctions antagonistes. Ceci suggère qu'au-delà d'une tissu-spécificité, la fonction de EZH2 pourrait dépendre du microenvironnement tumoral, mais aussi du stade d'évolution de la tumeur.

On peut aussi supposer que la surexpression de EZH2 pourrait être une conséquence plutôt qu'une cause de cancers (Comet et Al., 2016). En effet, la surexpression de EZH2 est corrélée à la prolifération des cellules et se trouve sous l'influence de facteurs clés de prolifération (voie pRB-E2F), afin de maintenir la marque H3K27me3 au cours des divisions cellulaires (Bracken et al., 2006). Dans des expériences réalisées in vitro sur la lignée MycCap de cancer de prostate, la modulation du taux de prolifération en augmentant la quantité de sérum dans le milieu, montre une forte corrélation de l'expression de EZH2 au taux de division cellulaire (Wassef et al., 2015). L'accumulation de H3K27me3 reste constante, suggérant que la surexpression de EZH2 est une tentative de garder un taux stable de la marque H3K27me3 qui est censée diminuer dans les cellules en division rapide. Effectivement, toujours dans les mêmes conditions, le knockdown de EZH2, en utilisant des shRNA, résulte en une diminution de la marque H3K27me3, suggérant que la surexpression de EZH2 est dans ce cas insuffisante pour contrer la diminution de la marque. Ces données montrent que la surepxression de EZH2 semble être nécessaire pour maintenir des taux stables de la marque H3K27me3 et impliquent que le niveau absolu d'accumulation de EZH2 n'est pas directement corrélé à l'accumulation de H3K27me3. Ceci suggère que la diminution de la marque H3K27me3 observée dans les cancers avancés

(Xu et al., 2012) pourrait être un signe de dépassement des capacités histone méthyltransférase de EZH2 dans des cellules en très forte prolifération et non pas le reflet d'un switch de l'activité inhibitrice de EZH2 (Wassef et al., 2015). Des analyses in silico, et d'inactivation dans des modèles de cancer du sein et de la prostate, ont effectivement montré que c'est ce dépassement dans des cellules en division anarchique, qui est responsable d'une instabilité transcriptionnelle et de la progression tumorale (Wassef et Al., 2015).

5. Cibler EZH2/PRC2 dans les cancers

a. Inhibition de EZH2

L'ensemble des données précédentes suggère que les dérégulations de EZH2 jouent un rôle important lors de la tumorigénèse. La recherche d'inhibiteurs spécifiques d'EZH2 est donc un enjeu important dans la découverte de nouveaux médicaments anti-cancéreux. Suite à ces résultats, la recherche et l'industrie cherchent à mettre en place des inhibiteurs spécifiques d'EZH2 et de faible toxicité.

DZNep. En 1986, le DZNep, un inhibiteur de S-adénosylhomocystéine, a été établi comme anti-cancéreux (Glazer et al., 1986). Depuis, le DZNep est largement étudié dans le but d'inhiber EZH2 dans les cancers. Le DZNep inhibe la catalyse de H3K27me3 et H3K20me3 et permet ainsi le ré-expression de gènes réprimés (Miranda et al., 2009). Cependant, le DZNep n'est pas spécifique de EZH2 (Richon et al., 2011).

La famille des GSK (GalxoSmithKline). Le GSK-A, un composé de la collection GlaxoSmithKline, est un inhibiteur compétitif du SAM (Diaz et al., 2012). Cet inhibiteur diminue l'abondance de la marque H3K27me3 dans les cellules cancéreuses de sein. Le GSK-A a servi de base afin de développer d'autres composés compétiteurs du SAM dans le cadre de chimiothérapie. Le GSK126 a montré son efficacité dans l'inhibition de prolifération et la mort des cellules de lymphome à larges cellules B mutées pour EZH2 (au niveau de la tyrosine Y641). Le GSK126 est 1000 fois plus spécifique de EZH2 que d'autres histones méthyltransférases et 150 fois plus spécifique de EZH2 que de EZH1 qui

possède un domaine SET identique à 96%. Cette molécule, contrairement au DZNep, n'entraine pas la dégradation de EZH2 (McCabe et al., 2012).

EI1. EL1 est un inhibiteur compétitif de EZH2. Dans les cellules de lymphomes diffus à grandes cellules B mutées pour EZH2 (au niveau de Y641), il induit la diminution de l'abondance de la marque H3K27 et ralentit la croissance cellulaire en favorisant l'apoptose (Qi et al., 2012).

UNC1999. C'est un produit qui cible EZH2 et EZH1. UNC1999 est compétiteur de SAM et permet la diminution de la marque H3K27me3 dans les cellules de lymphomes mutées pour EZH2 au niveau de Y641 (Konze et al., 2013).

La famille EPZ (Epizyme). La mutation de la protéine EZH2 aux niveaux des acides aminés tyrosine 641 (Y641) et alanine (A677) induit son hyperactivation. Cette mutation au niveau de EZH2 est retrouvée dans les lymphomes. Le traitement avec l'inhibiteur EPZ005687 entraine l'apoptose cellulaire des cellules mutantes et a peu d'action sur les cellules non mutées. Cette inhibition de prolifération est accompagnée d'une réduction de la marque H3K27. EPZ005687 est 500 fois plus spécifique pour EZH2 que pour d'autres histones méthyltransférases et 50 fois plus spécifique de EZH2 que de EZH1. Ce composé pourrait être utilisé pour le traitement des patients portant des mutations activatrices de EZH2 (Knutson et al., 2012). Actuellement, un inhibiteur per os de EZH2, EPZ6438 ou tazemetostat est en cours d'essai clinique chez des patients atteints de lymphome à cellule B ou de diverses tumeurs solides de stade avancé et dont les premiers résultats semblent encourageants (Yamagishi and Uchimaru, 2017). Dans certains cas, il est nécessaire d'inhiber à la fois EZH2 et EZH1 pour réduire l'accumulation de H3K27me3 (Shen et al., 2008). Un double inhibiteur EZH1/2, le DS-3201b, a donc été développé. Il est testé en clinique chez des patients atteints de lymphome et leucémie sévères (Yamagishi and Uchimaru, 2017)

b. Inhibition du complexe PRC2

Une dernière stratégie thérapeutique potentielle pourra cibler le complexe PRC2. L'idée générale est alors d'empêcher la liaison de EZH2 avec EED. La

synthèse d'une hélice α qui mime le domaine de liaison de EED à EZH2 permet la dissociation de EZH2 et EED et diminue l'abondance de H3K27me3. L'utilisation de cette hélice α dans les cellules de leucémie entraîne un arrêt de la croissance cellulaire et la différenciation des macrophages (Kim et al., 2013b).

Un inhibiteur permettant d'empêcher la reconnaissance de la marque H3K27me3 par EED a été découvert : l'EED226. L'EED226 induit un changement de conformation de EED et diminue alors l'activité du complexe PRC2. Ainsi, on inhibe l'activité de EZH2 PRC2-dépendante tout en maintenant les activités de EZH2 indépendantes du complexe (Qi et al., 2017).

L'A-395 inhibe également la liaison de EED à H3K27me3. Ce composé possède une activité anti-tumorale. Son effet réduit l'abondance de la marque H3K27me3 et inhibe la prolifération cellulaire (He et al., 2017).

L'ensemble de ces données met en évidence un nombre croissant d'inhibiteurs de EZH2 et PRC2 qui pourront être utilisés dans le traitement de cancers. Toutefois, compte-tenu des multiples activités de EZH2 et de son implication variable dans la progression tumorale, les stratégies de ciblage thérapeutique de EZH2 devront donc prendre en compte cette complexité, afin de présenter des chances de succès.

IV. Présentation du projet de recherche

Les facteurs épigénétiques jouent de nombreux rôles essentiels, du développement embryonnaire jusqu'à la tumorigenèse, en passant par l'homéostasie des tissus. Parmi ces facteurs, la méthyltransférase EZH2 est la sous-unité catalytique du complexe PRC2 qui pose la marque H3K27me3, induisant ainsi la répression de ses gènes cibles. EZH2 est impliqué dans le contrôle de l'homéostasie de cellules souches au cours du développement embryonnaire (Collinson et al., 2016) mais également chez l'adulte (Caretti et al., 2004; Sher et al., 2008). Des altérations de l'expression de EZH2 et de son activité sont largement associées à la tumorigénèse, au travers de mécanismes moléculaires variés (Comet et al., 2016).

La glande surrénale, glande endocrine de réponse au stress, est constituée de deux tissus aux fonctions physiologiques distinctes : le cortex et la médulla. Nous venons de révéler un rôle central de Ezh2 dans le maintien de l'homéostasie du cortex surrénalien. En effet, dans le cortex surrénalien, les cellules progénitrices acquièrent une identité glomérulée puis en fasciculée, après une étape de conversion orchestrée par l'équilibre entre l'activation des voies WNT et PKA, selon la position des cellules au sein du cortex. La voie WNT impose une identité glomérulée, tandis que la voie PKA, en inhibant la voie WNT, impose une identité fasciculée (Drelon et al., 2016a). Dans l'équipe, nous avons montré que EZH2 permet une réponse optimale à la signalisation ACTH/AMPc/PKA en inhibant les inhibiteurs de cette voie (les PDE) et permet ainsi aux cellules de répondre de façon adéquate à l'ACTH. De plus, EZH2 prévient la dédifférenciation des cellules stéroïdogènes engagées (Mathieu et al, en révision). De manière intéressante, dans les cancers de la cortico-surrénale (CCS), nous avons montré que EZH2 était le facteur épigénétique le plus surexprimé. Sa surexpression était associée à l'agressivité de ces tumeurs et à un mauvais pronostic (Drelon et al., 2016b). Dans les cellules H295R, l'inhibition de EZH2 était associée à une inhibition de la prolifération, une induction de l'apoptose et une diminution des capacités de migration cellulaire. Cependant, les modalités

d'action de EZH2 dans ce contexte n'avaient jamais été recherchés.

En effet, EZH2 a été initialement décrit comme une histone méthyl-transférase capable de réprimer la transcription génique en posant la marque chromatinienne H3K27me3 au sein du complexe PRC2 dans lequel il s'associe à RBAP48,SUZ12 et EED. Toutefois, des études récentes montrent qu'il peut également agir comme activateur transcriptionnel en interagissant directement avec des facteurs de transcription tels que AR, STAT3 ou E2F1. Ce changement d'activité de EZH2 est dépendant de sa phosphorylation sur sa sérine 21 par des kinases telles que AKT (Wassef and Margueron, 2016). Par ailleurs, des approches in vitro et in vivo ont permis de montrer que malgré une nette surexpression, EZH2 n'était pas capable de déposer efficacement la marque H3K27me3 dans les cellules fortement proliératives du cancer du sein, conduisant à une instabilité transcriptionnelle associée à la progression tumorale (Wassef et al., 2015). L'ensemble de ces données suggère donc que EZH2 peut agir suivant de multiples modalités en fonction du tissu et du stade de progression tumorale.

Ces observations ont été le point de départ de mon projet de thèse dont l'objectif initial était donc d'identifier le mode d'action et les cibles de EZH2 dans le contexte du CCS.

Afin d'identifier le mode d'action global et les cibles potentielles de EZH2 dans le CCS, nous avons conduit une analyse bioinformatique suivie par une validation des résultats in vitro en réalisant une série d'immunoprécipitations de chromatine (ChIP), des Knock-down par ARN interférence et des inhibitions pharmacologiques dans le but de disséquer les mécanismes moléculaires originaux impliquant une interaction entre EZH2 et ses cibles.

Résultats

EZH2 stimulates expression of genes involved in adrenocortical carcinoma progression

Houda Tabbal*, Amandine Septier*, Mickael F. Mathieu, Coralie Drelon, Stéphanie Rodriguez, Typhanie Dumontet, Marie Batisse-Lignier, Igor Tauveron, Jean-Christophe Pointud, Isabelle Sahut-Barnola, Bruno Ragazzon, Guillaume Assié, Jérôme Bertherat, Anne-Marie Lefrançois-Martinez, Antoine Martinez, Pierre Val.

* These authors contributed equally to this work

Abstract

Adrenocortical carcinoma (ACC) is an aggressive endocrine tumour with dismal prognosis. We have recently shown overexpression of the methyltransferase EZH2 in ACC from three different cohorts of patients. This was associated with poor prognosis in patients and siRNA-mediated knock-down or pharmacological inhibition of EZH2 resulted in inhibition of growth, induction of apoptosis and reduction of aggressive characteristics of H295R ACC cells in culture. Although EZH2 was identified as the methyltransferase that deposits the repressive H3K27me3 histone mark within PRC2 complex, recent data suggest that EZH2 can also cooperate with transcription factors to stimulate gene transcription. Here, using a combination of bioinformatics approaches on gene expression data from three cohorts of ACC patients, we show that EZH2 mostly works as a transcriptional inducer in ACC. We further show that this positive effect of EZH2 on gene transcription is the result of a functional cooperation between EZH2 and the transcription factor E2F1. By combining gene expression data from patients and a mouse model of adrenal-specific *Ezh2* gene ablation, we identify three target genes involved in cell cycle regulation and mitosis i.e., RRM2, PTTG1 and Ase1/PRC1. Overexpression of these genes is associated with poor prognosis, suggesting a potential role in acquisition of aggressive ACC features. Interestingly, pharmacological and siRNA-mediated inhibition of RRM2 blocks cell proliferation, induces apoptosis and inhibits cell migration, suggesting that it may be an interesting target in ACC. Altogether, these data show an unexpected role of EZH2 and E2F1 in stimulating expression of genes associated with ACC aggressiveness.

Introduction

Malignant adrenocortical carcinomas (ACC), are rare endocrine malignancies.

The annual incidence ranges from 0.5 to 2 new cases per million. Despite this rarity, these tumors are associated with dismal prognosis. At diagnosis, eighty percent of patients present metastases reducing the 5 years survival rate below 30% for most series.

Although clinical management relies on complete surgical resection and mitotane treatment alone or in combination with chemotherapy, surgery remains ineffective in patients with metastatic disease (1). It is thus essential to identify the contributors of malignancy in order to develop more effective therapeutic approaches.

Molecular analyses have shown three molecular mechanisms predominantly altered in adrenocortical carcinomas (ACC). These alterations include inactivating mutations of the TP53 associated with loss of heterozygosity of the locus in 25%-35% of ACC)(2, 3), suggesting that P53 is involved in ACC pathogenesis. Consistent with this idea, inactivation of both P53 and RB in the adrenal cortex of mice expressing the simian virus 40 (SV40) large T antigen (TAg) results in metastatic ACC development (4). Other frequent alterations found in ACC result in overexpression of IGF-II (90% of ACC) and constitutive activation of the Wnt/β-catenin signaling pathway (about 40% of ACC)(2, 3). However, using transgenic mouse models, we have shown that these alterations, even when combined together, were not sufficient to induce malignant progression (5–7), indicating that further alterations are required to allow ACC progression.

Screening of epigenetic factors in publicly available transcriptome data from ACC patients identified the histone methyltransferase EZH2 as the most deregulated histone modifier in the adrenal cortex cancer. We have also shown that EZH2 overexpression was associated with tumor progression and poor prognosis in ACC (8) in agreement with other cancers (9). Overexpression of EZH2 in ACC patients was also consistent with the high expression of EZH2 detected in AdTAg mice during tumour progression (4).

Although EZH2 was initially described as the catalytic core protein of the polycomb repressive complex 2 (PRC2), initiating target genes silencing by promoting H3K27 trimethylation (10), emerging literature suggests that EZH2 functions as a multifaceted molecule (9) and switches to the role of a transcriptional activator by directly interacting with transcription factors such as STAT3 and AR (11, 12).

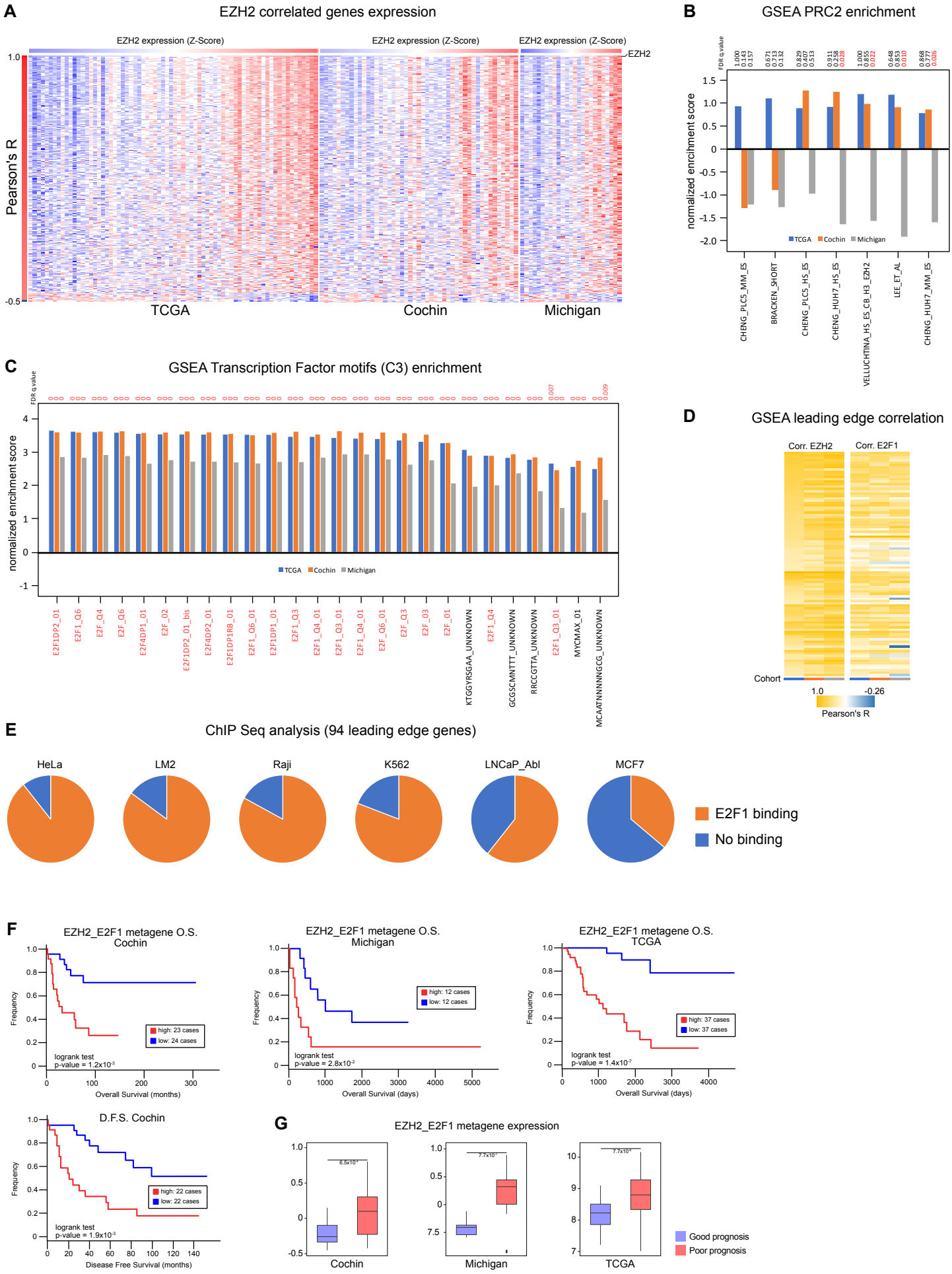

A
EZH2 correlated genes expression
EZH2 expression (Z-Score)
EZH2
Pearson's R
TCGA
Cochin
Michigan
B
GSEA PRC2 enrichment
FDR q value
normalized enrichment score
TCGA
Cochin
Michigan
CHENG_PLC5_MM_ES
BRACKEN_SHORT
CHENG_PLC5_H5_ES
CHENG_HUH7_H5_ES
VELLUCHTINA_H5_ES_CB_H3_EZH2
LEE_ET_AL
CHENG_HUH7_MM_ES
C
GSEA Transcription Factor motifs (C3) enrichment
FDR q value
normalized enrichment score
TCGA
Cochin
Michigan
E2F1DP2_01
E2F1_Q6
E2F_Q4
E2F_Q6
E2F4DP1_01
E2F_02
E2F1DP2_01_bis
E2F4DP2_01
E2F1DP1RB_01
E2F1_Q6_01
E2F1DP1_01
E2F1_Q3
E2F1_Q4_01
E2F1_Q3_01
E2F1_Q4_01
E2F_Q6_01
E2F_Q3
E2F_03
E2F_01
KTGGYRSGAA_UNKNOWN
E2F1_Q4
GCGSCMNTTT_UNKNOWN
RRCCGTTA_UNKNOWN
E2F1_Q3_01
MYCMAX_01
MCAATNNNNNGCG_UNKNOWN
D
GSEA leading edge correlation
Corr. EZH2
Corr. E2F1
Cohort
1.0
-0.26
Pearson's R
E
ChIP Seq analysis (94 leading edge genes)
HeLa
LM2
Raji
K562
LNCaP_Abl
MCF7
E2F1 binding
No binding
F
EZH2_E2F1 metagene O.S.
Cochin
high: 23 cases
low: 24 cases
logrank test
p-value = 1.2x10-3
Frequency
Overall Survival (months)
EZH2_E2F1 metagene O.S.
Michigan
high: 12 cases
low: 12 cases
logrank test
p-value = 2.8x10-2
Overall Survival (days)
EZH2_E2F1 metagene O.S.
TCGA
high: 37 cases
low: 37 cases
logrank test
p-value = 1.4x10-7
Overall Survival (days)
D.F.S. Cochin
high: 22 cases
low: 22 cases
logrank test
p-value = 1.9x10-3
Disease Free Survival (months)
G
EZH2_E2F1 metagene expression
Cochin
Michigan
TCGA
Good prognosis
Poor prognosis

Figure 1. EZH2 may act as a transcriptional activator through potential cooperation with E2F1 in ACC. A- Heatmap showing levels of expression of the genes with highest Pearson's correlation with EZH2 (FDR<0.001) in transcriptomes of three ACC cohorts (TCGA, Cochin, Michigan). Patients (columns) are organised according to increasing EZH2 expression shown as a z-score (from blue, low expression, to red, high expression). Genes (lines) are organised by decreasing Pearson's R coefficient. **B-** Correlation coefficients with EZH2 were used in a pre-ranked Gene set enrichment analysis (GSEA) to evaluate the presence of PRC2 targets in the genes correlated with EZH2. Curated lists of PRC2 targets were described in (13). **C-** Correlation coefficients with EZH2 were used in a pre-ranked GSEA analysis to identify putative transcription factors binding sites in the promoters of the genes correlated with EZH2. Only gene sets with FDR < 0.01 were selected. Gene sets were extracted from MSigDB C3, which contains gene sets defined by the presence of putative transcription factor binding sites within their regulatory regions. **D-** Genes constituting the leading edges of the 21 "E2F" gene sets were extracted and intersected to build an EZH2/E2F core list of 94 genes. Their correlation coefficients with EZH2 and E2F1 were computed in the three cohorts of patients and represented as a heatmap. Columns represent the three cohorts, line represent correlation coefficients for each gene. **E-** The capacity of E2F1 to bind to the regulatory regions (+- 2kb from TSS) of the 94 leading edge genes was analysed in publically available E2F1 ChIP sequencing data obtained from 6 different cell lines. Pie charts represent the proportion of genes with (orange) or without (blue) E2F1 biding. **F-** Patients' overall survival (Cochin, Michigan, TCGA) and disease-free survival (Cochin) was analysed as a function of the mean expression of the 94 genes (EZH2_E2F1 metagene) by the Kaplan-Meier method. Statistical significance was evaluated by the Logrank test. **G-** Expression of the metagene in ACC in the groups of good (blue) and poor prognosis (red). Statistical significance was evaluated by Wilcoxon's test.

In this paper, we aimed to identify EZH2 target genes and its main mode of action in ACC. Thus, we conducted a bio-informatics analysis of ACC patients from three different cohorts. This analysis showed a strong correlation between highly expressed EZH2 and positively regulated genes suggesting a role of transcriptional inducer for EZH2 in ACC. We further show that this positive effect of EZH2 on gene transcription is the result of a functional cooperation between EZH2 and the transcription factor E2F1. By combining gene expression data from patients and a mouse model of adrenal-specific *Ezh2* gene ablation (13), we show that this interaction results in the upregulation of three genes implicated in cell cycle regulation and mitosis i.e., RRM2, PTTG1 and Ase1/PRC1. Overexpression of these genes is associated with decreased overall and disease free survival, suggesting a potential role in acquisition of aggressive ACC features. Interestingly, pharmacological and siRNA-mediated inhibition of RRM2 blocks cell proliferation, induces apoptosis and inhibits cell migration, suggesting that it may be an interesting target in ACC. Altogether, these data show an unexpected role of EZH2 and E2F1 in stimulating expression of genes associated with ACC aggressiveness.

Results

In order to identify EZH2 target genes in ACC, we performed correlation analyses on the basis of publicly available transcriptome data from Cochin, Michigan and TCGA cohorts, which represented a total of 146 cancer patients. Pearson R correlation coefficients between EZH2 and all genes were computed. After determination of a false discovery rate (FDR) threshold of 0.001, we selected genes that were correlated with EZH2 in all three cohorts. These data were then represented as a heatmap in which patients were ordered as a function of EZH2 expression and genes as a function of correlation coefficients (Fig 1A). Unexpectedly, most genes that passed our selection criteria were positively correlated with EZH2 (n = 314/15701) and only a

small proportion of genes were negatively correlated (n = 11/15701, difference in proportions F-test p value = 6.37 10^{-79}) (Fig 1A, Table S1). Even though decreasing the stringency of our selection criteria (FDR < 0.01) increased the number of correlated genes, the proportion of positively correlated genes (653/15701) was still much higher than negatively correlated genes (172/15701, F-test p value =2.2 10^{-16}). This suggested that the main mode of action of EZH2 in ACC might not be associated with gene repression. This hypothesis was further supported by low enrichment for EZH2/PRC2 ChIP targets in the list of EZH2 correlated genes (Fig 1B). Recent data suggest that EZH2 can function as a transcriptional activator by associating with a number of transcription factors (TF). To gain insight into which TF may be associated with EZH2-dependent gene regulation in ACC, we performed GSEA analysis using gene sets defined by the presence of conserved putative TF binding motifs within their promoters (MSigDB C3). Out of the 33 significantly enriched gene sets (FDR <0.01), 21 (63%) were defined by the presence of putative E2F binding motifs (Fig 1C). To further confirm the involvement of E2F transcription factors in the control of these genes, we extracted and intersected leading edge genes from the 21 gene sets. This represented a list of 94 potential targets (Table S2). These 94 genes were highly correlated with both EZH2 and E2F1 expression in the three cohorts of patients (Fig 1D). Analysis of publically available ChIP sequencing data showed evidence of E2F1 binding within their regulatory regions (± 2 kb from TSS) in HeLa (84/94), LM2 (80/94), Raji (78/94), K562 (76/94), LNCaP-Abl (57/94) and MCF7 cells (34/94) (Fig 1E).

To gain insight into the potential involvement of these genes into ACC pathogenesis, we analysed patient survival as a function of the mean expression of the 94 genes (EZH2_E2F1 metagene). Interestingly, high expression of the metagene was associated with decreased overall survival (Cochin, TCGA) and shorter disease-free survival (Cochin) analysed as continuous variables (Wald test, TCGA O.S. p=3.69x10^{-5}, Cochin O.S. p=2.74x10^{-3}, Michigan O.S. p=0.036, Cochin D.F.S. p=3.33x10^{-3}) or after dichotomisation according to median of expression (Fig 1F). This was further confirmed by significantly higher expression of signature genes in the group of poor prognosis within the three cohorts (Fig 1G).

Altogether, these data suggested that EZH2 might positively control expression of genes involved in ACC progression, through positive interaction with the E2F family of TF. To further refine the list of

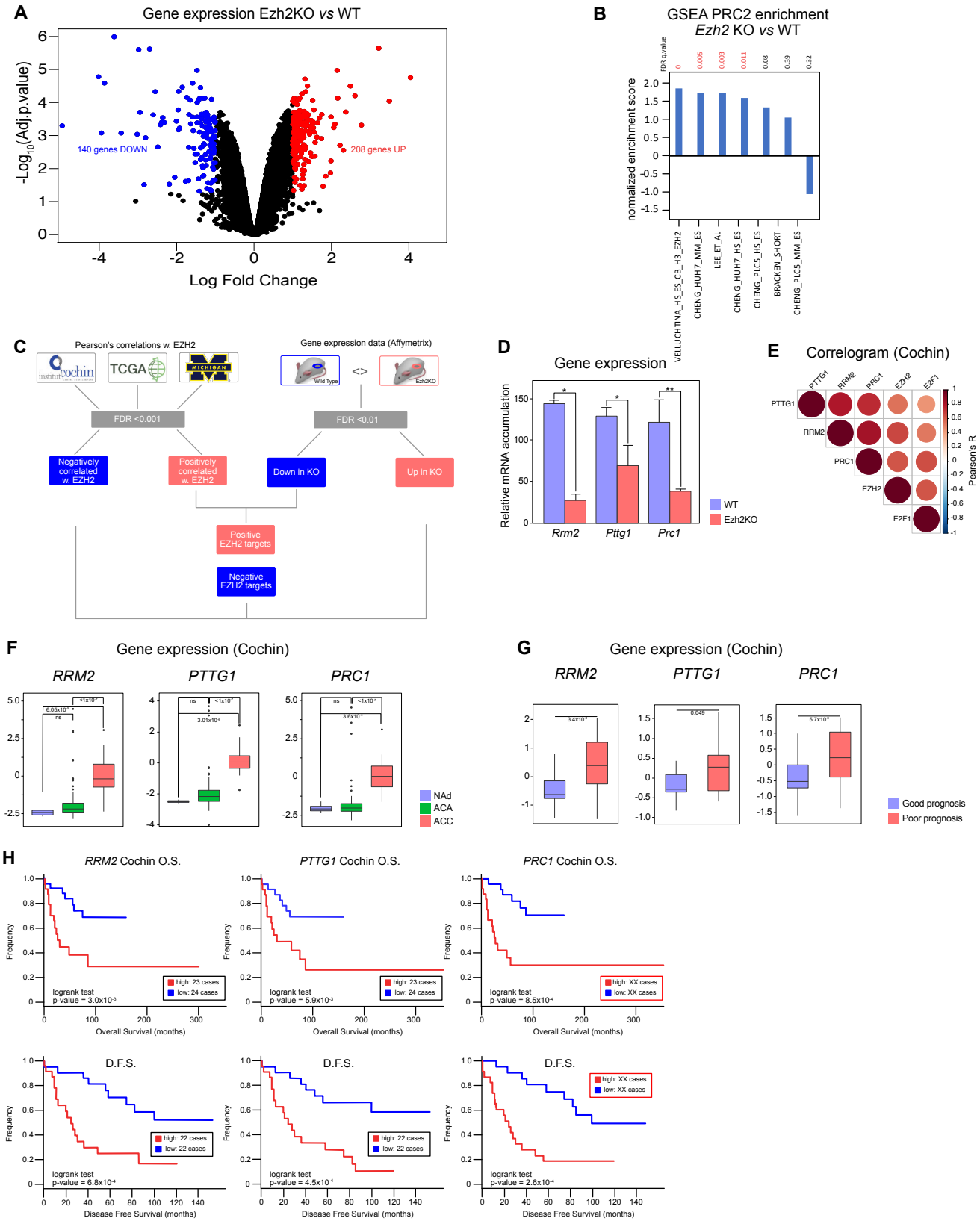


Figure 2. Identification of EZH2 target genes. A- Differential gene expression was evaluated by micro-array analysis in a mouse model of adrenal-specific inactivation of Ezh2, compared with wild-type mice (13). Volcano plot represents Log Fold Change and –Log10 of adjusted p.value (FDR) for 4 knockout compared with 3 wild-type adrenals. Red dots show genes significantly up-regulated in knockout compared with wild-type adrenals. Blue dots show genes significantly down-regulated in knockout compared with wild-type adrenals. B- GSEA evaluation of PRC2 targets enrichment in differentially expressed genes. C- Strategy for identification of EZH2 targets in ACC by intersection of patients' correlation data with mouse gene expression data. D- Expression levels of the three identified positive target genes (RRM2, PTTG1, PRC1) were determined by RTqPCR in 8 wild-type and 8 Ezh2 knockout adrenals. Bars represent the mean +- SEM. Statistical analysis was conducted by Wilcoxon's test. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ E- Correlogram shows correlation of expression of RRM2, PTTG1 and PRC1 with expression of EZH2 and E2F1 in Cochin's cohort. F- Expression of RRM2, PTTG1 and PRC1 in normal adrenals, adrenocortical adenomas and adrenocortical carcinomas. Significance was evaluated by ANOVA. G- Expression of RRM2, PTTG1 and PRC1 in the groups of good (blue) and poor (red) prognosis in Cochin's cohort. Significance was evaluated by Wilcoxon's test. H- Overall (O.S) and disease-free (D.F.S) survival as a function of RRM2, PTTG1 and PRC1 expression in Cochin's cohort. Statistical significance was evaluated by the Logrank test.

relevant EZH2 targets in the adrenal gland, we made use of transcriptome data obtained by analysis of a mouse model of adrenal-specific Ezh2 knockout. This model, which relies on excision of Ezh2 exon by Sf1:Cre mediated recombination was recently characterized (13). Comparison of gene expression in 3 control and 4 knockout adrenals showed significant deregulation of 348 genes (FDR <0.1, Abs(LogFC)>1.0) upon inactivation of Ezh2 (Fig 2A). In this physiological context, Ezh2 ablation was essentially associated with gene overexpression (Fig 2A) and positive enrichment of PRC2 target genes (Fig 2B). This suggested that the main mode of action of EZH2 differed between normal and cancer cells in the adrenal gland. However, intersection of human and mouse data (Fig 2C) resulted in the identification of *RRM2*, *PTTG1* and *PRC1* as three potential positive targets of EZH2 in the adrenal. Consistent with this, their expression was significantly decreased in knockout adrenals (Fig 2D) and was positively correlated with EZH2 and E2F1 in all three cohorts of patients (Fig 2E and Supplementary Fig 1A).

PTTG1 encodes Securin, a protein involved in the G2/M transition by inhibiting separation of sister chromatids (14) but also in DNA repair (15) and regulation of transcription (16). It is a putative oncogene in a number of tissues such as pituitary (where it was isolated) (17) and kidney (18) and was shown to be overexpressed in ACC by an independent study (19).

PRC1, also known as ASE1, encodes another key regulator of mitosis, which binds microtubules and is essential for the formation of the midzone bundle, central spindle organisation and subsequent cytokinesis (20, 21). It is associated with cancer progression and WNT pathway activation in a number of tissues (22, 23). RRM2 encodes one of the small subunits of ribonucleotide reductase (RR), the rate limiting enzyme for production of deoxyribonucleotides. RRM2 associates with RRM1 to form an active RR and its accumulation plays a central role in controlling RR activity (24). RRM2 is known to play an active role in tumorigenesis (25) and is a prognostic factor for cancers such as colon, breast and pancreas (26–28). These data suggest that these three genes may be involved in ACC pathogenesis and aggressiveness.

Consistent with this idea, all three genes were markedly overexpressed in ACC compared with normal adrenals and ACA in both Cochin and Michigan cohorts (Fig 2F and Supplementary Fig 1B). This was further supported by the observation of higher expression of the three genes in the groups of poor prognosis in the three cohorts of patients (Fig 2G and

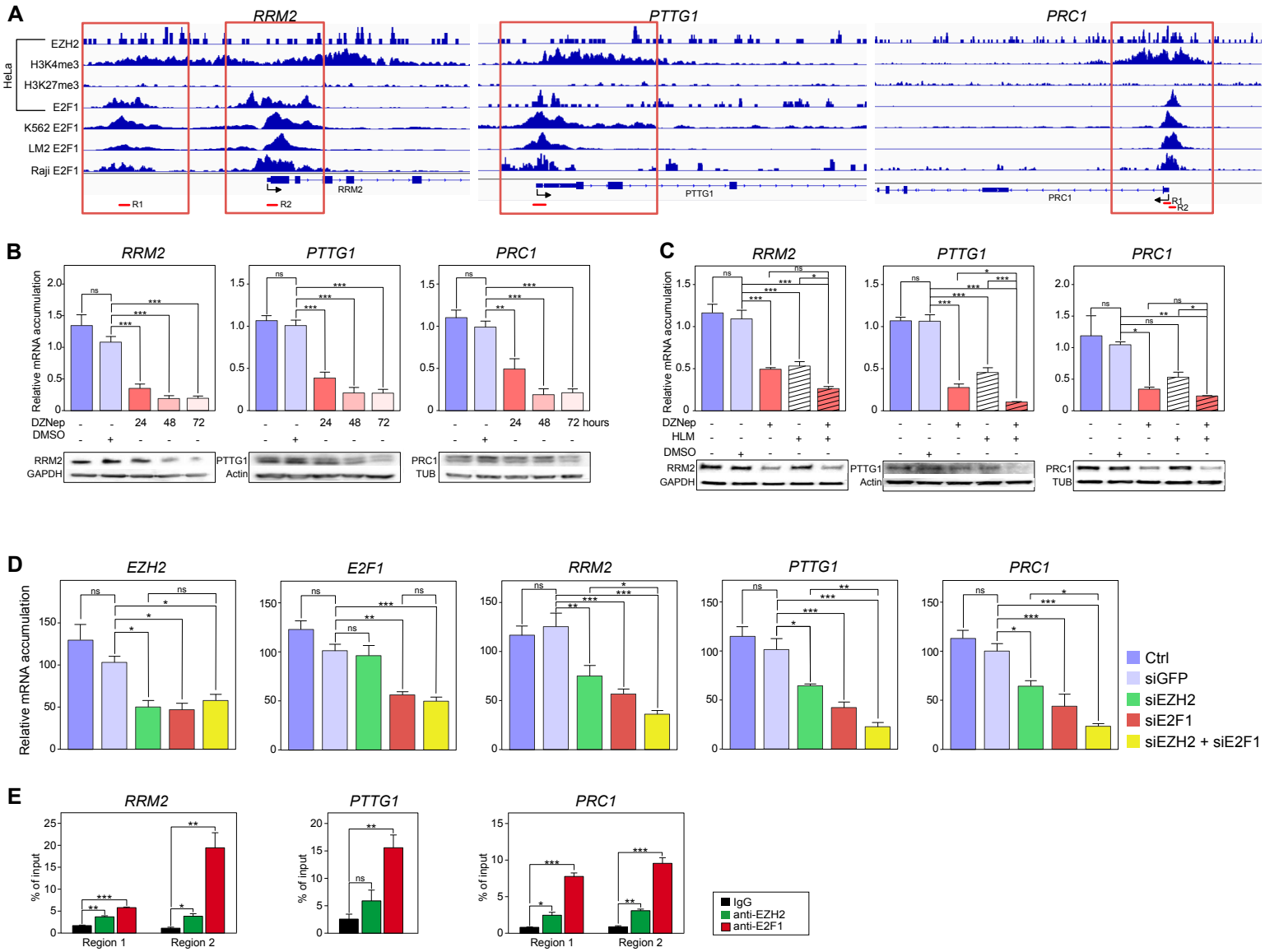


Figure 3. EZH2 and E2F1 cooperate to up-regulate expression of RRM2, PTTG1 and PRC1 in ACC. A- Graphical representation of enrichment for EZH2, H3K4me3, H3K27me3 and E2F1 on the regulatory regions of RRM2, PTTG1 and PRC1 in HeLa, K562, LM2 and Raji cells. Red boxes show regions with EZH2, E2F1 and H3K4me3 enrichment, in absence of H3K27me3. Regions amplified by qPCR in panel E are shown as red segments under graphical representations. B- Effect of DZNep 5µM treatment for 24, 48 and 72h on expression of RRM2, PTTG1 and PRC1 was evaluated by RTqPCR (graphs) and western-blot (bottom panels) in H295R cells. C- Effect of DZNep and/or HLM treatment for 48 h on expression of RRM2, PTTG1 and PRC1 was evaluated by RTqPCR (graphs) and western-blot (bottom panels) in H295R cells. D- Effect of EZH2 and/or E2F1 knockdown on expression of RRM2, PTTG1 and PRC1 was evaluated by RTqPCR after transfection of siRNAs targeting EZH2 and/or E2F1 in H295R cells. E- Binding of EZH2 and E2F1 to the regulatory regions of RRM2, PTTG1 and PRC1 was evaluated by ChIP in H295R cells. Data are expressed as percent of enrichment over chromatin input. IgG were included as negative control. In B, C and D graphs represent the mean of 5 independent experiments +- SEM. In E, graphs represent the mean of three independent IP experiments +- SEM. Significance was evaluated by ANOVA in B, C, D and E. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

Supplementary Fig 1C). Higher expression of *RRM2, PTTG1* and *PRC1* was also associated with significantly lower overall survival (Cochin, TCGA, Michigan) and lower disease-free survival (Cochin) (Fig 2H and Supplementary Fig 1D-E). Altogether, these data suggested that EZH2 positively controlled expression of three genes associated with ACC progression.

Analysis of publically available ChIP sequencing data showed strong E2F1 binding peaks in the regulatory regions of these three genes in HeLa, K562, LM2 and Raji cell lines (Fig 3A). Interestingly, these E2F1 binding peaks were also associated with the H3K4me3 mark (active chromatin) and EZH2, in the absence of the H3K27me3 mark (inactive chromatin) in HeLa cells. This suggested that EZH2 and E2F1 could cooperate to activate rather than repress, transcription of *RRM2, PTTG1* and *PRC1* (Fig 3A). To evaluate this hypothesis in adrenocortical cells, we treated H295R cells with DZNep, a compound that we previously used as an EZH2 inhibitor (8). Treatment with 5 µM DZNep for 24, 48 and 72 h resulted in a strong reduction in the accumulation of RRM2, PRC1 and PTTG1 mRNA and protein, suggesting that EZH2 controlled their expression positively (Fig 3B). To evaluate the possibility that EZH2 cooperated with E2F1 to activate gene expression, we used HLM006474 (HLM), a compound that has been shown to inhibit E2Fs accumulation and transcriptional activity (29). Treatment with HLM alone induced a robust dose-dependent decrease in accumulation of RRM2, PRC1 and PTTG1 (Fig 3C & Supplementary Fig 2A), which was associated with decreased accumulation of E2F1 (Fig 3C & Supplementary Fig 2A) and inhibition of H295R cell growth and deregulation of cyclins expression (Supplementary Fig 2B-C). To further assess cooperation between EZH2 and E2F1, we combined inhibition of EZH2 with DZNep and inhibition of E2F with HLM. Consistent with our previously published data (8), inhibition of E2F with HLM resulted in decreased expression of EZH2 (Supplementary Fig 3D). In contrast, DZNep had no effect on E2F1 expression ruling out a direct effect of EZH2 on E2F1 expression (Supplementary Fig3D). Consistent with a potential positive cooperation between EZH2 and E2F1, accumulation of RRM2, PRC1 and PTTG1 was further decreased upon treatment with HLM and DZNep (Fig 3C). To further confirm cooperation between EZH2 and E2F1, we transfected H295R cells with siRNAs targeting EZH2 and E2F1 (Fig 3D). Interestingly, transfection with either EZH2 or E2F1 siRNAs decreased mRNA accumulation of *RRM2*, *PTTG1* and *PRC1* (Fig 3D). This decrease was further amplified by

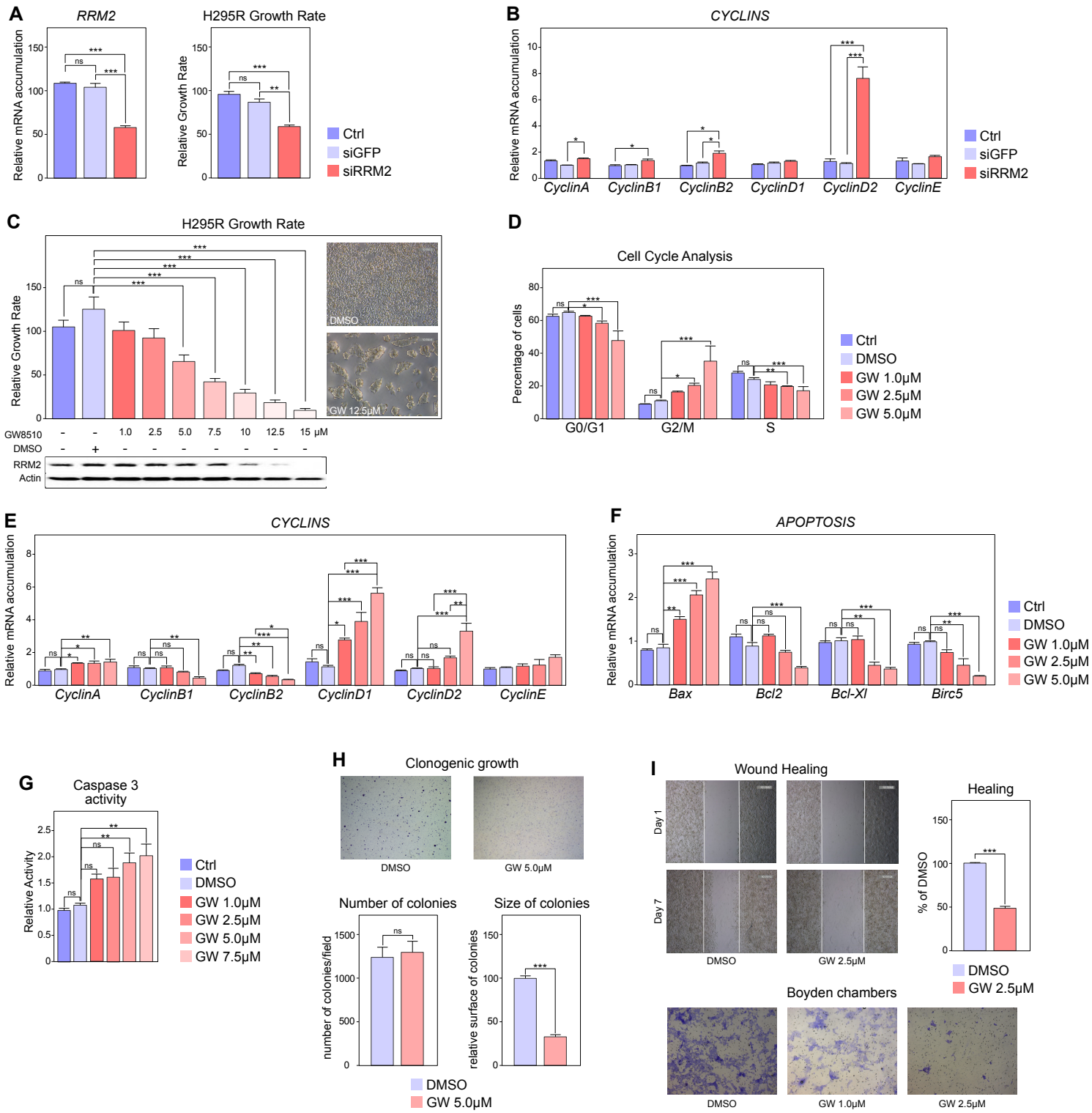


Figure 4. Inhibition of RRM2 reduces H295R cells growth and aggressiveness. A- Effect of siRNA-mediated knockdown of RRM2 on RRM2 expression (left panel) and H295R cells growth after 5 days. B- Effect of siRNA-mediated knockdown of RRM2 on expression of Cyclin coding genes in H295R cells was evaluated by RTqPCR. C- Effect of pharmacological inhibition of RRM2 on the growth of H295R cells was determined by counting live cells after 5 days of treatment with increasing amounts of GW8510. Bottom panel shows RRM2 accumulation following GW8510 treatment. Representative images were taken at the end of treatment. D- Effect of pharmacological inhibition of RRM2 on H295R cell cycle was determined by FACS following propidium iodide incorporation after 2 days of treatment with increasing amounts of GW8510. E- Effect of RRM2 inhibition on expression of Cyclin coding genes in H295R cells was evaluated by RTqPCR. F- Effect of RRM2 inhibition on expression of apoptosis-related genes in H295R cells was evaluated by RTqPCR. G- Caspase 3 activity in H295R cells was determined after 1 day of GW8510 treatment at increasing concentrations. H- Effect of RRM2 inhibition on clonogenic cell growth was determined by growing H295R cells in soft agar for 21 days in the presence or absence of 5 μM GW8510. Number and sizes of colonies were determined using Image J. I- Effect of RRM2 inhibition on cell migration was determined by wound healing assays (top panel) in the absence or presence of 5 μM GW8510 for 7 days. For Boyden chambers migration assays (bottom panel) cells were incubated for 48h with two doses of GW8510 and migrating cells were stained with Hematoxylin. Graphs in A, B, C, D, E, F and G represent the mean of 4 experiments +- SEM. Statistical significance in these panels was evaluated by ANOVA. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$. Graphs in H and I represent the mean of 3 experiments +- SEM. Statistical significance was determined by Wilcoxon's test.

transfection of both siRNAs even though expression of EZH2 and E2F1 was not further altered by cotransfection of the two siRNAs (Fig 3D). This further supported the idea that EZH2 and E2F1 cooperated to stimulate expression of these three targets. To further confirm this theory, we analysed the binding of these two factors by chromatin immunoprecipitation in H295R cells (Fig 3E). Primer pairs used for real-time PCR quantification of enrichment were designed in zones of coincident EZH2 and E2F1 binding on the regulatory regions of the three genes in HeLa cells (Fig 3A). These experiments showed significant enrichment of E2F1 on the regulatory regions of RRM2, PTTG1 and PRC1. This was associated with significant binding of EZH2 on the regulatory regions of RRM2 and PRC1. Although not significant, there was a trend for EZH2 recruitment on the regulatory regions of PTTG1 (Fig 3E).

Altogether, our data demonstrate that EZH2 cooperates with E2F1 to induce expression of RRM2, PTTG1 and PRC1, three factors associated with ACC aggressiveness. Whereas drugs targeting PTTG1 and PRC1 are scarce, recent data have shown that RRM2 can be inhibited by compounds such as GW8510 (30). Interestingly, transfection of H295R cells with siRNAs targeting RRM2 resulted in cell growth inhibition (Fig 4A). This was associated with increased expression of genes coding *Cyclins A*, *B2* and *D2* (Fig 4B), suggesting that RRM2 inhibition resulted in cell cycle arrest. To further gain insight into the role of RRM2 in ACC cell growth and to evaluate its potential as a therapeutic target, we treated H295R cells with GW8510 (GW). Incubation with increasing concentrations of GW for 5 days resulted in a dose-dependent decrease in RRM2 accumulation, which was associated with a dose-dependent reduction in cell growth and an almost complete absence of cells at the highest doses at the end of treatment (Fig 4C). Cell cycle analysis by FACS following propidium iodide incorporation showed a dose-dependent decrease in G0/G1 and S phases and a concomitant increase in G2/M, suggesting that RRM2 inhibition resulted in G2/M arrest (Fig 4D). Consistent with this, GW inhibited expression of Cyclins B1/B2 and increased expression of Cyclins D1/D2 (Fig 4E). Interestingly, RRM2 inhibition was also associated with decreased expression of the anti-apoptotic Bcl2, Bcl-xl and Birc5 genes and increased expression of the pro-apoptotic factor Bax (Fig 4F). Consistent with potential induction of apoptosis, this was associated with increased caspase 3 activity (Fig 4G).

Altogether, these data established RRM2 as a potential therapeutic target in the context of ACC. To further confirm this

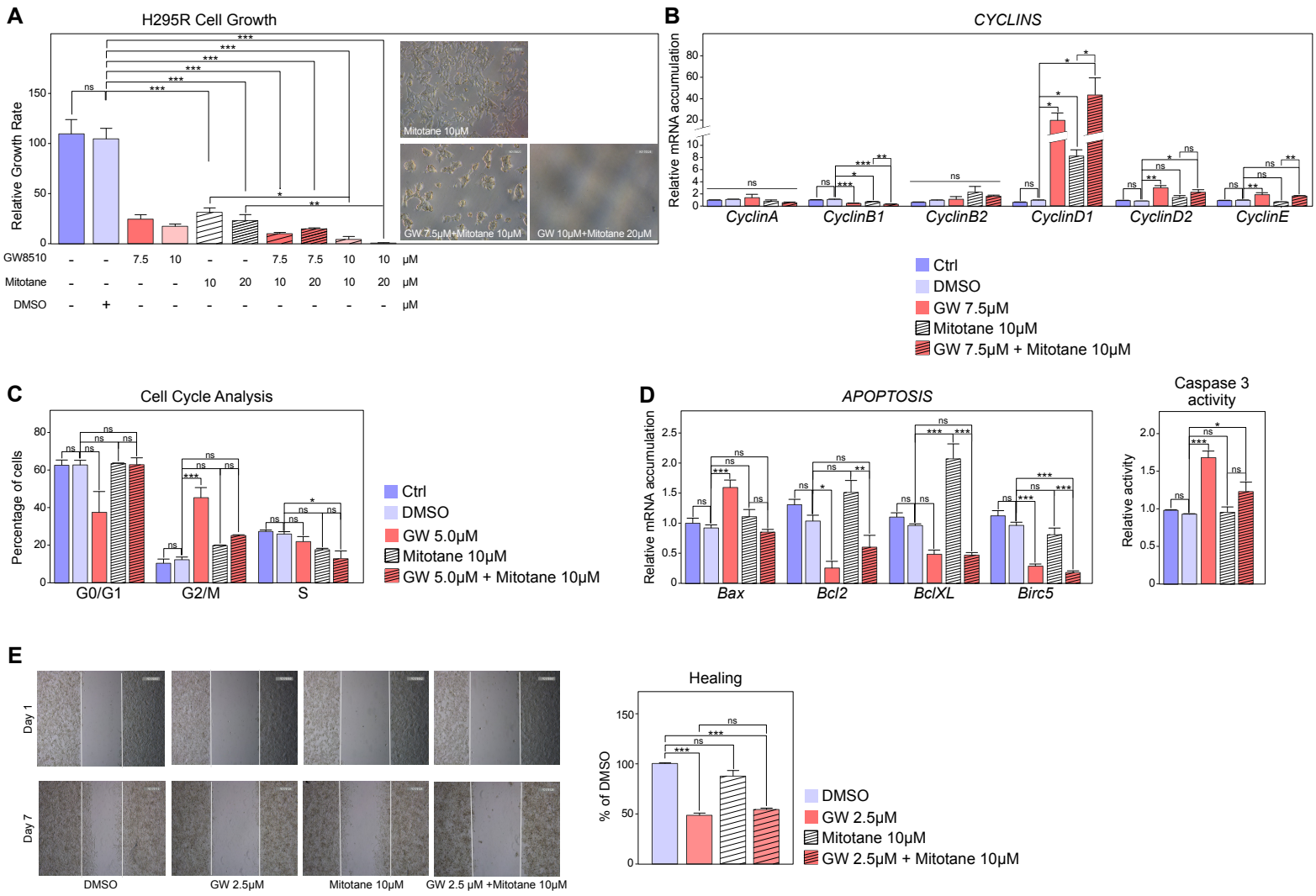


Figure 5. Combined effects of mitotane and RRM2 inhibition on H295R cells growth and aggressiveness. A- Effect of pharmacological inhibition of RRM2 and/or mitotane treatment on the growth of H295R cells was determined by counting live cells after 5 days of treatment with two doses of GW8510 and/or mitotane. Representative images were taken at the end of treatment. B- Effect of pharmacological inhibition of RRM2 and/or mitotane treatment on expression of Cyclin coding genes in H295R cells was evaluated by RTqPCR. C- Effect of pharmacological inhibition of RRM2 and/or mitotane treatment on H295R cell cycle was determined by FACS following propidium iodide incorporation after 2 days of treatment with GW8510 and/or mitotane. D- Effect of RRM2 inhibition and/or mitotane treatment on expression of apoptosis-related genes in H295R cells was evaluated by RTqPCR (left panel). Caspase 3 activity was determined of GW8510 and/or mitotane treatment for 1 day (right panel). E- Effect of GW8510 and/or mitotane on cell migration was determined by wound healing assays in the absence or presence of 2.5 µM GW8510 and/or 10 µM Mitotane for 7 days. Graphs in A-E represent the mean of 4 experiments +- SEM. Statistical significance was determined by ANOVA. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

idea, we evaluated the effect of GW on the aggressive characteristics of H295R cells in culture. Consistent with its effect on cell growth, GW treatment induced a marked reduction in the size of H295R colonies growing in soft agar, even though it did not prevent clonogenic growth *per se* (Fig 4H). However, even low doses of GW (1.0 and 2.5 μM) were associated with a significant reduction in H295R migratory capacities as shown by wound healing and Boyden chambers migration assays (Fig 4I).

A vast majority of ACC patients are treated with Mitotane, which induces adrenostatic effects. However, these effects are only achieved when plasma mitotane concentrations exceed 14 mg/l (equivalent to 100 μM in tissue culture), which in practice is difficult to reach in a significant number of patients over a short time course. We thus evaluated the potential of RRM2 inhibition to synergise with low doses of Mitotane. Interestingly, combination of 10 μM mitotane with 10 μM GW had a significant effect on H295R cell growth compared with mitotane alone (Fig 5A). This was further amplified by the combination of 20 μM mitotane and 10 μM GW which resulted in the death of almost all cells after 5 days of incubation (Fig 5A). These growth inhibitory effects were reflected in a significant effect of the combination of both compounds on expression of CylinB1and CyclinD1 (Fig 5B). However, GW alone was more efficient than the combination of both compounds to induce G2/M arrest and only mildly enhance the effect of mitotane on S phase arrest (Fig 5C). We then investigated apoptosis. As expected, GW induced expression of the pro-apoptotic gene Bax and inhibited expression of the anti-apoptotic factors Bcl2, BclXL and Birc5 (Fig 5D). Mitotane alone had no effect on Bax, Bcl2 or Birc5 expression and only induced BclXL accumulation (Fig 5D). Accordingly, there was no effect of mitotane alone on Caspase3 activity (Fig 5D, right panel). Surprisingly, mitotane reversed the effect of GW on Bax and Bcl2 expression and abrogated induction of Caspase3 activity by GW (Fig 5D). This showed that mitotane did not cooperate with GW8510 but rather prevented its pro-apoptotic effects. Investigation of the combination of mitotane and GW on cell migration further showed no effect of mitotane alone (Fig 5E) or in combination with GW (Fig 5E). Altogether, these data show a synergistic effect of RRM2 inhibition on H295R cells growth but not on other aggressiveness parameters.

Discussion

We have previously shown that the methyltransferase EZH2 was the most deregulated epigenetic regulator in ACC and that it was associated with tumour

progression (8). Although EZH2 is the catalytic component of PRC2 complex that deposits the H3K27me3 repressive histone mark, recent data suggest that EZH2 can also stimulate transcription by interactions with a number of transcription factors. Here we investigated the mode of action and targets of EZH2 in ACC. By a combination of bioinformatics analyses relying on datasets from 3 distinct ACC patients' cohorts, we show that the main mode of action of EZH2 in ACC is related with transcription activation rather than repression, although some PRC2 gene sets show significant enrichment, in particular in the cohort from Michigan (Fig 1B). This is in sharp contrast with normal mouse adrenal in which Ezh2 ablation is associated with up-regulation of PRC2 target genes (Fig 2A-B and (13)). Interestingly, these differential activities are also associated with differential effects on cell homeostasis. Indeed, whereas knockdown of EZH2 in H295R cells results in decreased proliferation and induction of apoptosis (8), inactivation of Ezh2 in the adrenal cortex does not alter proliferation but rather modulates differentiation of steroidogenic cells (13). This suggests that ACC cells have rerouted EZH2 activity from PRC2-mediated control of differentiation to PRC2-independent stimulation of proliferation. How this is achieved is unclear. In breast cancer and castration resistant prostate cancer, phosphorylation of serine 21 by AKT has been shown to play an essential role in diverting EZH2 away from its function as a histone methyltransferase, although its enzymatic activity was still required. This phenomenon was associated with cancer aggressiveness (12, 31). Interestingly, the growth factor IGF2, which signals through PI3K/AKT pathway is almost systematically upregulated in ACC (2, 3). Although the role of IGF2 in ACC pathogenesis is still unclear (5, 6), it may be involved in modulation of EZH2 activity through activation of AKT. The recent observation that PKA, which plays a central role in adrenal physiology, can phosphorylate EZH2 on threonine 372 in ovarian cancer cells is also interesting. In contrast with phosphorylation at S21, PKA-mediated phosphorylation of EZH2 reduces ovarian cancer cell growth and migration (32). This is consistent with our data showing an inhibitory role of PKA on ACC progression. The potential decrease in PKA signalling in the most aggressive carcinomas in patients (33) could result in decreased T372 phosphorylation and altered EZH2 activity. Interestingly, we recently showed that EZH2 programs adrenocortical cells for optimal response to PKA signalling by PRC2-mediated repression of phosphodiesterases and regulatory subunits of PKA (13). These

observations raise the question of a complex interplay between PKA and EZH2 in adrenal physiology and tumorigenesis.

Modulation of EZH2 phosphorylation has been shown to induce interaction of EZH2 with a number of transcription factors such as AR (12) and STAT3 (11, 32). Here, using a combination of bioinformatics and in vitro analyses, we show that EZH2 functionally interacts with E2F1 to stimulate gene expression in ACC. These findings are consistent with recent data showing a similar functional interaction in castration resistant prostate cancer (CRPC). In this study, using a combination of ChIP sequencing and expression data, Xu et al. showed that EZH2 cooperated with E2F1 to stimulate expression of a group of 56 genes involved in cancer progression. Interestingly, collaboration between EZH2 and E2F1 was also found to regulate the majority of these genes in diffuse large B-cell lymphomas, suggesting that this activity was generally found in cancer (34). In contrast, even though we showed functional interaction between EZH2 and E2F1 in ACC, only 6 out of 56 CRPC genes were also found in our list of EZH2/E2F1 targets (Table S3). This suggests that the repertoire of EZH2/E2F1 positive targets may vary from one tissue to the other.

One issue that our study did not address is the molecular mechanism that accounts for cooperation between EZH2 and E2F1. A direct physical interaction between EZH2 and E2F1 has been shown in LNCaP Abl prostate cancer cells (34). Furthermore, EZH2 and E2F1 were shown to form a tripartite complex with RB on repetitive DNA elements. However, in that case, this interaction was associated with silencing of these genomic sequences (35). In the context of physical/functional interactions with transcription factors, EZH2 is able to methylate AR, resulting in transcription activation (12) and GATA4 resulting in transcription inhibition (36). Whether EZH2 methylates E2F1 to stimulate its transcriptional activity will have to be investigated. In contrast with CRPC, where EZH2 expression seems to be independent of E2F1 levels (34), we have previously shown that E2F1 directly stimulates EZH2 expression in ACC (8). A reciprocal effect of EZH2 on E2F1 expression has been shown in hepatocellular carcinoma cells, where EZH2 repressed expression of E2F1, which may constitute a negative feedback loop (37). In contrast, we show that tampering with EZH2 expression/activity has no impact on E2F1 expression (Fig 3D and Fig S2D). Therefore, our data show that ACC progression may be dependent on a feed-forward loop involving E2F1 stimulated

EZH2 expression, which would in turn stimulate E2F1 transcriptional activity.

Consistent with observations in CRPC (34), the 94 positive targets of EZH2/E2F1 interaction are mostly involved in cell cycle control, DNA replication and mitosis and their overexpression is strongly associated with reduced overall and disease free survival. In order to functionally assess the involvement of some of these genes in ACC pathogenesis, we decided to reduce the list of targets by intersecting data from patients' cohorts with data from our mouse model of adrenal-specific Ezh2 deletion (13). Although this approach may seem restrictive, it allowed identification of PTTG1, PRC1 and RRM2 as three robust target genes. Interestingly, recent reports have also shown overexpression of PTTG1 (19) and RRM2 (38) in ACC. However, they did not provide a molecular mechanism accounting for their deregulation in ACC. Here, our combination of knock-down, pharmacological inhibition and ChIP experiments shows that these three genes are transcriptionally stimulated by cooperation of EZH2 and E2F1 on their regulatory regions. Increased expression of these genes is strongly associated with poor prognosis and results in decreased overall and disease-free survival, suggesting that they may play a role in ACC progression.

Consistent with this idea, we show that pharmacological inhibition and/or siRNA-mediated knockdown of RRM2, which is required for the catalytic activity of the ribonucleotide reductase, is associated with decreased cell growth, G2/M arrest, increased apoptosis and inhibition of cell migration. These findings are consistent with the anti-tumour effects of RRM2 inhibition in pancreatic (39), cervical (26) and breast cancer (40) as well as in neuroblastoma (41) and glioblastoma (42). It further suggests that RRM2 may be an interesting therapeutic target in the context of ACC. However, clinical targeting of RRM2 may require development of inhibitors with more specificity than GW8510, which can also inhibit CDK2 and that has not been used in vivo so far (30). Interestingly, a number of compounds that can inhibit ribonucleotide reductase activity, such as Triapine (https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=triapine) or COH-29 (NCT02112565) have undergone or are undergoing phase I and II clinical trials (43, 44) and may prove interesting in the context of ACC. RRM1, which forms the tetrameric nucleotide reductase complex together with RRM2 and RRM2 itself, have been associated with resistance to gemcitabine in a number of cancers (45–47). Interestingly, high expression of RRM1 was associated with mitotane resistance in ACC patients and its

knockdown restored sensitivity to mitotane in SW13 cells (48). Whether RRM2 plays a similar role in ACC is unclear. However, it is interesting to note that RRM2 inhibition with GW8510 increased the growth-inhibitory effect of mitotane on H295R cells (Fig 5A). Although this may seem encouraging, it is important to stress that mitotane prevented induction of apoptosis by GW8510, suggesting that combination of the two drugs might not be efficient in vivo.

Ase1/PRC1 and PTTG1 encode proteins involved in mitosis. Whereas PRC1 acts as an anti-parallel microtubule crosslinker required for mitotic spindle assembly (21), PTTG1 is an essential component of the mitotic checkpoint that inhibits Separase to allow for timed chromatid sister separation (49). Pan-genomic characterisation of ACC has shown frequent whole genome doubling events, associated with cancer progression (18, 19). Although this was associated with increased TERT expression, the molecular mechanisms involved in this phenomenon are still unclear. Interestingly, increased expression of PTTG1 downstream of RB/E2F1 is associated with increased ploidy in retinoblastoma cells (50), which is consistent with increased ploidy of fibroblasts that lack Separase (49). This suggests that increased expression of PTTG1 resulting from cooperation between EZH2 and E2F1 may be involved in polyploidization of adrenocortical carcinomas, by aberrant inhibition of Separase.

Altogether, our data show that EZH2 cooperates with E2F1 to stimulate expression of genes involved in ACC progression and establishes RRM2 as an interesting therapeutic target in this cancer.

Materials and methods

Patients Cohorts

The clinical datasets used in this paper are derived from three cohorts of patients. Cochin's cohort (47 ACC, 41 ACA and 4 NAd, Assié et al., 2014, GSE49280) and Michigan's cohort (33 ACC, 22 ACA and 10 NAd, Giordano et al., 2009, GSE10927), were analyzed by Affymetrix microarray (HG-U133 Plus 2.0 and HG-U95Av2, respectively). Data analyzed were provided by our collaborators after RMA normalization and inter-array normalization. The third transcriptome (74 patients) is from the TCGA database (The Cancer Genome Atlas, Tomczak et al., 2015) and it relies on Illumina HiSeq 2000 RNA Sequencing Version 2. Expression data were standardized by the Relative Standard Error of the Mean (RSEM) algorithm and transformed into Log2 in order to refocus and symmetrize values' distribution. For each cohort, patients'

survival data were available and distribution in the good (C1B) and poor prognosis (C1A) groups, was defined by our collaborators on the basis of unsupervised clustering (de Reyniès et al. 2009). Datasets were treated independently and intersected on the basis of gene names.

Microarray analysis of gene expression

Transcriptome data from our mouse model of Ezh2 ablation (Ezh2-KO) in the adrenal were obtained as described in (13). Raw expression data (.CEL files) were standardized by the RMA method under R v 3.4.2 (package 'affyio' v1.46.0). After assignment of gene identifiers using the annotation file available on the Affymetrix website, the expression matrix was reduced by a R-script in order to have a single level of expression for each probe (mean expression of redundant probes). Evaluation of differential gene expression between wild-type and Ezh2-KO mice was analysed by ANOVA thanks to the Limma package (v3.32.6) p-values were adjusted by the Benjamini-Hochberg method, generating a FDR (False Discovery Rate).

Expression data analyses process

- Correlation analyses were conducted in R using cor.test with parameter method='pearson' (package stats v3.4.2). Significance was calculated using the method previously described, and adjusted using the Benjamini-Hochberg correction ('p.adjust' function).

-Survival curves were obtained by the Kaplan-Meier method (package 'survival' v2.41-3) which allows evaluation of significance for the outcome prediction model, based on mRNA expression. Differences between survival curves were assessed using the log-rank test.

-Univariate Cox proportional hazards regression analyses were performed to evaluate the association of gene expression levels to overall patients' survival. *P* values were calculated using Wald test.

-Enrichment analyses were conducted by GSEA v3.0 software (http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp), which allows to determine if a set of genes (pre-defined or user-supplied signatures) is differentially enriched between two biological conditions from expression data (classical mode). The preranked mode was used to define gene setx enrichment or transcription factors binding motifs from sorted lists (such as the correlation coefficients with EZH2). PRC2 gene sets were previously defined in (13). Enrichment and Significance Values (FDR) were determined by permutation tests, set at 1000 for each analysis.

-Expression levels comparisons were evaluated by Tukey's HSD or Wilcoxon tests.

Chip sequencing datasets

Chip sequencing data were obtained from various published sources and were downloaded from Gene Expression Omnibus (GEO) or Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE) (Table S4).

Chip sequencing analyses process

All data were retrieved in .sra format and converted to .fastq (except for the E2F1 mark of the K562 cell line) using fastq-dump tool (v2.1.7). The reads were aligned on the reference genome GRCh38 using bowtie2 software (v2.2.6, default parameters). The resulting .sam files were converted to .bam and then sorted using samtools (v0.1.19). Specific peaks detection and identification of studied marks were obtained by Macs14 software (v1.4.2) (J Feng et al., 2012 protocol). To eliminate redundant reads densities, normalization was carried out using input during software setup. Annotations for peaks with an FDR <0.05 were performed under R with the 'GenomicRanges' package (v1.28.5), taking into account a ± 2Kb window around the CDS (coding DNA sequence). To illustrate the peaks, .wig files obtained through Macs14 software were converted to .Bigwig files using the wigToBigWig tool delivered by UCSC (http://hgdownload.soe.ucsc.edu/admin/exe/). Peaks were visualized with IGV software (version 2.3.91).

Cell culture

Human H295R ACC cells were cultured in DMEM/Ham's F12 supplemented with 10% foetal bovine serum (S1800-500, Biowest), 2 mM L-Glutamine (ref. 25030, Gibco), 50 U/ ml penicillin, 50 mg/ml streptomycine and 1x Insulin/ Transferrin/Selenium (ref. 41400-045, Gibco).

Measure of cell growth

H295R cell growth rate was determined by calculating the ratio of live H295R cells after treatment over the number of cells initially seeded. It was then expressed as a relative value over control DMSO-treated group. For knockdown experiments, cells were counted 5 days after the first round of siRNA transfection. For pharmacological inhibition, cells were counted 5 days after initiation of treatment. These experiments were repeated at least four times with triplicate samples.

For cell cycle analysis, H295R cells were trypsinized after 5 days and centrifuged. Pellets were resuspended in 500 µl of FxCycle™ PI/RNase Staining Solution (F10797, Thermofisher). Cell cycle distribution was determined by analysing propidium incorporation by flow cytometry. At least 20 000 events were

measured for each sample. These experiments were repeated three times with triplicate samples.

Transfections and treatments

For siRNA-mediated knockdown of EZH2 and SF1, H295R were seeded at a density of 4.10^5 cells per well in 6-wells plates (no. 353046, BD Falcon). Cells were then transfected twice within 48h with Effectene using 100 pmol siRNA per well, following manufacturer's (ID: 301425) instructions. siRNA sequences were: siGFP: ACUACCAGCAGAACACCCCUU; siEZH2: Silencer Select (s4917, Ambion Life Technologies); siE2F1 (sc-29297, Santa Cruz Biotechnology) and siRRM2 (106532, Thermofisher). For pharmacological RRM2 inhibition, H295R cells were seeded as above and treated with increasing doses (1, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15) of GW8510 (G7791, Sigma) for 5 days in complete culture medium, which was changed every 24h. Likewise, for pharmacological EZH2 inhibition, H295R cells were seeded as above and treated with 5µM dose of DZNep (102052-95-9, Cayman Chemical) for 24–72 h in complete culture medium, which was changed every 24h. Mitotane (Sigma-Aldrich) treatment was conducted in a similar way with 10 or 20 µM doses. In all experiments, control cells were treated with equivalent amounts of DMSO.

Wound healing assay

H295R cells were seeded at a density of $3.5x\ 10^6$ per well in six wells plates. After 48 h, the confluent monolayer was wounded with a 1 ml pipette tip. Cells were then treated with GW8510 5 µM, Mitotane 10 µM or DMSO for 5 days. After treatment, wound healing was measured with Image J. These experiments were performed three times with triplicate samples.

Protein extraction and western blot analyses

Proteins from H295R cells or patients samples were extracted with nuclear lysis buffer (50mM Tris-HCl pH 8.1, 10mM EDTA and 1% SDS) supplemented with protease inhibitors (Complete, 2796 | 11-697-498-001, Roche). Thirty micrograms of total proteins were separated by SDS-PAGE electrophoresis and transferred to a nitrocellulose membrane and detected with antibodies to EZH2 (1/1000, no. 3147, Cell Signaling Technology), E2F1 (1/1000, 05-379, Millipore), RRM2 (1/400, no. ab57653, Abcam), PTTG1 (1/5000, no. ab79546, Abcam), PRC1 (1/5000, no. ab51248, Abcam) and BCL2 (1/1000, no. 2876, Cell Signaling Technology). EZH2, E2F1, RRM2, PTTG1, PRC1 and BCL2 accumulation levels were normalized to

actin (1/500, no. A2066, Sigma Aldrich), Tubulin (1/500, T6074, Sigma Aldrich) and GAPDH (1/1000, NB30021, Novus).

Detection of Caspase 3 activity

H295R cells were seeded at a density of $4x10^5$ per well (six-well plates). After 48 h treatment, cells were lysed and Caspase 3 activity was determined using a Caspase 3 colorimetric assay kit, following manufacturer's instructions (ALX-850-215-KI01, Enzo Life Sciences). Data were expressed as Caspase 3 activity in GW8510 and Mitotane treated groups, relative to control DMSO-treated group. These experiments were performed three times with triplicate samples.

Clonogenic growth assay

H295R cells were seeded at a density of 4 x 10^5 per well (six-well plate). After 24 h, cells were treated with GW8510 (5 µM) or DMSO for 48 h. They were then trypsinized and resuspended at a density of 1x 10^4 cells/ml of a 0.6% agar solution in DMEM/Ham's F12, in the presence of 5 µM GW8510 or DMSO. One ml of this suspension was seeded on 1ml of a 1.6% agar base (per well) that had been allowed to settle in six-well plates. After 21 days in culture, cell colonies were fixed with 4% PFA and stained with heamtoxylin. These experiments were performed three times with triplicate samples.

Boyden chamber assay

Invasion analyzes were performed using Boyden chambers (Millicell) with 8 µm pore-sized membranes, coated with Matrigel (BD Bioscience). Control or GW8510 treated H295R cells (2.5×10^5 cells) were seeded in the upper chamber in minimum medium DMEM-F12 medium (Invitrogen) containing penicillin/streptomycin (100 mg ml^{-1}) and L-glutamine (2 mM). The lower chamber contains DMEM-F12 medium (Invitrogen) supplemented with penicillin/streptomycin (100 mg ml^{-1}), L-glutamine (2 mM) and 10% FBS (Biowest) and 5% SR3 (S2640, Sigma). Cells were incubated for 48 h before fixation using Paraformaldehyde 4% and staining with Hematoxylin (Sigma). Remaining cells in upper chamber were removed with cotton tips.

Real-time quantitative PCR

Total RNAs from H295R cells were extracted using Trizol. One microgram of total RNAs was reverse transcribed for 1h at 37°C with 5 pmoles of random hexamer primers, 200 U reverse transcriptase (M-MLV RT, M1701, Promega), 2mM dNTPs and 20 U RNAsin (N2615, Promega). One microliter of a one-tenth dilution of cDNA was used in each quantitative PCR reaction. All reactions were conducted

with SYBR qPCR Premix Ex Taq II Tli RNase H+ (TAKRR820W, Takara). Primer pairs are listed in Table S5. For each experiment and primer pairs, efficiency of PCR reactions was evaluated by amplification of serial dilutions of a mix of cDNAs. Relative gene expression was normalized to ACTIN by the ΔΔCt method. Statistical analyses were directly conducted on ΔΔCt values.

Chromatin immunoprecipitation

H295R-TR/SF1 cells ChIP was performed as follows: H295R-TR/SF1 cells were seeded at a density of 5×10^6 per 10 cm dish and treated with 1.0 µM doxycycline or DMSO for 48 h. Following treatment, cells were fixed by addition of 1.5mM ethylene glycol bis(succinimidyl succinate) (EGS) for 30 min and refixed with 1% formaldehyde for 10 min. Fixation was stopped by addition of 125 µM glycine. Cells were rinsed three times with PBS and scraped in CLB buffer (5 mM PIPES, 85 mM KCl, 0.5% NP40). After centrifugation, nuclei pellet was resuspended in NLB buffer (50 mM Tris–HCl, 10 mM EDTA, 1% SDS) and incubated on ice for 1hour 45 min. Chromatin was then sheared to an average length of 500 pb and submitted to immunoprecipitation with 5 µg of antibodies directed against EZH2 (C15310039, Diagenode), E2F1 (05-379, Millipore) or Rabbit IgGs (kch-504-250, Diagenode) used as a control. Chromatin-antibodies complexes were collected with protein A or G magnetic beads (Dynabeads, Invitrogen). After seven washes in IP buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris–HCl, 5 mMEDTA, 0.5% NP40, 1% Triton X-100), beads were resuspended in 100 µl of 10% Chelex slurry. After 10 min boiling, the Chelex/protein A/G bead suspension was allowed to cool to room temperature. Proteinase K (100 mg/ml) was then added and beads were incubated for 30 min at 55°C while shaking, followed by another round of boiling for 10 min. Suspension was centrifuged and supernatant is collected. The Chelex/protein A/G beads fraction was vortexed with another 100 µl water, centrifuged again, and the first and the second supernatants were combined. Eluate were then purified using Qiagen Qiaquick PCR purification columns and eluted in 30 µl of water (1). One µl of the eluate was used directly as a template in real-time PCR to detect enrichment of RRM2, PTTG1 and PRC1 regulatory regions in the precipitates (Table S5). Results are expressed as fold enrichment over 10% of input chromatin.

Gene	Orientation	Sequence 5'-3'
EZH2	Forward Reverse	ACCAGTTTGTTGGCGGAAGCG CCAAGTCACTGGTCACCGAACAAG
BCL-XL	Forward Reverse	GATCCCCATGGCAGCAGTAAAGCAAG CCCCATCCCGGAAGAGTTCATTCACT
Birc5	Forward Reverse	ATTCGTCCGGTTGCGCTTTCC CACGGCGCACTTTCTTCGCAG
BCL-2	Forward Reverse	TTGTGGCCTTCTTTGAGTTCGGTG GGTGCCGGTTCAGGTACTCAGTCA
Actin	Forward Reverse	CGCGAGAAGATGACCCAGATC TCACCGGAGTCCATCACGA
RRM2	Forward Reverse	GATATTCTGGCTCAAGAAACGAGGACTG CTCTCCTCCGATGGTTTGTGTACCAG
PTTG1	Forward Reverse	GCTCTGTTCCTGCCTCAGATGATG GTCAAGGATCATGAGAGGCACTCC
PRC1	Forward Reverse	GCAGAAATTCATGGAGTATGTGGCAGAAC CGCCGCTTGCTAGGTGTTCGAG
CyclinA	Forward Reverse	TCCTGTCTTCCATGTCAGTGC CAAACTCTGCTACTTCTGGGG
CyclinB1	Forward Reverse	CAGTCAGACCAAAATACCTACTGGGT ACACCAACCAGCTGCAGCATCTTCTT
CyclinB2	Forward Reverse	CATGTGCGTTGGCATTATGG CAAGAGCAGAGCAGTAATCC
CyclinD1	Forward Reverse	CGGTGTCCTACTTCAAATGTGTGCAGAA GGGCTCCAGCGACAGGAAGC
CyclinD2	Forward Reverse	CATTGCTCTGTGTGCCACCG GCGAGCTCACTTCCTCATCC
CyclinE	Forward Reverse	CACTTTCTTGAGCAACACCC CCGGTCAAAGAAATCTTGTGCC

Table S5 : Human primers

References

1. Libé,R. (2015) Adrenocortical carcinoma (ACC): diagnosis, prognosis, and treatment. *Front. Cell Dev. Biol.*, **3**, 45.

2. Assié,G., Letouzé,E., Fassnacht,M., Jouinot,A., Luscap,W., Barreau,O., Omeiri,H., Rodriguez,S., Perlemoine,K., René-Corail,F., *et al*. (2014) Integrated genomic characterization of adrenocortical carcinoma. *Nat. Genet.*, 10.1038/ng.2953.

3. Zheng,S., Cherniack,A.D., Dewal,N., Moffitt,R.A., Danilova,L., Murray,B.A., Lerario,A.M., Else,T., Knijnenburg,T.A., Ciriello,G., *et al*. (2016) Comprehensive Pan-Genomic Characterization of Adrenocortical Carcinoma. *Cancer Cell*, **29**, 723–736.

4. Batisse-Lignier,M., Sahut-Barnola,I., Tissier,F., Dumontet,T., Mathieu,M., Drelon,C., Pointud,J.-C., Damon-Soubeyrand,C., Marceau,G., Kemeny,J.-L., *et al*. (2017) P53/Rb inhibition induces metastatic adrenocortical carcinomas in a preclinical transgenic model. *Oncogene*, **36**, 4445–4456.

5. Drelon,C., Berthon,A. and Val,P. (2013) Adrenocortical Cancer and IGF2: Is the Game Over or Our Experimental Models Limited? *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **98**, 505–507.

6. Drelon,C., Berthon,A., Ragazzon,B., Tissier,F., Bandiera,R., Sahut-Barnola,I., De Joussineau,C., Batisse-Lignier,M., Lefrançois-Martinez,A.-M., Bertherat,J., *et al*. (2012) Analysis of the role of Igf2 in adrenal tumour development in transgenic mouse models. *PLoS One*, **7**, e44171.

7. 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 {beta}-catenin activation induces adrenal hyperplasia and promotes adrenal cancer development. *Hum Mol Genet*, **19**, 1561–1576.

8. Drelon,C., Berthon,A., Mathieu,M., Ragazzon,B., Kuick,R., Tabbal,H., Septier,A., Rodriguez,S., Batisse-Lignier,M., Sahut-Barnola,I., *et al*. (2016) EZH2 is overexpressed in adrenocortical carcinoma and is associated with disease progression. *Hum. Mol. Genet.*, **25**, 2789–2800.

9. Wassef,M. and Margueron,R. (2016) The Multiple Facets of PRC2 Alterations in Cancers. *J. Mol. Biol.*, 10.1016/j.jmb.2016.10.012.

10. Margueron,R. and Reinberg,D. (2011) The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature*, **469**, 343–349.

11. Kim,E., Kim,M., Woo,D.-H., Shin,Y., Shin,J., Chang,N., Oh,Y.T., Kim,H., Rheey,J., Nakano,I., *et al*. (2013) Phosphorylation of EZH2 Activates STAT3 Signaling via STAT3 Methylation and Promotes Tumorigenicity of Glioblastoma Stem-like Cells. *Cancer Cell*, **23**, 839–852.

12. Xu,K., Wu,Z.J., Groner,A.C., He,H.H., Cai,C., Lis,R.T., Wu,X., Stack,E.C., Loda,M., Liu,T., *et al*. (2012) EZH2 oncogenic activity in castration-resistant prostate cancer

cells is Polycomb-independent. *Science*, **338**, 1465–1469.

13. Mathieu,M., Drelon,C., Rodriguez,S., Tabbal,H., Septier,A., Damon-Soubeyrand,C., Dumontet,T., Berthon,A., Sahut-Barnola,I., Batisse-Lignier,M., *et al*. Steroidogenic differentiation and PKA signalling are programmed by histone methyltransferase EZH2 in the adrenal cortex. *Proc Natl Acad Sci U A*, **in revision**.

14. Zou,H., McGarry,T.J., Bernal,T. and Kirschner,M.W. (1999) Identification of a vertebrate sister-chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis. *Science*, **285**, 418–422.

15. Bernal,J.A., Roche,M., Méndez-Vidal,C., Espina,A., Tortolero,M. and Pintor-Toro,J.A. (2008) Proliferative potential after DNA damage and non-homologous end joining are affected by loss of securin. *Cell Death Differ*., **15**, 202–212.

16. Tong,Y., Tan,Y., Zhou,C. and Melmed,S. (2007) Pituitary tumor transforming gene interacts with Sp1 to modulate G1/S cell phase transition. *Oncogene*, **26**, 5596–5605.

17. Pei,L. and Melmed,S. (1997) Isolation and characterization of a pituitary tumor-transforming gene (PTTG). *Mol. Endocrinol. Baltim. Md*, **11**, 433–441.

18. Wei,C., Yang,X., Xi,J., Wu,W., Yang,Z., Wang,W., Tang,Z., Ying,Q. and Zhang,Y. (2015) High expression of pituitary tumor-transforming gene-1 predicts poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *Mol. Clin. Oncol*., **3**, 387–391.

19. Demeure,M.J., Coan,K.E., Grant,C.S., Komorowski,R.A., Stephan,E., Sinari,S., Mount,D. and Bussey,K.J. (2013) PTTG1 overexpression in adrenocortical cancer is associated with poor survival and represents a potential therapeutic target. *Surgery*, **154**, 1405–1416; discussion 1416.

20. Portran,D., Zoccoler,M., Gaillard,J., Stoppin-Mellet,V., Neumann,E., Arnal,I., Martiel,J.L. and Vantard,M. (2013) MAP65/Ase1 promote microtubule flexibility. *Mol. Biol. Cell*, **24**, 1964–1973.

21. Duellberg,C., Fourniol,F.J., Maurer,S.P., Roostalu,J. and Surrey,T. (2013) End-binding proteins and Ase1/PRC1 define local functionality of structurally distinct parts of the microtubule cytoskeleton. *Trends Cell Biol*., **23**, 54–63.

22. Zhan,P., Zhang,B., Xi,G., Wu,Y., Liu,H., Liu,Y., Xu,W., Zhu,Q., Cai,F., Zhou,Z., *et al*. (2017) PRC1 contributes to tumorigenesis of lung adenocarcinoma in association with the Wnt/β-catenin signaling pathway. *Mol. Cancer*, **16**.

23. Chen,J., Rajasekaran,M., Xia,H., Zhang,X., Kong,S.N., Sekar,K., Seshachalam,V.P., Deivasigamani,A., Goh,B.K.P., Ooi,L.L., *et al*. (2016) The microtubule-associated protein PRC1 promotes early recurrence of hepatocellular carcinoma in association with the Wnt/β-catenin signalling pathway. *Gut*, **65**, 1522–1534.

24. Nordlund,P. and Reichard,P. (2006) Ribonucleotide reductases. *Annu. Rev. Biochem.*, **75**, 681–706.

25. Furuta,E., Okuda,H., Kobayashi,A. and Watabe,K. (2010) Metabolic genes in cancer: their roles in tumor progression and clinical implications. *Biochim. Biophys. Acta*, **1805**, 141–152.

26. Liu,X., Zhang,H., Lai,L., Wang,X., Loera,S., Xue,L., He,H., Zhang,K., Hu,S., Huang,Y., *et al*. (2013) Ribonucleotide reductase small subunit M2 serves as a prognostic biomarker and predicts poor survival of colorectal cancers. *Clin. Sci. Lond. Engl. 1979*, **124**, 567–578.

27. Fujita,H., Ohuchida,K., Mizumoto,K., Itaba,S., Ito,T., Nakata,K., Yu,J., Kayashima,T., Souzaki,R., Tajiri,T., *et al*. (2010) Gene expression levels as predictive markers of outcome in pancreatic cancer after gemcitabine-based adjuvant chemotherapy. *Neoplasia N. Y. N*, **12**, 807–817.

28. Jones,D.T., Lechertier,T., Mitter,R., Herbert,J.M.J., Bicknell,R., Jones,J.L., Li,J.-L., Buffa,F., Harris,A.L. and Hodivala-Dilke,K. (2012) Gene expression analysis in human breast cancer associated blood vessels. *PloS One*, **7**, e44294.

29. Ma,Y., Kurtyka,C.A., Boyapalle,S., Sung,S.-S., Lawrence,H., Guida,W. and Cress,W.D. (2008) A small-molecule E2F inhibitor blocks growth in a melanoma culture model. *Cancer Res.*, **68**, 6292–6299.

30. Hsieh,Y.-Y., Chou,C.-J., Lo,H.-L. and Yang,P.-M. (2016) Repositioning of a cyclin-dependent kinase inhibitor GW8510 as a ribonucleotide reductase M2 inhibitor to treat human colorectal cancer. *Cell Death Discov.*, **2**, 16027.

31. Cha,T.-L., Zhou,B.P., Xia,W., Wu,Y., Yang,C.-C., Chen,C.-T., Ping,B., Otte,A.P. and Hung,M.-C. (2005) Akt-mediated phosphorylation of EZH2 suppresses methylation of lysine 27 in histone H3. *Science*, **310**, 306–310.

32. Özeş,A.R., Pulliam,N., Ertosun,M.G., Yılmaz,Ö., Tang,J., Çopuroğlu,E., Matei,D., Özeş,O.N. and Nephew,K.P. (2018) Protein kinase A-mediated phosphorylation regulates STAT3 activation and oncogenic EZH2 activity. *Oncogene*, **37**, 3589–3600.

33. Drelon,C., Berthon,A., Sahut-Barnola,I., Mathieu,M., Dumontet,T., Rodriguez,S., Batisse-Lignier,M., Tabbal,H., Tauveron,I., Lefrançois-Martinez,A.-M., *et al*. (2016) PKA inhibits WNT signalling in adrenal cortex zonation and prevents malignant tumour development. *Nat. Commun.*, **7**, 12751.

34. Xu,H., Xu,K., He,H.H., Zang,C., Chen,C.-H., Chen,Y., Qin,Q., Wang,S., Wang,C., Hu,S., *et al*. (2016) Integrative Analysis Reveals the Transcriptional Collaboration between EZH2 and E2F1 in the Regulation of Cancer-Related Gene Expression. *Mol. Cancer Res. MCR*, **14**, 163–172.

35. Ishak,C.A., Marshall,A.E., Passos,D.T., White,C.R., Kim,S.J., Cecchini,M.J., Ferwati,S., MacDonald,W.A., Howlett,C.J., Welch,I.D., *et al*. (2016) An RB-EZH2 Complex Mediates Silencing of Repetitive DNA Sequences. *Mol. Cell*, **64**, 1074–1087.

36. He,A., Shen,X., Ma,Q., Cao,J., von Gise,A., Zhou,P., Wang,G., Marquez,V.E., Orkin,S.H. and Pu,W.T. (2012) PRC2 directly methylates GATA4 and represses its transcriptional activity. *Genes Dev.*, **26**, 37–42.

37. Gao,S.-B., Zheng,Q.-F., Xu,B., Pan,C.-B., Li,K.-L., Zhao,Y., Zheng,Q.-L., Lin,X., Xue,L.-X. and Jin,G.-H. (2014) EZH2 Represses Target Genes through H3K27-Dependent and H3K27-Independent Mechanisms in Hepatocellular Carcinoma. *Mol. Cancer Res.*, **12**, 1388–1397.

38. Grolmusz,V.K., Karászi,K., Micsik,T., Tóth,E.A., Mészáros,K., Karvaly,G., Barna,G., Szabó,P.M., Baghy,K., Matkó,J., *et al.* (2016) Cell cycle dependent RRM2 may serve as proliferation marker and pharmaceutical target in adrenocortical cancer. *Am. J. Cancer Res.*, **6**, 2041–2053.

39. Zheng,S., Wang,X., Weng,Y.-H., Jin,X., Ji,J.-L., Guo,L., Hu,B., Liu,N., Cheng,Q., Zhang,J., *et al.* (2018) siRNA Knockdown of RRM2 Effectively Suppressed Pancreatic Tumor Growth Alone or Synergistically with Doxorubicin. *Mol. Ther. Nucleic Acids*, **12**, 805–816.

40. Zhang,H., Liu,X., Warden,C.D., Huang,Y., Loera,S., Xue,L., Zhang,S., Chu,P., Zheng,S. and Yen,Y. (2014) Prognostic and therapeutic significance of ribonucleotide reductase small subunit M2 in estrogen-negative breast cancers. *BMC Cancer*, **14**, 664.

41. Li,J., Pang,J., Liu,Y., Zhang,J., Zhang,C., Shen,G. and Song,L. (2018) Suppression of RRM2 inhibits cell proliferation, causes cell cycle arrest and promotes the apoptosis of human neuroblastoma cells and in human neuroblastoma RRM2 is suppressed following chemotherapy. *Oncol. Rep.*, **40**, 355–360.

42. Li,C., Zheng,J., Chen,S., Huang,B., Li,G., Feng,Z., Wang,J. and Xu,S. (2018) RRM2 promotes the progression of human glioblastoma. *J. Cell. Physiol.*, **233**, 6759–6767.

43. Shao,J., Zhou,B., Chu,B. and Yen,Y. (2006) Ribonucleotide reductase inhibitors and future drug design. *Curr. Cancer Drug Targets*, **6**, 409–431.

44. Mortazavi,A., Ling,Y., Martin,L.K., Wei,L., Phelps,M.A., Liu,Z., Harper,E.J., Ivy,S.P., Wu,X., Zhou,B.-S., *et al.* (2013) A phase I study of prolonged infusion of triapine in combination with fixed dose rate gemcitabine in patients with advanced solid tumors. *Invest. New Drugs*, **31**, 685–695.

45. Sierzega,M., Pach,R., Kulig,P., Legutko,J. and Kulig,J. (2017) Prognostic Implications of Expression Profiling for Gemcitabine-Related Genes (hENT1, dCK, RRM1, RRM2) in Patients With Resectable Pancreatic Adenocarcinoma Receiving Adjuvant Chemotherapy. *Pancreas*, **46**, 684–689.

46. Bergman,A.M., Eijk,P.P., Ruiz van Haperen,V.W.T., Smid,K., Veerman,G., Hubeek,I., van den Ijssel,P., Ylstra,B. and Peters,G.J. (2005) In vivo induction of resistance to gemcitabine results in increased expression of ribonucleotide reductase subunit M1 as the major determinant. *Cancer Res.*, **65**, 9510–9516.

47. Chen,P., Wu,J.-N., Shu,Y., Jiang,H.-G., Zhao,X.-H., Qian,H., Chen,K., Lan,T., Chen,C.-G. and Li,J. (2018) Gemcitabine resistance mediated by ribonucleotide reductase M2 in lung squamous cell carcinoma is reversed by GW8510 through autophagy induction. *Clin. Sci. Lond. Engl. 1979*, **132**, 1417–1433.

48. Volante,M., Terzolo,M., Fassnacht,M., Rapa,I., Germano,A., Sbiera,S., Daffara,F., Sperone,P., Scagliotti,G., Allolio,B., *et al.* (2012) Ribonucleotide reductase large subunit (RRM1) gene expression may predict efficacy of adjuvant mitotane in adrenocortical cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, **18**, 3452–3461.

49. Wirth,K.G., Wutz,G., Kudo,N.R., Desdouets,C., Zetterberg,A., Taghybeeglu,S., Seznec,J., Ducos,G.M., Ricci,R., Firnberg,N., *et al.* (2006) Separase: a universal trigger for sister chromatid disjunction but not chromosome cycle progression. *J. Cell Biol.*, **172**, 847–860.

50. Pappas,L., Xu,X.L., Abramson,D.H. and Jhanwar,S.C. (2017) Genomic instability and proliferation/survival pathways in RB1-deficient malignancies. *Adv. Biol. Regul.*, **64**, 20–32.

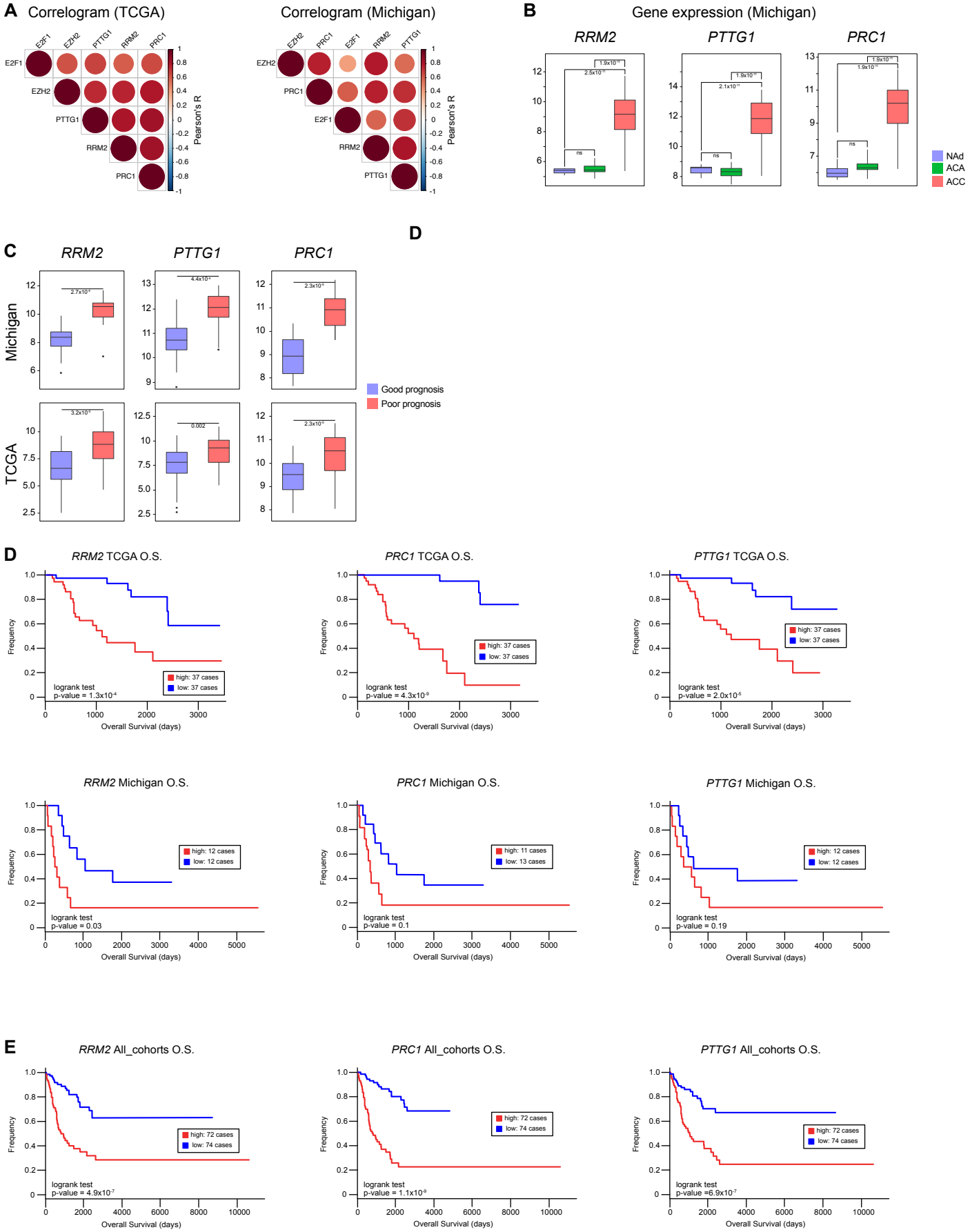


Figure S1. Expression of RRM2, PTTG1 and PRC1 is associated with poor prognosis in ACC. A- Correlogram shows correlation of expression of RRM2, PTTG1 and PRC1 with expression of EZH2 and E2F1 in TCGA and Michigan cohorts. B- Expression of RRM2, PTTG1 and PRC1 in normal adrenals, adrenocortical adenomas and adrenocortical carcinomas. Significance was evaluated by ANOVA. C- Expression of RRM2, PTTG1 and PRC1 in the groups of good (blue) and poor (red) prognosis in TCGA and Michigan cohorts. Significance was evaluated by Wilcoxon's test. D- Overall (O.S) survival as a function of RRM2, PTTG1 and PRC1 expression in TCGA and Michigan cohorts. E- Overall (O.S) survival as a function of RRM2, PTTG1 and PRC1 expression in all cohorts combined. Statistical significance was evaluated by the Logrank test.

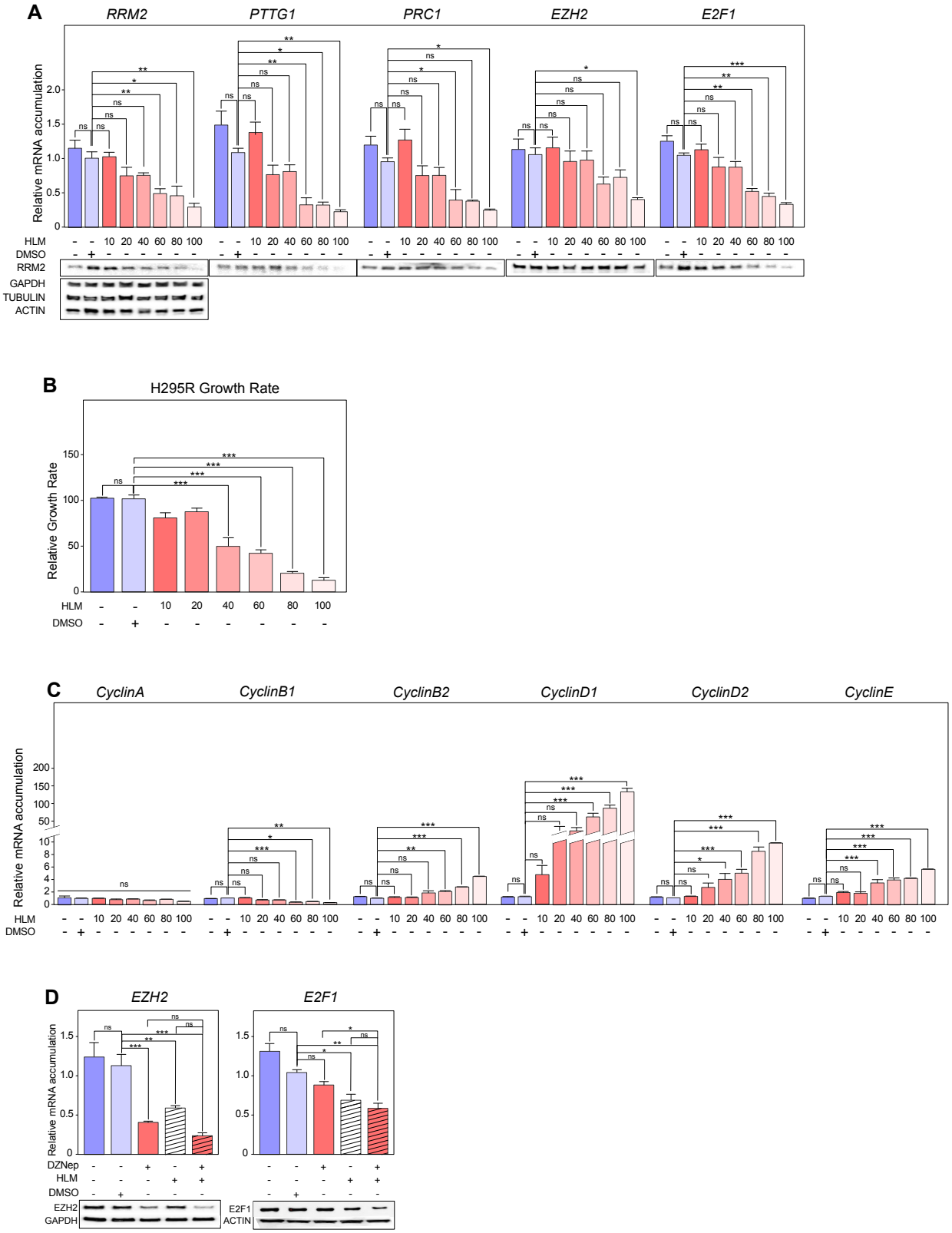


Figure S2. Effect of E2F1 inhibition by HLM. A-Effect of increasing doses of HLM treatment for 72h on expression of RRM2, PTTG1 and PRC1 was evaluated by RTqPCR (graphs) and western-blot (bottom panels) in H295R cells. B- Effect of pharmacological inhibition of E2F1 on the growth of H295R cells was determined by counting live cells after 3 days of treatment with increasing amounts of HLM. C- Effect of E2F1 inhibition on expression of Cyclin coding genes in H295R cells was evaluated by RTqPCR. D- Effect of 5 µM DZNep and/or 40 µM HLM treatment for 48 h on expression of EZH2 and E2F1 was evaluated by RTqPCR (graphs) and western-blot (bottom panels) in H295R cells. Graphs in A-D represent the mean of 4 experiments +- SEM. Statistical significance was determined by ANOVA. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

TCGA					
Gene	P.estimate.c	P.p.value	S.estimate.rh	S.p.value	FDR
A1BG	-0.04183993	0.714279720	-0.11623661	0.306989804	0.858415947831621
A1CF	-0.11694814	0.304695128	0.061467711	0.590481733	0.577227992641649
A2M	-0.13502046	0.235463781	-0.17448880	0.123912154	0.507537629347679
A2ML1	-0.12733481	0.263440458	-0.26658963	0.017554460	0.536942688629362
A4GALT	0.223301615	0.047909789	-0.05783836	0.611952334	0.195788155402787
A4GNT	0.002462005	0.982819668	-0.02499048	0.826950746	0.992371824561201
AAAS	-0.13633197	0.230903837	-0.05557448	0.625971439	0.501903076353824
AACS	0.245819560	0.028984877	0.404259980	0.000247551	0.140025136492488
AADAC	-0.12701423	0.264654282	-0.14561168	0.200392971	0.537834526736468
AADACL2	-0.11538377	0.311254249	-0.11518777	0.312082425	0.583395237188103
AADAT	-0.03806328	0.739102464	-0.11509250	0.311800323	0.87224587090071
AAGAB	0.088001137	0.440587253	0.212925998	0.059705615	0.691383308946756

Table S1(La suite est disponible en ligne)

EZH2_E2F1_94_gene_Signature_ACC

MCM7	RAD51	ATAD2
RRM2	CDT1	CDC25A
DNMT1	HMGN2	H2AFV
CDCA7	POLA2	SUV39H1
POLD1	INTS7	CTDSPL2
MCM2	LIG1	E2F1
KIAA0101	WEE1	TOPBP1
CLSPN	KIF15	HNRNPD
FANCG	USP1	MTF2
PKMYT1	PLK4	SMC3
MCM6	TIPIN	EED
FANCC	MELK	MAZ
POLE2	CDC45	PRKDC
FBXO5	SMC2	CASP8AP2
POLD3	YWHAQ	GEN1
MCM3	CASP2	UBR7
MSH2	WDR67	SMC6
E2F8	RPS19	RAVER1
GMNN	NUP155	POLA1
NOLC1	ESPL1	HOXC10
NASP	NCBP1	EZH2
MCM4	DLEU2	STMN1
CDC6	CCDC150	CDK1
ATAD5	KNTC1	ARHGAP11A
SNRPD1	PRIM1	E2F7
ZNF367	ANP32E	SASS6
MXD3	ANP32A	SETD8
ILF3	SLBP	MCM8
H2AFZ	RPA2	FANCD2
PCNA	FUS	RBL1
TMPO	CD3EAP	CBX3
RASAL2		

Table S2

EZH2_E2F1_94_gene_Signature_ACC	EZH2_E2F1_gene_Signature_CrPc_XU_et_al	Intersection
MCM7	ARL6IP1	ATAD2
RRM2	ATAD2	CDC6
DNMT1	BIRC5	CDK1
CDCA7	BNIP2	POLE2
POLD1	BRIX1	SMC2
MCM2	BTG3	TMPO
KIAA0101	CCNA2	
CLSPN	CCNE2	
FANCG	CDC6	
PKMYT1	CDK1	
MCM6	CENPK	
FANCC	CHEK1	
POLE2	CKS2	
FBXO5	CNOT6	
POLD3	DSCC1	
MCM3	FANCI	
MSH2	FOXM1	
E2F8	GGH	
GMNN	GLOD4	
NOLC1	GPSM2	
NASP	GUCY1B3	
MCM4	H1F0	
CDC6	H1FX	
ATAD5	H2AFX	
SNRPD1	HMGB2	
ZNF367	HMMR	
MXD3	IER5	
ILF3	KIF23	
H2AFZ	MMD	
PCNA	MND1	
ATAD2	MRPL20	
CDC25A	MTFR2	
H2AFV	NCAPG	
SUV39H1	NCAPG2	
CTDSPL2	NDC1	
E2F1	NME1	
TOPBP1	NMU	
HNRNPD	NUF2	
MTF2	PA2G4	
SMC3	PBK	
EED	PLK1	
MAZ	POLE2	
PRKDC	PPIH	
CASP8AP2	PRC1	
GEN1	RFC2	

UBR7	RFWD3	
SMC6	RRM1	
RAVER1	SMC2	
POLA1	SMC4	
HOXC10	SNRPA1	
EZH2	SPAG5	
STMN1	TACC3	
CDK1	TMPO	
ARHGAP11A	TRIP13	
E2F7	TYMS	
SASS6	WDR34	
SETD8		
MCM8		
FANCD2		
RBL1		
CBX3		
CD3EAP		
TMPO		
RASAL2		
RAD51		
CDT1		
HMGN2		
POLA2		
INTS7		
LIG1		
WEE1		
KIF15		
USP1		
PLK4		
TIPIN		
MELK		
CDC45		
SMC2		
YWHAQ		
CASP2		
WDR67		
RPS19		
NUP155		
ESPL1		
NCBP1		
DLEU2		
CCDC150		
KNTC1		
PRIM1		
ANP32E		
ANP32A		

SLBP		
RPA2		
FUS		

Table S3

Chipseq

Experiment	Datasets GEO	Datasets ENCODE	Initial Data
Hela			
E2F1	GSM935484		SRR502355.sra SRR502356.sra
H3K27me3	GSM733696		SRR227472.sra SRR227473.sra
H3K4me3	GSM733682		SRR227441.sra SRR227442.sra
EZH2	GSM1003520		SRR568331.sra SRR568332.sra
Input	GSM509051		SRR036650.sra SRR036651.sra SRR036652.sra SRR036653.sra SRR036654.sra
K562			
E2F1		Replicat 1 : ENCLB809EWT	ENCFF749JUG.fastq ENCFF942QFN.fastq
Input	GSM777645		SRR332096.sra
LM2			
E2F1	GSM2501567		SRR5282135.sra
Input	GSM2501570		SRR5282138.sra
LnCap_ABL			
E2F1	GSM1656410		SRR1970880.sra
Input	GSM1656411		SRR1970881.sra
MCF7			
E2F1	GSM935477		SRR1970880.sra
Input	GSM594608		SRR065825.sra
Raji			
E2F1	GSM1976292		SRR3048087.sra
Input	GSM1976298		SRR3048093.sra

Table S4

Gene	Orientation	Sequence 5'-3'
EZH2	Forward Reverse	ACCAGTTTGTTGGCGGAAGCG CCAAGTCACTGGTCACCGAACAAG
BCL-XL	Forward Reverse	GATCCCCATGGCAGCAGTAAAGCAAG CCCCATCCCGGAAGAGTTCATTCACT
Birc5	Forward Reverse	ATTCGTCCGGTTGCGCTTTCC CACGGCGCACTTTCTTCGCAG
BCL-2	Forward Reverse	TTGTGGCCTTCTTTGAGTTCGGTG GGTGCCGGTTCAGGTACTCAGTCA
Actin	Forward Reverse	CGCGAGAAGATGACCCAGATC TCACCGGAGTCCATCACGA
RRM2	Forward Reverse	GATATTCTGGCTCAAGAAACGAGGACTG CTCTCCTCCGATGGTTTGTGTACCAG
PTTG1	Forward Reverse	GCTCTGTTCCTGCCTCAGATGATG GTCAAGGATCATGAGAGGCACTCC
PRC1	Forward Reverse	GCAGAAATTCATGGAGTATGTGGCAGAAC CGCCGCTTGCTAGGTGTTCGAG
CyclinA	Forward Reverse	TCCTGTCTTCCATGTCAGTGC CAAACTCTGCTACTTCTGGGG
CyclinB1	Forward Reverse	CAGTCAGACCAAAATACCTACTGGGT ACACCAACCAGCTGCAGCATCTTCTT
CyclinB2	Forward Reverse	CATGTGCGTTGGCATTATGG CAAGAGCAGAGCAGTAATCC
CyclinD1	Forward Reverse	CGGTGTCCTACTTCAAATGTGTGCAGAA GGGCTCCAGCGACAGGAAGC
CyclinD2	Forward Reverse	CATTGCTCTGTGTGCCACCG GCGAGCTCACTTCCTCATCC
CyclinE	Forward Reverse	CACTTTCTTGAGCAACACCC CCGGTCAAAGAAATCTTGTGCC

Table S5 : Human primers

Résultats complémentaires

EZH2 cooperates with SF1 to inhibit expression of the pro-apoptotic factor NOV/CCN3 in adrenocortical carcinoma

Houda Tabbal, Amandine Septier, Stéphanie Rodriguez, Marie Batisse-Lignier, Igor Tauveron, Jean-Christophe Pointud, Isabelle Sahut-Barnola, Cyril Djari, Anne-Marie Lefrançois-Martinez, Mabrouka Doghman, Enzo Lalli, Antoine Martinez, Pierre Val.

Abstract

Adrenocortical carcinoma (ACC) is a highly aggressive cancer. Expression of the pro-apoptotic factor NOV/CCN3 is decreased in ACC and the nuclear receptor SF1 has been shown to negatively regulate its expression. However, the molecular mechanisms involved in SF1-mediated repression of NOV in ACC have remained elusive. We have recently shown that the histone methyltransferase EZH2 is the most deregulated epigenetic histone modifier in ACC. Interestingly, in prostate cancer, NOV expression is inhibited by the androgen receptor, another nuclear receptor, through recruitment of EZH2 and deposition of the H3K27me3 mark. Here, using a combination of knockdown, pharmacological treatment, overexpression and ChIP experiments, we show that SF1 inhibits NOV expression through recruitment of EZH2 on its regulatory regions. Our preliminary data relying on neutralization of NOV with an antibody, further show that induction of apoptosis following inhibition of EZH2 is at least in part mediated by overexpression of NOV. Altogether, these experiments suggest that SF1 and EZH2 cooperate to stimulate ACC progression through repression of the pro-apoptotic factor NOV/CCN3.

Introduction

Adult adrenocortical carcinoma is a rare neoplasm (0,5 to 2 per million per year) with devastating consequences and poorly understood pathogenesis [1]. Pediatric adrenocortical carcinoma is even less frequent with a high incidence in Paraná and Sao Polo states in the South of Brazil [2], [3]. Steroidogenic factor-1 SF1 (also known as Ad4BP or NR5A1) was initially suggested in 1995 by Sasano et al., to distinguish between adrenocortical tumors and tumours form other origins [4]. SF1 is a transcription factor belonging to the nuclear receptor family, implicated in the development of steroidogenic tissues by playing a key role in the regulation of steroid hydroxylases [5]. Overexpression of SF1 was detected in the majority of pediatric adrenocortical carcinoma cases [4]. This is mainly due to amplification of its genomic locus (9q33.3) but also to some other unidentified mechanisms [6]. Conversely, SF1 overexpression appears to be less frequent in adult ACC where it could be used as an unfavorable prognostic marker [7]. Inhibition of SF1 transcriptional activity leads to a decrease in cancer cell proliferation [8], highlighting the potential use of SF1 as a therapeutic target in ACC. Studies in transgenic mice and human cell lines have shown a dosage-dependent target genes regulation mediated by SF1 [9]. In childhood ACC, one of the most down-regulated genes in a SF1 dependent manner is Nephroblastoma overexpressed (NOV)/cysteine-rich protein 61/connective tissue growth factor/nephroblastoma overexpressed gene (CCN)-3 [10].

Nov belongs to the CCN family of multidomain-secreted proteins. It is a multi-modular mosaic protein containing four conserved modules, including insulin-like growth factor (IGF) binding domain, von Willebrand type C domain, thrombospondin-1 domain, and a C-terminal domain containing a putative cystine knot [11], [12]. It was originally named Nov because of its high expression in Mav (Myeloblastosis Associated Virus)-induced nephroblastomas [11]. Nov was identified to be a marker of the definitive zone of the fetal adrenal cortex [13] and its functions vary from promoting metastasis and angiogenesis to proliferation inhibition depending on the cellular system [12]. In human adrenocortical cells, Nov is characterized by its selective proapoptotic activity and is surprisingly down-regulated by the nuclear receptor SF1 known to work mostly as a

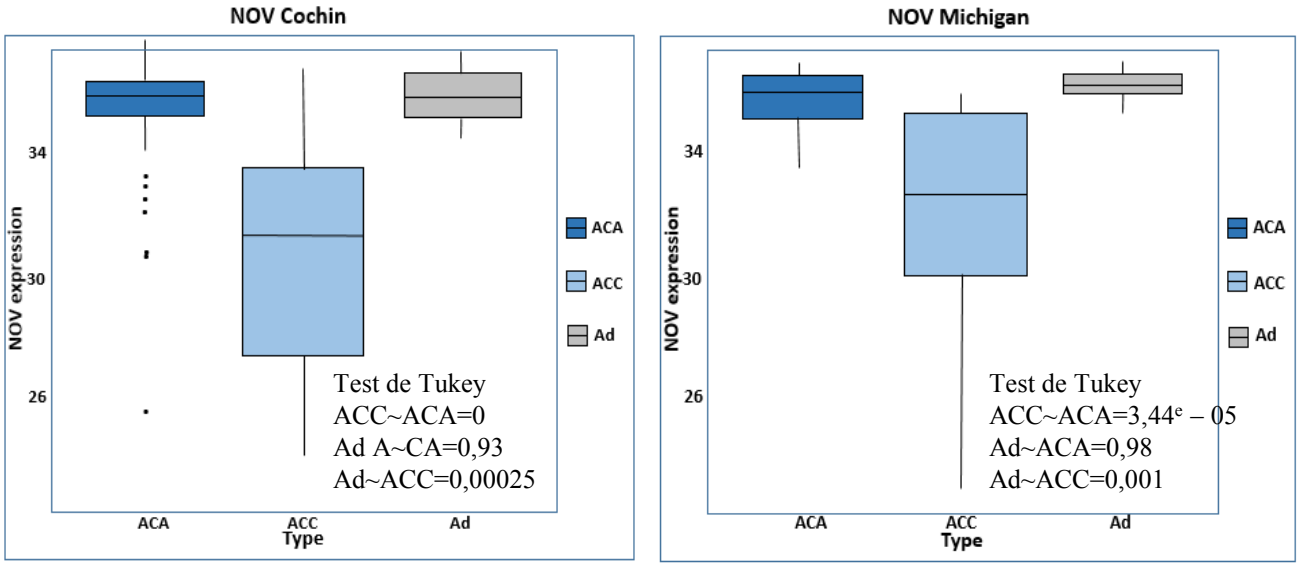


Figure 1: NOV/CCN3 expression is reduced in ACC. Boxplots represent mRNA accumulation of NOV in normal adrenals (grey), adrenocortical adenomas (dark blue) and adrenocortical carcinomas (light blue) from two independent cohorts (Cochin and Michigan).

transcriptional activator [14]. This raises the question of the molecular mechanisms involving SF1 in repression of NOV transcription. Interestingly, in prostate cancer, the androgen receptor (AR), another member of the nuclear receptor family inhibits NOV expression by recruiting the histone methyltransferase EZH2 to NOV regulatory regions, which is associated with disease aggressiveness [15], [16]. EZH2 is the catalytic core protein of the polycomb repressive complex 2 (PRC2), initiating target genes silencing by promoting H3K27 trimethylation. Its overexpression was shown to be associated with tumor progression and poor prognosis in many cancers including ACC [1], [17]. All these data suggest the existence of a similar mechanism in ACC, in which SF1 could down-regulate the expression of Nov by recruiting EZH2. Indeed, we show that NOV expression is negatively correlated with EZH2 in ACC and that knock-down or inhibition of EZH2 results in up-regulation of NOV expression. We further show that SF1-mediated inhibition of NOV is dependent on EZH2 expression and demonstrate increased recruitment of EZH2 on NOV regulatory regions following induction of SF1 expression. Finally, by neutralizing extra-cellular NOV protein with an antibody, we show that induction of apoptosis following knock-down of EZH2 may be partly dependent on NOV overexpression. Altogether, these data provide novel molecular insight into the mechanisms of SF1-mediated gene repression and show that NOV may be an important negative target of EZH2 in the context of ACC progression.

Results

NOV/CCN3 expression is downregulated in adrenocortical carcinomas

In order to evaluate Nov/CCN3 expression in adult ACC, we used publically available transcriptome data from Cochin and Michigan ACC patients. Interestingly, NOV showed a significantly reduced expression in carcinomas in comparison with adenomas and normal adrenals in both Cochin and Michigan cohorts (Figure 1).

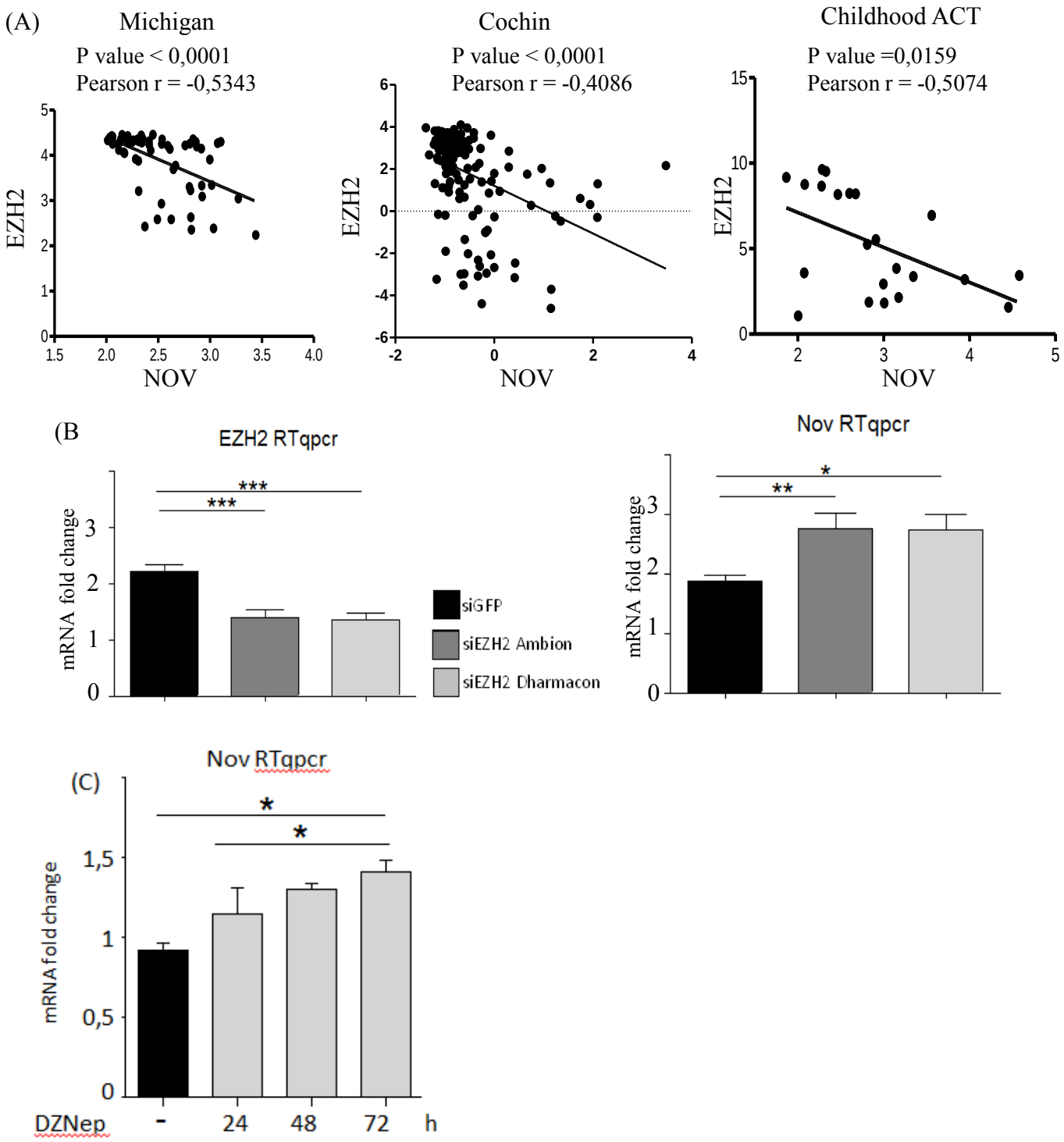


Figure 2: Expression of Nov is inhibited by EZH2 in ACC. (A) Expression of NOV is negatively correlated with expression of EZH2. Pearson correlation between log2 values of NOV and EZH2 mRNA accumulation in adrenocortical tumours from Cochin and Michigan cohorts and in childhood ACC. P, P-value; r, Pearson correlation coefficient. (B) Effect of EZH2 knockdown on NOV expression in H295R cells. H295R cells were transfected with siRNAs targeting GFP (negative control), and EZH2 from two different sources (Dharmacon and Ambion). After 5 days, expression levels of NOV and EZH2 were determined by RTqPCR. (C) Pharmacological inhibition of EZH2 with DZNep in H295R cells. H295R cells were treated with DMSO or 5.0 µM of DZNep following a kinetic of 24, 48 and 72 hours. Likewise, expression levels of NOV were determined by RTqPCR.

Bars represent the mean of at least four experiments performed in triplicate ±SD. Statistical analysis was performed by Anova test.

Expression of NOV is inhibited by EZH2 in ACC

We previously showed an upregulation of the histone methyltransferase EZH2 in adrenal carcinomas and its overexpression was significantly associated with poor survival rate [1]. Interestingly, correlation analyses in adult (Michigan and Cochin) and pediatric ACC showed a significant negative correlation between EZH2 and NOV expression levels (Figure 2A). This suggested that EZH2 may negatively regulate NOV expression in ACC. To test this hypothesis, H295R human adrenocortical carcinoma cells were transfected with two distinct siRNAs targeting EZH2. As expected, EZH2 siRNAs induced a 40% reduction in EZH2 mRNA levels. Interestingly, transfection of EZH2 siRNAs increased mRNA accumulation of Nov by 50% (Figure 2B). H295R cells were then treated with DZNep, a pharmacological inhibitor circumventing the toxicity that results from transfection with siRNAs and that was proven to inhibit EZH2 and H3K27me3 accumulation in H295R cell line [1]. Similar to EZH2 siRNAs, kinetic treatment with 5μM DZNep for 24, 48 and 72 hours, resulted in an increase of Nov expression at the transcript level (Figure 2C). These results show that the proapoptotic factor NOV/CCN3 may be inhibited by EZH2 in human adrenocortical carcinoma cell lines.

Cooperation between SF1 and EZH2 to repress NOV expression

Consistent with previously published data, induction of SF1 expression by doxycycline (Dox) in the H295R-TR/SF1 cell line [10] resulted in about 60% inhibition of NOV mRNA accumulation after 48h Dox treatment (Figure 3A). We then evaluated a possible contribution of EZH2 to SF1-mediated NOV repression by pharmacological and siRNA inhibition of EZH2. Treatment with 5 μM DZNep or transfection of EZH2 siRNA resulted in a significant increase in NOV expression (Figure 3B). Overexpression of SF1 following Dox treatment robustly inhibited NOV expression (Figure 3B). Interestingly, DZNEp treatment or EZH2 siRNA transfection were able to completely reverse the effect of SF1 overexpression, which resulted in baseline levels of NOV mRNA accumulation. This strongly suggested that EZH2 was required for SF1-mediated NOV repression. To further confirm this idea, we transfected H295R cells with siRNAs

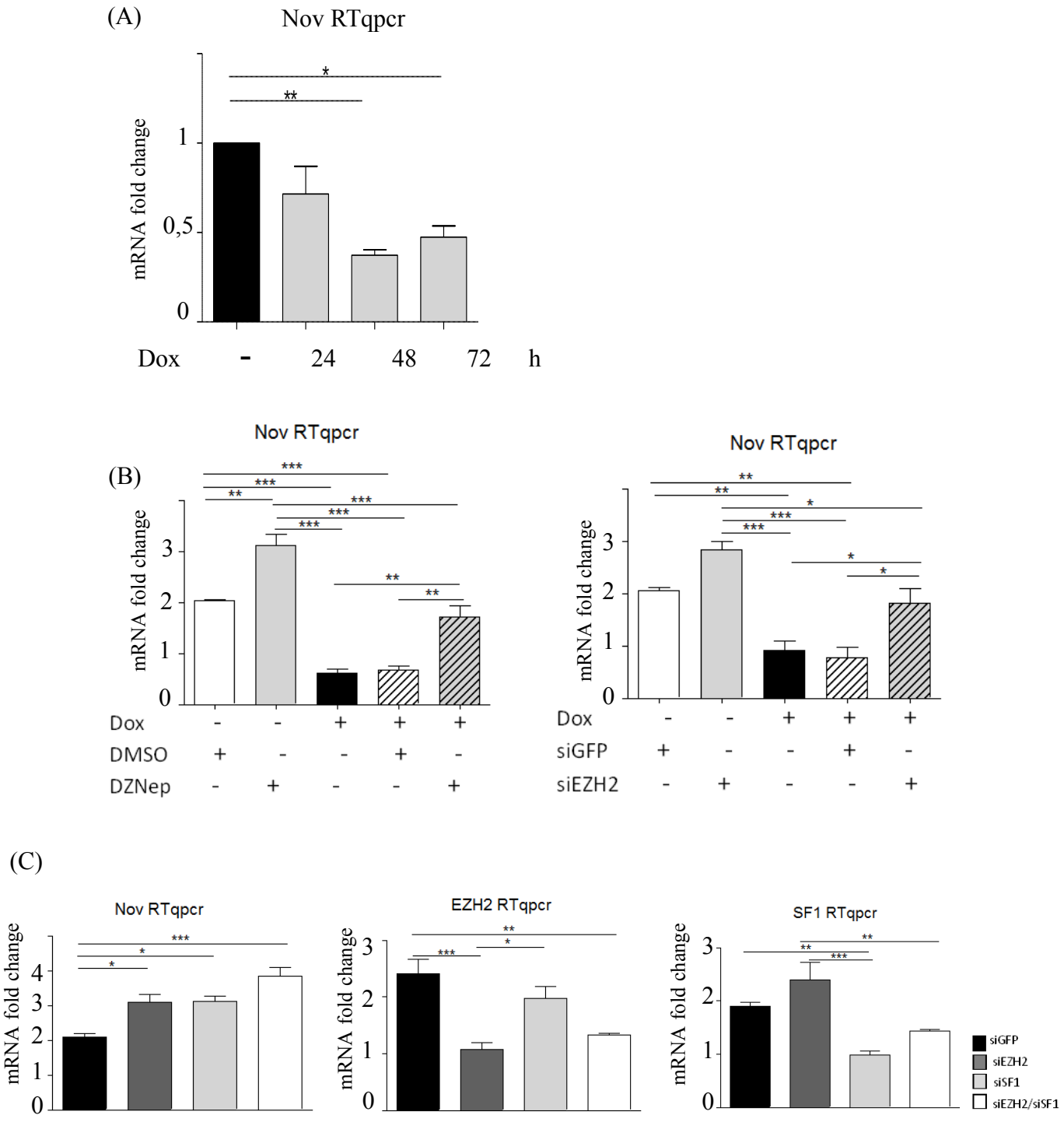


Figure 3: SF1 and EZH2 can cooperate to repress NOV. (A) NOV mRNA accumulation is down-regulated by SF1 overexpression following doxycyclin treatment in in H295R/TR-SF1 cells [10]. NOV mRNA accumulation was measured by RTqPCR after 24, 48 and 72 hours of SF1 induction with doxycyclin (B) EZH2 inhibition prevents NOV inhibition by SF1. NOV mRNA accumulation was measured by RTqPCR following overexpression of SF1 and pharmacological inhibition of EZH2 with 5µM DZNep or siRNA-mediated EZH2 knockdown. (C) Concomitant knock-down of EZH2 and SF1 results in a greater rise in NOV mRNA accumulation. Combination of SF1 and EZH2 knock-down using siRNAs in H295R cells results in an increase in Nov expression as shown by RTqPCR analysis (left graph). Effect of the concomitant knock-down on EZH2 and SF1 mRNA accumulation (right graphs). Bars represent the mean of at least four experiments performed in triplicate ±SD. Statistical analysis was performed by Anova test.

targeting SF1 and/or EZH2. These, reduced expression of their respective targets by about 50% (Figure 3C). SF1 or EZH2 knockdown were associated with a significant increase in NOV expression (Figure 3C). Consistent with a requirement for both factors to repress NOV, simultaneous knockdown of SF1 and EZH2 resulted in a further significant increase in NOV expression (Figure 3C).

SF1 overexpression induces EZH2 recruitment on NOV regulatory regions

Altogether, the previous data offer evidence that SF1 could cooperate with EZH2 to suppress Nov expression and suggest two hypotheses: 1. The transcriptional activator SF1, induces EZH2 activation, which in turn will extinguish NOV expression. 2. SF1 recruits EZH2 on Nov promoter in order to repress its transcription. To evaluate each hypothesis, we decided to asses EZH2 expression after modulation of SF1 dosage in H295R cells. Neither SF1 overexpression (by doxycycline treatment), nor its knockdown (by siRNAs), caused an alteration in EZH2 mRNA accumulation (Figure 4A). This result excludes our first hypothesis and supports the idea that EZH2 is recruited by SF1 on NOV regulatory regions. To further confirm that this effect was transcriptional, we transfected H295R-TR/SF1 cells with reporter plasmids bearing two different fragments of NOV promoter, cloned upstream of Luciferase (Figure 4B). As expected, induction of SF1 expression by Dox treatment repressed activity of both constructs. Interestingly, treatment with DZNep or GSK343 [18], a highly specific EZH2 inhibitor, induced activity of both constructs, indicating that the effect of EZH2 on NOV expression was indeed transcriptional. Consistent, with the requirement for EZH2 to allow SF1-mediated NOV repression, treatment with DZNep or GSK343 almost completely reversed the inhibitory effect of Dox on the two promoter fragments (Figure 4B). Altogether, these experiments show that SF1 and EZH2 cooperate to repress NOV transcription and that the shortest -625 promoter fragment bears all the required elements for this effect.

To further establish a role of SF1 in recruitment of EZH2 on NOV promoter, we performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments with EZH2 antibody on H295R-TR/SF1 after SF1 upregulation. Consistent with a role of SF1

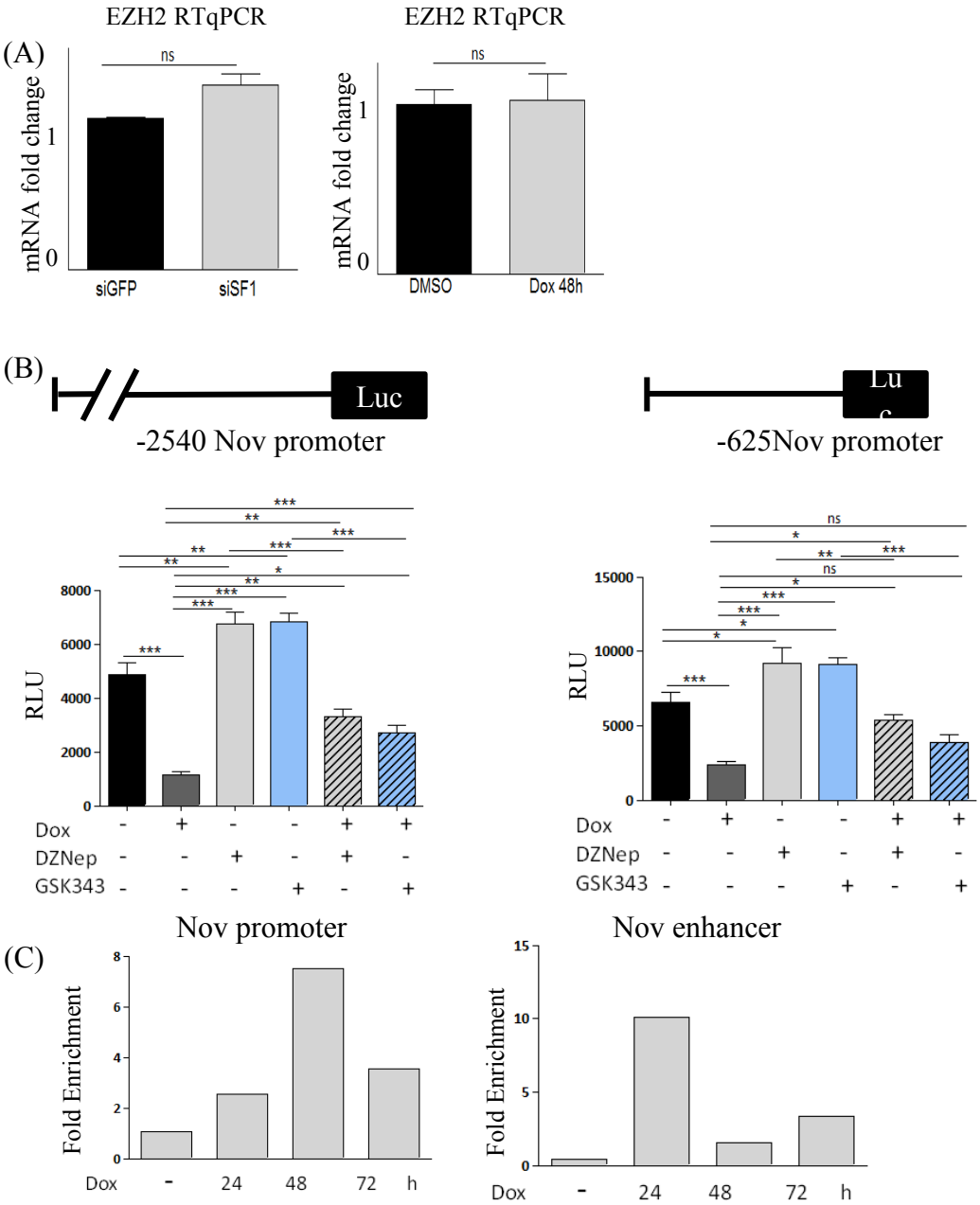


Figure 4: SF1 overexpression induces EZH2 recruitment on NOV regulatory regions. (A) EZH2 expression is not controlled by SF1. EZH2 mRNA accumulation was measured by RTqPCR following SF1 knockdown by siRNA or overexpression following doxycycline treatment (B) Effect of EZH2 and SF1 on NOV expression is transcriptional. H295R cells were transfected with reporter plasmids containing two different lengths of NOV regulatory regions driving expression of Luciferase. Cells were treated for 48h with doxycycline to induce SF1 expression and DZNep or GSK343 to inhibit EZH2 activity and luciferase activity was evaluated (C) Analysis of EZH2 recruitment on NOV promoter after SF1 induction. Recruitment of EZH2 on NOV promoter and enhancer in H295R-TR/SF1 cells was evaluated by ChIP with EZH2 antibody following SF1 overexpression.

in recruiting EZH2, our preliminary ChIP analyses showed that EZH2 was markedly enriched on NOV promoter and enhancer, following Dox induction of SF1 expression (Figure 4C). However, this enrichment was transitory and displayed different kinetics on promoter and enhancer (maximum enrichment on Nov promoter after 48h treatment and on Nov enhancer after 24h treatment).

EZH2 apoptosis induction is mediated by NOV repression

We have previously shown that pharmacological inhibition of EZH2 by DZNep increased apoptosis and Caspase 3 activity [1]. As Nov is known for its proaopoptotic activities, we wondered if apoptotic induction following inhibition of EZH2 was dependent on NOV overexpression. To evaluate this, we neutralized NOV using an antibody (anti-NOV) in H295R cells transfected with siRNAs targeting EZH2 and evaluated cell growth. Interestingly, our preliminary experiments showed that neutralization of NOV partially reversed the growth inhibitory effect of EZH2 knockdown (Figure 5A). To evaluate the contribution of apoptosis inhibition to this phenomenon, we examined expression of anti-apoptotic factors such as BCL2, BCL-XL and BIRC5 by RTqPCR. Our preliminary results show that neutralization of NOV partially reversed the inhibition of BCL2, BCL-XL and BIRC5 expression, following EZH2 knockdown (Figure 5B). Altogether, these data suggest that some of the apoptotic effects of EZH2 inhibition are mediated by increased NOV expression.

Discussion

Several studies highlighted the important role of the transcription factor SF1 in adrenal cortex physiology as well as its carcinogenesis [8], [9]. Overexpression of SF1 was detected in children and in adult ACC where it could be used as an unfavorable prognostic marker. Studies have also shown a dosage-dependent target gene regulation mediated by SF1 In childhood ACC, where NOV was one of the most down-regulated genes in a SF1 dependent manner [10].

In this study, we show how the nuclear receptor SF1 acts as a transcriptional repressor in ACC, in addition to its well-documented role in gene activation. Indeed, our data show that SF1 and the histone methyltransferase

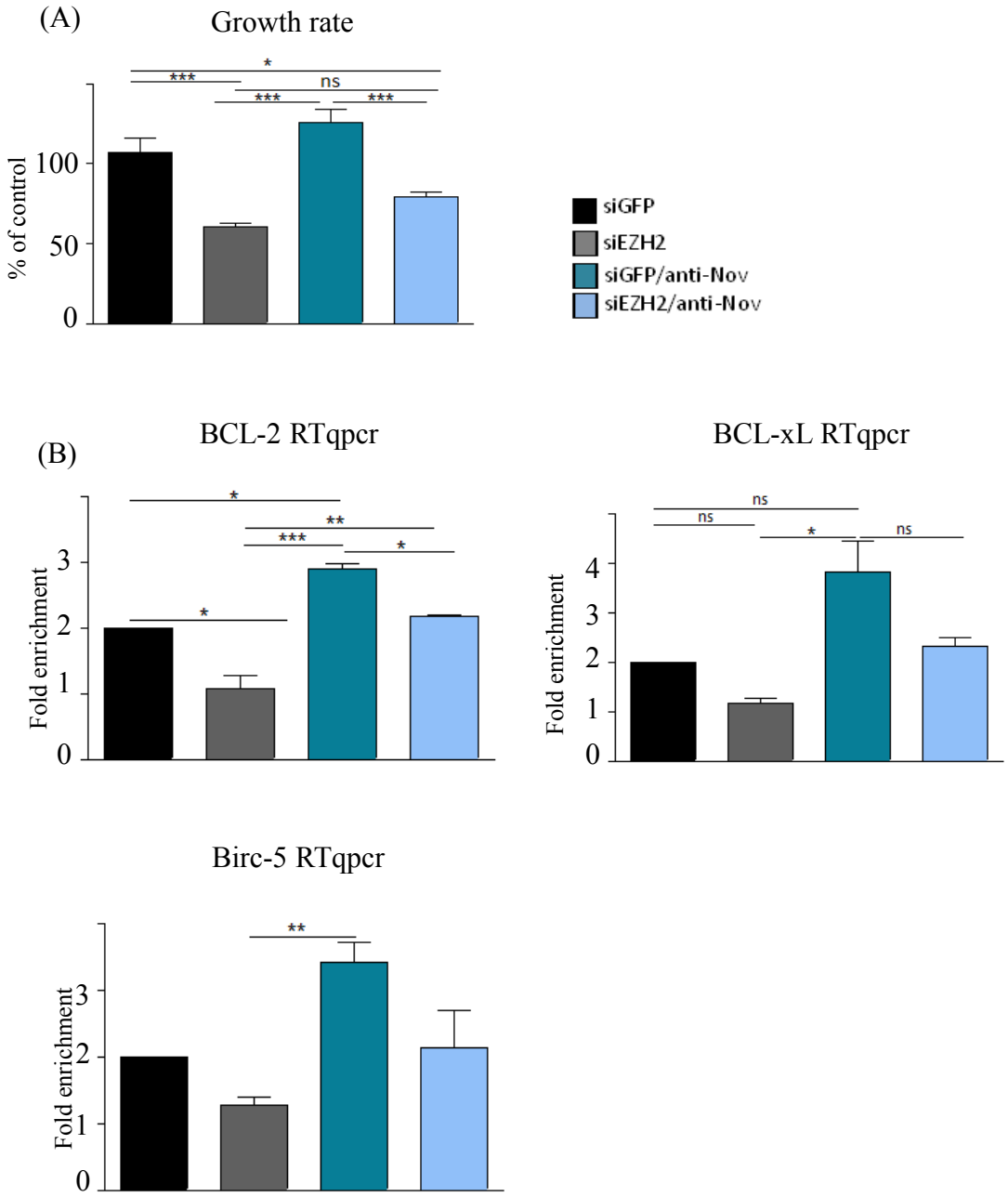


Figure 5: EZH2 apoptosis induction is mediated by NOV repression. (A) NOV neutralizing antibody counteracts EZH2 KD-induced cell growth inhibition. H295R cells were transfected by siRNA targeting EZH2 and treated in parallel with NOV neutralizing antibody (1mg/ml). Cell growth rate was evaluated by counting live cells after 5 days treatment. (B) NOV neutralizing antibody blocks induction of pro-apoptotic genes. Expression of BCL2, BCL-XL and BIRC5 was evaluated by RTqPCR following EZH2 KD and treatment with NOV neutralizing antibody.

EZH2 are both required to repress NOV expression in H295R cells. Our preliminary ChIP experiments further suggest that this repression relies on recruitment of EZH2 by SF1 on the regulatory regions of NOV/CCN3. Whether this relies on deposition of the H3K27me3 mark by EZH2 will have to be demonstrated by further ChIP experiments.

Since its discovery two decades ago [19], [20] NOV has been investigated in a number of cancer types [21] where it has been shown to regulate oncogenic properties in a cell type and context dependent manner [21]. In breast and prostate cancers that share many homologous oncogenic mechanisms, NOV has been shown to inhibit cell growth and tumor metastasis [15], [22]. Likewise, in ACC, NOV inhibition resulted in an increase in the growth rate of H295R cells, through reduction of apoptosis [1]. As NOV is known for its proapoptotic activity, here we showed that the increase in cell growth following knockdown of NOV by a neutralizing antibody is the result of proapoptotic genes downregulation (BCL-2, BCL-XL and Birc5). In combination with EZH2 knock-down, NOV inhibition partially prevented the decrease in cell growth rate caused by inhibition expression of EZH2. These data strongly suggest that EZH2 apoptotic induction could be mediated by NOV inhibition.

In conclusion, our study used a series of knockdown and overexpression experiments to illustrate the mechanisms by which SF1 functions as a transcriptional repressor in ACC. Using H295-TR/SF1 cells, we showed that this inhibition is mediated by the histone methyltransferase EZH2. In addition, NOV inhibition resulted in an increase in growth rate of H295R cells suggesting a protective role of this CCN family factor in adrenocortical tumorigenesis. Altogether, these data suggest that it may be important in future studies to explore novel therapeutic strategies aiming at targeting SF1 and EZH2. In this context, SF1-repressed genes such as NOV may be useful biomarkers for treatment response.

Materials and methods

- Cell culture

Human H295R ACC cells were cultured in DMEM/Ham's F12 supplemented with 10% foetal bovine serum (S1800-500, Biowest), 2 mM L-Glutamine (ref. 25030, Gibco), 50 U/ ml penicillin, 50 mg/ml streptomycine and 1x Insulin/ Transferrin/Selenium (ref. 41400-045, Gibco). H295R cell clones overexpressing SF-1 in a doxycycline-inducible fashion (H295R TR/SF-1) were a kind gift from Dr. Enzo Lalli [9]. They were maintained by adding blasticidin (5µg/ ml) and zeocin (100µg/ ml) to supplemented DMEM/Ham's F12 medium. Induction of SF1 expression was achieved by addition 1 µg/ml doxycycline for 48 hours.

- Measure of cell growth

H295R cell growth rate was determined by calculating the ratio of live H295R cells after treatment over the number of cells initially seeded. It was then expressed as a relative value over control DMSO-treated group. For knockdown experiments, cells were counted 5 days after the first round of siRNA transfection. For pharmacological inhibition, cells were counted 5 days after initiation of treatment. These experiments were repeated at least four times with triplicate samples.

- Transfections and treatments

For siRNA-mediated knockdown of EZH2 and SF1, H295R were seeded at a density of 4.10^5 cells per well in 6-wells plates (no. 353046, BD Falcon). Cells were then transfected twice within 48h with Effectene using 100 pmol siRNA per well, following manufacturer's (ID: 301425) instructions. siRNA sequences were: siGFP: ACUACCAGCAGAACACCCCUU; siEZH2-1: Silencer Select (s4917, Ambion Life Technologies); siEZH2-2: ON-TARGET plus SMART pool (J-0042 18-07, Dharmacon). For pharmacological EZH2 inhibition, H295R cells were seeded as above and treated with 5.0 µM of DZNep (102052-95-9, Cayman Chemical) or GSK343 at a concentration of 5.0 µM, for 24-72 hours. Control cells were treated with equivalent concentrations of DMSO.

- Transient transfection and luciferase assays

H295R cells were transfected with NOV promoter reporters, obtained from Dr. Enzo Lalli, using the Effectene reagent (ID: 301425, Qiagen) following the manufacturer's instructions. The cells were transfected once with 0.5 µg of each reporter construct and luciferase activity was measured 24h after treatment.

- Real-time quantitative PCR

Total RNAs from H295R cells were extracted using Trizol. One microgram of total RNAs was reverse transcribed for 1h at 37°C with 5 pmoles of random hexamer primers, 200 U reverse transcriptase (M-MLV RT, M1701, Promega), 2mM dNTPs and 20 U RNAsin (N2615, Promega). One microliter of a one-tenth dilution of cDNA was used in each quantitative PCR reaction. All reactions were conducted with SYBR qPCR Premix Ex Taq II Tli RNase H+ (TAKRR820W, Takara). Primer pairs are listed in Table 1. For each experiment and primer pairs, efficiency of PCR reactions was evaluated by amplification of serial dilutions of a mix of cDNAs. Relative gene expression was normalized to ACTIN by the ΔΔCt method. Statistical analyses were directly conducted on ΔΔCt values.

- Chromatin immunoprecipitation

H295R-TR/SF1 cells ChIP was performed as follows: H295R-TR/SF1 cells were seeded at a density of 5×10^6 per 10 cm dish and treated with 1.0 μM doxycycline or DMSO for 48 h. Following treatment, they were fixed by addition of 1% formaldehyde to the culture medium for 10 min. Fixation was stopped by addition of 125 μM glycine. Cells were rinsed three times with PBS and scraped in CLB buffer (5 mM PIPES, 85 mM KCl, 0.5% NP40). After centrifugation, nuclei pellet was resuspended in NLB buffer (50 mM Tris–HCl, 10 mM EDTA, 1% SDS) and incubated on ice for 1hour 45 min. Chromatin was then sheared to an average length of 500 pb and submitted to immunoprecipitation with 5 μg of antibodies directed against EZH2 (C15310039, Diagenode) or Rabbit IgGs (kch-504-250, Diagenode) used as a control. Chromatin-antibodies complexes were collected with protein A or G magnetic beads (Dynabeads, Invitrogen). After seven washes in IP buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris–HCl, 5 mMEDTA, 0.5% NP40, 1% Triton X-100), beads were resuspended in 100 μl of 10% Chelex slurry. After 10 min boiling, the Chelex/protein A/G bead suspension was allowed to cool to room temperature. Proteinase K (100 mg/ml) was then added and beads were incubated for 30 min at 55 °C while shaking, followed by another round of boiling for 10 min. Suspension was centrifuged and supernatant is collected. The Chelex/protein A/G beads fraction was vortexed with another 100 μl water, centrifuged again, and the first and the second supernatants were combined.

Eluate were then purified using Qiagen Qiaquick PCR purification columns and eluted in 30 µl of water (1). One µl of the eluate was used directly as a template in real-time qPCR. Enrichment of Nov promoter and enhancer in precipitates was detected by real-time qPCR using primers: Nov promoter-Fw 50-GCTGAGTGGTTTCTCCTTGTC -30 and Nov promoter-Rev 50-ACACCAGACAGCATGAGCAG-30; Nov enhancer-Fw 50-ATGCACGTGCGTGTAAACAG-30 and Nov enhancer-Rev 50-CACAAGGTTTCTGGGTAGGG -30 (14). Results were normalized to IgG and are expressed as fold enrichment over control DMSO treated cells.

- Patients' data analysis

The clinical datasets used in this paper are derived from three cohorts of patients. Cochin's cohort (47 ACC, 41 ACA and 4 NAd, [23], GSE49280) and Michigan's cohort (33 ACC, 22 ACA and 10 NAd, [24], GSE10927), were analyzed by Affymetrix microarray (HG-U133 Plus 2.0 and HG-U95Av2, respectively). Data analyzed were provided by our collaborators after RMA normalization and inter-array normalization. The third transcriptome is from pediatric adrenal cortex tumours [25] and it relies on Illumina HiSeq 2000 RNA Sequencing Version 2. Expression data were standardized by the Relative Standard Error of the Mean (RSEM) algorithm and transformed into Log2 in order to refocus and symmetrize values' distribution.

Gene	Orientation	Sequences 5'3'
EZH2	Forward Reverse	ACCAGTTTGTTGGCGGAAGCG CCAAGTCACTGGTCACCGAACAAG
SF1/NR5A1	Forward Reverse	CGAGCTGCTGGTGTTCGACCACA CAACACCAGGCTGTGCAGCAGC
BCL-XL	Forward Reverse	GATCCCCATGGCAGCAGTAAAGCAAG CCCCATCCCGGAAGAGTTCATTCACT
Birc5	Forward Reverse	ATTCGTCCGGTTGCGCTTTCC CACGGCGCACTTTCTTCGCAG
BCL-2	Forward Reverse	TTGTGGCCTTCTTTGAGTTCGGTG GGTGCCGGTTCAGGTACTCAGTCA
Actin	Forward Reverse	CGCGAGAAGATGACCCAGATC TCACCGGAGTCCATCACGA
NOV	Forward Reverse	GGACCCCAGCAACCAGACTGG CACTGCGGTAGATGACCCCATCG

Table 1: Human primers used for RTqpcr.

References

[1] C. Drelon *et al.*, 'EZH2 is overexpressed in adrenocortical carcinoma and is associated with disease progression', *Hum. Mol. Genet.*, vol. 25, no. 13, pp. 2789–2800, 01 2016.

[2] B. C. Figueiredo *et al.*, 'Penetrance of adrenocortical tumours associated with the germline TP53 R337H mutation', *J. Med. Genet.*, vol. 43, no. 1, pp. 91–96, Jan. 2006.

[3] R. C. Ribeiro *et al.*, 'An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 16, pp. 9330–9335, Jul. 2001.

[4] S. Sbiera *et al.*, 'High diagnostic and prognostic value of steroidogenic factor-1 expression in adrenal tumors', *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 95, no. 10, pp. E161-171, Oct. 2010.

[5] K. L. Parker and B. P. Schimmer, 'Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function', *Endocr. Rev.*, vol. 18, no. 3, pp. 361–377, Jun. 1997.

[6] M. Q. Almeida *et al.*, 'Steroidogenic Factor 1 Overexpression and Gene Amplification Are More Frequent in Adrenocortical Tumors from Children than from Adults', *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 95, no. 3, pp. 1458–1462, Mar. 2010.

[7] E. Duregon, M. Volante, J. Giorcelli, M. Terzolo, E. Lalli, and M. Papotti, 'Diagnostic and prognostic role of steroidogenic factor 1 in adrenocortical carcinoma: a validation study focusing on clinical and pathologic correlates', *Hum. Pathol.*, vol. 44, no. 5, pp. 822–828, May 2013.

[8] M. Doghman, J. Cazareth, D. Douguet, F. Madoux, P. Hodder, and E. Lalli, 'Inhibition of Adrenocortical Carcinoma Cell Proliferation by Steroidogenic Factor-1 Inverse Agonists', *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 94, no. 6, pp. 2178–2183, Jun. 2009.

[9] M. Doghman *et al.*, 'Increased steroidogenic factor-1 dosage triggers adrenocortical cell proliferation and cancer', *Mol. Endocrinol. Baltim. Md*, vol. 21, no. 12, pp. 2968–2987, Dec. 2007.

[10] M. Doghman *et al.*, 'Nephroblastoma overexpressed/cysteine-rich protein 61/connective tissue growth factor/nephroblastoma overexpressed gene-3 (NOV/CCN3), a selective adrenocortical cell proapoptotic factor, is down-regulated in childhood adrenocortical tumors', *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 92, no. 8, pp. 3253–3260, Aug. 2007.

[11] D. R. Brigstock, 'The CCN family: a new stimulus package', *J. Endocrinol.*, vol. 178, no. 2, pp. 169–175, Aug. 2003.

[12] N. Planque and B. Perbal, 'A structural approach to the role of CCN (CYR61/CTGF/NOV) proteins in tumourigenesis', *Cancer Cell Int.*, vol. 3, no. 1, p. 15, Aug. 2003.

[13] J. Ratcliffe, M. Nakanishi, and R. B. Jaffe, 'Identification of definitive and fetal zone markers in the human fetal adrenal gland reveals putative developmental genes', *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 88, no. 7, pp. 3272–3277, Jul. 2003.

[14] Z. Hu, L. Zhuang, X. Guan, J. Meng, and M. L. Dufau, 'Steroidogenic factor-1 is an essential transcriptional activator for gonad-specific expression of promoter I of the rat prolactin receptor gene', *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 22, pp. 14263–14271, May 1997.

[15] L. Wu *et al.*, 'CCN3/NOV gene expression in human prostate cancer is directly suppressed by the androgen receptor', *Oncogene*, vol. 33, no. 4, pp. 504–513, Jan. 2014.

[16] C. M. Armstrong and A. C. Gao, 'CCN3-EZH2-AR feedback loop: new targets for enzalutamide and castration resistant prostate cancer', *J. Cell Commun. Signal.*, vol. 11, no. 1, pp. 89–91, Mar. 2017.

[17] G. Deb, A. K. Singh, and S. Gupta, 'EZH2: Not EZHY (Easy) to Deal', *Mol. Cancer Res. MCR*, vol. 12, no. 5, pp. 639–653, May 2014.

[18] T. Yu *et al.*, 'The EZH2 inhibitor GSK343 suppresses cancer stem-like phenotypes and reverses mesenchymal transition in glioma cells', *Oncotarget*, vol. 8, no. 58, pp. 98348–98359, Sep. 2017.

[19] C. Martinerie *et al.*, 'Physical mapping of human loci homologous to the chicken nov proto-oncogene', *Oncogene*, vol. 7, no. 12, pp. 2529–2534, Dec. 1992.

[20] V. Joliot *et al.*, 'Proviral rearrangements and overexpression of a new cellular gene (nov) in myeloblastosis-associated virus type 1-induced nephroblastomas', *Mol. Cell. Biol.*, vol. 12, no. 1, pp. 10–21, Jan. 1992.

[21] B. Perbal, 'CCN3: Doctor Jekyll and Mister Hyde', *J. Cell Commun. Signal.*, vol. 2, no. 1–2, pp. 3–7, Jun. 2008.

[22] T. Ohgawara *et al.*, 'Association of the metastatic phenotype with CCN family members among breast and oral cancer cells', *J. Cell Commun. Signal.*, vol. 5, no. 4, pp. 291–299, Dec. 2011.

[23] G. Assié *et al.*, 'Integrated genomic characterization of adrenocortical carcinoma', *Nat. Genet.*, vol. 46, no. 6, pp. 607–612, Jun. 2014.

[24] T. J. Giordano *et al.*, 'Molecular classification and prognostication of adrenocortical tumors by transcriptome profiling', *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 15, no. 2, pp. 668–676, Jan. 2009.

[25] E. M. Pinto *et al.*, 'Genomic landscape of pediatric adrenocortical tumors', *Nat. Commun.*, vol. 6, p. 6302, Mar. 2015.

Discussion et perspectives

Les corticosurrénalomes sont des tumeurs malignes rares avec 0.5 à 2 nouveaux cas par an et par million. Ces tumeurs sont associées à un mauvais pronostic avec une survie à 5 ans inférieure à 40% (Else et al., 2014). Le seul traitement curatif des CCS repose sur l'exérèse complète de la tumeur primaire. Toutefois, environ 80% des patients ayant subi cette chirurgie présenteront une récidive (Fay et al., 2014). De plus, au moment du diagnostic, près de 50% des patients présentent des métastases (Else et al., 2014). Une thérapie adjuvante au mitotane peut alors être proposée, mais le mitotane entraine de nombreux effets secondaires et ne conduit pas à une réponse thérapeutique durable (Berruti et al., 2008). Il est donc nécessaire d'identifier les altérations à l'origine du développement et de la progression tumorale cortico-surrénalienne afin de développer des stratégies thérapeutiques ciblées plus efficaces.

Les deux altérations les plus fréquentes dans les CCS sont la surexpression du facteur de croissance IGF2 (90% des cas) (Gicquel et al., 1997; Giordano et al., 2003) et l'activation de la voie Wnt/ß-caténine (39% des CCS) (Gaujoux et al., 2011). Notre équipe a démontré que la ß-caténine est un oncogène surrénalien, mais que d'autres altérations doivent être nécessaires pour la progression maligne (Berthon et al., 2010). Nous avons mis en évidence que Igf2 seul n'initie pas la tumorigenèse cortico-surrénalienne et que sa surexpression associée à l'activation de la ß-caténine dans le cortex surrénalien n'a qu'un effet modéré sur la progression maligne (Drelon et al., 2012). Afin d'identifier de nouvelles altérations, une réanalyse de données de transcriptome de trois

cohortes de patients a mis en évidence une surexpression de EZH2 dans les CCS, qui était associée, comme dans d'autres cancers, à un mauvais pronostic. Nos analyses moléculaires ont montré que cette surexpression se situe en aval de la cascade TP53/RB1/E2F1, dont la dérégulation est également corrélée au mauvais pronostic (Drelon et al., 2016b). L'inhibition pharmacologique de EZH2 par le DZNep ou le GSK126 est associée à une diminution de la croissance et une induction de l'apoptose de cellules humaines de CCS en culture. Elle permet également une restauration de l'anoïkis et une inhibition des capacités migratoire (Drelon et al., 2016b). L'ensemble de ces résultats suggère que EZH2 participe à la progression du CCS et que son inhibition pourrait constituer une piste thérapeutique intéressante. Par contre, les mécanismes régulés par cette méthyltransférase sont inconnus dans les CCS.

Compte-tenu de l'ensemble de ces données, mon projet au cours de la thèse a été d'essayer d'identifier le mode d'action et les cibles de EZH2 dans le contexte du CCS.

En effet, EZH2 a été initialement décrit comme une histone méthyltransférase capable de réprimer la transcription génique en posant la marque chromatinienne H3K27me3 au sein du complexe PRC2 dans lequel il s'associe à RBAP48, SUZ12 et EED. Toutefois, des études récentes montrent qu'il peut également agir comme activateur transcriptionnel en interagissant directement avec des facteurs de transcription tels que AR, STAT3 ou E2F1. Ce changement d'activité de EZH2 est dépendant de sa phosphorylation sur sa sérine 21 par des kinases telles que AKT (Wassef and Margueron, 2017). Par ailleurs, des approches in vitro et in vivo ont permis de montrer que malgré une

nette surexpression, EZH2 n'était pas capable de déposer efficacement la marque H3K27me3 dans les cellules fortement prolifératives du cancer du sein, conduisant à une instabilité transcriptionnelle associée à la progression tumorale (Wassef et al., 2015a). L'ensemble de ces données suggère donc que EZH2 peut agir suivant de multiples modalités en fonction du tissu et du stade de progression tumorale (Wassef et al., 2015a).

I. EZH2 agit majoritairement comme activateur transcriptionnel dans le CCS

Afin d'identifier le mode d'action global de EZH2 dans le CCS, nous avons conduit une analyse dans laquelle nous avons corrélé l'expression de l'ensemble des gènes des transcriptomes des trois cohortes indépendantes de CCS à EZH2 et croisé les listes de gènes. Cette approche a suggéré un mode d'action plutôt positif de EZH2 dans le CCS malgré l'enrichissement de certains sets de gènes cibles de PRC2 précisément dans la cohorte Michigan. Bien que l'invalidation de Ezh2 conduise majoritairement à la surexpression de cibles du complexe PRC2 dans la surrénale normale (mise en évidence par des analyses d'enrichissement), les CCS sont associés à un mode d'action positif indépendant de ce complexe. Ce switch d'activité est dépendant de sa phosphorylation sur sa sérine 21 par des kinases telles que AKT (Wassef and Margueron, 2017), une modification également observée dans le cancer de prostate résistant à la castration (Cha et al., 2005). La signalisation PI3K/AKT se trouve en aval du facteur de croissance IGF2, un facteur systématiquement surexprimé dans les CCS (Giordano et al., 2003). Bien que le rôle de IGF2 dans la pathogenèse du CCS ne soit pas clairement établi (Drelon et al., 2012), l"ensemble de ces données pourrait suggérer une

implication de IGF2 dans la modulation de l'activité de EZH2 dans le CCS. Cette hypothèse pourrait être vérifiée dans notre modèle de surexpression surrénalienne de IGF2 (Drelon et al., 2012) grâce à un anticorps ciblant la phosphorylation du résidu S21 de EZH2. Toutefois, nos analyses préliminaires montrent que cet anticorps commercial (Bethyl Laboratories) détecte une protéine dans les tissus des souris invalidées pour EZH2, suggérant un manque de spécificité qui pourrait s'avérer préjudiciable pour ces analyses.

D'une manière intéressante, une étude récente a montré une phosphorylation de EZH2 au niveau de sa thréonine 372 par la PKA dans les cellules du cancer de l'ovaire, une phosphorylation qui est à la base de l'inhibition de l'activité canonique de EZH2 ce qui résulte en une diminution de la prolifération et de la migration des cellules cancéreuses ovariennes (Özeş et al., 2018). Ces données sont en accord avec les nôtres montrant que la PKA s'oppose à l'activité tumorale dans les CCS (Drelon et al., 2016a). Il serait donc intéressant de valider l'hypothèse d'une phosphorylation de EZH2 par la PKA, dans la corticosurrénale saine et dans nos modèles de tumorigenèse indépendants (les souris ΔCat, (Berthon et al., 2010), et les souris AdTAg (Ragazzon et al., 2006)) et dépendants de la signalisation PKA (les souris AdKO (Sahut-Barnola et al., 2010)).

Récemment, Mickael Mathieu a mis en évidence le rôle de l'histone méthyltransférase EZH2 dans le contrôle de l'identité des cellules stéroïdogènes du cortex surrénalien (Mathieu et al, en révision). Dans ces cellules, Ezh2 contrôle la voie de signalisation PKA, en réprimant l'expression d'inhibiteurs de cette voie comme les phosphodiestérases (PDE) et la sous-unité régulatrice

progression du corticosurrénalome. EZH2 étant lui-même en aval de E2F1 dans le CCS (Drelon et al., 2016b), ces résultats suggèrent l'existence d'une boucle d'emballement dépendant de ces deux facteurs, conduisant à la surexpression d'acteurs clés du cycle et de la mitose.

L'interaction physique entre EZH2 et E2F1 a été démontrée dans les cellules de cancer de la prostate (LNCaP Abl) (Xu et al., 2016). Celle-ci pourra être confirmée par des expériences de co-immunoprécipitation de E2F1 et EZH2 dans des cellules de CCS, mais également des surrénales saines. Compte-tenu de l'effet PRC2-dépendant de EZH2 dans le contrôle de l'expression génique dans la surrénale saine, on peut imaginer l'existence d'un recrutement différentiel de E2F1 en fonction du statut tissulaire.

La question des mécanismes moléculaires expliquant la coopération fonctionnelle de EZH2 et E2F1 reste ouverte. Des substrats non-histones de EZH2 ont été identifiés tels que les facteurs de transcription GATA4 et STAT3 (He et al., 2012; Kim et al., 2013). Afin de vérifier si E2F1 est un substrat de EZH2, on va réaliser dans un premier temps des expériences validant la méthylation de E2F1 dans les cellules H295R. On réalisera une immunoprécipitation de E2F1, qui sera suivie par des western-blots en utilisant des anticorps anti-pan-methyl lysine. Si E2F1 est méthylé dans les cellules H295R, on pourra s'interroger sur le rôle de EZH2 dans la méthylation de E2F1. Dans ce but, on pourra inhiber EZH2 soit en utilisant des shARN, soit des inhibiteurs pharmacologiques (DZNep) et vérifier ensuite le statut de méthylation de E2F1 par immunoblot. Ensuite, afin de déterminer si l'activité méthyltransférase de EZH2 est requise pour la méthylation de E2F1, on pourra

surexprimer une forme mutante de EZH2 avec une activité méthyltransférase inactive (EZH2 H689A) (Kuzmichev et al., 2004) par une transduction lentivirale et évaluer ensuite la méthylation de E2F1.

Afin de déterminer l'effet de la méthylation sur l'activité de E2F1, on pourra tout d'abord identifier les résidus triméthylés de E2F1 par spectrométrie de masse. Une fois identifiés, on pourra générer des lentivirus exprimant une forme mutée de E2F1 dans laquelle le résidu méthylé est remplacé par un autre acide aminé. Ces mutants E2F1 seront surexprimés dans les cellules H295R et des co-IP seront conduites afin de déterminer l'interaction avec EZH2 ainsi que le statut de méthylation. Comme l'activité de E2F1 est associée à la prolifération des cellules H295R, nous pourrons évaluer le taux de croissance suite à la surexpression de la forme mutée de E2F1 en comparaison avec la forme sauvage. Nous pourrons analyser aussi l'expression des trois gènes cibles identifiés de E2F1 dans les mêmes conditions afin d'évaluer les conséquences de la méthylation de E2F1 sur son activité transcriptionnelle. Enfin, nous pourrons envisager des expériences de RNAseq et de ChIPseq afin d'identifier les gènes cibles de E2F1 et potentiellement de EZH2 dans ces différents contextes cellulaires.

ii. Rôle de EZH2 et E2F1 dans le contrôle de l'expression de RRM2, PRC1 et PTTG1

Afin d'affiner la liste des cibles pertinentes, nous avons croisé les listes de gènes corrélés avec EZH2 chez les patients avec les listes de gènes dérégulés en réponse à l'invalidation de Ezh2 dans la corticosurrénale murine (Mathieu et al., en révision). Le croisement des données a identifié RRM2, PTTG1 et PRC1/ASE1

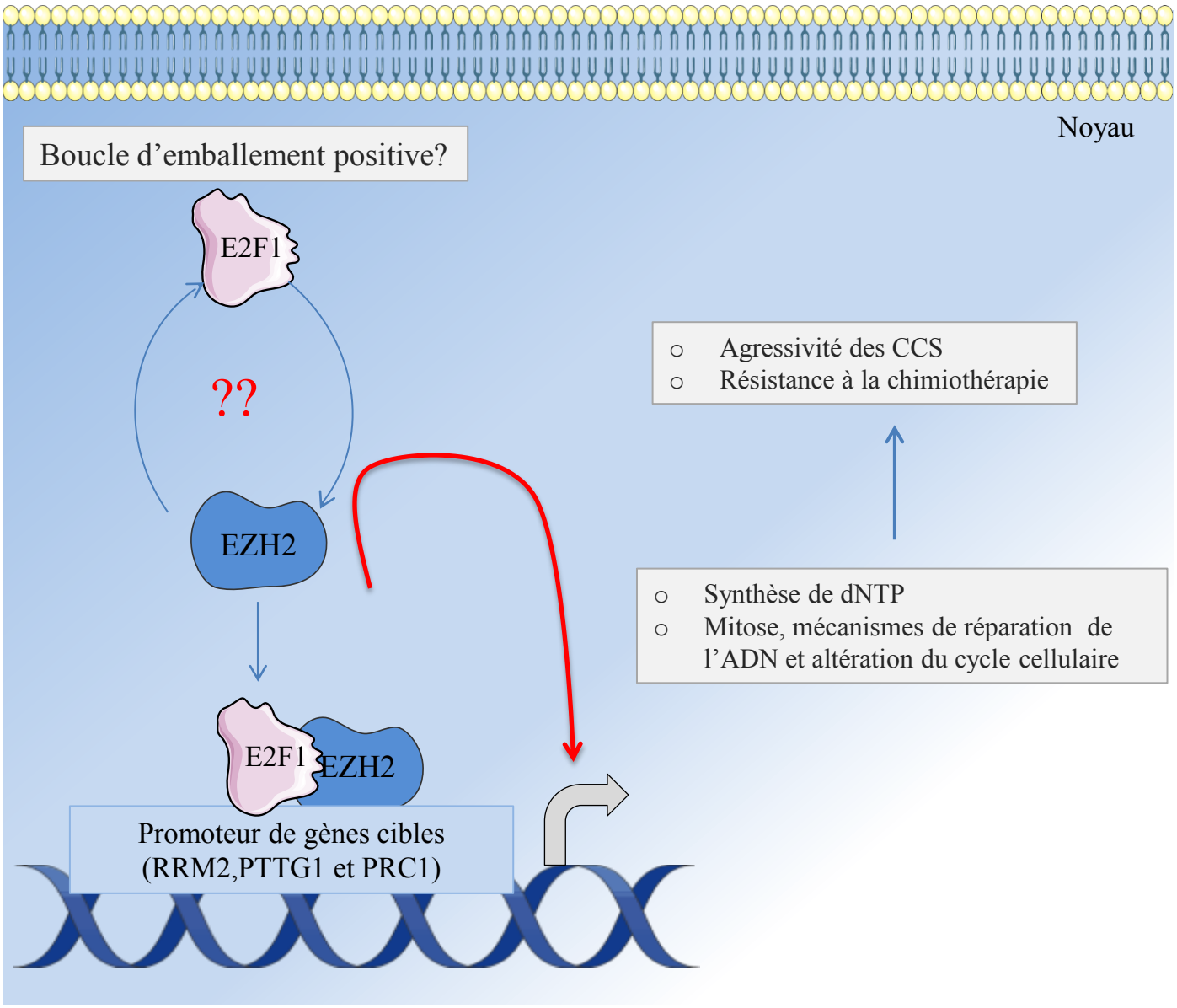


Figure 29: Interaction E2F1/EZH2 et agressivité des CCS.
E2F1 stimule l'expression de EZH2 (Drelon et al., 2016b). Un mécanisme de régulation positive de l'expression génique par EZH2 est révélé dans les CCS grâce à son interaction avec E2F1. Ces données suggèrent fortement l'existence d'une boucle d'emballement dans laquelle E2F1 stimule l'expression de EZH2 qui à son tour stimule l'activité transcriptionnelle de E2F1 afin de stimuler l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire et la synthèse de dNTP notamment RRM2, PTTG1 et PRC1, favorisant ainsi la progression des CCS.

comme trois cibles positives de EZH2. L'expression de ces trois gènes se trouve fortement corrélée à EZH2 mais aussi à E2F1 dans les trois cohortes de patients. Elle est significativement diminuée par l'invalidation de Ezh2 chez la souris et par le knock-down de EZH2 et/ou E2F1 dans les cellules H295R. RRM2 (Fang et al., 2015; Lewis et al., 2016)et PTTG1 (Zhou et al., 2009) avaient été décrits comme des cibles de E2F1 dans le cancer colorectal, pancréatique et de l'hypophyse. Nos analyses de ChIP avec des anticorps dirigés contre EZH2 et E2F1 ont démontré que ces deux gènes et PRC1 sont des cibles de E2F1 mais aussi de EZH2 dans le corticosurrénalome.

Afin de confirmer l'existence d'un effet indépendant de PRC2, nous pourrons également effectuer des expériences de ChIP dirigé contre H3K27me3, H3K4me3 et EED. Globalement, l'ensemble de ces expériences permet de valider un mécanisme original de régulation positive de l'expression génique par EZH2. La capacité de E2F1 à stimuler l'expression de EZH2 (Drelon et al., 2016b) suggère fortement l'existence d'une boucle d'emballement dans laquelle E2F1 stimule l'expression de EZH2 qui à son tour stimule l'activité transcriptionnelle de E2F1, afin de favoriser la progression du CCS (Figure 29).

iii. Implication de RRM2 dans la prolifération, l'apoptose, la migration et la clonogénicité des cellules H295R

Nos analyses montrent que l'expression de RRM2, PRC1 et PTTG1 est fortement corrélée à la survie globale et sans récidive et se trouve fortement augmentée dans les groupes de mauvais pronostic de CCS. PRC1/ASE1 est associée au fuseau mitotique et s'avère nécessaire pour l'assemblage de l'anneau contractile au moment de la cytokinèse (Jiang et al., 1998). Comme PRC1,

PTTG1 code une protéine impliquée dans la mitose, la sécurine, qui prévient la séparation des chromatides sœurs en inhibant la séparase (Smith et al., 2010). Il a été démontré que la sécurine réprime l'activité transcriptionnelle de p53 ainsi que son pouvoir apoptotique (Bernal et al., 2002). En plus, PTTG1 active la transcription de l'oncogène c-myc (Pei, 2001), un facteur de transcription impliqué dans la pathogénèse des CCS (Pei, 2001). Deux publications récentes ont mis en évidence la surexpression de PTTG1 (Demeure et al., 2013) et RRM2 (Grolmusz et al., 2016) dans les corticosurrénalomes. Toutefois, le rôle de ces deux facteurs dans la prolifération/survie cellulaire n'a pas été évalué.

Aucun inhibiteur pharmacologique n'étant disponible pour PRC1 et PTTG1, nous avons décidé de focaliser nos analyses sur RRM2. RRM2 est la sous-unité catalytique de la ribonucléotide réductase RR responsable de la conversion des ribonucléotides (NTP) en déoxyribonucléotides (dNTP). RR est un tétramère hétérodimérique constitué de deux sous-unités RRM1 et RRM2 codées par deux gènes localisés sur deux chromosomes différents (chromosome 11 et 2 respectivement). L'activité de RRM1 est généralement stable pendant tout le cycle cellulaire alors que celle de RRM2 s'accentue juste avant la phase S, afin de permettre une synthèse accrue de dNTP (Eriksson and Martin, 1981). L'unité additionnelle RRM2B (p53R2), induite par p53, peut se substituer à RRM2 pour une activité maximale du complexe RR (Dans les cas de réplication mitochondriale ou de réparation des dommages de l'ADN, par exemple) (Tanaka et al., 2000).

Nos résultats mettent en évidence un très fort effet sur la croissance des cellules H295R du GW8510, inhibiteur de RRM2, utilisé seul et qui est amplifié par le

mitotane (traitement de référence du CCS). Ces données sont encourageantes par rapport à d'autres combinaisons avec le mitotane. En effet, la combinaison du mitotane et de la gemcitabine inhibe leurs actions anti-tumorales sur les cellules H295R (Germano et al., 2014). Même si le GW8510 n'est pas spécifique de RRM2, puisqu'il inhibe également CDK2 (Johnson et al., 2005) , le knockdown de RRM2 avec des ARN interférents conduit aussi à une inhibition de la croissance cellulaire, confirmant le rôle de RRM2 dans ce phénomène. Le traitement des cellules H295R avec le GW8510 induit également une diminution de leur prolifération en milieu semi-liquide et diminue leurs capacités migratoires (en test de blessure et chambres de Boyden), un effet absent suite au traitement avec le mitotane. L'ensemble de ces expériences a permis pour la première fois de mettre en évidence le rôle de RRM2 dans le contrôle des caractéristiques agressives de cellules H295R. Ces résultats sont conformes aux effets anti-tumoraux résultant de l'inhibition de RRM2 dans le cancer du pancréas (Zheng et al., 2018), du col de l'utérus (Wang et al., 2018), du sein (Zhang et al., 2014), mais aussi dans le neuroblastome (Li et al., 2018b) et le glioblastome (Li et al., 2018a). Ces résultats mettent RRM2 en avant comme cible thérapeutique potentielle dans le CCS. Toutefois, le manque de spécificité du GW8510 ne permettra pas son ciblage chez les patients, dans l'immédiat.

iv. Implication de RRM2 dans la résistance aux traitements

Dans le cancer du pancréas, plusieurs études ont évalué le rôle potentiel du complexe RR dans la résistance à la gemcitabine (Farrell et al., 2016; Sierzega et al., 2017) où RRM1 et RRM2 présentaient des effets différentiels. En effet, l'excès de dNTP pourra être à la base de cette chimiorésistance : 1) L'excès de

dNTP produit par la RR inhibe l'activité de la deoxycytidine kinase, l'enzyme nécéssaire pour la phosphorylation de la gemcitabine, inhibant ainsi l'activation et l'incorporation de la gemcitabine dans les séquences d'ADN 2) les dNTP augmentant l'activité de la deoxycytidine déaminase, une enzyme qui dégrade la gemcitabine 3) les dNTP entrent en compétence avec la gemcitabine afin de s'incorporer dans les séquences d'ADN (Duxbury et al., 2004).

Dans le cancer de la corticosurrénale, Henning et al. ont révélé que l'expression de RRM1 ne présente pas d'association avec l'efficacité au traitement à la gemcitabine (Henning et al., 2017). Cette résistance pourra être due à l'activité de RRM2 qui est surexprimée suite à ce traitement (Grolmusz et al., 2016). RRM2 pourrait donc être un biomarqueur intéressent à évaluer dans la résistance des CCS aux chimiothérapies.

Il est également intéressant de noter que la surexpression de RRM1 chez les patients atteints de CCS diminue la réponse au mitotane (Volante et al., 2012). Cette résistance pourrait être due à l'interaction de RRM1 avec les métabolites du mitotane, notamment l'o,p'DDE (1,1-(o,pdichlorodiphenyl)-2,2 dichloroethene) dans les cellules SW13 (Germano et al., 2015). Le rôle potentiel de RRM2 dans ces phénomènes n'a pas encore été évalué. Nos résultats suggèrent qu'il pourrait jouer un rôle dans la résistance aux traitements du CCS.

v. Rôle de RRM2 dans la croissance tumorale et évaluation de l'effet curatif des molécules inhibant RRM2 *in vivo*

Afin de compléter nos analyses *in vitro* et de proposer un ciblage pré-clinique, le rôle de RRM2 dans le contrôle de la prolifération et de l'apoptose sera également évalué *in vivo*. Pour cela, nous utiliserons un modèle de xénogreffes de

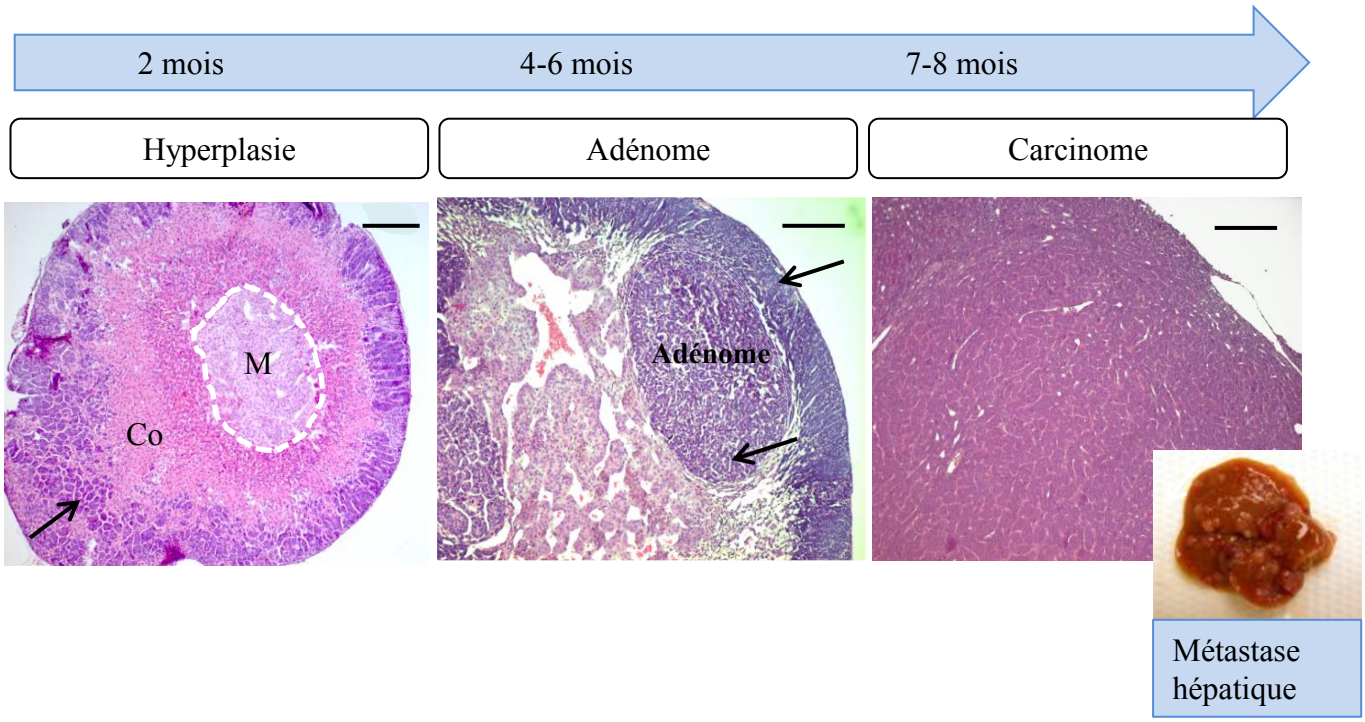


Figure 30: Tumorigenèse cortico-surrénalienne dans les souris AdTag**.**
L'expression de l'AgT dans la cortico-surrénale induit le développement de carcinomes. La formation de ces CCS est progressive avec une hyperplasie à 2 mois, puis l'apparition d'adénomes à 4-6 mois et enfin des CCS avec présence de métastases hépatiques et pulmonaires. Co : Cortex ; M : Medulla; barre d'échelle = 200µm. La médulla est délimitée par la zone pointillé. Les flèches noires désignent des cellules tumorales.

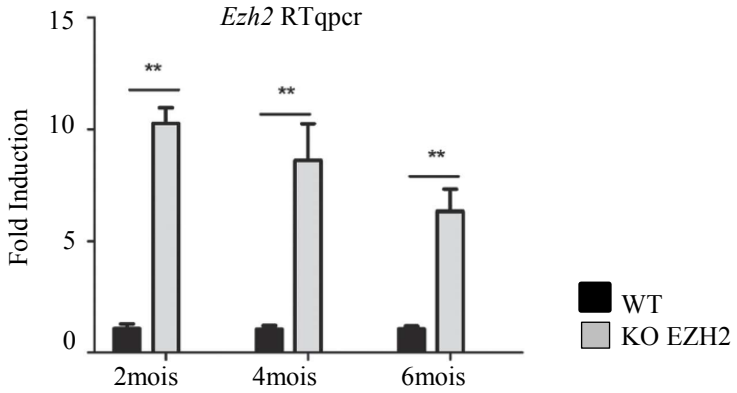


Figure 31 : Surexpression de *Ezh2* dans les surrénales des souris AdTag.
Quantification relative de l'expression de *Ezh2* par RTqPCR dans les surrénales des souris AdTag et contrôles de 2, 4 et 6 mois. Le graphique représente la quantité relative d'ARNm chez 5 souris AdTag par rapport à 5 souris contrôles. Mann-Whitney test **p ≤0.01. *D'après M Batisse-Ligner et al., 2017*

cellules H295R dans des souris immunodéficientes. L'activité de RRM2 pourra être inhibée grâce à des injections intra-péritonéales de GW8510. Toutefois, à notre connaissance, ce composé n'a pas encore été utilisé *in vivo.* Le traitement pourrait donc s'avérer difficile à mettre en œuvre. Dans ce contexte, on pourrait donc utiliser une construction transfectée stablement et permettant l'expression de ShRNAs dirigés contre RRM2 et inductible par le tamoxifène. Ces modèles nous permettront d'évaluer le rôle de RRM2 dans la croissance de cellules tumorales humaines. Cependant, ces expériences reposent sur une seule lignée cellulaire et le site d'implantation des cellules ne reproduit pas fidèlement le micro-environnement tumoral de la corticosurrénale. Ainsi, afin de valider l'effet curatif des molécules inhibant RRM2, cette expérience pourra être conduite dans un modèle murin de CCS. Nous disposons au laboratoire des souris exprimant l'antigène T (les souris AdTag) (Figure 30), qui sont à ce jour le seul modèle murin de CCS métastatiques. Ces souris transgéniques expriment l'antigène T de SV40 spécifiquement dans le cortex surrénalien, grâce aux régions régulatrices de *Akr1b7* (Ragazzon et al., 2006). Cet antigène, en inhibant p53 et Rb provoque le développement progressif de CCS qui forment des métastases pulmonaires et hépatiques à partir de 6 à 8 mois (Batisse-Lignier et al., 2017). Ce modèle présente l'intérêt de surexprimer EZH2 dès les stades précoces de la tumorigenèse. Il est donc un bon modèle pour évaluer l'implication de RRM2, cible positive de EZH2 (Figure 31), dans la progression tumorale et tester l'effet curatif de l'inhibition de RRM2, dans un contexte tumoral plus proche des CCS humains. L'ensemble de ces expériences permettra de valider l'implication de

le développement de CCS et de proposer son ciblage thérapeutique avec des molécules pharmacologiques quand celles-ci seront disponibles.

II. NOV/CCN3, une cible négative de EZH2 et SF1 dans le CCS

De nombreuses études soulignent le rôle du récepteur nucléaire SF1 dans la physiologie du cortex de la corticosurrénale. Son importance s'étend à la tumorigénèse où des fortes expressions de ce facteur de transcription ont été détectées dans les carcinomes corticosurrénaliens adultes ainsi que pédiatriques (Doghman et al., 2007a, 2010). Dans ces tumeurs infantiles, les études ont montré également une régulation génétique dose-dépendante orchestrée par SF1. Un des gènes les plus sous-exprimés en réponse à une surexpression de SF1 est le facteur pro-apoptotique NOV/CCN3. Des études de transfections transitoires et de ChIP ont montré que NOV était une cible négative directe du récepteur nucléaire SF1, normalement considéré comme un activateur transcriptionnel (Doghman et al., 2007b). De fait, le mécanisme moléculaire expliquant la régulation négative de l'expression NOV par SF1 n'avait pas été élucidé.

EZH2 étant capable d'interagir avec AR - un autre récepteur nucléaire - afin d'inhiber l'expression de NOV dans les cellules de cancer prostatique (Wu et al., 2014a), nous avons émis l'hypothèse que EZH2 pourrait réguler négativement l'expression de NOV dans les cellules de CCS, en coopération avec SF1. Conformément à cette hypothèse, l'expression de NOV est diminuée et négativement corrélée à EZH2 dans les CCS, par rapport aux surrénales saines et aux adénomes des cohortes Cochin et Michigan. Cette observation s'étend également aux CCS de l'enfant (Pinto et al., 2015) dans lesquels NOV avait été initialement identifié. Par une combinaison de KD et d'inhibition

pharmacologique, nous avons montré que EZH2 contrôlait négativement l'expression de NOV/CCN3 et qu'il était requis pour permettre sa répression par SF1 dans des cellules H295TR-SF1 portant une construction stable, permettant la surexpression de SF1 en réponse à la doxycycline (système TET-ON). Nous avons complété ces approches en réalisant le KD seul et combiné de SF1 et EZH2 dans les cellules H295R natives qu'on a transfectées avec deux siRNAs distincts ciblant chacun de ces acteurs où l'expression de NOV/CCN3 subit une surexpression en RTqPCR. Le caractère transcriptionnel de l'inhibition de NOV/CCN3 par EZH2 a été confirmé par l'induction de constructions rapportrices des régions régulatrices de NOV/CCN3, en réponse au KD ou à l'inhibition pharmacologique de EZH2. Même si ces expériences devront être confirmées par la surexpression de EZH2 et de SF1 en transfection, ces données suggèrent une interaction fonctionnelle de SF1 et EZH2 sur le promoteur de NOV. Cette hypothèse est confirmée par le recrutement accru de EZH2 sur le promoteur et l'enhancer de Nov en réponse à la surexpression de SF1 dans les cellules H295TR-SF1. Ces expériences préliminaires de ChIP devront toutefois être répétées. Il nous faudra également déterminer la région du promoteur cible de cette interaction, les deux délétions utilisées répondant de manière similaire à l'inhibition de EZH2 (d'autres délétions des régions régulatrices sont disponibles). L'ensemble de ces expériences suggère l'existence d'une interaction fonctionnelle de EZH2 et SF1 sur le promoteur de NOV, afin de réprimer son activité.

Ces expériences seront complétées par l'immunoprécipitation de SF1, mais aussi de la marque répressive H3K27me3, de la marque activatrice H3K4me3 et

de EED, partenaire indispensable de EZH2 au sein du complexe PRC2. En fonction des régions régulatrices identifiées par les approches de transfections décrites ci-dessus, nous évaluerons l'enrichissement de ces différents acteurs sur les zones potentiellement ciblées du promoteur. Enfin, nous évaluerons l'existence d'une interaction physique entre SF1 et EZH2 par immunoprécipitation après transfection de cellules H295R avec des vecteurs codant des versions étiquetées de SF1 et EZH2 (disponibles au laboratoire).

L'ensemble de ces expériences permettra de mettre en évidence l'interaction de SF1 et EZH2/PRC2 directement sur les régions régulatrices de NOV. Nous évaluerons le caractère plus universel de ces interactions en effectuant des analyses bioinformatiques en croisant les données de ChIPsequencing disponibles pour SF1, EZH2 et H3K27me3, dans différents modèles.

III. Rôle potentiel de NRSF/REST dans l'interaction EZH2/SF1

D'une manière intéressante, une interaction fonctionnelle entre SF1 et le facteur de transcription NRSF/REST a été révélée dans les cellules H295R afin de réguler négativement l'expression génique (Doghman et al., 2013). Le facteur de transcription NRSF/REST (Neuron-Restrictive Silencer Factor/ RE1-Silencing Transcription Factor) lie la séquence NRSE (Neuron-Restrictive Silencer Element), une séquence d'ADN qui réprime la transcription des gènes neuronales dans les cellules non neurales (Chong et al., 1995; Schoenherr and Anderson, 1995). Dans les cellules H295R/TR-SF1, la séquence de liaison de NRSF/REST était toujours significativement enrichie dans les sites chromatiniens de liaison de SF1 dans différentes conditions de dosage de SF1 (Niveau basal de SF1 ainsi

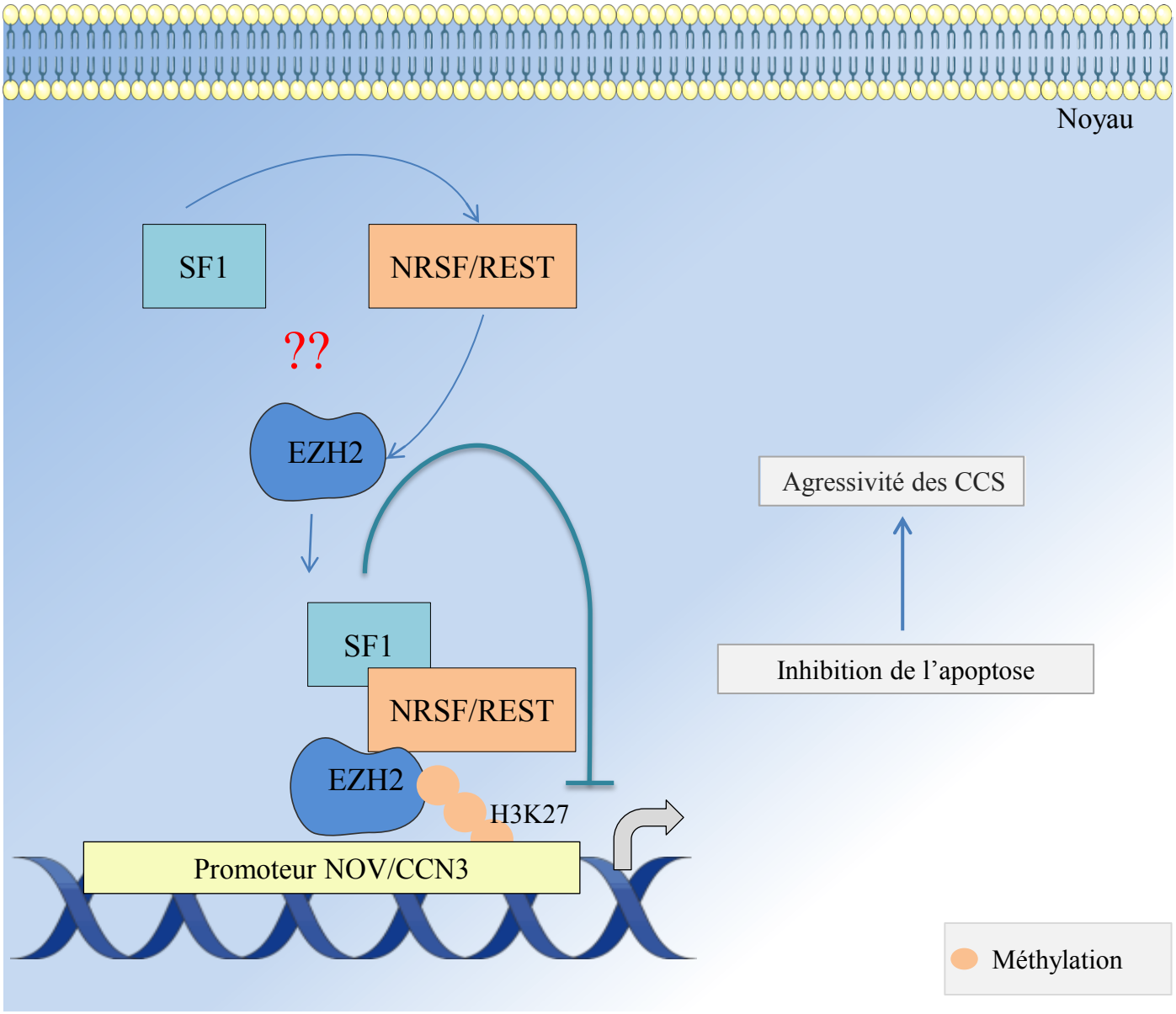


Figure 32: Interaction SF1/NRSF/EZH2 et répression génique dans les CCS.
une interaction fonctionnelle entre SF1 et le facteur de transcription NRSF/REST existe dans les cellules H295R afin de réguler négativement l'expression génique (Doghman et al., 2013). NRSF/REST, à son tour, recruterait EZH2 au niveau des promoteurs des gènes cibles notamment le facteur pro-apoptotique NOV/CCN3. EZH2, à son tour, déposerait la marque répressive H3K27me3, inhibant ainsi la transcription génique. L'apoptose inhibie, en association avec la division anarchique des cellules suite à la dérégulation de gènes impliqués dans le cycle cellulaire, conduit à l'agressivité des tumeurs du cortex surrénalien.

que sa surexpression). L'enrichissement de NRSF/REST sur ses sites est spécifique des gènes régulés négativement par SF1.

Dans les cellules souches embryonnaires de souris, des études ont montré que les motifs REST recrutent les complexes de répression PRC1 et PRC2 notamment en interagissant avec SUZ12 et EZH2 du complexe PRC2 (Dietrich et al., 2012). L'ensemble de ces données est en cohérence avec les nôtres et suggère que la répression génique médiée par SF1 pourrait être due à son interaction avec NRSF/REST qui, à son tour, recruterait EZH2 au niveau des promoteurs des gènes cibles. EZH2, à son tour, déposerai la marque répressive H3K27me3, inhibant ainsi la transcription génique (Figure 32). Afin d'étayer cette hypothèse, on pourrait envisager de réaliser des co-IP afin de montrer l'interaction de EZH2 avec les protéines REST dans les cellules H295R. Ces expériences pourraient être complétées par des analyses d'immunoprécipitation de chromatine et de ChIP et re-ChIP pour l'un et l'autre des facteurs. Enfin, on pourrait effectuer le knock-down du facteur REST dans les cellules H295R/TR-SF1 et évaluer ensuite l'enrichissement de EZH2 sur le promoteur de NOV après induction de SF1.

i. Rôle de NOV dans l'apoptose induite par l'inhibition de EZH2 dans les CCS

n effet, NOV, décrit dans plusieurs types de cancers, contrôle les propriétés oncogéniques selon le type cellulaire. Dans les tumeurs du sein et de la prostate, il inhibe la croissance cellulaire et la capacités aggressives des tumeurs conduisant aux métastases (Wu et al., 2014b). Ces résultats sont consistants avec les effets observés dans les cellules H295R de CCS humain où l'inhibition de NOV par un anticorps bloquant (Chen et al., 2013a) est capable de renverser partiellement l'apoptose induite par le KD de EZH2.

L'ensemble de ces résultats suggère une coopération entre SF1 et EZH2 pour réprimer l'expression de NOV et prévenir l'apoptose induite par ce facteur dans le CCS.

NOV/CCN3 appartient à la famille CCN de protéines impliqués dans des processus cellulaires divers tels que la division cellulaire, l'apoptose, l'adhésion et la motilité (Chen and Lau, 2009; Perbal, 2004). Différents groupes de recherche se sont intéressé aux rôles de NOV/CCN3 dans la tumorigénèse. La surexpression de NOV, observée dans le cancer du col de l'utérus, était associée à un mauvais pronostic (Zhang et al., 2013). Dans les cellules des tumeurs d'Ewing, NOV augmentait les capacités migratoires et invasives des cellules. En effet, les cellules exprimant NOV, présentaient une vitesse de migration 3 à 4 fois plus grande que les cellules parentales en chambres de Boyden (Benini et al., 2005). Des conclusions similaires ont été évoquées dans le cas des ostésarcomes. En effet, Perbal et al. ont montré que la surexpression de NOV dans les ostésarcomes est significativement corrélée à un pronostic défavorable, soulignant l'intérêt de l'évaluation du niveau d'expression de CCN3 au moment du diagnostic qui pourra présenter un outil moléculaire utile de pronostic (Perbal et al., 2008).

En revanche, l'expression de NOV dans d'autres cancers présentait des effets opposés. Dans les tumeurs gliales, une interaction de NOV avec la connexine43 a été démontrée. Cette interaction est à la base d'une diminution du taux de croissance cellulaire (Gupta et al., 2001; Sin et al., 2008). Au niveau des mélanomes, des expériences *in vitro* ont montré la capacité de NOV à diminuer la transcription et l'activation des métalloprotéinases inhibant ainsi le pouvoir invasif des cellules (Fukunaga-Kalabis et al., 2008). La transfection des

mélanocytes avec des adénovirus exprimant CCN3 conduisait à un arrêt de la prolifération sans induction de l'apoptose. Malgré son potentiel à induire les capacités agressives des cellules des tumeurs d'Ewing, l'expression ectopique de NOV dans ces cellules présente des effets inhibiteurs de la croissance par induction de l'apoptose (Benini et al., 2005; Lin et al., 2003).

Ces résultats montrent que NOV pourra avoir des multiples fonctions dépendantes du type cellulaire et du contexte. Dans le corticosurrénalome, les données de Doghman et al. montrent un effet pro-apoptotique de NOV (Doghman et al., 2007b). Nous avons récemment montré que l'inhibition de EZH2 avec le DZNep induit l'apoptose (Drelon et al., 2016b). EZH2 étant capable d'inhiber l'expression de NOV, nous avons voulu évaluer la contribution de NOV aux effets inhibiteurs de croissance de l'inactivation de EZH2. Nos résultats préliminaires suggèrent que l'incubation de cellules H295R avec un anticorps bloquant NOV (Chen et al., 2013b) pourrait renverser partiellement l'effet du KD de EZH2 sur la croissance cellulaire des cellules H295R et altère l'expression des gènes pro-aoptotiques (BCL2, BCL-XL et Birc5). Nous voulons répéter ces expériences avec un deuxième anticorps bloquant de NOV et valider l'effet anti-apoptotique de ces anticorps en mesurant l'activité Caspase et en évaluant le marquage Annexine V en cytométrie en flux dans les différentes conditions. Ces expériences permettront de valider l'implication de modulations d'expression de NOV dans l'acquisition de caractéristiques agressives dans le CCS.

L'ensemble de ces données présente une piste pour des nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant à la fois SF1 et EZH2 afin de réactiver leurs gènes cibles.

IV. Conclusion

Le corticosurrénalome est un des cancers les plus agressifs avec un taux de survie à 5 ans inférieur à 15% pour les patients métastatiques au diagnostic (la moitié d'entre-eux). Malheureusement pour ces patients, le traitement par le mitotane seul ou en combinaison avec une chimiothérapie lourde (étoposide, doxorubicine, cisplatine) n'a que peu d'effet à long terme. Les altérations les plus fréquentes dans ce cancer conduisent à une surexpression de IGF2, une activation constitutive de la voie WNT/ß-caténine et/ou une inactivation de TP53/RB. Toutefois, nous avons montré que ces altérations ne sont pas suffisantes pour expliquer la progression maligne du CCS. Nous venons de montrer que l'histone méthyltransférase EZH2 est surexprimée et associée à l'agressivité du CCS. Bien que décrit comme un répresseur transcriptionnel agissant au travers du complexe PRC2, EZH2 est également capable de stimuler la transcription en interagissant avec des facteurs de transcription. Mes résultats ont mis en évidence le facteur pro-apoptotique NOV/CCN3 comme cible négative de EZH2. J'ai disséqué le mécanisme moléculaire original impliquant une interaction fonctionnelle entre EZH2 et SF1 afin de réprimer l'expression de NOV. Nous avons également montré l'implication de la répression de NOV par EZH2 dans la résistance des cellules de CCS à l'apoptose. Ces données permettront de mieux cerner les mécanismes impliqués dans la progression du CCS adulte mais aussi du CCS de l'enfant dans lequel l'inhibition de NOV par SF1 a été initialement mise en évidence.

Bien que EZH2 soit capable d'inhiber certains gènes clés de la progression du CCS, j'ai pu montrer que le mode d'action principal de EZH2 dans ces tumeurs

est d'activer la transcription génique au travers de E2F1. Dans ce contexte, j'ai identifié trois cibles potentielles de cette interaction, impliquées dans la synthèse d'ADN et la mitose. J'ai également pu confirmer le mode d'action originale de EZH2 au travers de E2F1 afin de stimuler l'expression génique dans le CCS en me focalisant sur le contrôle de l'expression de RRM2, sous-unité de la ribonucléotide réductase, essentielle pour la synthèse d'ADN. Mes résultats suggèrent que RRM2 pourrait être une cible thérapeutique pertinente dans le CCS. Globalement, ce projet permettra une meilleure compréhension des mécanismes à l'œuvre dans la progression du CCS et l'identification de cibles thérapeutiques potentielles, essentielles pour l'amélioration de la prise en charge des patients. La dissection des mécanismes moléculaires mobilisés par la surexpression de EZH2 pourrait avoir un impact dans de nombreux cancers, EZH2 étant dérégulé de manière quasi universelle dans ces pathologies.

V. Le dilemme toujours présent : EZH2 activateur ou inhibiteur de la progression des CCS ?

EZH2, initialement décrit comme une histone méthyl-transférase capable de réprimer la transcription génique en posant la marque chromatinienne H3K27me3 au sein du complexe PRC2, peut également agir comme activateur transcriptionnel en interagissant directement avec des facteurs de transcription tels que AR, STAT3 ou E2F1. Ce changement d'activité de EZH2 est dépendant de sa phosphorylation sur sa sérine 21 par des kinases telles que AKT (Wassef and Margueron, 2016). Des approches in vitro et in vivo ont permis de montrer que malgré une nette surexpression, EZH2 n'était pas capable de déposer efficacement la marque H3K27me3 dans les cellules fortement proliférives du

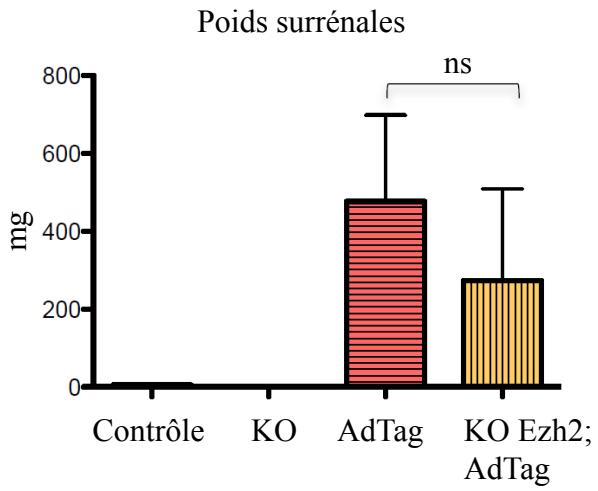


Figure 33 : Absence d'effet significatif de l'invalidation de *Ezh2* sur le poids des surrénales des souris AdTag.
Poids des glandes surrénales pesées individuellement après le sacrifice des animaux de 3 et 6 mois (Contrôle : n=11, KO Ezh2 : n=8, AdTag : n=16, KO Ezh2;AdTag : n=19).

cancer du sein, conduisant à une instabilité transcriptionnelle associée à la progression tumorale (Wassef et al., 2015a). Sa surexpression dans ces cas n'est pas nécessairement un oncogène. L'ensemble de ces données suggère donc que EZH2 peut agir suivant de multiples modalités en fonction du tissu et du stade de progression tumorale.

Afin d'évaluer la contribution de EZH2 à la progression du CCS *in vivo* et mieux coprendre son mode d'action, nous sommes en train de développer une lignée de cellules H295R invalidées pour *Ezh2* grâce à la technologie du Crispr/Cas9. Toujours dans le contexte d'analyses *in vivo*, nous avons développé dans l'équipe, un modèle de tumorigenèse surrénalienne agressive, le modèle AdTag. Dans ces tumeurs, on retrouve une surexpression de *Ezh2*, résultant de la dérépression de E2F1 suite à l'inhibition de p53/Rb (Batisse-Lignier et al., 2017; Drelon et al., 2016b). Cette surexpression est corrélée à une augmentation de la prolifération de ces tumeurs et pourrait donc jouer un rôle oncogénique. Afin de vérifier l'implication de EZH2 dans la progression des tumeurs corticosurrénaliennes des souris exprimant l'antigène T (les souris AdTag), Mickael Mathieu (étudiant en thèse dans l'équipe) a croisé ces souris avec les souris invalidées pour *Ezh2* grâce à la recombinase CRE sous contrôle des régions régulatrices de SF1, permettant une invalidation dès la formation de l'ébauche de surrénale. Bien qu'il y ait une tendance à une diminution du poids des surrénales des souris AdTAg invalidées pour *Ezh2*, la différence n'est pas significative (Figure 33). Ceci pourrait suggérer que Ezh2 ne participe pas au développement du CCS, malgré une forte surexpression dès les stades précoces de la tumorigenèse (Batisse-Lignier et al., 2017). Cependant, l'absence de

diminution significative de l'expression de *Ezh2* dans les KO Ezh2 ;AdTag par rapport aux AdTag seules, suggère que les cellules constituant les tumeurs des souris KO Ezh2;AdTag pourraient avoir échappé à la recombinaison. Si l'absence de recombinaison du locus Ezh2 est confirmée grâce au système rapporteur mTmG (Muzumdar et al., 2007), ceci indiquera que les cellules surexprimant Ezh2 présentent un avantage sélectif, cohérent avec sa fonction supposée d'oncogène. Dans le cas contraire, on pourra émettre l'hypothèse que Ezh2 ne joue pas un rôle moteur dans le processus de tumorigenèse dans la surrénale. Toutefois, l'ensemble de ces hypothèses devra être vérifié à l'aide d'une CRE inductible permettant la recombinaison tardive de EZH2 après les phases de développement de la surrénale. Une autre possibilité est également que les capacités fonctionnelles de Ezh2 soient dépassées malgré la surexpression observée. Ceci serait cohérent avec les observations dans le cancer du sein et de la prostate, mettant en évidence que ce dépassement de capacité répressive, caractérisé par une diminution globale de la marque H3K27me3, est associé à une instabilité transcriptionnelle (Wassef et al., 2015b). De fait, nos analyses préliminaires (non présentées) mettent en évidence une diminution globale de l'accumulation de la marque H3K27me3 dans les tumeurs avancées.

Ces approches génétiques pourront être complétées par des approches pharmacologiques grâce à des inhibiteurs spécifiques de Ezh2, tels que l'EPZ-6438 qui fait actuellement l'objet d'un essai clinique de phase 1 et 2 dans le lymphome et le sarcome (clinicaltrial.gov) ou le DS-3201b (Yamagishi and Uchimaru, 2017) qui cible à la fois EZH2 et EZH1, permettant de s'affranchir d'une possible redondance entre les deux méthyltransférases. L'ensemble de ces

expériences pourrait permettre de proposer une alternative thérapeutique dans le contexte du CCS, dont le pronostic demeure sombre.

Annexes

Article 2

PKA inhibits WNT signalling in adrenal cortex zonation and prevents malignant tumour developpement.

Nat. Commun. 7, 12751.

Drelon C, Berthon A, Sahut-Barnola I, Mathieu M, Dumontet T, Rodriguez S, Batisse-Ligner M, **Tabbal H**, Tauveron I, Lefrançois-Martinez A-M, Martinez A & Val P. (2016a)

nature COMMUNICATIONS

ARTICLE

Received 30 Jul 2015 | Accepted 28 Jul 2016 | Published 14 Sep 2016

DOI: 10.1038/ncomms12751 OPEN

PKA inhibits WNT signalling in adrenal cortex zonation and prevents malignant tumour development

Coralie Drelon[1], Annabel Berthon[1,2], Isabelle Sahut-Barnola[1], Mickaël Mathieu[1], Typhanie Dumontet[1], Stéphanie Rodriguez[1], Marie Batisse-Lignier[1,3], Houda Tabbal[1], Igor Tauveron[1,3], Anne-Marie Lefrançois-Martinez[1], Jean-Christophe Pointud[1], Celso E. Gomez-Sanchez[4,5], Seppo Vainio[6], Jingdong Shan[6], Sonia Sacco[7], Andreas Schedl[7], Constantine A. Stratakis[2], Antoine Martinez[1] & Pierre Val[1]

Adrenal cortex physiology relies on functional zonation, essential for production of aldosterone by outer zona glomerulosa (ZG) and glucocorticoids by inner zona fasciculata (ZF). The cortex undergoes constant cell renewal, involving recruitment of subcapsular progenitors to ZG fate and subsequent lineage conversion to ZF identity. Here we show that WNT4 is an important driver of WNT pathway activation and subsequent ZG differentiation and demonstrate that PKA activation prevents ZG differentiation through WNT4 repression and WNT pathway inhibition. This suggests that PKA activation in ZF is a key driver of WNT inhibition and lineage conversion. Furthermore, we provide evidence that constitutive PKA activation inhibits, whereas partial inactivation of PKA catalytic activity stimulates β-catenin-induced tumorigenesis. Together, both lower PKA activity and higher WNT pathway activity lead to poorer prognosis in adrenocortical carcinoma (ACC) patients. These observations suggest that PKA acts as a tumour suppressor in the adrenal cortex, through repression of WNT signalling.

[1] CNRS, UMR 6293, GReD, Inserm U1103, Clermont Université, F-63171 Aubière Cedex, France. [2] Developmental Endocrine Oncology and Genetics, Section on Genetics and Endocrinology, Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development, Bethesda, Maryland 20892-1103, USA. [3] Centre Hospitalier Universitaire, Service d'Endocrinologie, Faculté de Médecine, F-63000 Clermont-Ferrand, France. [4] Division of Endocrinology, G.V. (Sonny) Montgomery VA Medical Center, Jackson, Mississippi 39216, USA. [5] Department of Medicine-Endocrinology, University of Mississippi Medical Center, Jackson, Mississippi 39216, USA. [6] Biocenter Oulu, Laboratory of Developmental Biology, InfoTech Oulu, Center for cell Matrix Research, Faculty of Biochemistry and Molecular Medicine, University of Oulu, 90220 Oulu, Finland. [7] Inserm UMR1091, CNRS UMR 7277, Institute of Biology Valrose, F-06108 Nice, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to P.V. (email: pierre.val@univ-bpclermont.fr).

The adrenal cortex plays essential roles in body homeostasis through secretion of mineralocorticoids, essential for sodium and potassium homeostasis and glucocorticoids, which are involved in stress response, glucose homeostasis and immune suppression. The production of these two distinct classes of steroids is the result of functional adrenal cortex zonation in the perinatal period[1]. This corresponds to the formation of two concentric layers of differentiated cells within mouse adrenal cortex. The outermost zona glomerulosa (ZG) produces mineralocorticoids in response to Angiotensin II stimulation whereas the innermost zona fasciculata (ZF) synthesizes glucocorticoids in response to pituitary ACTH. Although the establishment and maintenance of functional zonation is essential for proper adrenal function, the molecular mechanisms involved in these processes remain unclear[2]. Postnatal adrenal cortex undergoes constant cell renewal. Recent lineage tracing studies have shown that adrenal cortex cell progenitors are recruited from capsular/subcapsular reservoirs through Shh/Gli1 signalling[3,4]. These cells migrate centripetally and contribute to both ZG and ZF renewal after differentiation. Interestingly, lineage-tracing experiments with the regulatory regions of *Cyp11b2* have shown that the preferred pathway for adrenal renewal involves initial differentiation to ZG and subsequent lineage conversion to ZF, along centripetal cell migration[4]. This suggests that cells receive positional cues leading them to sequentially differentiate as ZG and ZF cells along their migration. In the liver, spatial restriction of WNT signalling pathway activation plays an essential role in functional zonation[5]. In the adrenal cortex, WNT signalling activity is essentially restricted to ZG and we showed that loss of this restriction in genetic models results in ectopic ZG differentiation within ZF. *In vivo* and *in vitro*, β-catenin activation is also associated with upregulation of AT1R and CYP11B2, two key determinants of ZG identity[6,7]. These data strongly suggest that WNT/β-catenin is a master driver of ZG identity that has to be inhibited to allow lineage conversion from ZG to ZF.

Expression of MC2R, the receptor for ACTH and MRAP, an accessory protein essential to trigger cAMP/PKA signalling pathway activation is higher in ZF than in ZG[8] and MC2R has been shown to play an essential role in ZF differentiation[9]. Consistent with its role in the establishment of ZG identity β-catenin activation can repress expression of MC2R and of one of its ZF-specific targets, CYP11B1 (ref. 10).

In this paper, we postulated that reciprocally, cAMP/PKA signalling played a role in repressing WNT/β-catenin signalling to allow lineage conversion and functional adrenal cortex zonation. Indeed, by a combination of hormonal manipulations and genetic alterations, we show that PKA activation prevents ZG differentiation through WNT4 repression and WNT pathway inhibition. This suggests that PKA activation in ZF is a key driver of WNT inhibition and lineage conversion. We further demonstrate that PKA activation is able to restrain WNT-mediated malignant adrenal cortex tumorigenesis. These data suggest an all-encompassing role of PKA-dependent WNT signalling inhibition in adrenal homeostasis and disease.

Results

PKA activation inhibits WNT signalling and ZG differentiation. To evaluate a potential role of ACTH/cAMP signalling in repressing WNT/β-catenin pathway, we injected adult wild-type female mice with dexamethasone, a synthetic glucocorticoid alone for 5 days (subcutaneously twice daily, 75 μg per mouse) to block endogenous ACTH secretion or dexamethasone for 3 days, followed by ACTH for 2 days to evaluate the effect of exogenous ACTH administration (intramuscularly, Synacthene retard 1.2 U). As expected, the expression of *Akr1b7*, an ACTH/cAMP/PKA responsive ZF differentiation marker[11], was significantly reduced by dexamethasone and markedly induced by ACTH treatment (analysis of variance (ANOVA), Supplementary Fig. 1A). In contrast, reverse transcription quantitative PCR (RT–qPCR) analyses showed a significant decrease in the expression of both *Lef1* and *Axin2*, two canonical WNT target genes, in ACTH-treated animals (ANOVA, Fig. 1a). Conversely, *Axin2* expression was significantly increased in the animals treated with dexamethasone (ANOVA, Fig. 1a). *In situ* analysis of β-catenin expression showed no major differences between the three treatment groups (Fig. 1b, a–c). However, ACTH treatment resulted in a robust reduction of LEF1 expression, which was almost completely extinguished in the ZG of treated animals (Fig. 1b, f versus d). This was further confirmed by extinction of LacZ activity in the adrenals of TopGal WNT signalling reporter mice[12] that were treated for 3 days with ACTH (Supplementary Fig. 1B). Altogether these data suggested that ACTH treatment could result in inhibition of WNT signalling in the adrenal cortex. We then sought to determine the impact of ACTH on ZG differentiation by immuno-histochemistry. This showed decreased CYP11B2 expression (Fig. 1b, i versus g) and a concomitant expansion of the expression domain of the ZF marker AKR1B7 within ZG (Fig. 1b, l versus j and Supplementary Fig. 1C). Altogether, these observations showed that stimulation of ACTH signalling pathway antagonized WNT signalling within the adrenal cortex, which was correlated with inhibition of ZG and expansion of ZF differentiation in WT adrenals. However, these experiments relied on short-term treatments and were performed on tissues with already established zonation. ACTH signalling in the adrenal relies on cAMP production and stimulation of PKA. Therefore, to further establish a potential role of ACTH/PKA-mediated WNT inhibition in the establishment of adrenal cortex zonation, we devised a genetic model of developmental constitutive PKA activation. For this, mice bearing a floxed allele of *Prkar1a*[13] were mated with mice expressing Cre recombinase under the control of Sf1 regulatory regions, which allows recombination as early as E10.5 (ref. 14). Analysis of recombination with the mTmG reporter system[15] confirmed that Sf1 regulatory regions drove robust recombination throughout the adrenal cortex, including ZG as shown by co-expression of Cyp11b2 and GFP (Supplementary Fig. 1D). RT–qPCR analysis of *Prkar1a* mRNA accumulation showed robust downregulation in the adrenals of *Sf1:Cre;Prkar1aFl/Fl* mice compared with controls, which confirmed efficient inactivation of *Prkar1a* (Supplementary Fig. 1E). This was accompanied by upregulation of *Akr1b7* (Supplementary Fig. 1F) and *StAR* (Supplementary Fig. 1G) mRNA accumulation (two known targets of PKA) and centrifugal expansion of fetal-like 20αHSD-positive cells (Supplementary Fig. 1H,I). This was reminiscent of AdKO mice in which, *Prkar1a* inactivation was driven by *Akr1b7* regulatory regions[16] (These mice will be fully characterized in another report). We then evaluated WNT signalling by RT–qPCR. Consistent with the effect of ACTH stimulation, chronic activation of PKA signalling resulted in robust repression of *Axin2* and *Lef1* mRNA accumulation (Fig. 1c). This was confirmed by a marked decrease in β-catenin and LEF1 protein expression in the outer cortex of *Sf1:Cre;Prkar1aFl/Fl* mice compared with wild-type mice (Fig. 1d, a–d). Consistent with the hypothesis that PKA-mediated WNT inhibition resulted in deficient ZG differentiation, RT–qPCR showed a marked downregulation of *Cyp11b2* and Angiotensin II receptors *At1a/At1b* expression in *Sf1:Cre;Prkar1aFl/Fl* animals (Fig. 1e). This was confirmed *in situ* by an almost complete extinction of CYP11B2 expression (Fig. 1f, a,b) and expansion of AKR1B7 towards the

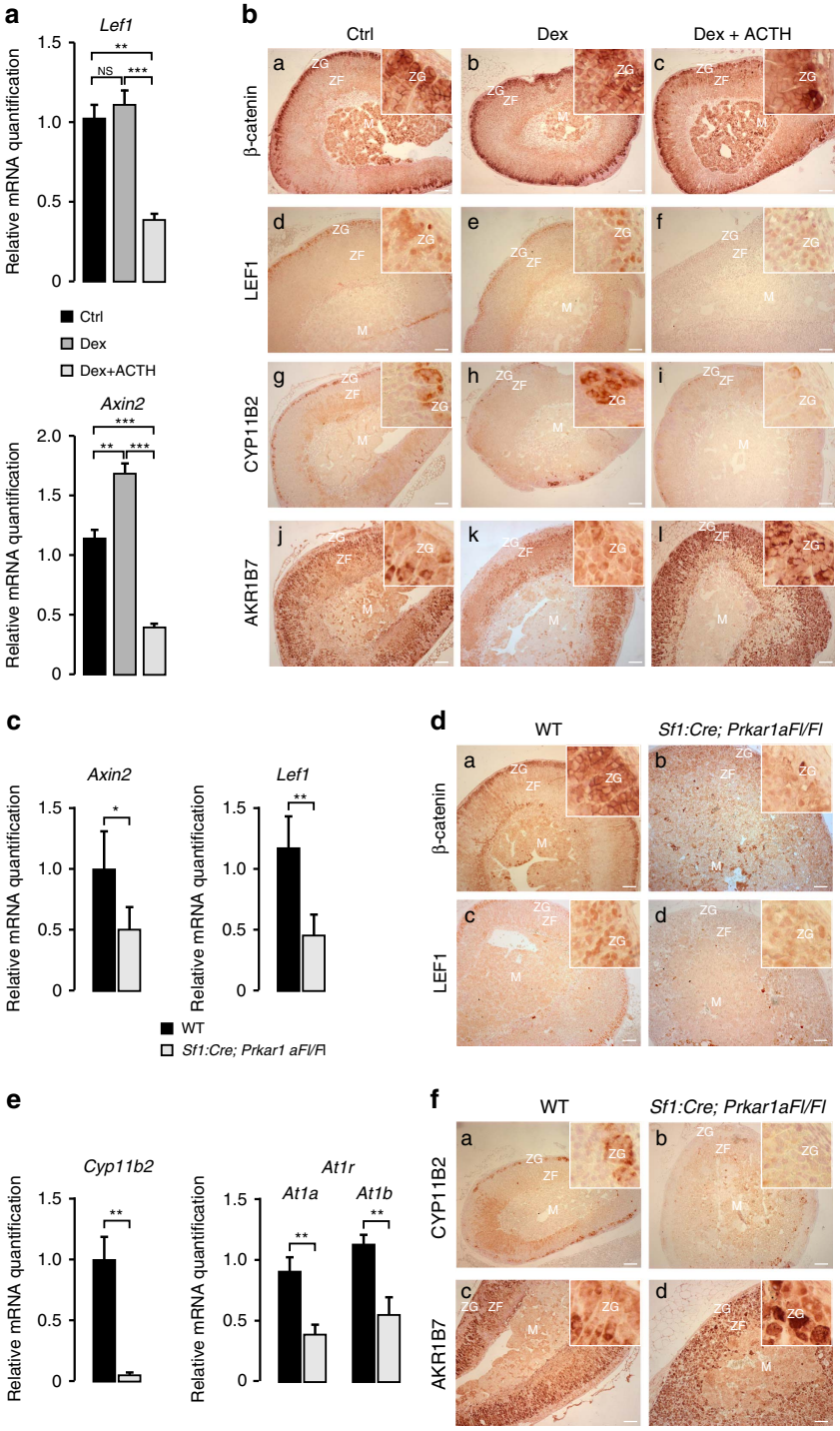


Figure 1 | Antagonistic effects of PKA on WNT signalling and ZG differentiation. (**a**) ACTH treatment inhibits WNT target genes expression in the adrenal gland. Wild-type C57/Bl6 mice were treated for 5 days with vehicle (Ctrl) or Dexamethasone (Dex) or for 3 days with dexamethasone followed by 2 days of Synacthene retard (Dex + ACTH). *Lef1* and *Axin2* expression levels were then analysed by RT–qPCR on mRNAs extracted from the adrenals. Bars represent mean expression in four animals per group ± s.e.m. (**b**) WNT pathway and ZG differentiation are inhibited by ACTH treatment. Expression of β-catenin, LEF1 (WNT pathway), AKR1B7 (ZF) and CYP11B2 (ZG) was analysed by immunohistochemistry in the adrenals from the same animal groups as in **a**. (**c**) Constitutive activation of PKA signalling inhibits WNT target genes expression in the adrenal gland. *Axin2* and *Lef1* expression levels were analysed by RT–qPCR on mRNAs extracted from wild-type and *Sf1:Cre;Prkar1aFl/Fl* adrenals. (**d**) Constitutive activation of PKA signalling inhibits β-catenin and LEF1 accumulation in ZG. Expression of β-catenin and LEF1 was analysed by immunohistochemistry in the adrenals from wild-type and *Sf1:Cre;Prkar1aFl/Fl* adrenals. (**e**) ZG differentiation is inhibited by constitutive PKA signalling. *Cyp11b2* and angiotensin II receptor *AT1R* isoforms a and b expression levels were analysed by RT–qPCR on mRNAs extracted from wild-type and *Sf1:Cre;Prkar1aFl/Fl* adrenals. (**f**) Constitutive PKA signalling promotes ZF differentiation at the expense of ZG. Expression of CYP11B2 and AKR1B7 was analysed by immunohistochemistry in the adrenals from wild-type and *Sf1:Cre;Prkar1aFl/Fl* adrenals. In **c**,**e**, bars represent mean expression in six animals per group ± s.e.m. Statistical analyses were conducted by one-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test (**a**) or by Student's *t*-test (**c**,**e**). $^{*}P<0.05$; $^{**}P<0.005$; $^{***}P<0.0005$; NS, not significant. In all the images, insets are focused on ZG. Scale bars, 100 μm. M, medulla; ZG, zona glomerulosa; ZF, zona fasciculata.

presumptive ZG (Fig. 1f, c,d and Supplementary Fig. 1J), which was consistent with increased *Akr1b7* mRNA accumulation (Supplementary Fig. 1F). In line with the *in situ* phenotype, intra-adrenal aldosterone levels were significantly decreased in *Sf1:Cre;Prkar1a Fl/Fl* animals (*t*-test, Supplementary Fig. 1K). We thus concluded that chronic constitutive activation of PKA throughout the adrenal cortex resulted in WNT signalling repression and expansion of ZF at the expense of ZG.

PKA activation induces inactivating β-catenin phosphorylation. In contrast with our data, previously published studies suggested that PKA signalling pathway activation was associated with WNT pathway activation in a number of cell types and tissues[17–20]. We thus wanted to identify the molecular mechanisms involved in this unexpected inhibitory interaction in the adrenal cortex. As a first approach, we used H295R human adrenocortical cell lines and COS7 cells, in which WNT pathway responds positively to PKA stimulation[18]. As expected, the treatment of H295R cells with Forskolin, a potent stimulator of adenylate cyclase, resulted in increased *StAR* expression (Supplementary Fig. 2A). Consistent with our *in vivo* data, Forskolin treatment repressed *Axin2* expression in H295R cells (Fig. 2a). In contrast, a similar treatment resulted in *Axin2* induction in COS7 cells (Fig. 2b). Data from the literature suggest that PKA can activate β-catenin by direct phosphorylation on serine residues 552 and 675, which induces its nuclear localization and transcriptional activity. PKA can also indirectly stimulate β-catenin accumulation by phosphorylating GSK3β serine 9, which results in its inactivation[17–20]. As expected, pS552 was rapidly increased in response to Forskolin treatment in COS7 cells (Fig. 2c, Supplementary Fig. 2B). This was associated with a transient increase in accumulation of active dephospho-β-catenin (ABC, Fig. 2c, Supplementary Fig. 2D). However, we did not observe significant induction of activating β-catenin serine 675 phosphorylation or of inactivating GSK3β serine 9 phosphorylation (ANOVA, Fig. 2c, Supplementary Fig. 2C,G). Consistent with the activated status of the pathway, phosphorylation of the residues that target β-catenin for proteasomal degradation (S33/S37/S45/T41) was not increased in response to Forskolin (Fig. 2c, Supplementary Fig. 2E,F). In H295R cells, Forskolin also induced phosphorylation of S552 as efficiently as in COS7 cells (Fig. 2c, Supplementary Fig. 2I). However, this was also associated with a robust increase in inactivating pT41/S45 (Fig. 2c, Supplementary Fig. 2L) even though pS33/S37/T41 phosphorylation was not altered (Fig. 2c,

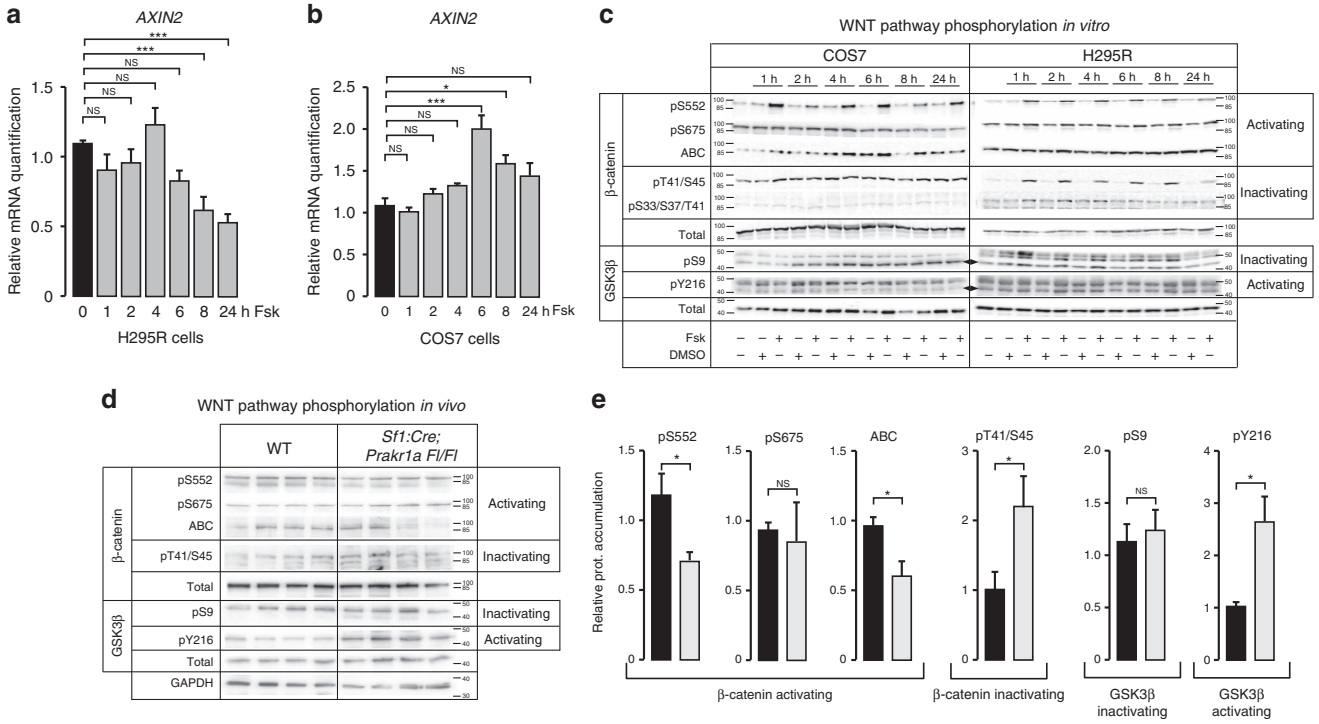


Figure 2 | Effect of PKA activation on downstream WNT pathway phosphorylation. (**a**) Forskolin represses *AXIN2* expression in human adrenocortical H295R cells. Human H295R cells were treated with either vehicle (0, DMSO) or Forskolin 10^{-5} M (Fsk) for 1 to 24 h and *AXIN2* expression was analysed by RT–qPCR. Bars represent mean expression in at least three independent experiments (in triplicate) ± s.e.m. Statistical analyses were performed by one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test. (**b**) Forskolin activates *AXIN2* expression in COS7 cells. COS7 cells were treated with Forskolin for 1 to 24 h and *AXIN2* expression was analysed as described in **a**. (**c**) Differential phosphorylation of β-catenin and GSK3β in COS7 and H295R cells. COS7 and H295R cells were treated as in **a**. Proteins were extracted and subjected to western blot analysis with antibodies to phospho/dephospho-β-catenin, phospho-GSK3β or the corresponding total proteins. β-catenin phosphorylations/dephosphorylations were sorted as activating (pS552, pS675, active beta-catenin) and inactivating (pT41/S45 and pS33/S37/T41). GSK3β serine 9 phosphorylation (pS9) results in its inactivation. GSK3β tyrosine 216 phosphorylation (pY216) results in its activation. Phospho-GSK3 antibodies recognize phospho-GSK3β arrowheads, and phospho-GSK3α (top band) (**d**) Phosphorylation of β-catenin and GSK3β in response to constitutive PKA activation *in vivo*. Activating and inactivating phosphorylations of β-catenin and Gsk3β were analysed in adrenal protein extracts from four wild-type and 4 *Sf1:Cre;Prkar1Fl/Fl* mice as described in **c**. (**e**) Constitutive activation of PKA inhibits activating phosphorylations and stimulates inactivating phosphorylations *in vivo*. Graphs show pooled quantification of phospho-specific signals in **d** and Supplementary Fig. 3, representing a total of nine wild-type and nine *Sf1:Cre;Prkar1aFl/Fl* mice. These were normalized to quantification of total corresponding proteins. Statistical analyses were performed with Student's *t*-test. $^{*}P<0.05$; $^{***}P<0.0005$; NS, not significant.

Supplementary Fig. 2M). Consistent with this, there was also no accumulation of the active ABC β-catenin in response to Forskolin in H295R cells (Fig. 2c, Supplementary Fig. 2K). Analysis of activating GSK3β tyrosine 216 phosphorylation, showed no effect of Forskolin in both cell lines (Fig. 2c, Supplementary Fig. 2H,O). Although pS33/S37/T41 β-catenin was not detectable *in vivo* (not shown), these *in vitro* findings were further confirmed by a significant increase in pT41/S45 β-catenin accumulation in the adrenals of *Sf1:Cre;Prkar1aFl/Fl* mice compared with their wild-type littermates (*t*-test, Fig. 2d,e, Supplementary Fig. 3), which was associated with a concomitant decrease in pS552 activating phosphorylation (Fig. 2d,e, Supplementary Fig. 3) and of active ABC β-catenin accumulation (Fig. 2d,e, Supplementary Fig. 3). In contrast, inactivating GSK3β S9 phosphorylation was not altered in response to *Prkar1a* inactivation (Fig. 2d,e, Supplementary Fig. 3). However, there was a significant increase in activating GSK3β tyrosine 216 phosphorylation[21], which could account for increased inactivating β-catenin T41/S45 phosphorylation (*t*-test, Fig. 2d,e, Supplementary Fig. 3). We thus concluded that in contrast with observations in COS7 cells, PKA stimulation was associated with an increase in inactivating and a decrease in activating β-catenin phosphorylation in adrenocortical cells *in vivo*.

Deregulation of WNT pathway regulators upon PKA activation. To further gain insight into the underpinnings of these phenomena, we conducted a comparative microarray analysis of gene expression in four wild-type and four *Sf1:Cre;Prkar1aFl/Fl* adrenals. Five hundred and five genes were found downregulated and 713 genes were found upregulated in response to *Prkar1a* gene inactivation (Fig. 3a and Supplementary Data 2). Consistent with inhibition of ZG differentiation in this model, a number of ZG markers such as *Cyp11b2, Agtr1b*, *Nr0b1*, *Nr4a3*, *Atp2b3*, *Vsnl1* and *Dab2* were among the most significantly downregulated genes in knockout adrenals compared with wild-type (adjusted *t*-test, Fig. 3a, right panel). To gain insight into WNT pathway regulation, we extracted expression levels of a list of 127 WNT targets and regulators (Supplementary Data 1). Fifteen of these 127 genes were significantly deregulated (adjusted *t*-test, adjusted P value <0.05) in knockout compared with wild-type adrenals (Fig. 3b), which was confirmed by RT–qPCR conducted on six independent WT and six knockout samples (Supplementary Fig. 4A,B). Consistent with our findings (Fig. 1), this unbiased analysis showed downregulation of WNT target genes *Lef1* and *Axin2*, but also of *Dab2* (ref. 22), *Rnf43* and *Znrf3* (ref. 23). We then evaluated which of these genes could account for decreased WNT signalling in response to PKA stimulation. The two most upregulated genes—*Ndrg1* and *Cdc73*—encode potential repressors of WNT signalling. NDRG1 is a metastasis suppressor that induces localization of dephosphorylated β-catenin at the plasma membrane and inhibits β-catenin nuclear translocation by reducing nuclear localization of PAK4 (ref. 24). *Cdc73* encodes parafibromin, a tumour suppressor that has been shown to work either as a WNT pathway activator[25] or repressor depending on its phosphorylation status[26]. Immunohistochemical analysis showed expression of NDRG1 in the adrenal capsule and ZG in wild-type mice (Fig. 3c,a and Supplementary Fig. 5A). Consistent with micro-array data, there was increased expression of NDRG1 in *Sf1:Cre;Prkar1aFl/Fl* adrenals (Fig. 3c,b). However, the increase was mostly restricted to ZF, suggesting that it was unlikely to account for WNT pathway repression within ZG. Interestingly, although CDC73 was mostly accumulated in the nucleus of ZF cells in wild-type adrenals (Fig. 3c,c and Supplementary Fig. 5A), its expression domain expanded within the presumptive ZG in *Sf1:Cre; Prkar1a Fl/Fl* adrenals (Fig. 3c,d). This suggested that CDC73 could participate in PKA-mediated WNT pathway repression. Consistent with this idea, there was a significant negative correlation between *Cdc73* and *Lef1* or *Axin2* expression levels in RT–qPCR experiments (Pearson's correlation, Supplementary Fig. 4C). *FrzB*, the most downregulated gene in our analysis (Fig. 3b), encodes the WNT signalling repressor SFRP3. It is thus unlikely to be responsible for WNT pathway repression in response to PKA activation. However, there was also marked downregulation of the WNT ligand *Wnt4* (Fig. 3b). Mice with constitutive *Wnt4* inactivation have decreased *Cyp11b2* expression and plasma aldosterone concentrations at birth[27]. Conversely, WNT4 overexpression in human adrenocortical cell lines induces CYP11B2 expression and aldosterone production[28]. This suggested that WNT4 could be one of the drivers of WNT pathway activation in the adrenal cortex and of subsequent ZG differentiation. Immunohistochemical analysis showed WNT4 expression within ZG in wild-type adrenals, which was almost completely extinguished in *Sf1:Cre;Prkar1aFl/Fl* mice (Fig. 3c, f versus e and Supplementary Fig. 5A). Consistent with our microarray data, RT–qPCR analysis of *Wnt4* expression showed a marked inhibition in mice with genetic ablation of *Prkar1a* (Fig. 3d and Supplementary Fig. 4A,B) and in wild-type mice in response to ACTH treatment following dexamethasone inhibition of endogenous ACTH secretion (Fig. 3e). This suggested that decreased *Wnt4* expression could account for decreased WNT signalling in response to PKA stimulation. In support for this hypothesis, *Wnt4* and *Axin2* expression levels were significantly correlated in both models (Pearson's correlation, Supplementary Fig. 4C and Supplementary Fig. 5B,C). To rule out a possible reduction in the number of WNT4 expressing cells in animal models in response to long-term PKA stimulation, we performed a single injection of ACTH (Synacthene retard) and analysed WNT4 expression 24 h later. This also showed a robust decrease in WNT4 protein (Fig. 3f, b versus a) and mRNA accumulation (Supplementary Fig. 5D). Consistent with a rapid effect of PKA signalling on WNT4 expression, *WNT4* mRNA accumulation was also significantly reduced after 8 h Forskolin treatment in H295R cells (ANOVA, Fig. 4a), which was correlated with *AXIN2* expression (Fig. 4b). Conversely, treatment with H89, a pharmacological PKA inhibitor, induced a modest increase in basal *WNT4* expression and prevented inhibition of *WNT4* expression by Forskolin treatment (Supplementary Fig. 5E). The potential role of *WNT4* repression in mediating the inhibitory effect of PKA on WNT signalling was further suggested by the observation that transfection of a plasmid encoding WNT4, counteracted the inhibitory effect of Forskolin stimulation on *AXIN2* expression in H295R cells (Fig. 4c).

WNT4 repression is involved in WNT pathway inhibition by PKA. Altogether, these experiments suggested that WNT4 played an important role in WNT pathway stimulation in the adrenal cortex and that PKA-mediated WNT signalling repression may partly rely on WNT4 repression. To further confirm these hypotheses, we generated a mouse model of *Wnt4* inactivation within the adrenal cortex by mating *Wnt4Fl/Fl* mice[29] with *Sf1:Cre* mice. As expected, this resulted in extinction of WNT4 expression in knockout adrenals (Supplementary Fig. 5A,F). Interestingly, mice with *Wnt4* inactivation had markedly reduced β-catenin (Fig. 4d, b versus a) and LEF1 (Fig. 4d, d versus c) accumulation within ZG. This was correlated with a significant reduction in *Axin2* and *Lef1* mRNA accumulation (*t*-test, Fig. 4e), which demonstrated that WNT4 was involved in canonical WNT pathway activation in the adrenal cortex. Consistent with the

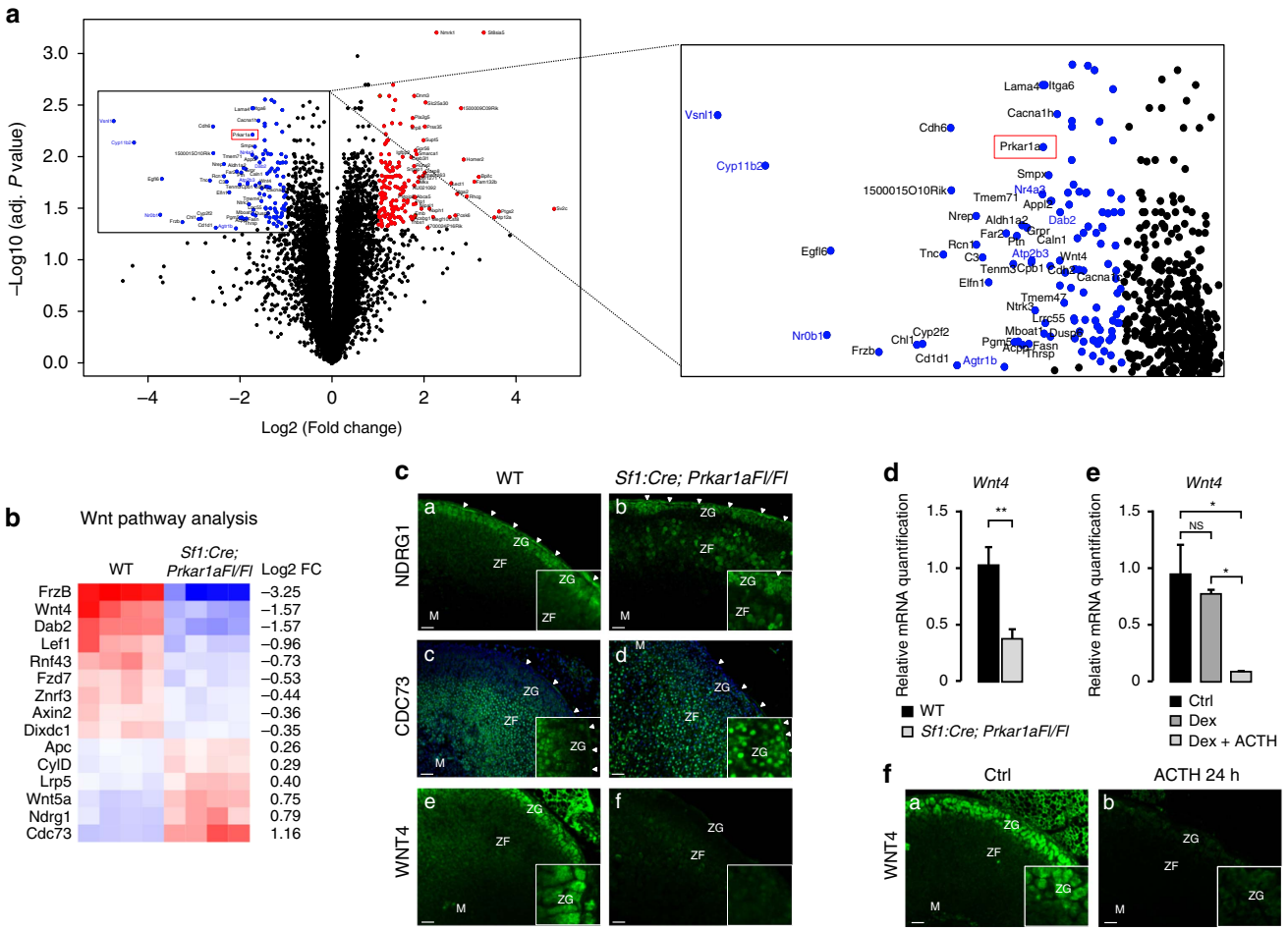


Figure 3 | WNT4 is downregulated by PKA signalling activation. (**a**) Constitutive activation of PKA signalling inhibits ZG markers expression. Volcano plot shows differential gene expression in adrenals from four *Sf1:Cre;Prakr1aFl/Fl* mice compared with four wild-type littermates. A number of ZG differentiation markers (gene symbols in blue) are among the most significantly downregulated genes. As expected, *Prkar1a* expression (red rectangle) is significantly decreased in knockouts. (**b**) Constitutive activation of PKA signalling modulates expression of WNT pathway target genes and regulators. Colour-coded heatmap shows expression of the 15 genes that were significantly deregulated (adjusted *P* value <0.05). (**c**) Expression of NDRG1, CDC73 and WNT4 in mouse adrenals. Expression of the two potential WNT signalling repressors NDRG1 and CDC73 and of the WNT ligand WNT4 was analysed by immunohistochemistry in wild-type ($n=4$; a,c,e) and *Sf1:Cre;Prkar1aFl/Fl* adrenals ($n=4$; b,d,f). Hoechst nuclear staining in c and d highlights the lack of Cdc73 expression in wild-type outer cortex. Insets show high magnification pictures of ZG. Arrowheads show adrenal capsule. (**d**) Constitutive activation of PKA signalling inhibits *Wnt4* expression. *Wnt4* expression levels were analysed by RT-qPCR on mRNAs extracted from wild-type and *Sf1:Cre;Prkar1aFl/Fl* adrenals. Bars represent the mean expression in six animals per group ± s.e.m. Statistical analyses were performed by Student's *t*-test. (**e**) ACTH stimulation represses *Wnt4* expression. *Wnt4* expression levels were analysed by RT-qPCR on mRNAs extracted from adrenals of wild-type mice treated with vehicle, dexamethasone or dexamethasone and ACTH as in Fig. 1a. Bars represent the mean expression in four animals per group ± s.e.m. Statistical analyses were performed by one-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test. (**f**) ACTH induces a rapid decrease in WNT4 protein accumulation. WNT4 expression was analysed by immunohistochemistry in the adrenal cortex of wild-type mice ($n=4$), 24 h after a single ACTH (Synacthene retard) injection. $^{*}P<0.05$; $^{**}P<0.005$. Scale bars, 100 μm.

essential role of β-catenin in ZG differentiation, there was a marked reduction in the number of CYP11B2 positive cells in response to *Wnt4* inactivation (Fig. 4f, b versus a). This was further associated with expansion of ZF differentiation as shown by strong AKR1B7 expression within the presumptive ZG of mutant adrenals (Fig. 4f, d versus c and Supplementary Fig. 5G). Thus, *Wnt4* inactivation phenocopied the effect of constitutive PKA activation, resulting from genetic ablation of *Prkar1a* (compare Fig. 4d,f with Fig. 1d,f). To further demonstrate the involvement of WNT4 repression in PKA-mediated WNT signalling inhibition, we treated control littermates and *Sf1:Cre;Wnt4Fl/Fl* mice with ACTH (Synacthene retard) for 3 days. As expected, ACTH treatment resulted in robust repression of *Axin2* and *Lef1* mRNA accumulation in control adrenals (Fig. 4g). Interestingly, PKA-mediated *Lef1* repression was almost completely abrogated in *Wnt4* knockout adrenals (Fig. 4g). There was also a significant albeit less dramatic reduction in *Axin2* repression (*t*-test, Fig. 4g). Altogether, these data showed that WNT4 was an essential driver of ZG differentiation through WNT pathway activation and that *Wnt4* repression was, at least in part, responsible for WNT pathway inhibition in response to PKA activation.

PKA activation inhibits WNT-induced tumorigenesis. We have previously shown that constitutive WNT pathway activation initially resulted in ectopic ZG hyperplasia and eventually adrenal carcinoma development[6,7]. We thus wanted to evaluate the

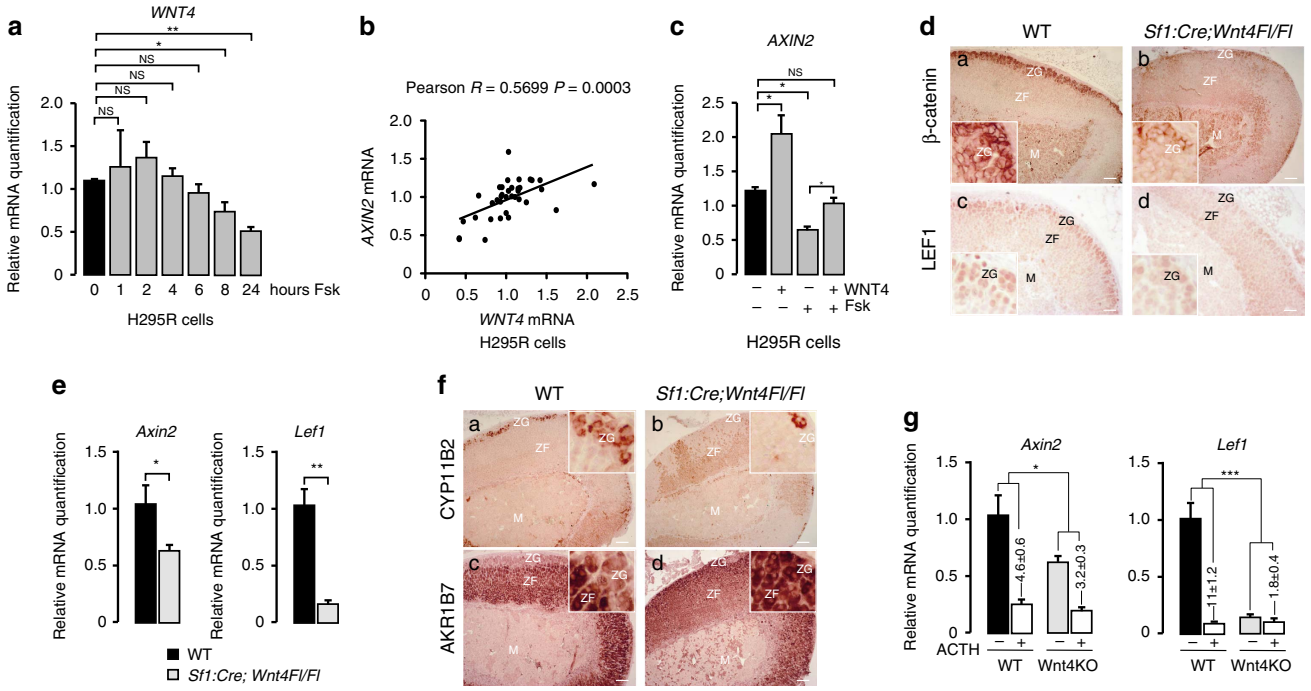


Figure 4 | WNT4 repression mediates the effect of PKA on WNT signalling in the adrenal gland. (**a**) Forskolin represses *WNT4* expression in human adrenocortical H295R cells. Human H295R cells were treated with either vehicle (0) or Forskolin 10^{-5}M (Fsk) for 1 to 24 h and *WNT4* expression was analysed by RTqPCR. Bars represent mean expression in three independent experiments (in triplicate) ± s.e.m. (**b**) *AXIN2* and *WNT4* expression levels are correlated in H295R cells. *AXIN2* and *WNT4* expression levels were correlated on the basis of RTqPCR data generated from H295R cell treatments. (**c**) Overexpression of WNT4 reverses the effect of Forskolin on *AXIN2* expression. H295R cells were transfected with pCMV-WNT4 to induce overexpression of WNT4 and treated with DMSO or Forskolin 10^{-5}M (Fsk) for 8 h. Expression of *AXIN2* was determined by RTqPCR. Bars represent mean expression in three independent experiments ± s.e.m. Statistical analyses were performed by one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test (**d**) *Wnt4* genetic ablation inhibits WNT pathway activation in ZG. Expression of β-catenin and WNT pathway target LEF1 was analysed by immunohistochemistry in the adrenals from wild-type and *Sf1:Cre;Wnt4Fl/Fl mice*. (**e**) *Wnt4* genetic ablation is associated with decreased *Axin2* and *Lef1* expression in the adrenal. *Axin2* and *Lef1* expression levels were analysed by RTqPCR on mRNAs extracted from wild-type and *Sf1:Cre;Wnt4Fl/Fl* adrenals. Bars represent the mean expression in 5 animals per group ± s.e.m. Statistical analyses were performed by Student's *t* test. (**f**) *Wnt4* genetic ablation is associated with loss of ZG differentiation and expansion of ZF. Expression of CYP11B2 (ZG) and AKR1B7 (ZF) was analysed in the adrenals from wild-type and *Sf1:Cre;Wnt4Fl/Fl* mice. (**g**) The ability of ACTH to repress *Axin2* and *Lef1* expression is blunted in Wnt4 knockout adrenals. Wild-type and *Sf1:Cre;Wnt4Fl/Fl* mice were treated for three days with PBS or ACTH (Synacthene Retard) and *Axin2* and *Lef1* expression levels were evaluated by RTqPCR. Bars represent the mean expression in 5 adrenals per genotype and per treatment group ± s.e.m. Fold repression by ACTH over PBS in both wild-type and *Sf1:Cre;Wnt4Fl/Fl* mice is shown. Statistical analyses were performed by Student's *t* test. $^{*}P<0.05$; $^{**}P<0.005$; $^{***}P<0.0005$; NS: Not significant. Scale bars, 100 μm. ZG, zona glomerulosa; ZF, zona fasciculata; M, medulla.

capacity of constitutive PKA signalling to inhibit WNT-induced ectopic ZG differentiation and aberrant proliferation. For this, we initially mated mice with *Sf1:Cre*-mediated *Prkar1a* inactivation with *Ctnnb1Fl(ex3)* mice[30] (to generate *ΔCat;Sf1:Cre* mice). However, consistent with previously published data[31], the robust activation of WNT signalling triggered by Sf1-driven Cre expression resulted in left adrenal hypoplasia and in most cases right adrenal agenesis in *ΔCat;Sf1:Cre* mice at one month of age, which precluded analysis of adrenal differentiation and proliferation (Fig. 5a,b, a). However, in this context, genetic ablation of *Prkar1a* allowed partial rescue of the WNT-induced developmental phenotype. This manifested as recovery of an hypoplastic right adrenal in most mice (Fig. 5a) and an increase in overall adrenal size (Figs 5b,a), even though adrenal cortex histology was still markedly disrupted in both *ΔCat;Sf1:Cre* and *ΔCat;Prkar1aFl/Fl;Sf1:Cre* mice (Fig. 5b, b–d). We thus resorted to using our previously characterized *Akr1b7:Cre* line, in which the later and stochastic expression of Cre recombinase bypasses β-catenin-dependent developmental phenotypes (Supplementary Fig. 6A). At 6 months, the adrenal phenotype in ΔCat mice was characterized by increased proliferation of steroidogenic cells within the central adrenal region (Figs 5c,d and ref. 6). This was associated with aberrant differentiation of DAB2-positive ZG cells (ref. 32 and Supplementary Fig. 6B) within ZF and central adrenal region (Fig. 5e,f). Interestingly, ablation of *Prkar1a* resulted in a decrease in both proliferation and aberrant differentiation of ZG cells within the central adrenal region (Fig. 5d,f). This suggested that constitutive PKA activation through *Prkar1a* gene ablation could inhibit WNT-induced hyperproliferation and ectopic ZG differentiation.

PKA inactivation accelerates WNT-induced tumorigenesis. To further confirm the repressive action of PKA on WNT signalling, we decided to reduce catalytic PKA activity to assess a potential overactivation of WNT signalling. *Prkaca*+/− adrenals were indistinguishable from wild-type (Supplementary Fig. 6C), suggesting normal control of WNT signalling in this genetic context. However, combination of heterozygous *Prkaca* ablation with constitutive β-catenin activation resulted in a marked aggravation of WNT-induced phenotypes. Indeed, adrenal weight was markedly increased in 12-month-old *ΔCat;Prkaca*+/−; *Akr1b7:Cre* mice compared with their *ΔCat;Akr1b7:Cre* littermates (Fig. 6a). This was correlated with a more dysplastic

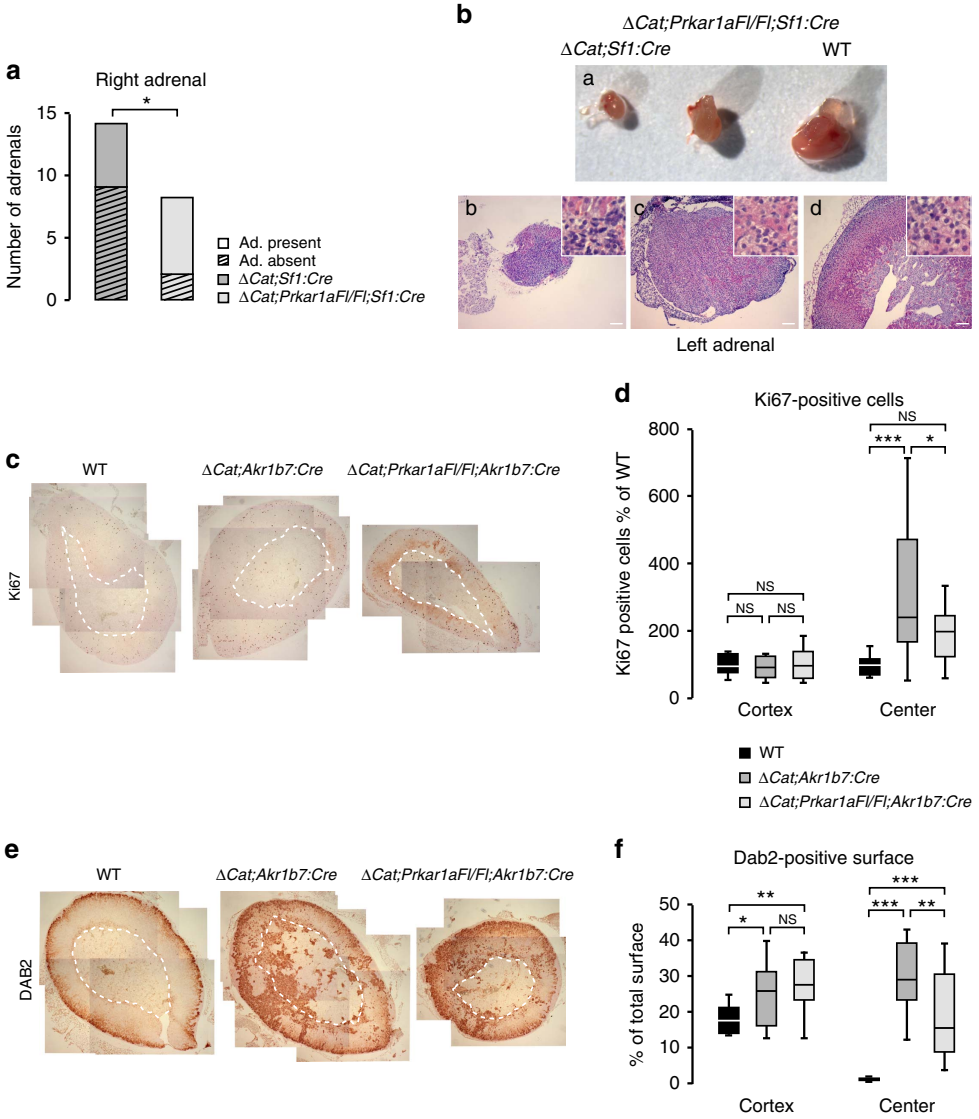


Figure 5 | Constitutive PKA signalling counteracts constitutive WNT signalling. (**a**,**b**) Constitutive PKA activation partially rescues WNT-induced developmental phenotypes. (**a**) Constitutive activation of β-catenin with *Sf1:Cre* driver is associated with right adrenal gland aplasia in 9 out of 14 animals (left bar). Genetic ablation of *Prkar1a* significantly rescues this phenotype (aplasia in two out of eight animals, right bar), $P = 0.0416$ in N-1 two proportion test. (**b**) Left adrenal size (a) and histological features are partially restored by genetic ablation of *Prkar1a* in the context of *Sf-1:Cre* mediated constitutive activation of β-catenin (c versus b). Wild-type adrenal is shown in d. (**c**,**d**) Constitutive PKA activation inhibits WNT-induced proliferation. (**c**) Ki67 expression was analysed by immunohistochemistry in wild-type, constitutive active β-catenin mutants (*ΔCat;Akr1b7:Cre*) and constitutive active β-catenin mutants in the context of *Prkar1a* genetic ablation (*ΔCat;Prkar1aFl/Fl;Akr1b7:Cre*). (**d**) Ki67 positive cells were separately counted in the adrenal cortex and central adrenal region of 12–14 animals of each genotype. Numbers of positive cells are represented as a percentage of positive cells in each wild-type compartment. (**e**,**f**) Constitutive PKA activation inhibits WNT-induced ectopic ZG differentiation. (**e**) Expression of the ZG marker DAB2 (see Supplementary Fig. 6B) was analysed by immunohistochemistry in the same genotypes as in **c**. (**f**) DAB2 stained areas were measured separately in the adrenal cortex and central adrenal region of 10–15 animals of each genotype. Stained areas are expressed as a percentage of total adrenal surfaces. Statistical analyses in **d**,**f** were conducted by one-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test $^{*}P<0.05$; $^{**}P<0.005$; $^{***}P<0.0005$; NS, not significant. Scale bars, 100 μm. Dashed lines delimit cortex from central adrenal area (medulla and ectopic glomerulosa cells).

histology (Fig. 6b, b–d versus a) and a significant increase in Ki67 labelling index (ANOVA, Fig. 6c,d). Acceleration of tumour development in response to *Prkaca* heterozygous ablation was further confirmed by a significant increase in *VegfA* and a decrease in *Connexinα43* expression, two hallmarks of adrenal malignancy (ANOVA, Fig. 6e). The correlation between decreased PKA activity and increased WNT signalling, was shown by a significant increase in *Axin2* and *Lef1* mRNA accumulation in *ΔCat;Prkaca+/−;Akr1b7:Cre* mice, compared with *ΔCat;Akr1b7:Cre* mice (ANOVA, Fig. 6f). This was further confirmed by a marked increase in the number of LEF1-labelled cells in immunohistochemistry (Fig. 6g, b versus a). These data showed that reduced PKA activity could favour malignant WNT-induced tumorigenesis. To evaluate a potential involvement of this interaction in the context of human ACC development, we took *StAR* expression as a proxy to PKA pathway activation, within the TCGA cohort of ACC[33] (RNA sequencing data). Interestingly, patients with high *StAR* expression levels (that is, high PKA activity) had significantly higher overall survival, when compared with patients with low *StAR* accumulation (that is, low PKA activity; LogRank test, Fig. 6h). To establish a link with WNT signalling, we determined

a WNT pathway activation signature based on the geometric mean of *LEF1*, *AXIN2* and *APCDD1* expression levels. Consistent with previously published data, patients with elevated WNT signalling had significantly lower survival than patients with low WNT signalling (Supplementary Fig. 7). To further confirm the association between low PKA signalling and high WNT signalling, we selected patients with no mutations in *CTNNB1* (activating), *APC* or *ZNRF3* (inactivating) and evaluated a potential negative association between *StAR* expression and WNT signature. Interestingly, WNT activation signature was inversely correlated with *StAR* (Fig. 6i, left panel). This correlation was further confirmed by clustering analysis of patients on the basis of *StAR* expression (Fig. 6i, right panel). Indeed, patients with low *StAR* expression generally showed high levels of WNT activation signature and of individual WNT target genes expression (*LEF1*, *AXIN2*, *APCDD1*). Altogether, these observations suggested that PKA activity could repress WNT-mediated tumour development in mouse models and in humans.

Discussion

Adrenal cortex renewal after recruitment of subcapsular progenitors preferentially occurs through lineage conversion

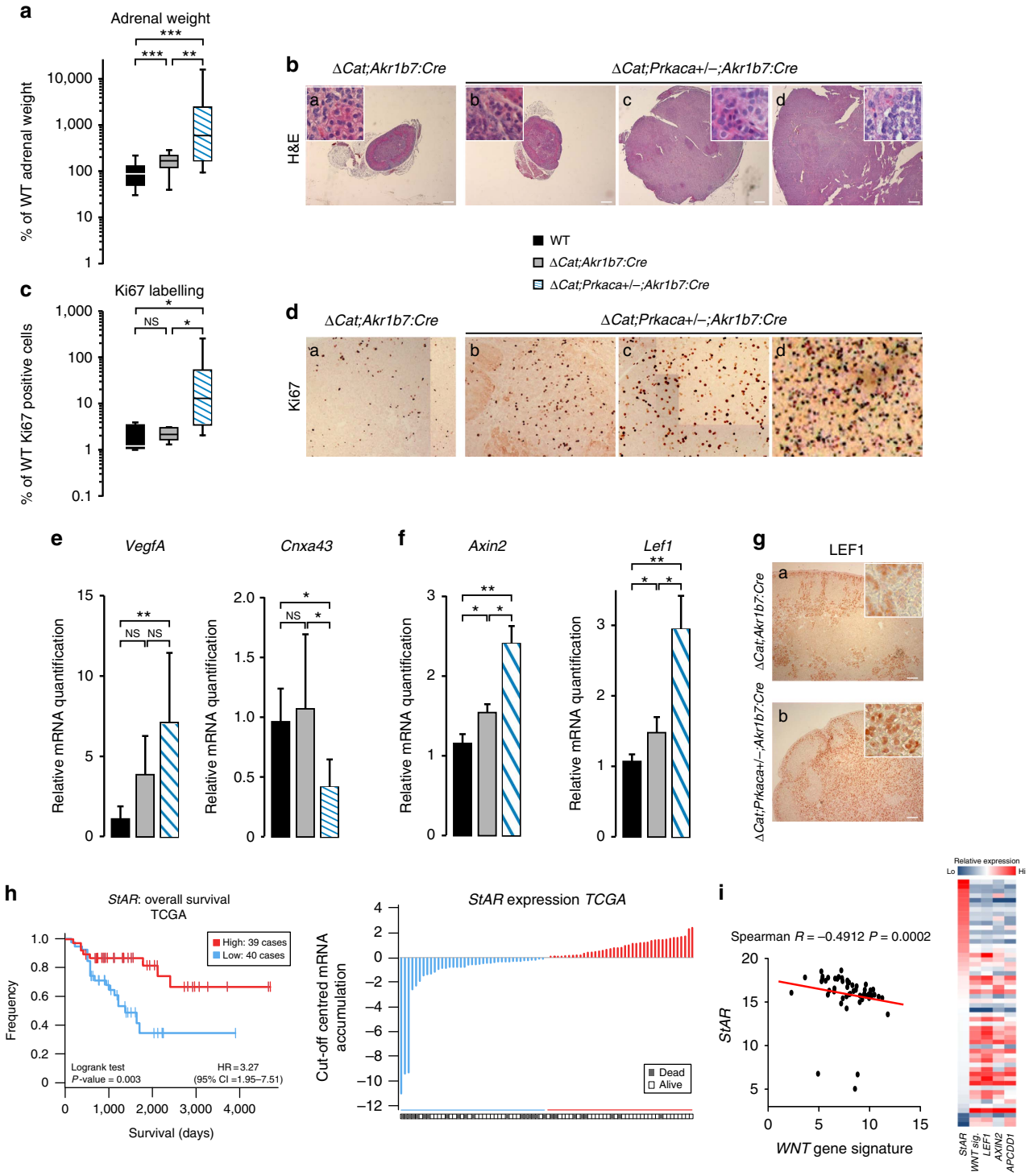


Figure 6 | *Prkaca* heterozygosity accelerates WNT-induced tumorigenesis. (**a**) Adrenal weight is significantly increased by loss of one *Prkaca* allele. Adrenal glands from wild-type, *ΔCat;Akr1b7:Cre* and *ΔCat;Prkaca+/−;Akr1b7:Cre* mice were weighed on killing. (**b**) *Prkaca* heterozygosity accelerates WNT-induced hyperplasia and dysplasia. *ΔCat;Akr1b7:Cre* (a) and *ΔCat;Prkaca+/−;Akr1b7:Cre* (b–d) adrenals were counterstained with haematoxylin and eosin. Pictures in b–d represent the range of phenotypes resulting from *Prkaca* heterozygosity. Scale bar, 400 μm. (**c**,**d**) *Prkaca* heterozygosity increases proliferation. Ki67 positive cells were counted in five high-power fields per adrenal (WT, $n=3$; *ΔCat;Akr1b7:Cre*, $n=4$; *ΔCat;Prkaca+/−;Akr1b7:Cre*, $n=9$).Results are expressed as a labelling index. Pictures in **d** show high-power fields for one *ΔCat;Akr1b7:Cre* adrenal (a) and three different *ΔCat;Prkaca+/−;Akr1b7:Cre* adrenals (b–d). (**e**) *Prkaca* heterozygosity is associated with increased malignancy. *VegfA* and *Cnxa43* expression levels were analysed by RT-qPCR in wild-type ($n=5$), *ΔCat;Akr1b7:Cre* ($n=7$) and *ΔCat;Prkaca+/−;Akr1b7:Cre* ($n=12$) adrenals. (**f**,**g**) *Prkaca* heterozygosity increases WNT pathway activity. (**f**) *Axin2* and *Lef1* expression levels were analysed by RT-qPCR (**g**) LEF1 expression was analysed by immunohistochemistry in *ΔCat;Akr1b7:Cre* and *ΔCat;Prkaca+/−;Akr1b7:Cre* adrenals. Insets show ectopic accumulation of LEF1 within ZF. Scale bar, 100 μm. (**h**) Low *StAR* expression is associated with lower overall survival in ACC patients. The patients were separated as two equivalent groups of high ($n=39$) and low ($n=40$) *StAR* expression. Left panel: Kaplan–Meier estimates of overall survival. Right panel: patients were ordered by cut-off-centred *StAR* expression. Dark grey boxes indicate specific death. (**i**) WNT pathway activity is inversely correlated with *StAR* expression in ACC patients. Adrenocortical carcinoma patients with no mutation in *CTNNB1*, *APC and ZNRF3* were selected and a WNT pathway activation signature was established based on expression levels of *LEF1*, *AXIN2* and *APCDD1*. Left panel: Spearman correlation between WNT signature and *StAR* expression. Right panel: hierarchical clustering of patients as a function of *StAR* expression and corresponding levels of WNT gene signature and individual WNT target genes expression. Bars in **e**,**f** represent mean expression ± s.e.m. Statistical analyses in **a**,**c**,**e** and **f** were conducted by one-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* $^{*}P<0.05$; $^{**}P<0.005$; $^{***}P<0.0005$; NS, not significant.

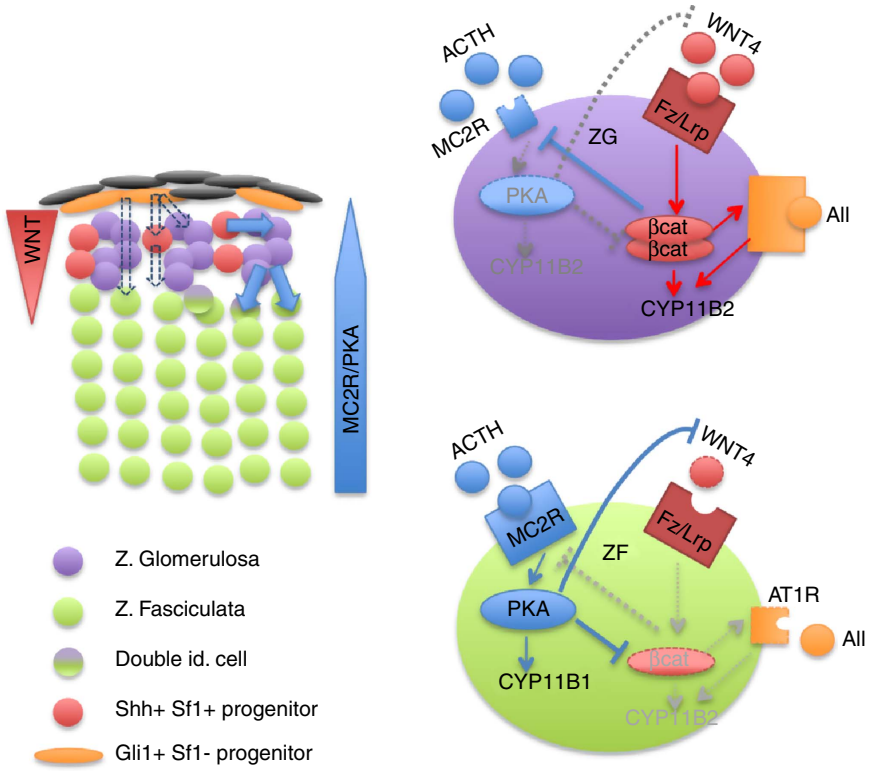


Figure 7 | Model for adrenocortical zonal differentiation. Left panel shows the zonal organization of the adrenal cortex with capsular (orange) and subcapsular (red) progenitor cells, ZG cells (purple), ZF cells (green) and transiting cells with double identity (purple and green). Solid blue arrows show the normal process of cell renewal occurring through recruitment of Shh-positive progenitors that initially differentiate as ZG cells and subsequently differentiate as ZF cells as they migrate within the cortex. Dashed arrows show alternative renewal pathways relying on capsular (Shh-negative) progenitors. Right panels show the interplay between WNT and PKA signalling pathways in ZG cells (purple) and ZF cells (green). Red arrows: activation; blue arrows: inhibition; grey arrows: inactive pathway.

from ZG to ZF cell identity[4]. Here, we show that establishment of ZG identity relies on WNT pathway activation through expression of WNT4, which has recently been proposed to act as a local relay for the effect of capsular RSPO3 on ZG differentiation[34]. We further show that either ACTH treatment or genetic constitutive PKA activation resulting from RIα ablation throughout the adrenal cortex not only inhibits canonical WNT signalling and subsequent glomerulosa differentiation by repressing WNT4 expression, but also allows ZF expansion in the presumptive ZG area. This strongly suggests that PKA activation within inner adrenal cortex is essential to restrict WNT pathway activity, inhibit subsequent ZG differentiation and allow lineage conversion towards ZF differentiation. Altogether, these observations suggest the following integrated model for functional adrenal cortex zonation (Fig. 7): within outer cortex, progenitor cells engage in glomerulosa differentiation in response to active WNT signalling, which stimulates expression of angiotensin II receptor AT1R and of CYP11B2 (ref. 7). The activation of β-catenin also ensures inhibition of ZF differentiation through repression of MC2R and CYP11B1

expression, which maintains cells in their ZG phenotype (this paper and refs 6,7,10). Along their centripetal migration, cells with ZG identity progressively escape from active WNT signalling influence, which results in decreased β-catenin activation and extinction of LEF1 expression as they reach ZF (this paper). WNT-mediated inhibition of MC2R expression[10] is released, which allows for activation of PKA signalling by ACTH. This in turn, definitively inhibits WNT signalling (this paper), which allows for acquisition of fasciculata identity. In this model, rather than an abrupt transition from ZG to ZF identity, cells at the boundary of ZG and ZF would transiently display features of both differentiation programs. The observation of cells with expression of both CYP11B1 and CYP11B2 in the inner glomerulosa is consistent with this hypothesis[4]. This suggests that adrenal cortex zonation and lineage conversion result from a subtle equilibrium between WNT and PKA signalling pathways. This is reminiscent of the role of PKA in neural tube patterning through Hedgehog pathway inhibition[35], which raises the possibility that such pathways interactions are involved in cell fate decisions and lineage conversion in other tissues.

One apparent contradiction to our model is the lack of ZG expansion in *Mc2r* knockout mice[9] that would be predicted to result from derepression of β-catenin activity within ZG. However, one likely explanation is that absence of PKA signalling within the cortex of MC2R knockout mice blocks cortical cell renewal, which would prevent centripetal displacement of ZG cells within the cortex. This would then artificially maintain a relatively normal ZG/ZF boundary, even in the absence of Mc2r expression. Consistent with this hypothesis, dexamethasone treatment for 2 weeks was shown to inhibit lineage conversion from ZG to ZF[4]. Another non-mutually exclusive hypothesis is that the restricted domain of WNT4 expression and activity is roughly preserved even in the absence of PKA signalling, which would ensure maintenance of zonation in cases of HPA axis depression. In this scenario, PKA-mediated WNT4 repression would just work as a secondary lock mechanism to ensure normal cortex zonation in a physiological context. This will have to be carefully examined once a conditional *Prkaca* allele becomes available.

In the adrenal, β-catenin activation is associated with both benign and malignant tumorigenesis. In contrast, abnormal PKA signalling has only been described in benign tumours. Observation of abnormal β-catenin accumulation within a number of benign tumours associated with PKA pathway activation suggested that some of the oncogenic effects of PKA could be mediated by WNT pathway activation[36–40]. Our data clearly show that this is an unlikely scenario as explained below. (1) There is clear inhibition of WNT pathway activity and β-catenin accumulation in our mouse model of *Sf1:Cre*-mediated *Prkar1a* inactivation. This inhibition can even partially rescue deleterious WNT-induced developmental phenotypes. (2) Combination of PKA activation (through *Prkar1a* inactivation) with WNT pathway activation mediated by the *Akr1b7:Cre* driver, partially inhibits WNT-induced tumorigenesis. (3) Inactivation of one allele of the catalytic subunit of PKA markedly accelerates WNT-induced tumorigenesis. Although we cannot completely rule out that species-specific mechanisms may account for these effects, it is more likely that the kinetics of pathway alterations play an essential role in phenotypic outcome. Indeed, in most PKA-dependent tumours that were analysed, PKA activation resulted from germline mutations of *PRKAR1A* or *GNAS*. Although β-catenin was found activated in these tumours on the basis of immunohistochemical analyses, *CTNNB1* somatic mutations were mostly found in larger tumours or macronodules that developed in the context of micronodular lesions[36,38]. Thus in patients, the sequence of events starts with PKA activation, followed by β-catenin activation in the most aggressive tumours. This is in sharp contrast with our mouse models in which both alterations are triggered at the same time by Cre recombinase expression. It is thus tempting to speculate that those tumours that combine both alterations in patients have overcome the negative effect of PKA on β-catenin activity, presumably through mutations in some essential components of this inhibitory mechanism, which would result in a selective growth advantage.

The marked acceleration in WNT-induced tumorigenesis in response to *Prkaca* heterozygosity is intriguing. Indeed, mice combining both alterations develop tumours with malignant characteristics as early as 12 months. This is in striking contrast with the 16 to 19 months period required for β-catenin activation alone, to induce a similar phenotype with the same Cre driver[6,41]. It suggests that a decrease in PKA activity could favour acquisition of malignant characteristics in adrenocortical tumours. Consistent with this hypothesis, and even though *StAR* expression may not completely reflect the degree of PKA activity, our data suggest that decreased PKA signalling is associated with more aggressive tumours that exhibit higher levels of WNT target genes expression in ACC patients. This is consistent with published data showing that LOH at the ACTH receptor was associated with more aggressive adrenal cortex carcinoma (ACC) in a small cohort of patients[42]. However, there was no evidence of MC2R LOH in the TCGA cohort, except for one patient (ID: TCGA-OR-A5JY) with homozygous deletion of the locus. This suggests that downregulation of PKA activity may result from alterations of other key players in the pathway or even from increased feedback, resulting from adrenal endocrine overactivity. Although this hypothesis will require thorough analysis of larger cohorts, it suggests that PKA activation suppresses WNT-induced malignant adrenal tumorigenesis. This is in line with the recent finding that PKA can act as a tumour suppressor that prevents basal cell carcinoma formation. However, in the epidermis, PKA exerts its protective effect by restraining Hedgehog and YAP signalling[43].

Our data showing an inhibitory action of PKA activation on WNT/β-catenin signalling within the adrenal cortex, is in sharp contrast with data from the literature showing that PKA can stimulate WNT pathway activity[17–20]. Indeed our data show that in contrast with COS7 cells, in which PKA stimulation is associated with induction of *Axin2* expression (ref. 18 and this paper), H295R adrenocortical cells in culture respond to PKA stimulation by accumulation of the inactive phospho-T41/S45 form of β-catenin even though activating phosphorylation at serine 552 is induced as efficiently as in COS7 cells. This phenomenon is also observed *in vivo*. Indeed *Sf1:Cre;Prkar1a Fl/Fl* adrenals show a combination of increased inactivating (pT41/S45) and decreased activating β-catenin phosphorylation (pS552), which results in decreased accumulation of the active ABC form of the protein. Whether increased T41/S45 is a direct effect of PKA on β-catenin in adrenocortical cells is unclear, even though experimental evidence suggests that these residues could be targets of the catalytic activity of PKA, both in reconstructed *in vitro* kinase assays and in cell culture[19]. Another possibility, at least *in vivo*, is that PKA indirectly triggers activating Y216 phosphorylation of GSK3β (Fig. 2d–w), which would result in increased T41/S45 phosphorylation of β-catenin. Beyond regulation of critical phosphorylations, our unbiased microarray analysis of WNT pathway regulators expression in *Sf1:Cre;Prkar1aFl/Fl* adrenals suggests that PKA may exert its inhibitory effect at multiple levels of WNT signalling pathway by deregulating expression of a number of potential repressors and activators. In this paper, we provide genetic evidence that inhibition of WNT4 expression in response to PKA signalling activation is one important aspect of this phenomenon. Indeed,

Sf1:Cre;Wnt4Fl/Fl mutants display a differentiation phenotype reminiscent of *Sf1:Cre;Prkar1aFl/Fl* mutants and Lef1 repression by ACTH is almost abrogated in *Wnt4* mutants. One conundrum of our study is the observation that PKA activation is still capable of inhibiting WNT signalling in ΔCat mice (Figs 4 and 5 and Supplementary Fig. 8) and H295R cells (Fig. 2) that express a destruction-complex resistant β-catenin[44]. In this context, WNT signalling is considered to be largely independent of WNT ligands. However, experimental evidence suggests that cells with activated β-catenin retain some sensitivity to extra-cellular signals such as RSPO2 and SFRPs[45,46]. Consistent, with a potential role of WNT4 inhibition in this setting, we observed a marked reduction in its accumulation in ΔCat mice, in response to ACTH treatment (Supplementary Fig. 8). Another non-mutually exclusive hypothesis could involve the potential repressor CDC73/parafibromin, a component of RNA-Pol II-associated PAF1 complex. It had initially been described as a positive regulator β-catenin transcriptional activity by recruiting Pygopus to β-catenin[25]. However, this positive interaction is dependent on CDC73 tyrosine dephosphorylation by the phosphatase SHP2 (ref. 47) and recent evidence suggests that CDC73 can repress WNT signalling in colorectal cancer cells and B-cells in response to activation of BTK (Bruton's Tyrosine kinase)[26], a kinase that has been proposed to activate PKA[48]. Our data show that CDC73 is normally accumulated in the nucleus of ZF but not ZG cells (Fig. 3c). Interestingly, we further show that this expression pattern expands within presumptive ZG upon deletion of *Prkar1a* (Fig. 3c). This strongly suggests that CDC73 may directly interact with and repress β-catenin transcriptional activity in response to PKA stimulation within the adrenal cortex. Careful evaluation of this hypothesis may reveal novel relevant interactions that could be targeted to block WNT pathway activation in adrenocortical tumours.

In conclusion, we have identified PKA-mediated WNT inactivation as an essential mechanism for lineage conversion from ZG to ZF and maintenance of adrenal cortex zonation. Our genetic data further show that this novel mechanism is also a potentially important repressor of WNT-induced tumorigenesis in the adrenal cortex.

Methods

Mice. All animal studies were approved by Auvergne Ethics committee and were conducted in agreement with international standards for animal welfare. *Akr1b7:Cre* (stochastic Cre expression in steroidogenic cells of the adrenal cortex starting t E14.5)[49], *Sf1:Cre* (Cre expression in all steroidogenic cells of the adrenal cortex from its inception)[14], *mT/mG* (recombination reporter system introduced at the ROSA26 locus that allows a switch from constitutive Tomato fluorescence to GFP upon recombination)[15], *Ctnnb1Fl(ex3)* (Floxed allele of *Ctnnb1* that allows Cre-mediated deletion of the third exon of the gene and subsequent constitutive activation)[30], *Prkar1aFl/Fl* (Floxed allele of *Prkar1a* that allows Cre-mediated inactivation)[13], *Prkaca*+/− (constitutive heterozygous deletion of *Prkaca*)[50], *Wnt4Fl/Fl* (Floxed allele of *Wnt4* that allows Cre-mediated inactivation)[29], TopGal mice (Canonical WNT pathway activation reporter mice)[12] were all previously described. They were all maintained and bred on a mixed background. Throughout the manuscript, ΔCat refers to either heterozygous *Ctnnb1Fl(ex3)/+* or homozygous *Ctnnb1Fl(ex3)/Fl(ex3)* mice. We did not observe any discernible difference between both genotypes, which is consistent with the dominant effect of the mutation[30]. Littermate control animals were used in all the experiments. All analysed mice were female. *Prkar1aFl/Fl;Sf1:Cre and ΔCat;Prkar1aFl/Fl;Sf1:Cre* mice were analysed from 4 to 6 weeks. *ΔCat;Prkar1aFl/Fl;Akr1b7:Cre* and *Wnt4Fl/Fl;Sf1:Cre* mice were analysed at 6 months. *ΔCat;Prkaca*+/−*;Akr1b7:Cre* mice were analysed at 12 months. For hormonal manipulations, 6-month-old C57Bl/6 mice were injected subcutaneously with vehicle for 5 days (sesame oil twice daily), dexamethasone actetate for 5 days, which depletes endogenous ACTH production (75 μg twice daily in sesame oil) or dexamethasone actetate for 3 days and Synacthene Retard for 2 days (long-lasting exogenous source of ACTH, I.M, 1.2 U, Sigma Tau Laboratories). *Sf1:cre Wnt4Fl/Fl* mice and littermate controls were treated for 3 days with Synacthene Retard (1.2 U). For acute ACTH stimulation, wild-type mice were treated for 24 h with Synacthene Retard (1.2 U). At the end of the experimental procedures, the mice were killed by decapitation and blood was collected in vacuum blood collection tubes (VF-053STK, Terumo). The adrenals were either frozen in liquid nitrogen or fixed in 4% PFA. Total mRNAs were extracted using RNAII nucleotide extraction kit (Macherey Nagel) according to the manufacturer's instructions. Total proteins were extracted with RIPA buffer in the presence of protease (Complete 1X, Roche) and phosphatase inhibitors (NaF, 1 mM; Na_3VO_4, 1 mM).

Immunohistochemistry. Immunohistochemistry for β-catenin (1/500, BD 610153), DAB2 (1/500, BD 610464), CYP11B2 (1/200, gift from C. Gomez-Sanchez, University of Mississippi, USA), AKR1B7 (1/500, ref. 6), Ki67 (1/200, RM9106-SO, Thermo Fisher) and 20αHSD (1/20000, kind gift from Y. Weinstein, Ben-Gurion University, Israel) was performed on tissues embedded in paraffin, after unmasking with sodium citrate 10 mM, Tween 0.05% (β-catenin, AKR1B7, Ki67 and 20αHSD) or Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 9.0, followed by 5 min in 10%SDS for CYP11B2, as previously described[6,16,41]. For LEF1 immunodetection, the slides were treated for 20 min in boiling sodium citrate 10 mM, tween 0.05% and blocked with 1% BSA. They were then incubated overnight with LEF1 antibody (1/100, #04-1159, Millipore) in 0.1% BSA. For immunodetection of NDRG1 (1/500, Ab37897, Abcam), CDC73 (1/500, SC-33638, Santa Cruz Biotechnology) and WNT4 (1/200, Ab91226, Abcam), the slides were treated for 20 min in boiling Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 9.0 and blocked with 1% BSA. They were then incubated overnight with NDRG1, CDC73 and WNT4 antibodies. All of the above primary antibodies were detected with SignalStain Boost HRP-Polymer solution (#8114S or #8125P, Cell Signalling) and either Vectastain ABC (PK-4000, Vector Labs) or TSA-Alexa 488 (T20948, Thermo Fisher) as substrates. For GFP immunodetection, the slides were treated for 20 min in boiling Vector Unmasking Solution (H3300, Vector Labs) and blocked with 10% foetal bovine serum (FBS) and 3% bovine serum albumin (BSA). They were then incubated overnight with GFP antibody (1/200, Ab5450, Abcam) in FBS 1%, BSA 1%. Primary antibody was detected with anti-goat Alexa 488 antibody (1/1,000, A11055, Molecular Probes Thermo Fisher). All immunohistochemical analyses were conducted on an automated processor (Intavis InSitu Pro) to ensure homogeneity and reproducibility of detections. Images were acquired with a Zeiss Axioplan 2 microscope and Axiocam HR camera. They were minimally processed for global levels and white balance using Adobe Photoshop. Image settings and processing were identical across genotypes.

X-Gal staining. X-Gal staining was performed on whole adrenals as described in ref. 49, after fixation in 0.2% glutaraldehyde for 1 h. After rinsing in wash buffer (phosphate-buffered saline (PBS), 2 mM $MgCl_2$, 0.1% Na deoxycholate, 0.02% NP40, 0.05% BSA), tissues were incubated for 12 h in X-Gal staining solution (PBS, 0.02% Nonidet-P40, 2 mM $MgCl_2$, 5 mM $K_3Fe(CN)_6$, 5 mM $K_4Fe(CN)_6$, 1 mg ml^{-1} X-gal) at 37 °C. After staining, the adrenals were rinsed in PBS and fixed in 4% PFA for 1 h. The tissues were then cryoprotected in sucrose 20% in PBS overnight at 4 °C and embedded in OCT. Ten micrometre sections were cut on a cryostat and deposited on Superfrost slides for observation.

RT-qPCR analysis. One microgram of total mRNAs (from tissues or cell culture) was reverse transcribed for 1 h at 37 °C with 5 pmol of random hexamers primers, 200 units reverse transcriptase (M-MLV RT, M1701, Promega), 2 mM dNTPs and 20 units RNAsin (N2615, Promega). One microlitre of a one-tenth dilution of cDNA was used in each qPCR. Except for *VegfA* and *Connexinα43* that were amplified with Taqman chemistry as described in ref. 41, all other reactions were conducted with SYBR qPCR Premix Ex Taq II Tli RNase H+ (TAKRR820W, Takara). Primer pairs are listed in Supplementary Data 3. For each experiment and primer pairs, efficiency of PCR reactions was evaluated by amplification of serial dilutions of a mix of cDNAs. Relative gene expression was obtained by the $\Delta\Delta Ct$ method after normalization to *36b4* (mouse) or *PPIB* (human).

Intra-adrenal aldosterone evaluation. Whole adrenal glands were disrupted in 1X PBS with tungsten beads (Qiagen) using a Tissue Lyser (Qiagen). Adrenal extract was then centrifuged at 12,000*g* and steroids contained in the supernatant were extracted with 10 volumes of dichloromethane. After evaporation, the samples were resuspended in 150 μl of buffer and aldosterone concentration was measured with Aldosterone ELISA Kit (CAN-ALD-450, Diagnostics Biochem Canada).

Cell culture. Human adrenocortical cancer H295R cell line (obtained from ATCC as a mycoplasma free cell line) was grown with DMEM/Ham's F12 supplemented with 10% FBS (S1800-500, Biowest), 2 mM L-Glutamine (25030, Gibco), 50 U ml^{-1} penicillin, 100 μg ml^{-1} streptomycin and 1X insulin transferrin selenium (41400-045, Gibco). COS7 cell line was grown with DMEM supplemented supplemented with 5% FBS (S1800-500, Biowest), 2 mM L-Glutamine (25030, Gibco), 50 U ml^{-1} penicillin and 100 μg ml^{-1} streptomycin. For PKA stimulation treatments, the cells were seeded at a density of 3×10^5 cells per well in six-well plates. The day after seeding, the cells were deprived of serum and growth factors for 12 h. They were then treated with vehicle (dimethyl sulfate (DMSO)) or with Forskolin (10^{-5} M) for the indicated amount of time. For inhibition of PKA signalling, H295R cells were deprived of serum and growth factors for 12 h. They were then treated with vehicle (DMSO), 10 μM H89, 10^{-5} M Forskolin or a combination of 10 μM H89 and 10^{-5} M Forskolin for 8 h, following 2 h

pre-incubation with H89. For transfection experiments, the cells were seeded at a density of 3×10^5 cells per well and transfected with 1 μg pCMV-WNT4 or empty vector (pCMV5) with Effectene reagent (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Twenty-four hours after transfection, the cells were deprived of serum and growth factors for 12 h and treated as above. Proteins were extracted with RIPA buffer in the presence of protease (Complete 1X, Roche) and phosphatase inhibitors (NaF, 1 mM; Na3VO4, 1 mM). mRNAs were extracted by TriReagent (Molecular Research Center Inc.) according to the manufacturer's instructions. All the experiments were performed at least three times in triplicate.

Western blot. Ten to forty micrograms of total proteins were loaded on 8% SDS–PAGE gel, transferred onto nitrocellulose and detected with the following antibodies: phospho-β-catenin S552 (1/1,000, #5651, CST), phospho-β-catenin S675 (1/1,000, #4176, CST), phospho-β-catenin T41/S45 (1/1,000, #9565, CST), phospho-β-catenin S33/37/T41 (1/200, #9561, CST), active β-catenin ABC (1/1,000, 05-665, Millipore), β-catenin (1/1,000, 610153, BD), phospho-GSK3 (1/1,000, 9331s, CST), GSK3β (1/1,000, 9315s, CST), phospho-GSK3β Y216 (1/1,000, Ab75475, Abcam) and GAPDH (1/1,000, NB30021, Novus). The signals were quantified with a DNR MF ChemiBis 3.2 camera system and Multi Gauge software suite (Fujifilm). Expression of the phospho-proteins was normalized to expression of the corresponding total protein. Full western-blot pictures are provided as Supplementary Fig. 9.

Microarray analysis of gene expression. Adrenal gene expression profiles for four 6-week-old *Sf1:Cre;Prkar1aFl/Fl* and four wild-type littermates were analysed using Affymetrix Mouse Gene 2.0 ST Arrays (Raw and processed data are deposited on NCBI GEO platform). Gene expression was normalized by RMA (Affy R package) and genotype comparisons were performed with *t*-test. All the *P* values were adjusted by the Benjamini–Hochberg correction method. Volcano plot was generated with R and displays $-\text{Log10}$(adjusted *P* value) as a function of Log2(fold change in knockout versus WT). Genes with adjusted *P* value <0.05 and Log 2 fold changes <-1 (blue dots) or >1 (red dots) were considered significantly down and upregulated, respectively. The WNT pathway targets and regulators list was curated from WNT Homepage (http://web.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/) and Pubmed searches. They are appended to this manuscript as Supplementary Data 1. Heatmaps were generated with R and represent colour-coded individual median centred gene expression levels (in the Log2 space) in four WT and four knockout adrenals. Genes were ordered according to the mean fold change (Log2) in knockout versus WT. Only genes with adjusted *P* values <0.05 are shown in these representations.

Patients' data. Gene expression and clinical data from adrenocortical carcinoma patients were extracted from mRNA sequencing data available from Broad Institute GDAC Firehose (TCGA data version 2015_03_26, http://gdac.broadinstitute.org). These include 79 adrenal cortex carcinomas. All the calculations were performed on Log2 values of RSEM normalized read counts. Mutational status was retrieved from cBioPortal (http://cbioportal.org). Heatmaps were generated with R. WNT gene signature was determined as the geometric mean of the Log2 values of RSEM normalized read counts for WNT target genes *LEF1*, *AXIN2* and *APCDD1*.

Statistical analyses. Statistical analyses of biological data were performed with R and GraphPad Prism 5.

Data availability. The authors declare that all data supporting the findings of this study are available within the article and its Supplementary Information files or from the corresponding author upon reasonable request. Microarray data are deposited on Gene Expression Omnibus repository with reference GSE77630.

References

1. Kim, A. C. *et al.* In search of adrenocortical stem and progenitor cells. *Endocr. Rev.* **30,** 241–263 (2009).
2. Drelon, C., Berthon, A., Mathieu, M., Martinez, A. & Val, P. Adrenal cortex tissue homeostasis and zonation: a WNT perspective. *Mol. Cell. Endocrinol.* **408,** 156–164 (2015).
3. King, P., Paul, A. & Laufer, E. Shh signalling regulates adrenocortical development and identifies progenitors of steroidogenic lineages. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **106,** 21185–21190 (2009).
4. Freedman, B. D. *et al.* Adrenocortical zonation results from lineage conversion of differentiated zona glomerulosa cells. *Dev. Cell* **26,** 666–673 (2013).
5. Benhamouche, S. *et al.* Apc tumour suppressor gene is the 'zonation-keeper' of mouse liver. *Dev Cell* **10,** 759–770 (2006).
6. Berthon, A. *et al.* Constitutive {beta}-catenin activation induces adrenal hyperplasia and promotes adrenal cancer development. *Hum. Mol. Genet.* **19,** 1561–1576 (2010).
7. Berthon, A. *et al.* WNT/β-catenin signalling is activated in aldosterone-producing adenomas and controls aldosterone production. *Hum. Mol. Genet* **23,** 889–905 (2014).
8. Gorrigan, R. J., Guasti, L., King, P., Clark, A. J. & Chan, L. F. Localisation of the melanocortin-2-receptor and its accessory proteins in the developing and adult adrenal gland. *J. Mol. Endocrinol.* **46,** 227–232 (2011).
9. Chida, D. *et al.* Melanocortin 2 receptor is required for adrenal gland development, steroidogenesis, and neonatal gluconeogenesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **104,** 18205–18210 (2007).
10. Walczak, E. M. *et al.* Wnt-signalling inhibits adrenal steroidogenesis by cell-autonomous and non-cell-autonomous mechanisms. *Mol. Endocrinol.* **28,** 1471–1486 (2014).
11. Aigueperse, C. *et al.* SF-1 (steroidogenic factor-1), C/EBPbeta (CCAAT/enhancer binding protein), and ubiquitous transcription factors NF1 (nuclear factor 1) and Sp1 (selective promoter factor 1) are required for regulation of the mouse aldose reductase-like gene (AKR1B7) expression in adrenocortical cells. *Mol. Endocrinol.* **15,** 93–111 (2001).
12. DasGupta, R. & Fuchs, E. Multiple roles for activated LEF/TCF transcription complexes during hair follicle development and differentiation. *Development* **126,** 4557–4568 (1999).
13. Kirschner, L. S. *et al.* A mouse model for the Carney complex tumour syndrome develops neoplasia in cyclic AMP-responsive tissues. *Cancer Res.* **65,** 4506–4514 (2005).
14. Bingham, N. C., Verma-Kurvari, S., Parada, L. F. & Parker, K. L. Development of a steroidogenic factor 1/Cre transgenic mouse line. *Genesis* **44,** 419–424 (2006).
15. Muzumdar, M. D., Tasic, B., Miyamichi, K., Li, L. & Luo, L. A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *Genesis* **45,** 593–605 (2007).
16. Sahut-Barnola, I. *et al.* Cushing's syndrome and foetal features resurgence in adrenal cortex-specific Prkar1a knockout mice. *PLoS Genet.* **6,** e1000980 (2010).
17. Fang, X. *et al.* Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **97,** 11960–11965 (2000).
18. Taurin, S., Sandbo, N., Qin, Y., Browning, D. & Dulin, N. O. Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **281,** 9971–9976 (2006).
19. Hino, S., Tanji, C., Nakayama, K. I. & Kikuchi, A. Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase stabilizes beta-catenin through inhibition of its ubiquitination. *Mol. Cell. Biol.* **25,** 9063–9072 (2005).
20. Zhang, M. *et al.* Protein kinase A activation enhances β-catenin transcriptional activity through nuclear localization to PML bodies. *PLoS ONE* **9,** e109523 (2014).
21. Hughes, K., Nikolakaki, E., Plyte, S. E., Totty, N. F. & Woodgett, J. R. Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation. *EMBO J.* **12,** 803–808 (1993).
22. Railo, A. *et al.* Genomic response to Wnt signalling is highly context-dependent—evidence from DNA microarray and chromatin immunoprecipitation screens of Wnt/TCF targets. *Exp. Cell Res.* **315,** 2690–2704 (2009).
23. Koo, B.-K. *et al.* Tumour suppressor RNF43 is a stem-cell E3 ligase that induces endocytosis of Wnt receptors. *Nature* **488,** 665–669 (2012).
24. Jin, R. *et al.* The metastasis suppressor NDRG1 modulates the phosphorylation and nuclear translocation of β-catenin through mechanisms involving FRAT1 and PAK4. *J. Cell Sci.* **127,** 3116–3130 (2014).
25. Mosimann, C., Hausmann, G. & Basler, K. Parafibromin/Hyrax activates Wnt/Wg target gene transcription by direct association with beta-catenin/Armadillo. *Cell* **125,** 327–341 (2006).
26. James, R. G. *et al.* Bruton's tyrosine kinase revealed as a negative regulator of Wnt-beta-catenin signalling. *Sci. Signal.* **2,** ra25 (2009).
27. Heikkila, M. *et al.* Wnt-4 deficiency alters mouse adrenal cortex function, reducing aldosterone production. *Endocrinology* **143,** 4358–4365 (2002).
28. Chen, M. & Hornsby, P. J. Adenovirus-delivered DKK3/WNT4 and steroidogenesis in primary cultures of adrenocortical cells. *Horm. Metab. Res.* **38,** 549–555 (2006).
29. Shan, J., Jokela, T., Peltoketo, H. & Vainio, S. Generation of an allele to inactivate Wnt4 gene function conditionally in the mouse. *Genesis* **47,** 782–788 (2009).
30. Harada, N. *et al.* Intestinal polyposis in mice with a dominant stable mutation of the beta-catenin gene. *EMBO J.* **18,** 5931–5942 (1999).
31. Huang, C.-C. J., Liu, C. & Yao, H. H.-C. Investigating the role of adrenal cortex in organization and differentiation of the adrenal medulla in mice. *Mol. Cell. Endocrinol.* **361,** 165–171 (2012).
32. Romero, D. G. *et al.* Disabled-2 is expressed in adrenal zona glomerulosa and is involved in aldosterone secretion. *Endocrinology* **148,** 2644–2652 (2007).
33. Zheng, S. *et al.* Comprehensive pan-genomic characterization of adrenocortical carcinoma. *Cancer Cell* **29,** 723–736 (2016).
34. Vidal, V. *et al.* The adrenal capsule is a signalling centre controlling cell renewal and zonation through Rspo3. *Genes Dev.* **30,** 1389–1394 (2016).
35. Huang, Y., Roelink, H. & McKnight, G. S. Protein kinase A deficiency causes axially localized neural tube defects in mice. *J. Biol. Chem.* **277,** 19889–19896 (2002).

36. Tadjine, M. *et al.* Detection of somatic beta-catenin mutations in primary pigmented nodular adrenocortical disease. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* **69,** 367–373 (2008).
37. Almeida, M. Q. *et al.* Activation of cyclic AMP signalling leads to different pathway alterations in lesions of the adrenal cortex caused by germline PRKAR1A defects versus those due to somatic GNAS mutations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **97,** E687–E693 (2012).
38. Gaujoux, S. *et al.* Wnt/beta-catenin and 3',5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate/protein kinase A signalling pathways alterations and somatic beta-catenin gene mutations in the progression of adrenocortical tumours. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **93,** 4135–4140 (2008).
39. Azevedo, M. F. & Stratakis, C. A. The transcriptome that mediates increased cAMP signalling in PRKAR1A defects and other settings. *Endocr. Pract.* **17,** 2–7 (2011).
40. Horvath, A. *et al.* Serial analysis of gene expression in adrenocortical hyperplasia caused by a germline PRKAR1A mutation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **91,** 584–596 (2006).
41. Drelon, C. *et al.* Analysis of the role of Igf2 in adrenal tumour development in transgenic mouse models. *PLoS ONE* **7,** e44171 (2012).
42. Reincke, M. *et al.* Deletion of the adrenocorticotropin receptor gene in human adrenocortical tumours: implications for tumorigenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82,** 3054–3058 (1997).
43. Iglesias-Bartolome, R. *et al.* Inactivation of a Gαs-PKA tumour suppressor pathway in skin stem cells initiates basal-cell carcinogenesis. *Nat. Cell Biol.* **17,** 793–803 (2015).
44. Tissier, F. *et al.* Mutations of beta-catenin in adrenocortical tumours: activation of the Wnt signalling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumours. *Cancer Res.* **65,** 7622–7627 (2005).
45. Wu, C. *et al.* RSPO2-LGR5 signalling has tumour-suppressive activity in colorectal cancer. *Nat. Commun* **5,** 3149 (2014).
46. Suzuki, H. *et al.* Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signalling in colorectal cancer. *Nat. Genet.* **36,** 417–422 (2004).
47. Takahashi, A. *et al.* SHP2 tyrosine phosphatase converts parafibromin/Cdc73 from a tumour suppressor to an oncogenic driver. *Mol. Cell* **43,** 45–56 (2011).
48. Newman, R. H. *et al.* Construction of human activity-based phosphorylation networks. *Mol. Syst. Biol.* **9,** 655 (2013).
49. Lambert-Langlais, S. *et al.* A transgenic mouse line with specific Cre recombinase expression in the adrenal cortex. *Mol. Cell. Endocrinol.* **300,** 197–204 (2009).
50. Skålhegg, B. S. *et al.* Mutation of the Calpha subunit of PKA leads to growth retardation and sperm dysfunction. *Mol. Endocrinol.* **16,** 630–639 (2002).

Acknowledgements

We thank Khirredine Ouchen, Sandrine Plantade and Philippe Mazuel for animal care, Jean-Paul Saru for western blot analyses, Christelle Damon-Soubeyrand for management of histological analyses facilities (Anipath Clermont), Corinne Belville for RNA quality analyses, Sébastien Jacques and Florent Dumont (Plateforme Genomic, Inserm U1016-CNRS UMR8104-Université Paris Descartes) for expert contributions, Clara Panzolini for Lac Z staining and Michelina Plateroti (CGPMC, Lyon) for helpful discussions. This work was funded through institutional support from Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Université Blaise Pascal, Université d'Auvergne and through grants from Fondation de France, La Ligue Contre le Cancer (Allier & Puy de Dôme committees), Fondation ARC, Société Française d'Endocrinologie (young researcher grant to C.D.) and Agence Nationale de la Recherche (ANR-14-CE12-0007-01-DevMiCar). Generation of *Wnt4* floxed mice by S.V. and J.S. was supported by grants from the Academy of Finland (206038, 121647) the Centre of Excellence Grant 2012–2017 of the Academy of Finland (251314), the Sigrid Jusélius, Finnish Cancer Research, the European Community's Seventh Framework Programme [FP7/2007–2013] under grant agreement FP7-HEALTH-F5-2012-INNOVATION-1 EURenOmics 305608. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

Author contributions

C.D., A.B., I.S.-B. and M.M., conceived and performed the experiments; T.D., S.R., M.B.-L., H.T., I.T., A.-M.L.-M. and J.-C.P., performed the experiments; C.E.G.-S., S.V., J.S., S.S., A.S. and C.A.S., contributed tools and reagents; A.M. conceived the experiments; P.V. supervised the project, conceived the experiments and wrote the manuscript

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at http://www.nature.com/naturecommunications

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permission information is available online at http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/

How to cite this article: Drelon, C. *et al.* PKA inhibits WNT signalling in adrenal cortex zonation and prevents malignant tumour development. *Nat. Commun.* 7:12751 doi: 10.1038/ncomms12751 (2016).

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

© The Author(s) 2016

Article 3

EZH2 is overexpressed in adrenocortical carcinoma and is associated with disease progression.

Hum. Mol. Genet. 25, 2789-2800.

Drelon C, Mathieu M, Berthon A, Ragazzon B, Kuick R, **Tabbal H**, Septier A, Rodriguez S, Batisse-Ligner M, Sahut-Barnola I, Dumontet T, Pointud J-C, Lefrançois-Martinez A-M, Baron S, Giordano J. T, Bertherat J, Martinez A & Val P. (2016b)

OXFORD

Human Molecular Genetics, 2016, Vol. 25, No. 13 2789–2800

doi: 10.1093/hmg/ddw136
Advance Access Publication Date: 5 May 2016
Original Article

ORIGINAL ARTICLE

EZH2 is overexpressed in adrenocortical carcinoma and is associated with disease progression

Coralie Drelon[1], Annabel Berthon[1,2,†], Mickael Mathieu[1,†], Bruno Ragazzon[3,†], Rork Kuick[4], Houda Tabbal[1], Amandine Septier[1], Stéphanie Rodriguez[1], Marie Batisse-Lignier[1,5], Isabelle Sahut-Barnola[1], Typhanie Dumontet[1], Jean-Christophe Pointud[1], Anne-Marie Lefrançois-Martinez[1], Silvère Baron[1], Thomas J. Giordano[6], Jérôme Bertherat[3], Antoine Martinez[1] and Pierre Val[1,*]

[1]CNRS, UMR6293, GReD, Inserm U1103, Clermont Université, F-63001 Clermont-Ferrand, France, [2]Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development, Bethesda, MD 20892-1103, USA, [3]Inserm U1016, CNRS UMR 8104, Université Paris Descartes, Institut Cochin, Paris, France, [4]Department of Biostatistics, University of Michigan Health System, Ann Arbor, MI 48109, USA, [5]Centre Hospitalier Universitaire, Service d'Endocrinologie, Faculté de Médecine, F- 63000 Clermont-Ferrand, France and [6]Department of Pathology, University of Michigan Health System, Ann Arbor, MI 48109, USA

*To whom correspondence should be addressed at CNRS UMR 6293 GReD, 24, avenue des Landais, 63171 Aubière Cedex, France. Tel: +33 4 7340 7412; Fax: +33 4 7340 7042; Email: pierre.val@univ-bpclermont.fr

Abstract

Adrenal Cortex Carcinoma (ACC) is an aggressive tumour with poor prognosis. Common alterations in patients include constitutive WNT/β-catenin signalling and overexpression of the growth factor IGF2. However, the combination of both alterations in transgenic mice is not sufficient to trigger malignant tumour progression, suggesting that other alterations are required to allow development of carcinomas. Here, we have conducted a study of publicly available gene expression data from three cohorts of ACC patients to identify relevant alterations. Our data show that the histone methyltransferase EZH2 is overexpressed in ACC in the three cohorts. This overexpression is the result of deregulated P53/RB/E2F pathway activity and is associated with increased proliferation and poorer prognosis in patients. Inhibition of EZH2 by RNA interference or pharmacological treatment with DZNep inhibits cellular growth, wound healing and clonogenic growth and induces apoptosis of H295R cells in culture. Further growth inhibition is obtained when DZNep is combined with mitotane, the gold-standard treatment for ACC. Altogether, these observations suggest that overexpression of EZH2 is associated with aggressive progression and may constitute an interesting therapeutic target in the context of ACC.

[†]All three authors contributed equally to this work.

Received: December 24, 2015. **Revised:** April 25, 2016. **Accepted:** April 25, 2016

© The Author 2016. Published by Oxford University Press.
All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com

Downloaded from https://academic.oup.com/hmg/article-abstract/25/13/2789/2525761
by BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE SECTION DROIT user
on 22 May 2018

Introduction

Adrenocortical carcinoma (ACC) is a rare tumour with an incidence of 0.5–2 new cases per million per year. However it is associated with poor prognosis. Half of the patients present with metastatic disease at diagnosis, which results in 5-year survival rates of 16–47%. Clinical management of ACC relies on surgical resection of the primary tumour and mitotane treatment alone or in combination with chemotherapy. However it is still ineffective in treating patients with metastases (1). It is thus essential to identify the causes of malignant progression in order to develop more effective therapeutic strategies.

Molecular analyses have shown that the two most frequent alterations in ACC are overexpression of IGF2 and constitutive activation of the Wnt/β-catenin signalling pathway (2,3). Using transgenic mouse models, we have shown that constitutive activation of β-catenin was sufficient to induce the development of benign tumours but not malignant progression (4). In contrast, overexpression of Igf2 alone had no oncogenic effect and only moderately accelerated tumour development in mice with constitutive β-catenin activation (5,6). This was consistent with the low efficacy of therapeutic strategies targeting IGF receptor in the context of ACC (7). Further alterations are thus required to allow malignant progression in adrenal cortex cancer.

Deregulation of epigenetic factors is frequently involved in tumour progression. This includes alteration of DNA methylation profiles, histone post-translational modifications (acetylation, methylation) and regulation by small and large non-coding RNAs that result in broad deregulations of gene expression. A number of studies have focused on the potential involvement of DNA methylation or deregulation of miRNA expression in ACC (reviewed in (8)). However, the potential role of factors controlling histone methylation has never been evaluated. In this article, we performed a screen of histone methyltransferases, demethylases and associated factors (9) in publicly available transcriptome data from ACC patients. We identified the methyl transferase EZH2 as the most deregulated histone modifier in adrenal cortex cancer. We show that overexpression of EZH2 is associated with tumour proliferation and poor prognosis in ACC patients. Conversely, inhibition of EZH2 by RNA interference or pharmacological treatment with DZNep inhibits cellular growth, wound healing and clonogenic growth and induces apoptosis of H295R cells in culture. These observations suggest that EZH2 may be involved in the progression of ACC and may constitute an interesting therapeutic target in the context of these devastating tumours.

Results

In order to identify novel contributors to adrenal cortex carcinoma progression, we conducted a retrospective analysis of publicly available micro-array data from Cochin and Michigan ACC patients' cohorts. Expression levels of a list of 58 histone modifying epigenetic factors (Supplementary Material, Fig. S1) were evaluated in ACC compared with normal adrenals (NAds) and adrenocortical adenomas in both cohorts. In this screen, EZH2 was the most significantly deregulated factor (Supplementary Material, Fig. S1), showing up-regulation in carcinomas compared with NAds and adenomas in both Cochin and Michigan cohorts (Fig. 1A). Overexpression of EZH2 in adrenal cortex carcinomas was further confirmed by RTqPCR (Fig. 1B) and western-blot analyses on a small independent cohort of 7 ACA and 7 ACC from the COrtico- et MEdullo-surrénale Tumeurs Endocrines (COMETE) network (Fig. 1C). EZH2 is the catalytic core protein in the Polycomb Repressor Complex 2 (PRC2), which catalyses the trimethylation of histone H3 lysine 27 (H3K27me3) and mediates silencing of its target genes (10). EZH2 expression is elevated in advanced prostate cancer (11), aggressive and metastatic breast cancer (12) and in most solid tumours and haematologic malignancies (13). This overexpression is often correlated with advanced stages of cancer and poor prognosis, which suggests that increased expression of EZH2 could be involved in progression of ACC. Interestingly, there was a significant correlation between *EZH2* accumulation and expression of both *Ki67* and *PCNA* in ACC patients of Cochin and Michigan cohorts, which was further supported by analysis of mRNAseq data from ACC patients enrolled in the The Cancer Genome Atlas (TCGA) programme (Fig. 1D). High *EZH2* expression was also significantly associated with poor overall survival in Cochin and TCGA cohorts when analyzed as a continuous variable (Cochin: $P = 0{,}0022$, hazard ratio (HR) = 2.27, 95% CI = 1.34–3.84; Michigan: $P = 0.12$, HR = 1.61, 95% CI = 0.89–2.93; TCGA: $p = 2.1 \times 10^{-9}$, HR = 3.07, 95% CI = 2.01–4.7) or after separation of ACC in three equivalent groups of high, medium and low *EZH2* expression, even though low and medium expression groups did not separate for Michigan and TCGA cohorts (Fig. 1E). The association of EZH2 overexpression with prognosis was further confirmed by the observation of significantly higher expression of EZH2 (Supplementary Material, Fig. S2) and enrichment of EZH2/EED/PRC2 oncogenic gene signatures (MSigDB C6 signature) in the C1A group of poor prognosis (14) when compared with C1B (Supplementary Material, Fig. S3). Altogether, these observations suggested that *EZH2* overexpression could be involved in the establishment of an aggressive tumour phenotype in the context of ACC.

Although the locus encoding *EZH2* is amplified in a number of cancers, there was no evidence for correlation between copy numbers and EZH2 expression in ACC (Supplementary Material, Fig. S4). Activating mutations of EZH2 have been described in B-cell lymphomas (15,16). However, there were no such alterations in Cochin and TCGA cohorts of ACC patients ((17) and Cbioportal). This suggested that increased accumulation of EZH2 in ACC could rely on its transcriptional control. *EZH2* expression is normally repressed by the P53/RB pathway (18,19). Consequently, inactivation of this pathway is associated with EZH2 overexpression in cancer. Consistent with this, ACC patients with inactivating mutations/deletions in *TP53* or *RB1* showed significantly higher EZH2 expression in both Cochin and TCGA cohorts (Fig. 2A). E2F transcription factors that are inhibited by RB (20), are stimulators of cell proliferation and positive regulators of *EZH2* expression (19). In humans, E2Fs are encoded by eight different genes (21,22). Analysis of their expression showed significant up-regulation of E2F1 and E2F8 in ACC from both Cochin and Michigan Cohorts (Fig. 2B and Supplementary Material, Fig. S5). Interestingly, expression levels of E2F1 and E2F8 were very significantly correlated with EZH2 expression in ACC from Cochin, Michigan and TCGA cohorts (Fig. 2C and Supplementary Material, Fig. S6). This suggested that E2F1 and eight could be positive regulators of EZH2 expression in ACC. To test this hypothesis, we decided to knockdown expression of both E2Fs in human ACC H295R cell lines. For this, H295R cells were transfected with siRNAs targeting EZH2, E2F1 or E2F8 alone or a combination of E2F1 and E2F8 siRNAs (Fig. 2D). As expected *EZH2* siRNAs induced a 40% reduction in both *EZH2* mRNA and EZH2 protein accumulation (Fig. 2D). Transfection of E2F1 and E2F8 siRNAs inhibited accumulation of their respective targets both at the mRNA (Supplementary Material, Fig. S7) and protein levels (Fig. 2D), whereas

Downloaded from https://academic.oup.com/hmg/article-abstract/25/13/2789/2525761
by BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE SECTION DROIT user
on 22 May 2018

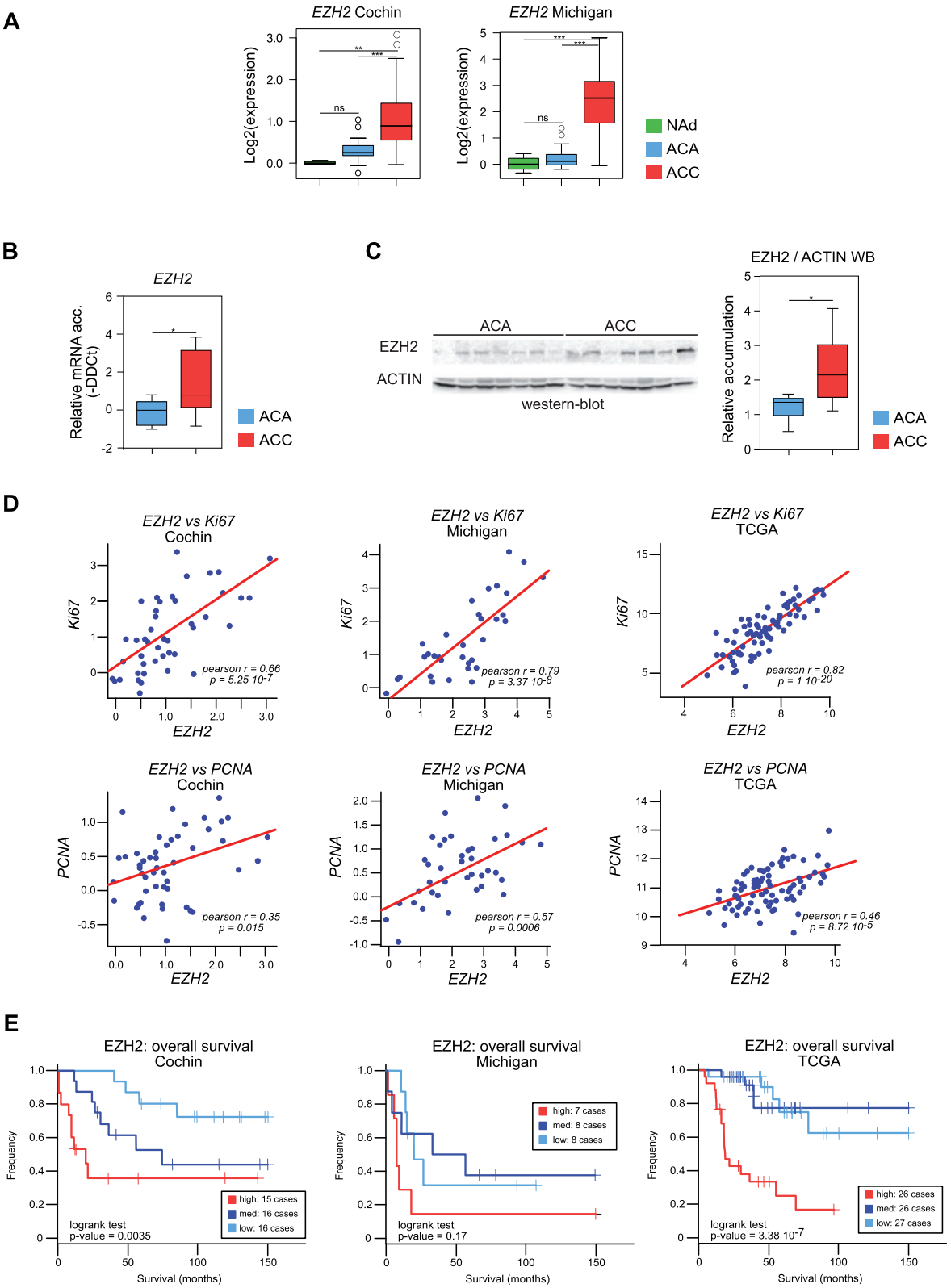


Figure 1. EZH2 is upregulated and associated with aggressive ACC in patients. **(A)** Expression levels of *EZH2* in patients. Boxplots represent the expression levels of *EZH2* in NAd (green), ACA (blue) and ACC (red), from two independent cohorts (Cochin and Michigan). **(B)** Expression of *EZH2* in an independent group of patients. mRNA accumulation of *EZH2* was evaluated by RTqPCR in 7 ACA and 7 ACC from the COMETE network. **(C)** EZH2 protein is overexpressed in ACC. Accumulation of EZH2 protein was evaluated by western blot in 7 ACA and 7 ACC from the COMETE network. **(D)** *EZH2* expression is correlated with *Ki67* and *PCNA*. Pearson correlation between log2 values of *EZH2* expression and expression of *Ki67* and *PCNA* genes in ACC from Cochin, Michigan and TCGA cohorts. *P*, *P*-value; r, Pearson correlation coefficient. **(E)** EZH2 overexpression is associated with poor prognosis. Graphs show Kaplan-Meier estimates of overall survival for patients with ACC, as a function of *EZH2* expression (divided as high, medium and low). The *P*-value of the log-rank test for differences between survival curves is shown.

Downloaded from https://academic.oup.com/hmg/article-abstract/25/13/2789/2525761
by BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE SECTION DROIT user
on 22 May 2018

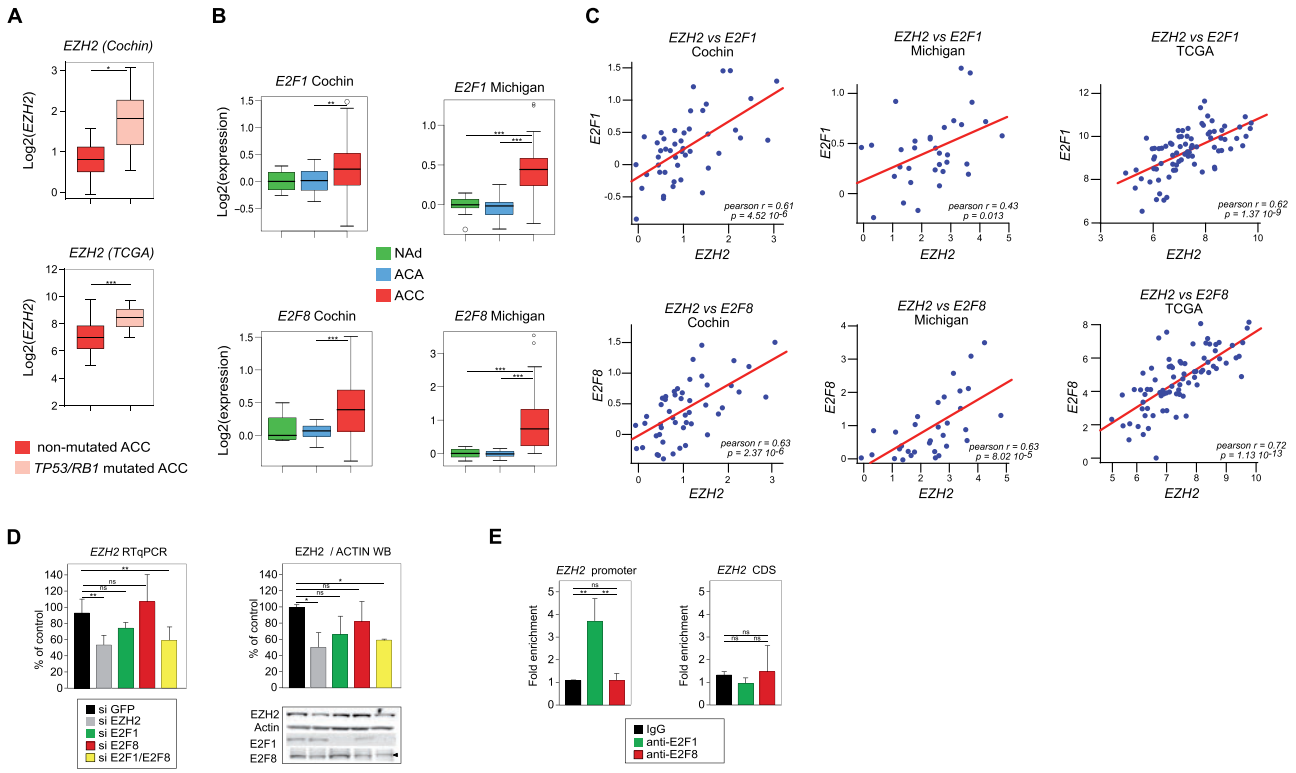


Figure 2. Expression of EZH2 is downstream of P53/RB/E2F in ACC. **(A)** EZH2 expression is higher in patients with inactivating mutations in *TP53/RB1*. Patients from Cochin and TCGA cohorts were separated in two groups based on the presence or absence of inactivating mutations in either *TP53* or *RB1* and relative expression levels of *EZH2* were calculated from micro-array and RNA seq data. Significance of the differential expression was evaluated by Student's *t* test. **(B)** E2F1 and E2F8 are up-regulated in ACC. Boxplots represent the expression levels of *E2F1* and *E2F8* in NAd (green), ACA (blue) and ACC (red), from two independent cohorts (Cochin and Michigan) **(C)** Expression of *EZH2* is correlated with expression of *E2F1* and *E2F8*. Pearson correlation between log2 values of *EZH2* expression and expression of *E2F1* and *E2F8* genes in ACC from Cochin, Michigan and TCGA cohorts. *P*, *P*-value; r, Pearson correlation coefficient. **(D)** Effect of E2F1 and E2F8 knockdown on EZH2 expression in H295R cells. H295R cells were transfected with siRNAs targeting GFP (negative control), *EZH2*, *E2F1*, *E2F8* or both *E2F1* and *E2F8*. After 5 days, expression levels of EZH2, E2F1 and E2F8 were determined by RTqPCR (*EZH2*, left panel) and western blot (EZH2, E2F1, E2F8, right panel). Bars represent the mean of at least four experiments performed in triplicate ± SD. **(E)** Analysis of E2F1 and E2F8 recruitment on EZH2 promoter. Recruitment of E2F1 and E2F8 on EZH2 promoter in H295R cells was evaluated by ChIP with E2F1 and E2F8 antibodies. Bars represent the mean of RTqPCR quantification of three independent ChIP experiments ± SD. These were obtained with primers within *EZH2* promoter, surrounding four putative E2F response elements (*EZH2* promoter) (19) or with primers within *EZH2* coding region (negative control).

combination of both siRNAs resulted in simultaneous down-regulation of both targets to about 50% of their control levels (Supplementary Material, Fig. S7). Interestingly, knockdown of E2F1 resulted in a mild reduction in the accumulation of EZH2 mRNA (Fig. 2D). Although the knockdown of E2F8 alone had no effect on EZH2 accumulation, the combination of both E2F1 and E2F8 siRNAs was associated with a 40% reduction in both mRNA and protein accumulation, which was comparable with the effect of EZH2 siRNA (Fig. 2D). Altogether, these experiments suggested that E2Fs positively controlled EZH2 expression in H295R cells. Even though E2F8 was described as a repressor of E2F1 target genes (22), there was no increase in EZH2 expression following E2F8 knockdown (Fig. 2D). To further establish a role of E2Fs in controlling EZH2 expression in H295R cells, we performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments with E2F1 and E2F8 antibodies. Consistent with knockdown experiments, ChIP analyses showed that E2F1, but not E2F8 was markedly enriched on EZH2 regulatory regions (Fig. 2E). This suggested that E2F1, but not E2F8 played a direct role in controlling EZH2 expression. We thus concluded that EZH2 expression was downstream of the P53/RB/E2F pathway in ACC.

Both EZH2 and E2Fs have been associated with cell proliferation. Consistent with a role of EZH2 in stimulating proliferation of adrenocortical cells, gene set enrichment analysis (GSEA) showed a very robust association between *EZH2*-correlated genes and both cell cycle and DNA replication pathways in ACC patients from Cochin, Michigan and TCGA cohorts (Fig. 3A and Supplementary Material, Fig. S8). To confirm this, we evaluated H295R cell growth after siRNA-mediated knockdown of EZH2. For this, H295R cells were transfected with three different EZH2 siRNAs and cell growth was calculated after 5 days in culture. As expected, the three siRNAs induced a robust reduction in EZH2 protein accumulation (Fig. 3B and Supplementary Material, Fig. S9A), which was associated with a significant reduction in total H3K27me3 levels for two of them (Fig. 3B and Supplementary Material, Fig. S9A), consistent with EZH2 activity within PRC2 complex. Interestingly, this was correlated with a 40% reduction in H295R cells growth after 5 days, which suggested that EZH2 was involved in controlling proliferation/apoptosis in ACC cell lines (Fig. 3B). Consistent with a role of E2F1 in stimulating EZH2 expression, knockdown of E2F1 alone or in combination with E2F8 also reduced H295R cell growth (Fig. 3C). However, isolated E2F8 knockdown also showed an effect on cell growth (Fig. 3C), even though it had no effect on EZH2 expression (Fig. 2D) or E2F1 expression (Supplementary Material, Fig. S7).

To further evaluate the role of EZH2 in H295R cells homeostasis, we elected to use DZNep, a pharmacological inhibitor that circumvents the toxicity resulting from transfection of siRNAs. As expected (23), treatment with DZNep inhibited EZH2

Downloaded from https://academic.oup.com/hmg/article-abstract/25/13/2789/2525761
by BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE SECTION DROIT user
on 22 May 2018

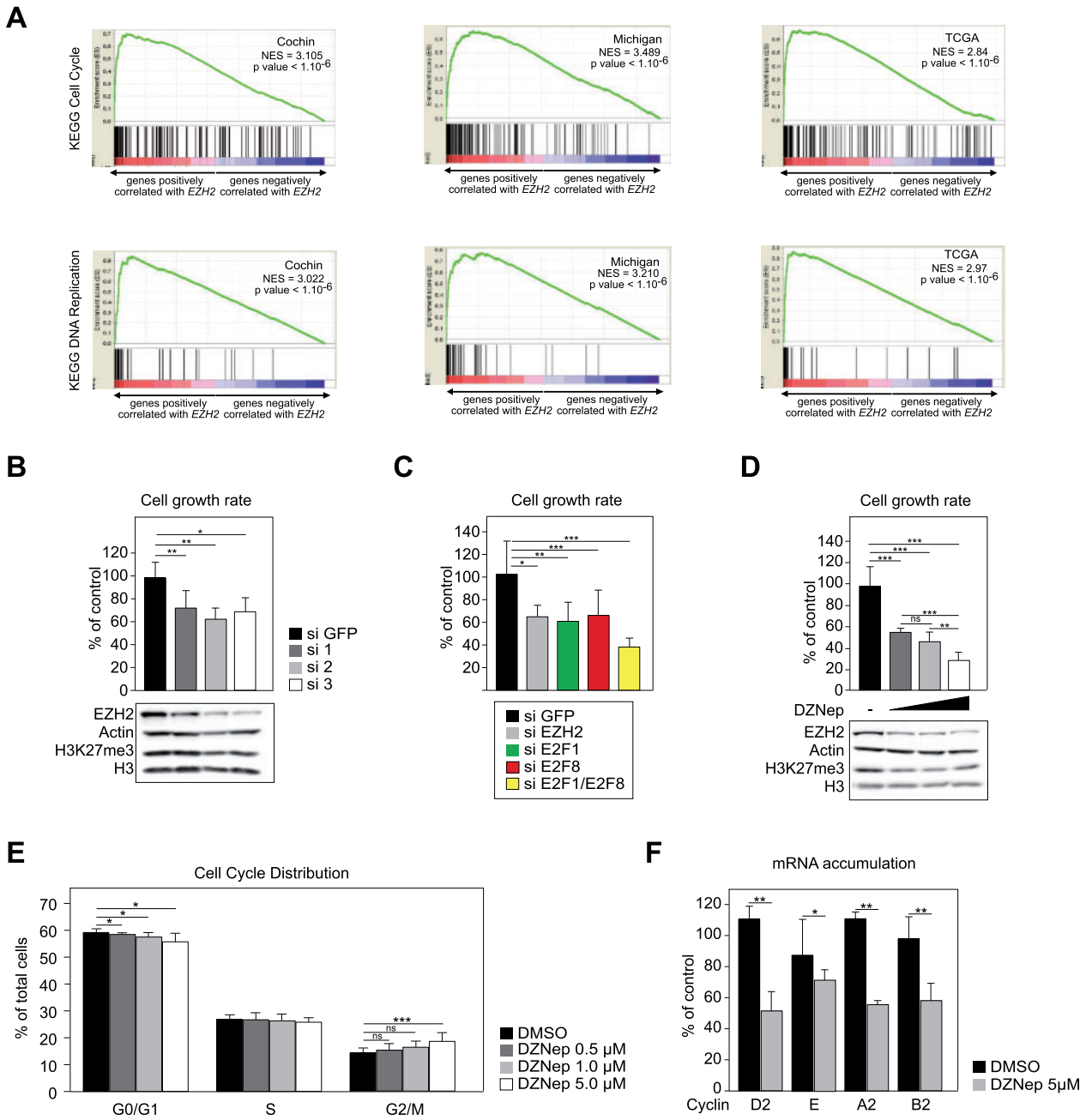


Figure 3. EZH2 overexpression is associated with ACC cell growth. **(A)** Overexpression of EZH2 is associated with cell cycle and DNA replication in ACC patients. GSEAs show a strong association between *EZH2* overexpression and both cell cycle and DNA replication KEGG pathways in patients from Cochin, Michigan and TCGA cohorts. NES, normalized enrichment score. **(B)** siRNA-mediated knockdown of EZH2 reduces H295R cell growth. H295R cells were transfected with siRNAs targeting GFP (si GFP, negative control) or three different siRNAs targeting *EZH2* (Si 1/2/3). Cell growth rate (top panel) was evaluated by counting live cells 5 days after transfection. Bottom panel shows corresponding accumulation of EZH2, Actin, H3K27me3 and histone H3, analysed by western blot. **(C)** siRNA-mediated knockdown of E2Fs reduces H295R H295R cell growth. H295R cells were treated as in Figure 2D and cell growth rate was determined 5 days after transfection. **(D)** Pharmacological inhibition of EZH2 with DZNep in H295R cells. H295R cells were treated with DMSO or increasing amounts of DZNep (0.5, 1.0 and 5.0 μM) for 5 days. Cell growth rate was then evaluated by counting live cells (top panel). Bottom panel shows corresponding accumulation of EZH2, Actin, H3K27me3 and histone H3, analysed by western blot. **(E)** DZNep treatment partially blocks H295R cells in G2/M. H295R cells were treated as in D and trypsinized after 5 days. They were then incubated with propidium iodide and analysed by flow cytometry to establish their distribution in the different phases of the cell cycle. Bars represent the mean of three independent experiments performed in triplicate ± SD. **(F)** DZNep treatment inhibits expression of *Cyclins*. H295R cells were treated with 5 μM DZNep for 5 days and expression of *Cyclin D2*, *E*, *A2* and *B2* was evaluated by RTqPCR. Bars represent the mean of at least four experiments performed in triplicate ± SD. Statistical analysis was performed by Student's *t* test. In A-C, Growth rates are shown relative to control (si GFP) transfected cells and represent the mean of at least four experiments ± SD.

expression and total H3K27me3 accumulation (Fig. 3D and Supplementary Material, Fig. S9B). This was also associated with a dose-dependent decrease in cell growth, which was inhibited by 70% for the highest dose that we evaluated (Fig. 3D). A similar effect of DZNep was also observed in SW13 cells, a highly undifferentiated ACC cell line (24) (Supplementary Material, Fig. S10). In H295R cells, growth inhibition was associated with a partial block in the G2/M phase of

Downloaded from https://academic.oup.com/hmg/article-abstract/25/13/2789/2525761
by BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE SECTION DROIT user
on 22 May 2018

the cell cycle and a concomitant reduction in the number of cells in the G0/G1 phase (Fig. 3E). RT-qPCR analysis further showed a significant decrease in expression of Cyclin D2, E A2 and B2 in response to 5 μM DZNep (Fig. 3F).

The potential role of EZH2 in aggressive behaviour of ACC cells in culture was further suggested by a 40% inhibition in their wound healing capacity after treatment with 5 μM DZNep (Fig. 4A). This treatment was also associated with a complete absence of clonogenic growth in soft agar, suggesting that inhibition of EZH2 restored anoikis in H295R cells (Fig. 4B). This also increased apoptosis by 50% (Fig. 4C), which was associated with increased Caspase 3 activity (Fig. 4D) and decreased expression of anti-apoptotic factors *BCL2*, *BCL-XL* and *BIRC5* (Fig. 4E). Interestingly, Z-VAD-FMK, a pan-Caspase inhibitor, almost completely reversed the inhibitory effect of DZNep on H295R cells growth (Fig. 4F), which confirmed the contribution of apoptosis to the cytostatic effect of DZNep. Altogether, these experiments suggested that inhibition of EZH2 could represent a potentially interesting option in the context of ACC.

To further evaluate the therapeutic potential of EZH2 inhibition, we evaluated its effect in combination with mitotane, the gold-standard treatment of ACC. We elected to use 5 μM DZNep (40% growth rate reduction, Fig. 5A) and two doses of mitotane that induced 35 (10 μM) and 60% (20 μM) growth rate reductions

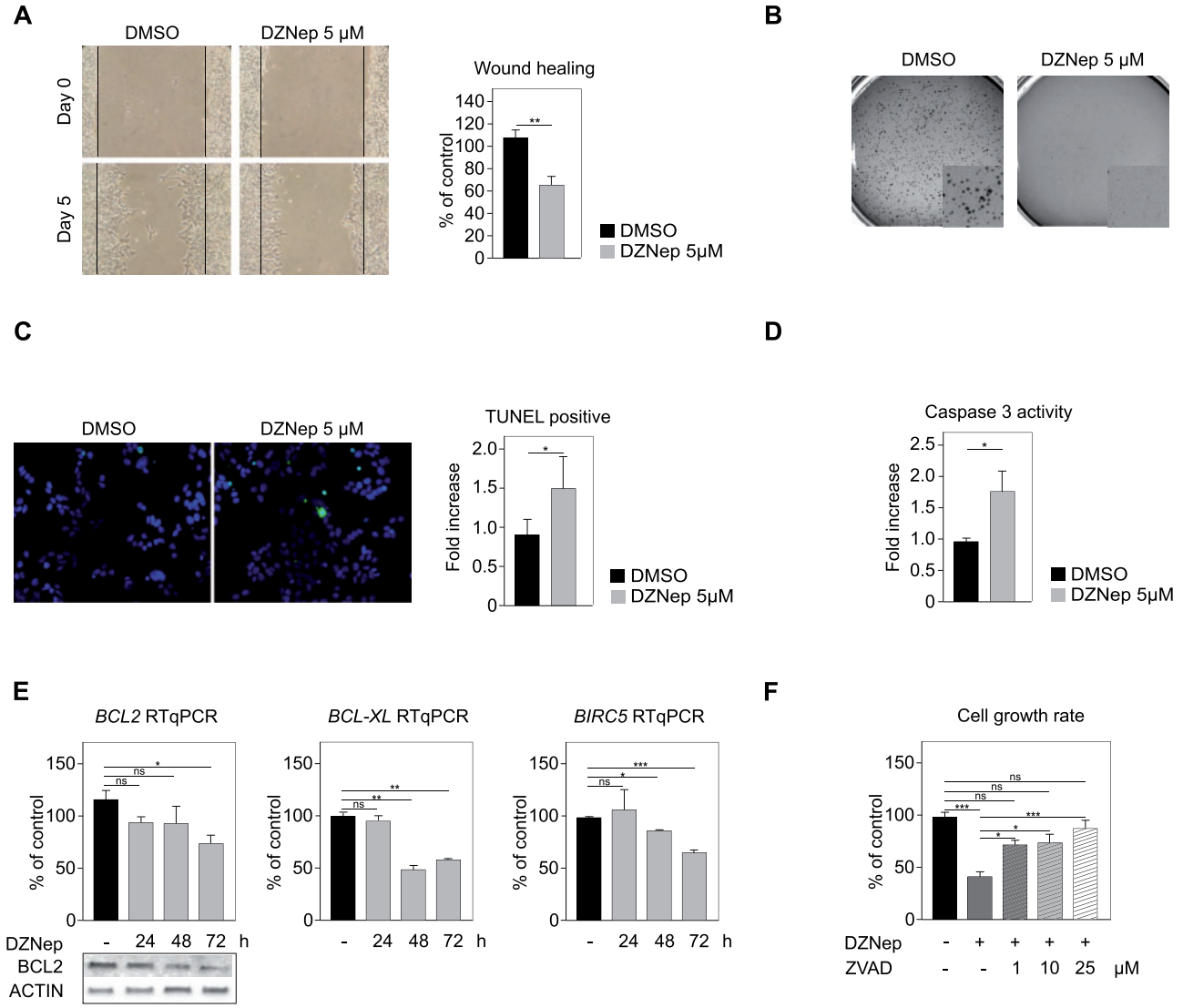


Figure 4. EZH2 inhibition inhibits aggressive behaviour and induces apoptosis of H295R cells. **(A)** DZNep inhibits wound healing capacity. A confluent monolayer of H295R cells was wounded with a tip and cells were allowed to heal the wound. Size of the wound was measured after 5 days in culture in the presence of DMSO or 5 μM DZNep. Left panel shows a typical experiment. Right panel: wound healing was quantified as a percentage of control DMSO-treated cells healing capacity. **(B)** DZNep blocks clonogenic growth in soft agar. Diluted H295R cells (1.10^4/well) were allowed to form clones in soft agar for 15 days. DZNep treatment completely prevented clonogenic growth. **(C)** DZNep induces apoptosis. H295R cells were grown on coverslips and treated with DMSO or 5 μM DZNep for 48 h. Apoptosis was detected by TUNEL staining (left panel). TUNEL-positive cells in DZNep treatment group are expressed relative to control group. **(D)** DZNep activates Caspase 3. H295R cells were treated for 48 h with DMSO or 5 μM DZNep and Caspase 3 activity was determined by a colorimetric assay. **(E)** DZNep inhibits expression of anti-apoptotic factors. H295R cells were treated for 24, 48 and 72 h with DMSO or 5 μM DZNep and expression of *BCL2*, *BCL-XL* and *BIRC5* was evaluated by RTqPCR. Bars represent the mean of 4 experiments performed in triplicate ± SD. Bottom panels show corresponding accumulation of BCL2, and ACTIN analyzed by western-blot in the same experiments. **(F)** Z-VAD-FMK reverses the growth inhibitory effect of DZNep. H295R cells were treated with DZNep alone or a combination of DZNEp and increasing doses of Z-VAD-FMK, a pan-caspase inhibitor, for 5 days. Cell growth rate was then evaluated by counting live cells. Bars represent the mean of four experiments performed in triplicate ± SD.

Downloaded from https://academic.oup.com/hmg/article-abstract/25/13/2789/2525761
by BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE SECTION DROIT user
on 22 May 2018

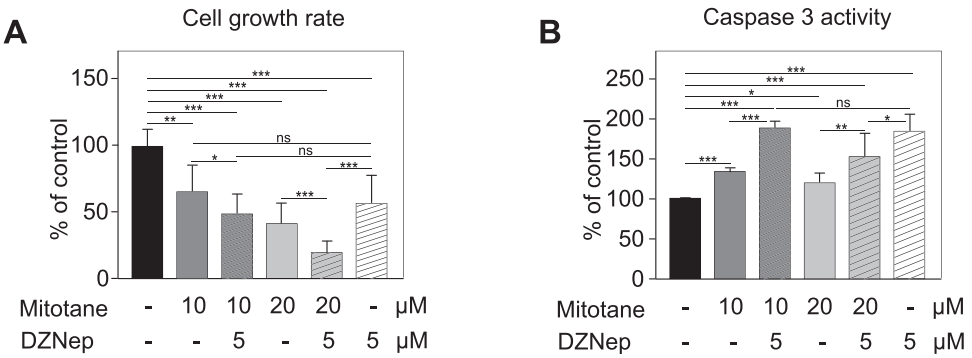


Figure 5. DZNep and mitotane have additive effects on H295R growth inhibition. **(A)** Effect of DZNep and mitotane on H295R cell growth. H295R cells were grown for 5 days with DMSO, Mitotane alone (10 or 20 μM), DZNep alone (5 μM) or a combination of 10 or 20 μM Mitotane with 5 μM DZNep. Cell growth rate was then evaluated by counting live cells. **(B)** Effect of DZNep and mitotane on Caspase 3 activity. H295R cells were treated as in A and Caspase 3 activity was evaluated by a colorimetric assay. In A-B, Growth rates and Caspase 3 activity are shown relative to control DMSO-treated cells and represent the mean of at least four experiments ± SD.

(Fig. 5A). Interestingly, the combination of 10 μM mitotane and 5 μM DZNep induced a more significant growth rate reduction than 10 μM mitotane alone (Fig. 5A), which did not result from decreased *EZH2* expression following mitotane treatment (Supplementary Material, Fig. S11). The combined effect was more evident when cells were treated with 20 μM mitotane and 5 μM DZNep. This induced an 80% reduction in cell growth rate, which was significantly different from the effect of 20 μM mitotane or 5 μM DZNep alone (Fig. 5A). In contrast with 10 μM treatment, high concentration of mitotane was associated with significantly decreased *EZH2* expression (Supplementary Material, Fig. S11). Altogether, these experiments showed that the combination of DZNep and mitotane was more efficient than one or the other compound alone to inhibit growth of H295R cells. We then evaluated their capacity to induce apoptosis by measuring Caspase 3 activity (Fig. 5B). Mitotane or DZNep significantly induced apoptosis. However, in contrast with their effect on proliferation, the combination of both compounds was not more efficient than DZNep alone to induce apoptosis (Fig. 5B).

Discussion

In this article, we show that histone epigenetic regulators and in particular EZH2, are strongly deregulated in adrenal cortex carcinomas compared with adenomas and NAds. *EZH2* encodes the methyl transferase of Polycomb Repressive Complex 2, which catalyses the tri-methylation of lysine 27 of histone H3. Our data show that it is overexpressed and correlated with proliferation and poor prognosis in ACC. We further show that siRNA-mediated knockdown and pharmacological inhibition of EZH2 are associated with decreased proliferation and aggressiveness as well as increased apoptosis of H295R ACC cells in culture.

To the best of our knowledge, this is the first demonstration of the role of a histone-modifying enzyme in adrenal tumourigenesis. EZH2 overexpression is associated with tumour progression in a variety of cancers including solid tumours and haematologic neoplasia (13). Our data strongly suggest that this is also the case in ACC, which is further supported by data from Sidhu's group (25). Interestingly, DZNep treatment of H295R cells induces a concomitant decrease in EZH2 expression and H3K27me3 accumulation, which is correlated with cell growth inhibition and induction of apoptosis. We further show that combination of DZNep with Mitotane, the gold-standard treatment for ACC is more effective at reducing H295R cell growth than either compound alone. Although DZNep is also capable of inhibiting methyl-transferases other than EZH2 (23), our preliminary data using GSK126, a highly selective EZH2 inhibitor (26), show a comparable effect on H295R cell growth (Supplementary Material, Fig. S12A). Altogether, these data suggest that EZH2 inhibition may be effective at inhibiting tumour growth in patients. This approach may prove feasible as compounds such as GSK2816126 (NCT02082977, (26)), EPZ-6438 (NCT01897571, (27)) or CPI-1205 (NCT02395601) have entered phase I clinical trials for lymphomas and advanced solid tumours.

The mechanisms that result in EZH2 overexpression in tumours are still unclear. Here we show that the transcription factor E2F1 is overexpressed in ACC, correlated with EZH2 within ACC samples and stimulates expression of EZH2 in vitro. This is consistent with previously published data showing that E2Fs control expression of EZH2 in MEFs (19) and fibroblasts (18) but also in bladder cancer (28). Interestingly, experimental evidence suggests that EZH2 could positively control expression and/or activity of E2Fs, which would constitute a feed-forward loop involved in tumour cell growth (27,29–32). Even if we cannot exclude such a scenario for some members of the E2F family, our data show no alteration of *E2F1* or *E2F8* expression following EZH2 knockdown in H295R cells (Supplementary Material, Fig. S5). Consistent with the central role of the TP53/RB/E2F cascade in the progression into S-phase, we show that high expression of E2F1 and to a lesser extent E2F8 is correlated with poor prognosis in ACC patients (Supplementary Material, Table S3). Furthermore, knockdown of E2F1 or E2F8 results in decreased H295R cell growth, suggesting that E2Fs may be involved in adrenal cortex tumour progression. This effect could involve direct regulation of EZH2 expression in the case of E2F1. However, knockdown of E2F8 had no effect on EZH2 expression (Fig. 2), which indicates that E2F8 in particular and probably other E2Fs stimulate proliferation of ACC cells through EZH2-independent mechanisms. Although this highlights E2Fs as interesting therapeutic targets in ACC, drugs targeting E2Fs are scarce (33) and may be ineffective in light of the complex effects of different E2F family members on cell cycle progression and cell growth (34). This emphasizes downstream E2Fs targets, such as EZH2, as better candidates for ACC treatment.

Consistent with data from the literature (19), our experiments show decreased expression of a number of *Cyclin* coding genes following EZH2 inhibition in H295R cells (Fig. 3F and Supplementary Material, Fig. S12B). Whether these are direct targets of EZH2 remains to be determined. Canonical activity of EZH2/PRC2 complex is to repress transcription of target genes

Downloaded from https://academic.oup.com/hmg/article-abstract/25/13/2789/2525761
by BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE SECTION DROIT user
on 22 May 2018

by catalysing tri-methylation of histone H3 on lysine 27 (H3K27me3). This serves as a docking platform for Polycomb PRC1 complex that monoubiquitinylates histone H2A at Lysine 119 (H2AK119ub), which maintains gene repression. This activity has been shown to repress expression of tumour suppressors (35) such as *DAB2IP*, *SLIT2*, *TIMP-3*, *MSMB* and *NKX3.1* in the prostate (35,36) or *RUNX3*, *FOXC1*, *RKIP*, *CIITA*, *IL-6*, *IL-8* and *CDKN1C* in breast tumours (36), which directly links overexpression of EZH2 with tumour growth. The decrease in *Cyclin* genes expression following EZH2 inhibition is thus incompatible with recruitment of PRC2 repressive activity on their promoters. However, recent data have identified novel activities of EZH2 that are independent of PRC2 complex. Indeed, after phosphorylation by Akt at serine 21, EZH2 has been shown to associate with and methylate the androgen receptor AR in advanced castration-resistant prostate cancer. This results in transcriptional induction through AR rather than inhibition (37). EZH2 has also been shown to stimulate transcriptional activity of STAT3 through methylation, which promotes tumourigenicity of glioblastoma stem-like cells (38). Therefore, EZH2 is capable of both transcription repression and activation depending on its partners and its serine 21-phosphorylation status. Which of these activities is mobilized in the context of ACC, will have to be determined.

We and others have shown that WNT signalling pathway plays a crucial role in adrenal cancer development (2,4–6,39). Interestingly, EZH2 has been shown to modulate WNT signalling in various tissues. Indeed, it represses *AXIN2*, a WNT repressor, in parathyroid cell lines (40) and it enhances WNT signalling in a β-catenin/PAF/EZH2 complex, independently of its methyltransferase activity in the intestine (41). EZH2 also activates WNT signalling in hepatocellular carcinoma by inhibiting expression of WNT antagonists such as AXIN2, NKD1, PPP2R2B, PRICKLE1, SFRP5 (42) and CXXC4 (43). However, it can also repress WNT signalling to facilitate adipogenesis, by inhibiting expression of a number of WNT ligands (44). Furthermore, EZH2 directly binds the promoters and represses the expression of *CTNNB1* and *LEF1* in human embryonic fibroblasts (45). Therefore, understanding the potential role of EZH2 in WNT signalling modulation in ACC, will require careful evaluation of the possible crosstalks between the two pathways.

In most cancer types, EZH2 has been proposed to play a role in tumour progression rather than initiation (11–13). Consistent with this idea, mouse models of EZH2 overexpression in mammary epithelium (46) or in haematopoietic stem cells (47) have failed to induce *bona fide* cancer development. However, overexpression of EZH2 in morphologically normal breast tissue is a good predictor of future neoplastic development (48), suggesting that it is involved in the establishment of a pre-cancerous state. Consistent with this idea, *EZH2* is amplified and overexpressed in both benign and malignant parathyroid tumours (40). Our data show that *EZH2* is already overexpressed in adrenocortical adenomas in both Cochin and Michigan cohorts (Fig. 1B). Although overexpression in these benign tumours is much lower than in ACC, it suggests that EZH2 may also participate in benign tumour development. Even though integrative genomic approaches suggest that ACA are not precursors of ACC (49), it may be interesting to determine whether those ACA with increased *EZH2* expression may represent a more aggressive adenoma phenotype or even a precancerous state. Defining the precise role of EZH2 in adrenal tumour development and progression will require development of genetically engineered mouse models.

In conclusion, we have shown that the histone methyltransferase EZH2 is overexpressed in adrenal cortex cancer and that its inhibition may constitute an interesting therapeutic approach.

Materials and Methods

Cell culture

Human H295R ACC cells and SW13 cells were cultured in DMEM/Ham's F12 supplemented with 10% foetal bovine serum (S1800-500, Biowest), 2 mM L-Glutamine (ref. 25030, Gibco), 50 U/ml penicillin, 50 mg/ml streptomycine and 1× Insulin/Transferrin/Selenium (ref. 41400-045, Gibco).

Transfections and treatments

For siRNA-mediated knockdown of EZH2, E2F1 and E2F8, H295R were seeded at a density of 4.10^5 cells per well in 6-wells plates (no. 353046, BD Falcon). Cells were then transfected twice within 48h with Effectene using 100 pmol siRNA per well, following manufacturer's instructions. siRNA sequences were: siGFP: ACUACCAGCAGAACACCCCUU; siEZH2-1: CAGAGAAUGUGGAU UUAUA; siEZH2-2: Silencer Select (s4917, Ambion Life Technologies); siEZH2-3: ON-TARGET plus SMART pool (J-0042 18-07, Dharmacon); siE2F1 (sc-29297, Santa Cruz Biotechnology); siE2F8 (sc-96849, Santa Cruz Biotechnology).

For pharmacological EZH2 inhibition, H295R cells were seeded as above and treated with increasing doses (0.5, 1.0, 5.0 μM) of DZNep (102052-95-9, Cayman Chemical) for 48–120 h in complete culture medium, which was changed every 24h. Mitotane (Sigma-Aldrich) treatment was conducted in a similar way with 10 or 20 μM doses. GSK126 (S7061, Selleckchem) treatment was conducted in a similar way, with increasing doses (0.5, 1.0, 5.0, 10 μM). In all experiments, control cells were treated with equivalent amounts of DMSO.

For inhibition of Caspases, H295R cells were treated as described above with 5 μM DZNep alone or in combination with increasing doses (1.0, 10, 25 μM) of Z-VAD-FMK (S7023, Selle ckchem), a pan-caspase inhibitor, for 120 h.

Real-time quantitative PCR

Total RNAs from patients' tissues and H295R cells were extracted with RNAII nucleotide extraction kit (Macherey Nagel), following manufacturer's instructions. One microgram of total mRNAs was reverse transcribed for 1 h at 37 °C with 5 pmoles of random hexamers primers, 200 U reverse transcriptase (M-MLV RT, M1701, Promega), 2 mM dNTPs and 20 U RNAsin (N2615, Promega). One microliter of a one-tenth dilution of cDNA was used in each quantitative PCR reaction. All reactions were conducted with SYBR qPCR Premix Ex Taq II Tli RNase H+ (TAKRR820W, Takara). Primer pairs are listed in Supplementary Material, Table S1. For each experiment and primer pairs, efficiency of PCR reactions was evaluated by amplification of serial dilutions of a mix of cDNAs. Relative gene expression was normalized to ACTIN by the ΔΔCt method. Statistical analyses were directly conducted on ΔΔCt values.

Protein extraction and western blot analyses

Proteins from H295R cells or patients samples were extracted with nuclear lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.1, 10 mM EDTA and 1% SDS) supplemented with protease inhibitors (Complete,

Downloaded from https://academic.oup.com/hmg/article-abstract/25/13/2789/2525761
by BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE SECTION DROIT user
on 22 May 2018

11-697-498-001, Roche). Thirty micrograms of total proteins were separated by SDS-PAGE electrophoresis and transferred to a nitrocellulose membrane and detected with antibodies to EZH2 (1/1000, no. 3147, Cell Signaling Technology), H3K27me3 (1/1000, no. 07-449, Merck Millipore), E2F1 (1/1000, 05-379, Millipore), E2F8 (1/1000, ab109596, Abcam) and BCL2 (1/1000, no. 2876, Cell Signaling Technology). EZH2, E2F1, E2F8 and BCL2 accumulation levels were normalized to actin (1/500, no. A2066, Sigma Aldrich). H3K27me3 was normalized to histone H3 (1/1000, no. C-16, Santa Cruz Biotechnology).

Chromatin immunoprecipitation

H295R cells ChIP was performed as previously described in (50). E2F1 and E2F8 were immunoprecipitated with 5 μg anti-E2F1 (05-379, Millipore) and 5 μg anti-E2F8 (ab109596, Abcam). Rabbit IgGs (kch-504-250, Diagenode) were used as a control. Enrichment of *EZH2* promoter in precipitates was detected by RTqPCR using primers pEZH2-Fwd 5′- GGGCCAAATAAAA GCGATGG-3′ and pEZH2-Rev 5′-CTGCCTTCTGAGTCCCACCG-3′ as described by Bracken *et al*. (19). Negative control primers (EZH2-neg-Fwd 5′- GGAGTTTGCTGCTGCTCTCACCG-3′; EZH2-neg-Rev 5′-CCCGTTTCAGTCCCTGCTTCCC-3′) were designed within the coding region of *EZH2*. Results are expressed as fold-enrichment over control IgG.

Measure of cell growth and cell cycle analysis

H295R cell growth rate was determined by calculating the ratio of live H295R cells after treatment over the number of cells initially seeded. It was then expressed as a relative value over control DMSO-treated group. For knockdown experiments, cells were counted 5 days after the first round of siRNA transfection. For pharmacological inhibition, cells were counted 5 days after initiation of treatment. These experiments were repeated at least four times with triplicate samples.

For cell cycle analysis, H295R cells were trypsinized after 5 days and centrifuged. Pellets were resuspended in a solution of 100 μg/ml RNAse A and 25 μg/ml Propidium Iodide. Cell cycle distribution was determined by analysing propidium incorporation by flow cytometry. At least 15 000 events were measured for each sample. These experiments were repeated three times with triplicate samples.

Detection of apoptosis by TUNEL assay

H295R cells were seeded at a density of 4×10^5 per well (six-well plates) on glass coverslips. After 48 h treatment, cells were fixed with 4% PFA for 30 min at room temperature. Cells were then permeabilized with 0.1% Triton X-100. Cells were then incubated for 1h at 37 °C with a mix of 20 U/μl TdT (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, EP0162, Thermo Scientific), 1 mM Biotin-11-dUTP (R0081, Thermo Scientific) and 1 mM ATP in TdT buffer. Following DNA end labelling, cells were incubated at room temperature for 1h with Streptavidin-HRP (1/1000, Jackson ImmunoResearch). HRP was then detected with Tyramide Signal Amplification following manufacturer's instructions (TSA-Alexa488, T-20932, Life Technologies). Nuclei were counterstained with Hoechst 33342. Apoptotic rate was determined by counting the number of TUNEL-positive cells on 5 high power fields (40×) for each slide. The data are expressed as the ratio of TUNEL-positive cells in DZNep treated cells over control DMSO-treated cells. These experiments were performed three times with triplicate samples.

Detection of Caspase 3 activity

H295R cells were seeded at a density of 4×10^5 per well (six-well plates). After 48 h treatment, cells were lysed and Caspase 3 activity was determined using a Caspase 3 colorimetric assay kit, following manufacturer's instructions (ALX-850-215-KI01, Enzo Life Sciences). Data were expressed as Caspase 3 activity in DZNep-treated group, relative to control DMSO-treated group. These experiments were performed three times with triplicate samples.

Clonogenic growth assay

H295R cells were seeded at a density of 4×10^5 per well (six-well plate). After 24 h, cells were treated with DZNep (5 μM) or DMSO for 48 h. They were then trypsinized and resuspended at a density of 1×10^4 cells/ml of a 0.45% agar solution in DMEM/Ham's F12, in the presence of 5 μM DZNep or DMSO. One ml of this suspension was seeded on 1 ml of a 0.75% agar base (per well) that had been allowed to settle in six-well plates. After 15 days in culture, cell colonies were fixed with 4% PFA and stained with crystal violet. These experiments were performed three times with triplicate samples.

Wound healing assay

H295R cells were seeded at a density of 3.5×10^6 per well in six-wells plates. After 48 h, the confluent monolayer was wounded with a 10μl pipette tip. Cells were then treated with DZNep 5 μM or DMSO for 5 days. After treatment, wound healing was measured with Image J. These experiments were performed three times with triplicate samples.

Patient's samples

We obtained frozen adrenal tumour samples through the COMETE network from patients who underwent adrenal surgery for adrenal cortex adenoma (7 ACA) or adrenal cortex carcinoma (7 ACC). The clinical and biological characteristics of the patients are summarized in Supplementary Material, Table S2. Methods for screening and criteria for diagnosing adenomas and carcinomas were in agreement with institutional guidelines. All patients gave written informed consent to participate to the study.

Patients' data analysis

Three independent cohorts of adrenocortical tumours were used: Cochin cohort included 47 ACC, 41 ACA and 4 NAds (Gene Expression Omnibus (GEO) dataset GSE49280 and ArrayExpress dataset E-TABM-311); Michigan Cohort included 33 ACC, 22 ACA and 10 NAd (GEO dataset GSE33371) and TCGA cohort included 79 ACC (http://gdac.broadinstitute.org, last accessed May 07, 2016, mRNA sequencing data, 2015_08_21 release). For Cochin and Michigan cohorts all samples were normalized in batches, independently for each chip type, using the RMA algorithm (Bioconductor *affy* package), and probe set intensities were then averaged per gene symbol. For both of these data-sets, each gene was centred to the median of the NAd samples. For TCGA cohort, mRNA sequencing data were extracted from Broad Institute GDAC Firehose (TCGA data version 2015_08_21) and all calculations were performed on Log2 values of RSEM normalized read

Downloaded from https://academic.oup.com/hmg/article-abstract/25/13/2789/2525761
by BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE SECTION DROIT user
on 22 May 2018

counts. Differential expression was measured with moderated F-test (limma R package) and all *P* values were adjusted using the Benjamini–Hochberg correction method. Survival curves were obtained by the Kaplan-Meier method. Differences in survival were assessed with the log-rank test. Data on EZH2 copy numbers and EZH2 expression were extracted from C-Bioportal (http://www.cbioportal.org, last accessed May 07, 2016). Mutational data for TP53 and RB1 were previously described for Cochin cohort (17) and were extracted from C-Bioportal for TCGA cohort. Only potentially inactivating mutations were considered in the analysis (exclusion of missenses). All analyses were performed using R 3.0.3 with custom scripts. GSEA (51) were performed with gene expression data from Cochin, Michigan and TCGA cohorts and with BioCarta (http://cgap.nci.nih.gov/Pathways/BioCarta_Pathways, last accessed May 07, 2016), KEGG (http://www.genome.jp/kegg/genes.html, last accessed May 07, 2016) and oncogenic signatures (MsigDB C6, http://software.broadinstitute.org/gsea/msigdb/collections.jsp#C6, last accessed May 07, 2016) gene sets. Significance was set at $P < 0.05$ (represented by * in figures); $P < 0.01$ (**) and $P < 0.001$ (***).

Statistical analyses of experimental data

Experimental data were processed with R. All data were analyzed in Log2 space. Two groups comparisons were analysed by Student's t test or Mann-Whitney test. All bars represent mean ± SD. Multiple group comparisons were analysed by two-way ANOVA procedures with terms for each condition and each experiment. Significance was set at $P < 0.05$. (represented by * in figures); $P < 0.01$ (**) and $P < 0.001$ (***).

Supplementary Material

Supplementary Material is available at *HMG* online.

Acknowledgements

We wish to thank Jean-Paul Saru for western blot analyses, Dr Adrian P. Bracken (Smurfit Institute, Dublin) for providing sequences of ChIP primers, Dr Marc Lombes and Dr Ségolène Hescot (UMR-S1185, Paris) for providing SW13 cells.

Conflict of Interest statement. None declared.

Funding

This work was supported by institutional support from Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Université Blaise Pascal, Université d'Auvergne and through grants from Fondation de France, La Ligue Contre le Cancer (Allier & Puy de Dôme committees), Fondation ARC (PJA20141201894), Société Française d'Endocrinologie (young researcher grant to C.D. and Researcher Prize to P.V.) and University of Michigan Cancer Center Support Grant P30-CA046592 (NIH to R.K. and T.J.G.). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the article.

References

1. Else, T., Kim, A.C., Sabolch, A., Raymond, V.M., Kandathil, A., Caoili, E.M., Jolly, S., Miller, B.S., Giordano, T.J. and Hammer, G.D. (2014) Adrenocortical carcinoma. *Endocr. Rev.*, **35**, 282–326.
2. Berthon, A., Martinez, A., Bertherat, J. and Val, P. (2011) Wnt/β-catenin signalling in adrenal physiology and tumour development. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **351**, 87–95.
3. Drougat, L., Omeiri, H., Lefèvre, L. and Ragazzon, B. (2015) Novel insights into the genetics and pathophysiology of adrenocortical tumors. *Front. Endocrinol.*, **6**, 96.
4. 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 {beta}-catenin activation induces adrenal hyperplasia and promotes adrenal cancer development. *Hum. Mol. Genet.*, **19**, 1561–1576.
5. Drelon, C., Berthon, A., Ragazzon, B., Tissier, F., Bandiera, R., Sahut-Barnola, I., De Joussineau, C., Batisse-Lignier, M., Lefrançois-Martinez, A.M., Bertherat, J. *et al.* (2012) Analysis of the role of Igf2 in adrenal tumour development in transgenic mouse models. *PLoS One*, **7**, e44171.
6. Heaton, J.H., Wood, M.A., Kim, A.C., Lima, L.O., Barlaskar, F.M., Almeida, M.Q., Fragoso, M.C.B.V., Kuick, R., Lerario, A.M., Simon, D.P. *et al.* (2012) Progression to adrenocortical tumorigenesis in mice and humans through insulin-like growth factor 2 and β-catenin. *Am. J. Pathol.*, **181**, 1017–1033.
7. Fassnacht, M., Berruti, A., Baudin, E., Demeure, M.J., Gilbert, J., Haak, H., Kroiss, M., Quinn, D.I., Hesseltine, E., Ronchi, C.L. *et al.* (2015) Linsitinib (OSI-906) versus placebo for patients with locally advanced or metastatic adrenocortical carcinoma: a double-blind, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol.*, **16**, 426–435.
8. Igaz, P., Igaz, I., Nagy, Z., Nyírő, G., Szabó, P.M., Falus, A., Patócs, A. and Rácz, K. (2015) MicroRNAs in adrenal tumors: relevance for pathogenesis, diagnosis, and therapy. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*, **72**, 417–428.
9. Varier, R.A. and Timmers, H.T.M. (2011) Histone lysine methylation and demethylation pathways in cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, **1815**, 75–89.
10. Cao, R. and Zhang, Y. (2004) The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **14**, 155–164.
11. Varambally, S., Dhanasekaran, S.M., Zhou, M., Barrette, T.R., Kumar-Sinha, C., Sanda, M.G., Ghosh, D., Pienta, K.J., Sewalt, R.G.A.B., Otte, A.P. *et al.* (2002) The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature*, **419**, 624–629.
12. Kleer, C.G., Cao, Q., Varambally, S., Shen, R., Ota, I., Tomlins, S.A., Ghosh, D., Sewalt, R.G.A.B., Otte, A.P., Hayes, D.F. *et al.* (2003) EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **100**, 11606–11611.
13. Deb, G., Singh, A.K. and Gupta, S. (2014) EZH2: Not EZHY (Easy) to Deal. *Mol. Cancer Res.*, 10.1158/1541-7786.MCR-13-0546.
14. de Reynies, A., Assie, G., Rickman, D.S., Tissier, F., Groussin, L., Rene-Corail, F., Dousset, B., Bertagna, X., Clauser, E. and Bertherat, J. (2009) Gene expression profiling reveals a new classification of adrenocortical tumors and identifies molecular predictors of malignancy and survival. *J. Clin. Oncol.*, **27**, 1108–1115.
15. McCabe, M.T., Graves, A.P., Ganji, G., Diaz, E., Halsey, W.S., Jiang, Y., Smitheman, K.N., Ott, H.M., Pappalardi, M.B., Allen, K.E. *et al.* (2012) Mutation of A677 in histone methyltransferase EZH2 in human B-cell lymphoma promotes hypertrimethylation of histone H3 on lysine 27 (H3K27). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **109**, 2989–2994.

Downloaded from https://academic.oup.com/hmg/article-abstract/25/13/2789/2525761
by BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE SECTION DROIT user
on 22 May 2018

16. Morin, R.D., Johnson, N.A., Severson, T.M., Mungall, A.J., An, J., Goya, R., Paul, J.E., Boyle, M., Woolcock, B.W., Kuchenbauer, F. *et al.* (2010) Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat. Genet.*, **42**, 181–185.
17. Assié, G., Letouzé, E., Fassnacht, M., Jouinot, A., Luscap, W., Barreau, O., Omeiri, H., Rodriguez, S., Perlemoine, K., René-Corail, F. *et al.* (2014) Integrated genomic characterization of adrenocortical carcinoma. *Nat. Genet.*, **46**, 607–612. 10.1038/ng.2953.
18. Tang, X., Milyavsky, M., Shats, I., Erez, N., Goldfinger, N. and Rotter, V. (2004) Activated p53 suppresses the histone methyltransferase EZH2 gene. *Oncogene*, **23**, 5759–5769.
19. Bracken, A.P., Pasini, D., Capra, M., Prosperini, E., Colli, E. and Helin, K. (2003) EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *Embo J.*, **22**, 5323–5335.
20. Dick, F.A. and Rubin, S.M. (2013) Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **14**, 297–306.
21. Dimova, D.K. and Dyson, N.J. (2005) The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. *Oncogene*, **24**, 2810–2826.
22. Lammens, T., Li, J., Leone, G. and De Veylder, L. (2009) Atypical E2Fs: new players in the E2F transcription factor family. *Trends Cell Biol.*, **19**, 111–118.
23. Miranda, T.B., Cortez, C.C., Yoo, C.B., Liang, G., Abe, M., Kelly, T.K., Marquez, V.E. and Jones, P.A. (2009) DZNep is a global histone methylation inhibitor that reactivates developmental genes not silenced by DNA methylation. *Mol. Cancer Ther.*, **8**, 1579–1588.
24. Wang, T. and Rainey, W.E. (2012) Human adrenocortical carcinoma cell lines. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **351**, 58–65.
25. Ip, J.C.Y., Pang, T.C.Y., Glover, A.R., Soon, P., Zhao, J.T., Clarke, S., Robinson, B.G., Gill, A.J. and Sidhu, S.B. (2015) Immunohistochemical validation of overexpressed genes identified by global expression microarrays in adrenocortical carcinoma reveals potential predictive and prognostic biomarkers. *Oncologist*, **20**, 247–256.
26. McCabe, M.T., Ott, H.M., Ganji, G., Korenchuk, S., Thompson, C., Van Aller, G.S., Liu, Y., Graves, A.P., Iii, A.D.P., Diaz, E. *et al.* (2012) EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations. *Nature*, 10.1038/nature11606.
27. Knutson, S.K., Kawano, S., Minoshima, Y., Warholic, N.M., Huang, K.C., Xiao, Y., Kadowaki, T., Uesugi, M., Kuznetsov, G., Kumar, N. *et al.* (2014) Selective inhibition of EZH2 by EPZ-6438 Leads to potent antitumor activity in EZH2-mutant non-hodgkin lymphoma. *Mol. Cancer Ther.*, **13**, 842–854.
28. Lee, S.R., Roh, Y.G., Kim, S.K., Lee, J.S., Seol, S.Y., Lee, H.H., Kim, W.T., Kim, W.J., Heo, J., Cha, H.J. *et al.* (2015) Activation of EZH2 and SUZ12 regulated by E2F1 predicts the disease progression and aggressive characteristics of bladder cancer. *Clin. Cancer Res.*, **21**, 5391–5403. 10.1158/1078-0432.CCR-14-2680.
29. Liu, T., Hou, L. and Huang, Y. (2014) EZH2-specific microRNA-98 inhibits human ovarian cancer stem cell proliferation via regulating the pRb-E2F pathway. *Tumour Biol.*, **35**, 7239–7247.
30. Leseva, M., Santostefano, K.E., Rosenbluth, A.L., Hamazaki, T. and Terada, N. (2013) E2f6-mediated repression of the meiotic Stag3 and Smc1β genes during early embryonic development requires Ezh2 and not the de novo methyltransferase Dnmt3b. *Epigenetics*, **8**, 873–884.
31. Wu, Z.L., Zheng, S.S., Li, Z.M., Qiao, Y.Y., Aau, M.Y. and Yu, Q. (2010) Polycomb protein EZH2 regulates E2F1-dependent apoptosis through epigenetically modulating Bim expression. *Cell Death Differ.*, **17**, 801–810.
32. Xu, H., Xu, K., He, H.H., Zang, C., Chen, C.H., Chen, Y., Qin, Q., Wang, S., Wang, C., Hu, S. *et al.* (2016) Integrative Analysis Reveals the Transcriptional Collaboration between EZH2 and E2F1 in the Regulation of Cancer-Related Gene Expression. *Mol. Cancer Res.*, **14**, 163–172.
33. Kurtyka, C.A., Chen, L. and Cress, W.D. (2014) E2F inhibition synergizes with paclitaxel in lung cancer cell lines. *PloS One*, **9**, e96357.
34. Chen, H.Z., Tsai, S.Y. and Leone, G. (2009) Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nat. Rev. Cancer*, **9**, 785–797.
35. Pommier, A.J.C., Dufour, J., Alves, G., Viennois, E., De Boussac, H., Trousson, A., Volle, D.H., Caira, F., Val, P., Arnaud, P. *et al.* (2013) Liver x receptors protect from development of prostatic intra-epithelial neoplasia in mice. *PLoS Genet.*, **9**, e1003483.
36. Deb, G., Thakur, V.S. and Gupta, S. (2013) Multifaceted role of EZH2 in breast and prostate tumorigenesis: epigenetics and beyond. *Epigenetics*, **8**, 464–476.
37. Xu, K., Wu, Z.J., Groner, A.C., He, H.H., Cai, C., Lis, R.T., Wu, X., Stack, E.C., Loda, M., Liu, T. *et al.* (2012) EZH2 oncogenic activity in castration-resistant prostate cancer cells is Polycomb-independent. *Science*, **338**, 1465–1469.
38. Kim, E., Kim, M., Woo, D.H., Shin, Y., Shin, J., Chang, N., Oh, Y.T., Kim, H., Rheey, J., Nakano, I. *et al.* (2013) Phosphorylation of EZH2 activates STAT3 signaling via STAT3 methylation and promotes tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells. *Cancer Cell*, **23**, 839–852.
39. Tissier, F., Cavard, C., Groussin, L., Perlemoine, K., Fumey, G., Hagnere, A.M., Rene-Corail, F., Jullian, E., Gicquel, C., Bertagna, X. *et al.* (2005) Mutations of beta-catenin in adrenocortical tumors: activation of the Wnt signaling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumors. *Cancer Res.*, **65**, 7622–7627.
40. Svedlund, J., Barazeghi, E., Stålberg, P., Hellman, P., Åkerström, G., Björklund, P. and Westin, G. (2014) The histone methyltransferase EZH2, an oncogene common to benign and malignant parathyroid tumors. *Endocr. Relat. Cancer*, **21**, 231–239.
41. Jung, H.Y., Jun, S., Lee, M., Kim, H.C., Wang, X., Ji, H., McCrea, P.D. and Park, J.I. (2013) PAF and EZH2 induce Wnt/β-catenin signaling hyperactivation. *Mol. Cell*, **52**, 193–205.
42. Cheng, A.S.L., Lau, S.S., Chen, Y., Kondo, Y., Li, M.S., Feng, H., Ching, A.K., Cheung, K.F., Wong, H.K., Tong, J.H. *et al.* (2011) EZH2-mediated concordant repression of Wnt antagonists promotes β-catenin-dependent hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.*, **71**, 4028–4039.
43. Lu, H., Sun, J., Wang, F., Feng, L., Ma, Y., Shen, Q., Jiang, Z., Sun, X., Wang, X. and Jin, H. (2013) Enhancer of zeste homolog 2 activates wnt signaling through downregulating CXXC finger protein 4. *Cell Death Dis.*, **4**, e776.
44. Wang, L., Jin, Q., Lee, J.E., Su, I.-H. and Ge, K. (2010) Histone H3K27 methyltransferase Ezh2 represses Wnt genes to facilitate adipogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **107**, 7317–7322.
45. Bracken, A.P., Dietrich, N., Pasini, D., Hansen, K.H. and Helin, K. (2006) Genome-wide mapping of Polycomb target genes unravels their roles in cell fate transitions. *Genes Dev.*, **20**, 1123–1136.

Downloaded from https://academic.oup.com/hmg/article-abstract/25/13/2789/2525761
by BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE SECTION DROIT user
on 22 May 2018

46. Li, X., Gonzalez, M.E., Toy, K., Filzen, T., Merajver, S.D. and Kleer, C.G. (2009) Targeted overexpression of EZH2 in the mammary gland disrupts ductal morphogenesis and causes epithelial hyperplasia. *Am. J. Pathol.*, **175**, 1246–1254.
47. Herrera-Merchan, A., Arranz, L., Ligos, J.M., de Molina, A., Dominguez, O. and Gonzalez, S. (2012) Ectopic expression of the histone methyltransferase Ezh2 in haematopoietic stem cells causes myeloproliferative disease. *Nat. Commun.*, **3**, 623.
48. Ding, L., Erdmann, C., Chinnaiyan, A.M., Merajver, S.D. and Kleer, C.G. (2006) Identification of EZH2 as a molecular marker for a precancerous state in morphologically normal breast tissues. *Cancer Res.*, **66**, 4095–4099.
49. Barreau, O., de Reynies, A., Wilmot-Roussel, H., Guillaud-Bataille, M., Auzan, C., René-Corail, F., Tissier, F., Dousset, B., Bertagna, X., Bertherat, J. *et al.* (2012) Clinical and pathophysiological implications of chromosomal alterations in adrenocortical tumors: an integrated genomic approach. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **97**, E301–E311.
50. Berthon, A., Drelon, C., Ragazzon, B., Boulkroun, S., Tissier, F., Amar, L., Samson-Couterie, B., Zennaro, M.C., Plouin, P.F., Skah, S. *et al.* (2014) WNT/β-catenin signalling is activated in aldosterone-producing adenomas and controls aldosterone production. *Hum. Mol. Genet.*, **23**, 889–905.
51. Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S. *et al.* (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **102**, 15545–15550.

Downloaded from https://academic.oup.com/hmg/article-abstract/25/13/2789/2525761
by BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE SECTION DROIT user
on 22 May 2018

Article 4

Steroidogenic differentiation and PKA signaling are programmed by histone methyltransferase EZH2 in the adrenal cortex

En révision à PNAS (Proceedings of the National Academy of Sciences)

Mathieu M, Drelon C, Rodriguez S, **Tabbal H**, Septier A, Dumontet T, Berthon A, Sahut-Barnola I, Damon-Soubeyrand C, Batisse-Ligner M, Pointud J-C, Kerdivel G, Calméjane MA, Boeva V, Tauveron I, Lefrançois-Martinez A-M, Martinez A & Val P.

Steroidogenic differentiation and PKA signalling are programmed by histone methyltransferase EZH2 in the adrenal cortex

Short Title: EZH2 programs steroidogenic differentiation

Mickael Mathieu[1], Coralie Drelon[1¶], Stéphanie Rodriguez[1¶], Houda Tabbal[1], Amandine Septier[1], Christelle Damon-Soubeyrand[1], Typhanie Dumontet[1], Annabel Berthon[1,2], Isabelle Sahut-Barnola[1], Marie Batisse-Lignier[1,3], Jean-Christophe Pointud[1], Gwenneg Kerdivel[4], Marie-Ange Calméjane[4], Valentina Boeva[4], Igor Tauveron[1,3], Anne-Marie Lefrançois-Martinez[1], Antoine Martinez[1] & Pierre Val[1*].

[1]CNRS, UMR 6293, GReD, Inserm U1103, Université Clermont Auvergne, 63001 Clermont-Ferrand, France

[2]*Eunice Kennedy Shriver* National Institute of Child Health and Human Development, Md 20892-1103, Bethesda, USA

[3]Centre Hospitalier Universitaire, Service d'Endocrinologie, Faculté de Médecine, 63000 Clermont-Ferrand, France

[4]Institut Cochin, Inserm U1016, CNRS UMR 8104, Université Paris Descartes UMR-S1016, 75014 Paris, France

¶ both authors contributed equally to this work

* Corresponding author and lead contact: pierre.val@uca.fr

Tel: +33 6 3278 0454

28, Place Henri Dunant, F-63001 Clermont-Fd

Abstract

Adrenal cortex steroids are essential for body homeostasis and adrenal insufficiency is a life-threatening condition. Adrenal endocrine activity is maintained through recruitment of subcapsular progenitor cells that follow a unidirectional differentiation path from zona glomerulosa (zG) to zona fasciculata (zF). Here, we show that this unidirectionality is ensured by the histone methyltransferase Ezh2. Indeed, we demonstrate that Ezh2 maintains adrenal steroidogenic cells differentiation by preventing expression of GATA4 and WT1 that cause abnormal dedifferentiation to a progenitor-like state in Ezh2 KO adrenals. Ezh2 further ensures normal cortical differentiation by programming cells for optimal response to ACTH/PKA signalling. This is achieved by repression of phosphodiesterases PDE1B, 3A and 7A and of PRKAR1B. Consequently, EZH2 ablation results in blunted zF differentiation and primary glucocorticoid insufficiency. These data demonstrate an all-encompassing role for EZH2 in programming steroidogenic cells for optimal response to differentiation signals and in maintaining their differentiated state.

Keywords: Adrenal, differentiation, homeostasis, progenitors, PKA signalling, EZH2

Significance Statement

The adrenal cortex plays a central role in regulating body homeostasis through production of glucocorticoids and mineralocorticoids that control metabolism, inflammation and blood pressure. The production of these hormones, known as steroidogenesis is achieved by differentiated steroidogenic cells that arise from undifferentiated progenitors and are constantly renewed throughout life. Until now the mechanisms that ensured that progenitors differentiated as steroidogenic cells and maintained this differentiated state were unknown. Our data show that the histone

methyltransferase EZH2, a key epigenetic factor is the central regulator of this process. Consequently, adrenal-specific EZH2 knockout mice fail to normally differentiate steroidogenic cells, which results in a life-threatening condition known as primary glucocorticoid insufficiency in patients.

Introduction

The adrenal gland is composed of two tissues. The inner medulla is derived from the neural crest and is an integral part of the sympathetic nervous system. The cortex is a key steroidogenic tissue which synthesizes mineralocorticoids, glucocorticoids and adrenal androgens in primates. This endocrine activity is essential for life and adrenal insufficiency is lethal in the absence of hormonal substitution (1). This activity relies on functional zonation. In rodents, this is characterised by differentiation of zona glomerulosa (zG) in the upper third of the cortex, which produces aldosterone and zona fasciculata (zF) in the remainder, which synthesizes glucocorticoids (2). We have recently shown that this functional zonation is established and maintained despite continuous cell renewal, by antagonistic interactions between WNT/β-catenin signalling in zG and PKA signalling in zF (3). Cortical cell renewal is a slow but continuous process which relies on a number of progenitor cells localised at the periphery of the gland (4). In homeostatic conditions, SF1-positive, SHH-positive cells within the zG niche are recruited for differentiation as CYP11B2-positive zG cells in response to WNT signalling activation by RSPO3/WNT4 (5–7). These cells move further within the cortex and subsequently differentiate as zF cells upon PKA activation and WNT pathway repression (3). Although lineage tracing studies have demonstrated the unidirectionality of the renewal process in the adult (5, 6), *i.e.* SF1-positive cells never give rise to undifferentiated capsular progenitors, the situation is quite different in the embryo. Indeed, differentiated foetal steroidogenic adrenal cells, characterised by expression of the foetal enhancer of SF1 (FAdE)(8), were shown to contribute to the pool of capsular GLI1-positive, SF1-negative progenitors that were found during embryonic development but also in the adult (9). Altogether, these data raise the question of the molecular

mechanisms that ensure that progenitors acquire and maintain an adrenal steroidogenic differentiation programme once they engage in centripetal cortex renewal.

Epigenetic factors play essential roles in programming and maintaining cell fate decisions during embryonic development and in adult tissues homeostasis (10). Recently, we have shown that the histone methyl-transferase EZH2 is the most deregulated epigenetic factor in adrenal cortex carcinoma in which it is associated with cancer progression (11). Here, we investigated the role of EZH2 in adrenocortical development and homeostasis by targeted inactivation of EZH2 in adrenal cortex steroidogenic cells using SF1:Cre, which is active as soon as the adrenal primordium emerges from the AGP (12) and a floxed allele of *Ezh2* (13). Our data show that EZH2 ablation is associated with deficient zona fasciculata differentiation, resulting in primary glucocorticoid insufficiency. This is caused by decreased PKA signalling pathway activity, in response to release of EZH2/PRC2–mediated repression of phosphodiesterases PDE1B, 3A and 7B. We further show that *Ezh2* ablation results in disruption of the unidirectional renewal and differentiation process. This is characterised by expansion of a pool of SF1-negative progenitor-like cells in the outer cortex, that originate from dedifferentiation of SF1-positive steroidogenic cells. Altogether, these data demonstrate an all-encompassing role of EZH2 in programming steroidogenic cells for optimal response to differentiation signals and in preventing their dedifferentiation to a progenitor-like state.

Results

Ezh2 ablation results in up-regulation of PRC2 target genes

In order to evaluate the role of EZH2 in adrenal cortex homeostasis, we mated mice with a floxed *Ezh2* allele (*Ezh2 Fl/Fl*) (13) with mice bearing a Cre recombinase under the control of SF1 regulatory regions (SF1:Cre)(12), which allows recombination as early as E10.5 in steroidogenic cells of the developing adrenal cortex (referred to as Ezh2 KO mice thereafter). We also included the mTmG reporter system in order to trace cells that have undergone recombination (14). Efficient deletion of *Ezh2* in the adrenal cortex was assessed by immunohistochemistry (IHC) at E14.5. In wild-type adrenals (*Sf1:Cre,mTmG,Ezh2+/+),* EZH2 was strongly expressed in the nuclei of all steroidogenic cells, identified by membrane expression of GFP from the mTmG locus, following SF1:Cre mediated recombination (Fig 1A, a). In contrast, EZH2 was almost undetectable in GFP positive steroidogenic cells in knockout adrenals (*Sf1:Cre,mTmG,Ezh2Fl/Fl*), indicating efficient deletion of the floxed allele (Fig 1A, b). This was further confirmed by a marked reduction in H3K27me3 accumulation in the nuclei of GFP positive cells in E18.5 and adult knockout adrenals (Fig 1A, d and Fig S1A), compared with wild-type (Fig 1A, c and Fig S1A). Although EZH2 is the catalytic subunit of the PRC2 repressive complex, recent data suggest that it can also function as a transcription activator through interaction with transcription factors such as AR (15). To gain insight into the activity of EZH2 in the adrenal cortex, we conducted microarray analysis of gene expression in three wild-type and 4 knockout adrenals from 2 months-old female mice. Interestingly, out of the 309 genes that were significantly deregulated, the majority (193) was up-regulated, suggesting that deletion of *Ezh2* was associated with a release of repression (Fig 1B). To evaluate this hypothesis, we performed gene set enrichment analyses (GSEA), using curated PRC2 target genes lists (Fig 1C, Fig S1B and

Supplementary Table 1). These showed significant enrichment of PRC2 target gene sets, further supporting the idea that EZH2 activity in the adrenal cortex was associated with PRC2-mediated gene repression.

Ezh2 ablation causes primary glucocorticoid insufficiency and aberrant zonal differentiation

We then evaluated the impact of EZH2-PRC2 inactivation on adult adrenal physiology. Haematoxylin & eosin staining of adrenal sections showed marked reduction in adrenal size, which was associated with significant disruption of architecture, characterised by misplacement of adrenal medulla, thinning and disorganisation of the columnar structure of zona fasciculata (zF) (Fig 2A). Hypoplasia of the gland was further confirmed by a significant decrease in adrenal weight (Fig 2B), which was associated with cortical cell hypertrophy (Fig 2C), suggesting that adrenal endocrine activity was altered. Consistent with this idea, plasma corticosterone concentration was significantly decreased (Fig 2D). This was associated with increased plasma ACTH indicating that Ezh2 KO mice presented primary glucocorticoid insufficiency. Interestingly, plasma aldosterone concentration was unaltered (Fig 2F), even though renin activity was decreased (Fig 2G). This suggested that EZH2 inactivation mostly had an impact on zF differentiation. To gain insight into zonal differentiation status, we performed GSEA analyses of our micro-array data using zona fasciculata and zona glomerulosa specific gene sets extracted from previously published micro-array analyses of micro-dissected rat adrenal zones (16). Consistent with primary glucocorticoid insufficiency, there was a significant negative enrichment of zF-specific genes in Ezh2 KO adrenals compared with wild-type (Fig 2H, top). However, there was a concomitant positive enrichment of zG-specific genes (Fig 2H, bottom), suggesting that zG differentiation may be favoured by *Ezh2* ablation. To gain insight into the tissue phenotype, we analysed expression of

AKR1B7, a marker of zF by IHC. As expected AKR1B7 was expressed throughout zF and excluded from zG in wild-type adrenals (Fig 2I, a). In contrast, expression of AKR1B7 was markedly reduced and restricted to innermost cortex in Ezh2 KO adrenals, indicating deficient zF differentiation (Fig 2I, b). This was further confirmed by decreased *Cyp11b1* mRNA accumulation (Fig 2J, top panel). Evaluation of zG differentiation using DAB2 staining showed significant expansion in Ezh2 KO adrenals compared with wild-type (Fig 2I, c). This was confirmed, albeit more subtly by expansion of CYP11B2 expression domain (Fig 2I, f *vs* e). Interestingly, co-immunohistochemistry for both DAB2 and AKR1B7 showed further alterations of adrenal zonal differentiation, which resulted in the presence of DAB2 positive cells (zG) deeply within zF (Fig 2I, h *vs* g, stars) and in the aberrant differentiation of cells with both zF and zG identity (Fig 2I, h *vs* g, arrowheads). Surprisingly, even though the number of zG cells was increased in Ezh2 KO adrenals, aldosterone production was normal (Fig 2F). This was probably the result of decreased renin activity (Fig 2G) acting as a feedback mechanism. This hypothesis was supported by decreased mRNA accumulation of *At1a* and *At1b*, encoding the two receptors for Angiotensin II (Fig 2J).

Altogether, these data indicated that E*zh2* ablation resulted in profound alterations of adrenal cortex zonation characterised by inhibition of zF differentiation and glucocorticoid production at the benefit of zG expansion, despite normal aldosterone output.

EZH2 programs adrenal steroidogenic cells response to PKA signalling

We have previously shown that adrenal cortex zonation results from a subtle equilibrium between WNT pathway activation in zG and PKA activation in zF (3). We thus evaluated activity of both pathways in response to EZH2 inactivation. GSEA analysis of WNT pathway associated targets and regulators showed positive albeit non-

significant enrichment in Ezh2 KO adrenals compared with wild-type (Fig 3A). This suggested that WNT pathway activity was only mildly altered in response to *Ezh2* ablation. Consistent with this, there were no canonical WNT target genes within the genes significantly up-regulated in KO adrenal micro-array data (Fig 3B) and RTqPCR analysis of *Lef1*, *Axin2* and *Apccd1* mRNA accumulation only showed moderate up-regulation of *Apcdd1* (Fig 3C). This was further supported by the mild expansion of LEF1 expression domain in the cortex of Ezh2 KO adrenals, compared with wild-type (Fig 3D). Altogether, these data suggested that *Ezh2* ablation had a mild impact on the activity of WNT pathway in the adrenal cortex. We thus evaluated the effect of *Ezh2* ablation on PKA signalling pathway activity in the cortex. GSEA analysis of steroidogenesis and cholesterol synthesis gene sets, that represent two pathways that are positively regulated by PKA (17), showed significant negative enrichment in KO adrenals (Fig 4A). This suggested that PKA activity may be down-regulated by *Ezh2* ablation. Consistent with this idea, there was a clear decrease in global PKA-mediated substrate phosphorylation in Ezh2 KO adrenals compared with wild-type (Fig 4B, b *vs* a). This was further supported by a marked decrease in CREB phosphorylation in GFP-positive recombined zF cells in KO adrenals (Fig 4B, d *vs* c) and a significant reduction in global P-CREB accumulation measured by western-blot on whole-adrenal extracts (Fig 4C). To confirm alteration of PKA signalling pathway activity, we measured PKA activity on whole adrenal extracts. Interestingly, analysis of PKA activity on whole adrenal extracts showed a significant decrease in basal activity in KO adrenals, although it was still as sensitive to cAMP induction as in wild-type (Fig 4D). This suggested that the defect in PKA pathway activity was situated upstream of catalytic activity. However, RTqPCR analyses did not show any alteration in the expression of *Mc2r* or of its cofactor *Mrap* that are essential to mediate PKA response to ACTH (Fig S2A). To further understand

the molecular underpinnings of decreased PKA activity, we evaluated expression of PKA regulators in our micro-array data. This showed significant up-regulation of the negative regulators *Pde7b*, *Pde3a*, *Pde1b* and *Prkar1b* (Fig 4E), which was further confirmed by RTqPCR analyses on an independent group of animals (Fig 4F). Altogether, these data suggested that EZH2 was required to mount an optimal response to PKA in the adrenal cortex by inhibiting expression of negative PKA regulators, in particular phosphodiesterases. Consistent with this idea, analysis of publically available ChIP sequencing data showed enrichment of EZH2/H3K27me3 on a number of phosphodiesterases regulatory regions in 14 different cell types (Fig S2B). To test this possibility in the adrenal, we evaluated enrichment for H3K27me3 and EZH2 on the promoters of *Prkar1b*, *Pde1b*, *Pde3a* and *Pde7b* in wild-type and Ezh2 KO adrenals. Consistent with a role of PRC2-mediated gene repression, we observed a significant enrichment (from 3 to 8-fold) for H3K27me3 on the promoters of all four negative PKA regulators compared to the housekeeping gene *Gapdh* in wild-type adrenals (Fig 4G). This was associated with moderate recruitment of EZH2 (Fig 4G). Interestingly, enrichment for H3K27me3 was significantly decreased for all four genes in KO adrenals whereas EZH2 recruitment was significantly reduced on *Pde1b* and *Pde3a* regulatory regions (Fig 4G). Altogether, these data showed that EZH2/PRC2 promoted PKA pathway activity by repressing expression of negative regulators of PKA signalling, through deposition of the H3K27me3 mark on their promoters. However, the low level of enrichment for EZH2 on promoters in the presence of high levels of H3K27 tri-methylation raised the question of EZH2 expression in the adult adrenal. Kinetic analysis showed high levels of expression throughout the adrenal gland at E15.5 (Fig 4H, a), which progressively restricted to cortical periphery by E18.5 (Fig 4H, b). This pattern was further restricted at 1 month and very few cells at the periphery of the cortex

expressed EZH2 by 6 months (Fig 4H, c-d). Even though EZH2 expression markedly decreased over time, H3K27me3 levels appeared relatively constant up to 6 months (Fig S2C). This suggested that PKA responsiveness of steroidogenic cells may be established by EZH2 activity during embryonic development. To evaluate this, we analysed adrenal differentiation phenotype at E18.5, when differentiation of *zonae* glomerulosa and fasciculata becomes evident. Indeed, in wild-type adrenals, we observed a clear separation of the expression domains of DAB2 (zG) and AKR1B7 (zF) (Fig 4I, a). In contrast, Ezh2 KO adrenals showed intermingling of the two domains and a number of cells with double zG/zF identity that were not present in the wild-type (Fig 4I, b *vs* a). This was also associated with decreased expression of *Cyp11b1* and *Akr1b7* in RTqPCR (Fig 4J) and significant up-regulation of *Pde1b* (Fig 4K). Altogether, these data strongly suggest that EZH2 programs adrenal cortex cells for optimal response to PKA signalling during embryonic development. However, although adrenal cortex cell renewal is a relatively slow process (12 weeks in female mice, (5)), this raises the question of H3K27me3 maintenance during cell divisions associated with this process. Interestingly, analysis of EZH2 expression together with DAB2 and AKR1B7, showed that the few cells that expressed Ezh2 in the adult adrenal were localised within zG, at the boundary between zG and zF or within outer zF (Fig 4L). This localisation suggested that EZH2 may be re-expressed in cortical cells when they enter the centripetal renewal process. This idea was further confirmed by co-localisation of EZH2 with Ki67 staining in the outer cortex (Fig 4M). Altogether, our data show that EZH2 is essential to program PKA responsiveness in developing adrenal cortex and in newly recruited adrenocortical cells during adult cortex renewal.

Ezh2 ablation results in accumulation of progenitor-like cells

Renewal of the adrenal cortex is highly coordinated with zonal cell differentiation to allow maintenance of adrenal homeostasis. Given the central role of EZH2 in controlling zF differentiation through PKA signalling pathway, we evaluated a potential role in controlling progenitors homeostasis. GSEA analysis of micro-array data showed a significant positive enrichment for genes associated with adrenal progenitors regulation in Ezh2 KO compared with wild-type adrenals (Fig 5A). Consistent with this, H&E staining showed massive expansion of fibroblastic-like cells, characteristic of the capsular and sub-capsular adrenal compartment where progenitors reside in the wild-type adrenal (Fig 5B, b *vs* a). Abnormal expansion of the progenitor compartment was further suggested by a large increase in the number of NR2F2 positive cells, following *Ezh2* ablation (Fig 5B, d *vs* c). Although homeostatic renewal of the cortex occurs mainly through recruitment of SF1-positive SHH+ cells located in the vicinity of zG (6) a number of SF1-negative cells expressing WT1, GLI1 or GATA4, can be recruited to meet supraphysiological demand (6, 18, 19). Interestingly, analysis of micro-array data showed up-regulation of *Gata4*, *Wt1* and *Gli1,* suggesting that supraphysiological progenitors may be accumulating in Ezh2 KO adrenals (Fig 5C). To evaluate this hypothesis, we analysed expression of the different progenitors populations by IHC, RNAScope in situ hybridisation (ISH) and RTqPCR. As expected *Shh* was detected within zG in wild-type adrenals (Fig 5D, a). Although the expression domain was somewhat disrupted by the presence of numerous fibroblastic cells in Ezh2 KO adrenals, the number of *Shh* positive cells did not seem to be altered by *Ezh2* ablation (Fig 5D, b *vs* a). This was further confirmed by normal levels of *Shh* transcript accumulation in Ezh2 KO adrenals (Fig 5E). In contrast, *Gli1* accumulation which marks progenitor cells that respond to Shh signalling, was markedly increased by *Ezh2* ablation and was detected in most fibroblastic-like cells, whereas it was restricted to the capsule in wild-type

adrenals (Fig 5D, d *vs* c). An almost 3-fold increase in *Gli1* accumulation was confirmed by RTqPCR (Fig 5E). The normal accumulation of both *Shh* and *Ptch1* (a target of SHH) (Fig 5E), strongly suggested SHH-independent accumulation of GLI1-positive cells. IHC for WT1 showed very weak expression in the adrenal capsule, as previously described in wild-type mice (18). In contrast, a large number of the fibroblastic-like cells that accumulated in Ezh2 KO adrenals expressed high levels of WT1 (Fig 5D, e-f), which was associated with a seven-fold increase in WT1 transcript accumulation (Fig 5F). Forced induction of WT1 in the adrenal cortex has been shown to result in increased expression of GATA4, through direct WT1 binding on *Gata4* regulatory regions (18). Consistent with this idea, whereas GATA4 was virtually absent from wild-type adrenals, it was strongly expressed in fibroblastic-like cells following *Ezh2* ablation (Fig 5D, g-h). This was also associated with an eight-fold increase in *Gata4* mRNA accumulation (Fig 5F). However, although there were cells with both WT1 and GATA4 staining, the expression domain of GATA4 was broader than the expression domain of WT1 (Fig 5G). This suggested that GATA4 induction may be somewhat independent of WT1 induction. Deregulation of WT1 and GATA4 expression in the adrenal has been shown to result in aberrant gonadal-like differentiation. Consistent with this, RTqPCR analyses showed up-regulation of *Pdgfra*, *Foxl2* and *Lhr*, characteristic of gonadal differentiation (Fig 5H). Altogether, these data showed that *Ezh2* ablation resulted in the accumulation of cells with characteristics of supraphysiological fibroblastic-like progenitors and aberrant gonadal-like differentiation.

EZH2 prevents dedifferentiation of steroidogenic cells

We then sought to determine the origin of this phenotype. GATA4 and WT1 cells have been shown to accumulate in the adrenal cortex of mice following castration (18, 19). Although Sf1:Cre is also active in the gonad, *Sf1:Cre,Ezh2 Fl/Fl* mice of both sexes were

fertile and showed no alteration of gonadal histology (Fig S3A) or plasma gonadotrophin concentrations (Fig S3B). This strongly suggested that accumulation of GATA4 and WT1-positive cells in Ezh2 KO adrenals was independent of a gonadal phenotype. To rule out a possible effect of increased ACTH signalling resulting from defective zF differentiation on the accumulation of supraphysiological progenitors, we evaluated their presence during embryonic development, when adrenal homeostasis is independent of the pituitary. Although RTqPCR analyses did not reveal deregulation of either *Gata4* or *Wt1* transcript accumulation at E14.5 (Fig 6B), IHC analyses showed abnormal accumulation of GATA4 (Fig 6A, b *vs* a) but not WT1 (Fig 6A, d *vs* c) within Ezh2 KO adrenals at this stage. By E18.5, GATA4 positive cells were detected throughout the cortex (Fig 6A, f vs e), which was correlated with up-regulation of *Gata4* mRNA accumulation in RTqPCR (Fig 6B). A small number of WT1-positive cells also appeared at the periphery of the gland (Fig 6A, h *vs* g), even though *Wt1* mRNA accumulation was unaltered (Fig 6B). Altogether, these data showed that accumulation of GATA4 and WT1 positive cells was not an indirect effect resulting from deregulation of gonadal or pituitary-adrenal axes. It also indicated that in contrast with previously published data (18), GATA4 accumulation was independent of and preceded WT1 accumulation in Ezh2 KO adrenals. We then wanted to identify the adrenal-autonomous mechanism responsible for accumulation of GATA4 and WT1 positive cells in response to *Ezh2* ablation. We first evaluated the possibility that this may be the result of increased proliferation of the few GATA4+ / WT1+ progenitor cells that reside in the capsule of wild-type adrenals. IHC analyses showed that there was no overall increase in the number of Ki67+ cortical cells following *Ezh2* ablation, both in IHC and RTqPCR (Fig 6C-D). Furthermore, even though some GATA4+ cells displayed Ki67 expression, most of them were Ki67-negative (Fig 6E), strongly suggesting that accumulation of GATA4+ cells was independent of

proliferation. GATA4 and WT1 are normally expressed in the AGP and turned off once the adrenal primordium becomes fully differentiated (18). We thus reasoned that abnormal expression of both factors in Ezh2 KO adrenals may rely on a direct role of EZH2 on their expression. Consistent with this idea, ChIP qPCR analyses showed enrichment of H3K27me3 and EZH2 on the regulatory regions of both GATA4 and WT1 and a significant decrease in enrichment in Ezh2 KO adrenals (Fig 6F). This indicated that EZH2/PRC2 was directly involved in repressing *Gata4* and *Wt1* expression in the adrenal cortex. However, whether EZH2 exerted this activity in capsular or steroidogenic cells was unclear. To gain insight into this, we evaluated EZH2 localisation in wild-type and KO adrenals by IHC. Interestingly, at all the stages that we examined, EZH2 expression was low (embryonic development, Fig S4A) or absent (adult adrenal, Fig 6G) in GFP-negative capsular cells in wild-type adrenals, whereas it was high in GFP-positive steroidogenic cells during embryonic development and the perinatal period (Fig 6G & Fig S4A). Consistent with the restricted activity of Sf1:Cre, there was no recombination of *GFP* or *Ezh2* in the capsule either during embryonic development or in the adult (Fig S4A & Fig 6G). This strongly suggested that EZH2 was essential to prevent expression of GATA4 and WT1 within steroidogenic rather than capsular cells. To further identify the mechanism involved in the accumulation of these aberrant cells, we analysed co-expression of GATA4, SF1 and GFP to identify cells of the steroidogenic lineage. As expected, in wild-type adrenals, GATA4 expression was virtually undetectable and all cells that were GFP-positive (recombined cells) were also positive for endogenous SF1 expression (Fig 6H). In contrast, there was a large number of fibroblastic-like GATA4-positive cells in Ezh2 KO adrenals. Interestingly, most of these cells did not express any detectable level of endogenous SF1 expression. However, the vast majority expressed GFP, indicating that although they were SF1-negative, they

derived from the steroidogenic lineage (Fig 6H). Analysis of serial sections stained for WT1, SF1 and GFP also showed that WT1-positive cells, despite being SF1-negative were largely derived from the steroidogenic lineage (Fig S4B). Altogether, these data strongly suggest that the large majority of GATA4 and WT1-positive fibroblastic-like cells that accumulate in Ezh2 KO adrenals originate from dedifferentiation of engaged steroidogenic cells. Interestingly, a number of reports have shown that fibroblastic-like cells also accumulate at the periphery of ageing mouse adrenals (19). However, these cells were thought to originate from capsular proliferation/recruitment. To evaluate this hypothesis, we also performed triple-IHC analysis in 12 month-old wild-type adrenals. GATA4-positive fibroblastic-like cells were also present at the periphery of the cortex, even though all spindle-shaped cells did not express GATA4 (Fig 6I). Consistent with their counterparts in Ezh2 KO adrenals, most GATA4-positive cells were also GFP-positive but SF1-negative (Fig 6I). This indicated that dedifferentiation of already engaged steroidogenic cells was also present in wild-type adrenals at a later time point, which was consistent with extinction of EZH2 expression in most steroidogenic cells over time (Figure 4H).

Discussion

The adrenal cortex is maintained by different pools of capsular and subcapsular undifferentiated progenitor cells that engage into and maintain steroidogenic differentiation throughout their centripetal migration within the gland (4). Although we and others have identified the molecular signals involved in zonal differentiation, the mechanisms involved in maintaining global steroidogenic differentiation during adrenal cortex renewal and cell migration have remained elusive (3, 7, 20, 21). Here, we show that the histone methyltransferase EZH2, by allowing appropriate levels of PKA signalling and by preventing dedifferentiation to a progenitor-like state, plays a central

role in ensuring that adrenal cortex cells maintain their steroidogenic potential, irrespective of their position in the gland and for the lifespan of the individual.

Adrenal cortex zonal differentiation is characterised by establishment of zona glomerulosa (zG) in the outer cortex, which synthesizes aldosterone and zona fasciculata (zF) in the inner cortex, which synthesizes corticosterone in rodents and cortisol in humans. Our data show that *Ezh2* ablation is associated with a strong reduction in zF differentiation, which results in primary glucocorticoid insufficiency, characterised by decreased plasma corticosterone concentration in the context of increased ACTH secretion. Consistent with the idea that zF and zG differentiation are in balance in the cortex (3), IHC analysis of DAB2 and CYP11B2, two markers of zG differentiation, shows expansion of glomerulosa in response to *Ezh2* ablation. Zonal differentiation is dependent on antagonistic interactions between WNT signalling in the outer cortex and PKA signalling in the inner cortex (7, 11, 21). Interestingly, EZH2 has been shown to directly inhibit WNT signalling in intestinal stem cells to prevent their differentiation (22) and in mesenchymal stem cells to allow their adipogenic differentiation (23). Analysis of WNT pathway status by microarrays and RTqPCR in Ezh2 KO adrenals, only showed moderate alterations of some WNT regulators which did not translate into clear activation of the pathway. This suggests that EZH2 does not play a central role in controlling WNT pathway activity in the adrenal cortex. Consistent with this idea and in contrast with the expanded zG in mice with constitutive activation of β-catenin (24, 25), expansion of zG in Ezh2 KO adrenals was not associated with increased aldosterone secretion. This suggests that these abnormally localised zG cells have retained the capacity to respond to the renin-angiotensin system in order to maintain aldosterone homeostasis. Indeed, our RTqPCR analyses showed decreased expression of the genes encoding angiotensin receptors AT1a and AT1b, associated with decreased

plasma renin activity. We thus reasoned that expansion of zG and shrinking of zF may be the result of decreased PKA signalling pathway activity in response to *Ezh2* ablation. Indeed, our combination of microarrays, RTqPCR, IHC and kinase activity assays undoubtedly demonstrated that PKA activity was significantly decreased in the adrenal cortex of Ezh2 KO mice. ChIP analyses showed that this phenomenon was dependent on derepression of a set of phosphodiesterases (*Pde1b*, *Pde3a*, *Pde7b*) and of one regulatory subunit of PKA (*Prkar1b*), which are all directly repressed by EZH2/PRC2 in normal adrenals. Our data further suggest that repression of these genes is programmed during embryonic development, when EZH2 is expressed in all adrenal steroidogenic cells and re-established in dividing cells in the adult gland through temporary re-expression of EZH2. To our knowledge, this is the first report of a role of EZH2/PRC2 in controlling activity of the PKA signalling pathway. Interestingly, our analysis of publically available ChIP sequencing data shows binding peaks of EZH2 and/or H3K27me3 on the regulatory regions of a large number of phosphodiesterase genes and regulatory subunits of PKA in a set of 14 different cell types, including cancer cell lines, but also embryonic stem cells and primary cultures of epithelial and fibroblastic cells. This strongly suggests that EZH2/PRC2 may be regulating cAMP/PKA signalling in tissues other than the adrenal.

Decreased PKA activity in the adrenal, resulting from mutations of the genes encoding ACTH receptor *MC2R* or its accessory protein MRAP, is associated with isolated familial glucocorticoid deficiency (FGD), a potentially fatal condition if left untreated (26, 27). These mutations only account for about 45% of FGD patients. NGS analyses have identified other alterations such as mutations in *NNT* (28), *TXNRD2* (29), *GPX1* and *PRDX3* (30) which disrupt cellular oxidative stress balance, mutations in the *MCM4* gene which encodes a component of a heterohexameric complex responsible for normal DNA

replication and chromosome stability (31) and gain of function mutations of the cell cycle inhibitor *CDKN1C* (32). However, for about 25% of FGD cases there is still no genetic diagnosis. Our data suggest that components of the PRC2 complex may be altered in these patients.

In homeostatic conditions, adrenal cortex renewal mostly occurs through recruitment of SHH-positive progenitor cells within the zG niche, that initially differentiate as zG cells and undergo trans-differentiation to zF identity (5). Capsular SF1-negative GLI1 and/or WT1-positive cells give rise to a large number of steroidogenic cells during embryonic development. They can also contribute, albeit at low frequency, to adrenal cortex replenishment in the adult (6, 9, 18, 19, 33) and can be mobilised upon gonadectomy, giving rise to adrenal neoplasia (34, 35) presenting characteristics of adrenogonadal cells such as GATA4, LHR and PDGFRα expression (19). Interestingly, ageing mouse adrenals also present subcapsular accumulation of spindle-shaped cells (36, 37). Although lineage tracing have shown that gonadectomy-induced lesions arise in part from WT1/GLI1 positive cells, the origin of spindle-shaped cells in the ageing adrenal cortex is not as clear, even though GLI1-positive cells may contribute to their appearance (19). Here, we show that *Ezh2* ablation results in the dramatic accumulation of spindle-shaped GATA4, WT1, GLI1 positive and SF1-negative cells in the subcapsular region of 2 month-old adrenals. Although we cannot rule out a direct contribution of SF1-negative WT1/GLI1 positive capsular cells to the subcapsular accumulation of these cells in response to *Ezh2* ablation, our experiments suggest a different scenario: 1) EZH2 is expressed at very low levels in the capsule and is not inactivated by Sf1:Cre in this compartment. 2) subcapsular GATA4-positive cells show no signs of increased proliferation. 3) Lineage tracing studies using Sf1:Cre and the mTmG reporter system show that even though GATA4 and WT1-positive spindle-shaped cells do not express

SF1, they descend from SF1-positive cells. 4) ChIP shows that EZH2/PRC2 directly represses expression of both GATA4 and WT1 in the adrenal cortex. Altogether, these data strongly suggest that GATA4+/WT1+ cells originate from dedifferentiation of SF1-positive steroidogenic cells in response to *Ezh2* ablation. Although dedifferentiation of steroidogenic cells was shown to contribute to the GLI1-positive, SF1-negative capsular compartment during embryonic development (9), to our knowledge, this is the first report of such a phenomenon in the adult adrenal gland. Interestingly, our lineage tracing analyses also suggest that this process is a strong contributor to the accumulation of GATA4-positive SF1-negative spindle-shaped cells in wild-type ageing adrenals. Our data showing progressive extinction of EZH2 expression in steroidogenic cells over time, suggest that these cells may naturally dedifferentiate as a result of loss of the H3K27me3 mark in dividing cortical cells, during homeostatic renewal. In this scenario, EZH2 ablation would precipitate an underlying natural process that would provide secondary GATA4-positive progenitors once the pool of physiological SHH-positive progenitors is exhausted. Whether these cells are required to maintain homeostasis of the ageing adrenal remains to be determined.

Although both WT1 and GATA4 are required for early development of the adrenal primordium, their expression is extinguished in adrenal steroidogenic cells after emergence of the adrenal anlagen from the AGP at E10.5 (18). On the basis of our ChIP data, EZH2 could be considered a good candidate repressor in this context. However, *Ezh2* ablation did not result in overexpression of GATA4 and WT1 before E14.5 and E18.5 respectively. This suggests that other repressive factors may be involved in this process. Alternatively, even though we did not detect overexpression of EZH1 in adult Ezh2 KO adrenals (data not shown), it may be compensating for loss of EZH2 during

early embryonic development. Such a compensatory mechanism has been demonstrated in mouse hepatocytes (38) or in mouse cardiomyocytes (39).

EZH2 is generally considered as a factor that maintains stem/progenitor cells in an undifferentiated state and its inactivation results in aberrant engagement and differentiation. Indeed, *EZH2* ablation in human embryonic stem cells results in aberrant activation of multiple differentiation programmes (40). This function is maintained in adult hematopoietic stem cells (41), myoblasts (42, 43) and neural stem cells (44, 45) and forced overexpression of EZH2 after differentiation is capable of inducing dedifferentiation of astrocytes toward neural stem cells (46). In marked contrast, our data show that EZH2 is mostly expressed in differentiated adrenal cortex cells. Its ablation in these cells results in their dedifferentiation towards a progenitor-like state and is also associated with a decreased capacity to respond to differentiation signals such as ACTH/cAMP/PKA signalling. This emphasizes the multiple and sometimes contradictory functions of EZH2 and raises the question of the role of EZH1 or other epigenetic factors in maintaining the undifferentiated status of adrenal progenitor cells.

Altogether, our data show a novel role of the histone methyltransferase EZH2 as a master regulator of PKA signalling in adrenal cortex homeostasis and differentiation.

Materials & Methods

Mice

All experiments with mice were approved by Auvergne Ethics committee (CEMEAA). Ezh2 Fl/Fl mice were obtained from the MMRRC repository (strain #015499_UNC) and were initially generated by Dr Tarakhovsky (13). Sf1:Cre mice were generated by Bingham et al. (12). mTmG mice were generated by Muzumdar et al. (14). Unless otherwise stated, all data on adult mice were generated on tissues from 2 month-old females. For embryonic analyses, embryos were used irrespective of sex. The morning of

the vaginal plug was considered as E0.5. Control animals were littermates of *Sf1:Cre,Ezh2 Fl/Fl* mice. All mice were maintained on a mixed background mostly composed of C57BL/6J and 129. There was no randomization of samples nor blinding of the investigator. At the end of experimental procedures, mice were euthanized by decapitation and blood was collected in vacuum blood collection tubes (VF-053STK, Terumo). Adrenals were either frozen in liquid nitrogen or fixed in 4% PFA. Total mRNAs were extracted using RNAII nucleotide extraction kit (Macherey Nagel) according to manufacturer's instructions.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed on tissues embedded in paraffin, after unmasking by boiling for 20 min in sodium citrate 10 mM, Tween 0.05%; Tris 10mM, EDTA 1mM, pH 9.0; or Vector Unmasking Solution (H3300, Vector Laboratories), depending on the primary antibody and/or combinations of antibodies to be used. For CYP11B2, unmasking with Tris-EDTA was followed by 5 min incubation in 10% SDS. After blocking for 1h, slides were incubated overnight at room temperature, with primary antibodies at the indicated concentrations (Table S1). Primary antibodies were detected with appropriate polymers (ImmPress Polymer Detection Kit, Vector Laboratories). Polymer-coupled HRP activity was then detected with either Vectastain ABC (PK-4000, Vector Laboratories) for brightfield images or TSA-Alexa-coupled fluorochromes for fluorescence (Invitrogen). All immunohistochemical analyses were conducted on an automated processor (Intavis InSitu Pro VSi) to ensure homogeneity and reproducibility of detections. Images were acquired with a Zeiss Axioplan 2, Zeiss AxioImager with Apotome2 or Zeiss Axioscan Z1 slide scanner. They were minimally processed for global levels and white balance using Affinity Photo®. Image settings and processing were identical across genotypes.

RNAScope™ analysis

RNA in situ hybridisation to detect *Shh* and *Gli1* expression was conducted on 5 µm paraffin sections using RNAScope probes for *Shh* (#314361) and *Gli1* (#311001) with the RNAScope 2.5HD detection reagent-Red system (#322360, Adanced Cell Diagnostics), following manufacturer's instructions.

ChIP sequencing analysis

Publically available ChIP sequencing data were retrieved by searching for a combination of "EZH2", "H3K27me3" and "ChIP" on the Gene Expression Omnibus (GEO) database (http://www.ncbi.nlm.gov/geo). We selected datasets for which .fastq, peaks.bed and input data were available for download. Mapping of ChIP seq reads was performed with Bowtie2 (version 2.3.0) on the hg38 Human reference genome. Output files were converted to .bam format using SAMtools (version 1.3.1). ChIP enrichment for each of the marks was determined using MACS2 (version 2.1.1), using a qvalue (minimal FDR) of 0.05. Peaks annotation was performed using the ChIPseeker package (version 1.12.1) under R (version 3.4.3). To detect potential target genes, peaks were annotated using the "TxDb.Hsapiens.UCSC.hg38.knownGene" package, using a -2/+2kb window surrounding the transcription start site.

Micro-array analyses

Adrenal gene expression profiles for three 2 month-old female wild-type and four Ezh2 KO littermates were analyzed using Affymetrix Mouse Gene 2.0 ST Arrays (Raw and processed data are deposited on NCBI GEO platform). Gene expression was normalised by RMA (Affy R package) and genotype comparisons were performed using the Limma package. All p-values were adjusted by the Benjamini-Hochberg correction method (Table S2). Heatmaps were generated with R and represent colour-coded individual median centered gene expression levels (in the Log2 space) in 3 WT and 4 knockout

adrenals. Genes were ordered according to the mean Fold change (Log2) in knockout versus WT. Genes with adjusted p value (FDR) <0.1 and Abs(Log 2 fold change) > 1.0 were considered significantly deregulated.

Gene set enrichment analyses

Gene set enrichment analysis were conducted using GSEA 2.2.1 (47) with custom curated gene sets (table S3). Permutations were set to 1000 and were performed on gene sets. PRC2_CHENG_PLC5_mmES, PRC2_CHENG_PLC5_hsES, PRC2_CHENG_hsES_HUH7, and PRC2_CHENG_HUH7_mmES were extracted from Cheng et al. (48). They represent genes with binding of EZH2, SUZ12 and H3K27me3 in both PLC5 and mouse ES cells (PRC2_CHENG_PLC5_mmES), in both PLC5 and human ES cells (PRC2_CHENG_PLC5_hsES), in both HUH7 and human ES cells (PRC2_CHENG_hsES_HUH7) and in both HUH7 and mouse ES cells (PRC2_CHENG_HUH7_mmES). PRC2_LEE represents genes with binding of SUZ12, EED and H3K27me3 in human ES cells and was extracted from Lee et al. (49). PRC2_VELICHTUNA_hsES_CB_K27_EZH2 represents genes with binding of EZH2 and H3K27me3 in both human ES cells and germinal center B cells and was extracted from Velichtuna et al. (50). PRC2_BRACKEN_SHORT represents genes presenting PRC2 binding and showing increased expression after Polycomb depletion. It was extracted from Bracken et al. (51). Adrenal_progenitors gene set was curated from Pubmed searches on regulators of adrenal progenitors homeostasis. Zf_Nishimoto and Zg_Nishimoto correspond to genes that are expressed in laser-captured rat zona fasciculata and zona glomerulosa respectively (16). WNT_pathway corresponds to WNT pathway regulators and targets extracted from Drelon et al. (3). Steroidogenis represents key players in adrenal steroidogenesis. Cholesterol_synthesis represents key players in de novo cholesterol synthesis through the mevalonate pathway.

Hormonal measurements

Plasma corticosterone (AR E-8100, LDN) and aldosterone (CAN-ALD-450, Diagnostics Biochem Canada) concentrations were determined using commercially available ELISA kits, following manufacturer's instructions. Renin activity rate in plasma was determined using a Fluorimetric Sensolyte 520 Mouse Renin Assay Kit (AnaSpec Inc). ACTH, LH and FSH concentrations were determined using a multiplex assay (MPTMAG-49K, Merck Millipore).

RTqPCR

One microgram of total mRNAs (from tissues or cell culture) was reverse transcribed for 1 hour at 37°C with 5 pmoles of random hexamers primers, 200 units reverse transcriptase (M-MLV RT, M1701, Promega), 2 mM dNTPs and 20 units RNAsin (N2615, Promega). One microliter of a one-tenth dilution of cDNA was used in each quantitative PCR. PCR reactions were conducted with SYBR qPCR Premix Ex Taq II Tli RNase H+ (TAKRR820W, Takara). Primer pairs are listed in Table S4. For each experiment and primer pairs, efficiency of PCR reactions was evaluated by amplification of serial dilutions of a mix of cDNAs. Relative gene expression was obtained by the $\Delta\Delta Ct$ method with normalization to average expression of three housekeeping genes, *36b4, Ppib and Actin*.

Western Blot

Twenty micrograms of total proteins were loaded on 10% SDS-PAGE gel, transferred onto nitrocellulose and detected with either total CREB (1/1000, #9197, Cell Signaling) or Phospho-Serine133-CREB (1/1000, #9198, Cell Signaling) antibodies in 5% BSA. Signals were quantified with a DNR MF ChemiBis 3.2 camera system and Multi Gauge software suite (Fujifilm). Expression of the phospho-protein was normalized to expression of the corresponding total protein.

PKA Activity

PKA activity was measured using PKA Kinase Activity Assay Kit (ab139435, Abcam), following manufacturer's instructions. It was measured on 10µg of protein extracts from pairs of adrenals from four 2 month-old female wild-type and four Ezh2 KO adrenals.

Chromatin Immunoprecipitation qPCR

H3K27me3 and EZH2 chromatin immunoprecipitation (ChIP) were performed using the iDeal ChIP-seq kit for histones (Diagenode) according to manufacturer's instructions, using the following antibodies: C15410195 (rabbit polyclonal, Diagenode) for H3K27me3 and C15410039 (rabbit polyclonal, Diagenode) for EZH2. Briefly, 20 to 35 mg of tissue from 2 month-old female WT and Ezh2 KO mice (pools of 6 adrenals from 3 mice, in triplicate) were first grinded using a dounce homogenizer and then cross-linked with 1% formaldehyde for 10 min. Cross-linking was stopped by adding glycine (125mM final) for 5 min at room temperature. Lysis buffer was then added and chromatin was sheared using a BioruptorPico (Diagenode) to obtain fragments of ~300 bp in average. Two percent of chromatin used for IPs was used as input control. IPs were conducted overnight at 4 °C on a rotating wheel. Two micrograms of antibody were used for H3K27me3 and 3µg for EZH2. After 4 successive washing, elution of chromatin was performed for 30 min at room temperature. The reversion of the cross-linking was performed by incubating chromatin 4 h at 65 °C with proteinase K. The Ipure kit (Diagenode) was used to precipitate and purify the DNA. qPCR were performed to validate ChIP for each antibody on specific genomic regions using SensiMix™ SYBR® (Bioline). 5µl of input or precipitated chromatin were used for the qPCR in the presence of 250pM primers (Table S1). The results were normalised as percentage of input (%(meIP/Input) = 2*((Ct(2%input) - 5.643856) - Ct(IP))*100) and are expressed as

relative enrichment of the same marks on the regulatory regions of the housekeeping gene GAPDH.

Statistical analyses

Minimal sample size was set at n=5 allowing for detection of 40% increases/decreases with α=0.05, 1-β=80%, σ=0.3 and mean of control group=1.0. Statistical analyses were conducted with R and GraphPad Prism 7. Normality of data was assessed using D'Agostino & Pearson normality test. Statistical analysis of normally distributed data was performed by two-tailed Student's t test (two groups) with or without Welch's correction (as a function of variance) or one-way ANOVA (multiple groups), followed by Tukey's multiple comparisons test. Analysis of non-normally distributed data was performed by two-tailed Mann & Whitney test (two groups) or Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test (multiple groups). All bars represent the mean ± SEM. Boxplots represent

Data Availability

The authors declare that all data supporting the findings of this study are available within the article and its supplementary information files or from the corresponding author upon reasonable request. Microarray data are deposited on Gene Expression Omnibus repository with reference GSE109578.

Acknowledgements

We wish to thank Khirredine Ouchen, Sandrine Plantade and Philippe Mazuel for animal care, Anipath Clermont for anatomopathological analyses, Sébastien Jacques and Florent Dumont (Plateforme Genomic, Inserm U1016-CNRS UMR8104-Université Paris Descartes) for microarray analyses. This work was funded through institutional support from Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Université Clermont Auvergne, La Ligue Contre le Cancer (Allier &

Puy de Dôme committees), Fondation ARC, Société Française d'Endocrinologie (young researcher grant to M.M. and research grant to P.V.) and Agence Nationale de la Recherche (ANR-14-CE12-0007-01-DevMiCar). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

Competing interest

The authors have no conflict of interest to declare

Authors contributions

M.M. performed experiments, C.D. performed experiments, S.R. performed experiments, H.T. performed experiments, A.S. performed bioinformatics analyses, C.D.S. performed experiments, T.D. performed experiments, A.B. performed experiments, I.S.B. performed experiments, M.B.L. performed experiments, J.C.P. performed experiments, G.K. performed experiments, M.A.C. performed experiments, V.B. conceived experiments, I.T. discussed data, A.M.L.M discussed data, A.M. conceived experiments, P.V. conceived experiments, performed experiments and wrote the manuscript.

References

1. Yates R, et al. (2013) Adrenocortical development, maintenance, and disease. *Curr Top Dev Biol* 106:239–312.

2. Vinson GP (2016) Functional Zonation of the Adult Mammalian Adrenal Cortex. *Front Neurosci* 10:238.

3. Drelon C, et al. (2016) PKA inhibits WNT signalling in adrenal cortex zonation and prevents malignant tumour development. *Nat Commun* 7:12751.

4. Pihlajoki M, Dörner J, Cochran RS, Heikinheimo M, Wilson DB (2015) Adrenocortical zonation, renewal, and remodeling. *Front Endocrinol* 6:27.

5. Freedman BD, et al. (2013) Adrenocortical zonation results from lineage conversion of differentiated zona glomerulosa cells. *Dev Cell* 26(6):666–673.

6. King P, Paul A, Laufer E (2009) Shh signaling regulates adrenocortical development and identifies progenitors of steroidogenic lineages. *Proc Natl Acad Sci U A* 106(50):21185–21190.

7. Vidal V, et al. (2016) The adrenal capsule is a signaling center controlling cell renewal and zonation through Rspo3. *Genes Dev* 30(12):1389–1394.

8. Zubair M, Parker KL, Morohashi KI (2008) Developmental links between the fetal and adult adrenal cortex revealed by lineage tracing. *Mol Cell Biol* 28(23):7030–7040.

9. Wood MA, et al. (2013) Fetal adrenal capsular cells serve as progenitor cells for steroidogenic and stromal adrenocortical cell lineages in M. musculus. *Dev Camb Engl* 140(22):4522–4532.

10. Margueron R, Reinberg D (2011) The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* 469(7330):343–349.

11. Drelon C, et al. (2016) EZH2 is overexpressed in adrenocortical carcinoma and is associated with disease progression. *Hum Mol Genet* 25(13):2789–2800.

12. Bingham NC, Verma-Kurvari S, Parada LF, Parker KL (2006) Development of a steroidogenic factor 1/Cre transgenic mouse line. *Genesis* 44(9):419–24.

13. Su I-H, et al. (2003) Ezh2 controls B cell development through histone H3 methylation and Igh rearrangement. *Nat Immunol* 4(2):124–131.

14. Muzumdar MD, Tasic B, Miyamichi K, Li L, Luo L (2007) A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *Genes N Y N 2000* 45(9):593–605.

15. Xu K, et al. (2012) EZH2 oncogenic activity in castration-resistant prostate cancer cells is Polycomb-independent. *Science* 338(6113):1465–1469.

16. Nishimoto K, et al. (2012) Transcriptome analysis reveals differentially expressed transcripts in rat adrenal zona glomerulosa and zona fasciculata. *Endocrinology* 153(4):1755–1763.

17. Dumontet T, et al. (2018) PKA signaling drives reticularis differentiation and sexually dimorphic adrenal cortex renewal. *JCI Insight* in press.

18. Bandiera R, et al. (2013) WT1 maintains adrenal-gonadal primordium identity and marks a population of AGP-like progenitors within the adrenal gland. *Dev Cell* 27(1):5–18.

19. Dörner J, et al. (2016) GLI1(+) progenitor cells in the adrenal capsule of the adult mouse give rise to heterotopic gonadal-like tissue. *Mol Cell Endocrinol*. doi:10.1016/j.mce.2016.08.043.

20. 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.

21. Walczak EM, et al. (2014) Wnt-Signaling Inhibits Adrenal Steroidogenesis by Cell-Autonomous and Non-Cell-Autonomous Mechanisms. *Mol Endocrinol Baltim Md*:me20141060.

22. Koppens MAJ, et al. (2016) Deletion of Polycomb Repressive Complex 2 From Mouse Intestine Causes Loss of Stem Cells. *Gastroenterology* 151(4):684-697.e12.

23. Wang L, Jin Q, Lee J-E, Su I -hsi., Ge K (2010) Histone H3K27 methyltransferase Ezh2 represses Wnt genes to facilitate adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(16):7317–7322.

24. Berthon A, et al. (2010) Constitutive {beta}-catenin activation induces adrenal hyperplasia and promotes adrenal cancer development. *Hum Mol Genet* 19(8):1561–1576.

25. Berthon A, et al. (2014) WNT/β-catenin signalling is activated in aldosterone-producing adenomas and controls aldosterone production. *Hum Mol Genet* 23(4):889–905.

26. Flück CE (2017) MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Update on pathogenesis of primary adrenal insufficiency: beyond steroid enzyme deficiency and autoimmune adrenal destruction. *Eur J Endocrinol* 177(3):R99–R111.

27. Meimaridou E, et al. (2013) Familial glucocorticoid deficiency: New genes and mechanisms. *Mol Cell Endocrinol* 371(1–2):195–200.

28. Meimaridou E, et al. (2012) Mutations in NNT encoding nicotinamide nucleotide transhydrogenase cause familial glucocorticoid deficiency. *Nat Genet* 44(7):740–742.

29. Prasad R, et al. (2014) Thioredoxin reductase 2 (TXNRD2) mutation associated with familial glucocorticoid deficiency (FGD). *J Clin Endocrinol Metab*:jc20133844.

30. Chan LF, Campbell DC, Novoselova TV, Clark AJL, Metherell LA (2015) Whole-Exome Sequencing in the Differential Diagnosis of Primary Adrenal Insufficiency in Children. *Front Endocrinol* 6. doi:10.3389/fendo.2015.00113.

31. Hughes CR, et al. (2012) MCM4 mutation causes adrenal failure, short stature, and natural killer cell deficiency in humans. *J Clin Invest* 122(3):814–820.

32. Arboleda V, et al. (2012) Mutations in the PCNA-binding domain of CDKN1C cause IMAGe syndrome. *Nat Genet* 44(7):788–92.

33. 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(3):1119–28.

34. Bielinska M, et al. (2006) Gonadectomy-induced adrenocortical neoplasia in the domestic ferret (mustela putorius furo) and laboratory mouse. *Vet Pathol* 43(2):97–117.

35. Krachulec J, et al. (2012) GATA4 is a critical regulator of gonadectomy-induced adrenocortical tumorigenesis in mice. *Endocrinology* 153(6):2599–2611.

36. Frith CH, Highman B, Burger G, Sheldon WD (1983) Spontaneous lesions in virgin and retired breeder BALB/c and C57BL/6 mice. *Lab Anim Sci* 33(3):273–286.

37. Petterino C, Naylor S, Mukaratirwa S, Bradley A (2015) Adrenal Gland Background Findings in CD-1 (Crl:CD-1(ICR)BR) Mice from 104-week Carcinogenicity Studies. *Toxicol Pathol* 43(6):816–824.

38. Bae WK, et al. (2015) The methyltransferases enhancer of zeste homolog (EZH) 1 and EZH2 control hepatocyte homeostasis and regeneration. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 29(5):1653–1662.

39. He A, et al. (2012) Polycomb repressive complex 2 regulates normal development of the mouse heart. *Circ Res* 110(3):406–415.

40. Collinson A, et al. (2016) Deletion of the Polycomb-Group Protein EZH2 Leads to Compromised Self-Renewal and Differentiation Defects in Human Embryonic Stem Cells. *Cell Rep* 17(10):2700–2714.

41. De Haan G, Gerrits A (2007) Epigenetic control of hematopoietic stem cell aging the case of Ezh2. *Ann N Y Acad Sci* 1106:233–239.

42. Caretti G, Di Padova M, Micales B, Lyons GE, Sartorelli V (2004) The Polycomb Ezh2 methyltransferase regulates muscle gene expression and skeletal muscle differentiation. *Genes Dev* 18(21):2627–2638.

43. Consalvi S, Brancaccio A, Dall'Agnese A, Puri PL, Palacios D (2017) Praja1 E3 ubiquitin ligase promotes skeletal myogenesis through degradation of EZH2 upon p38α activation. *Nat Commun* 8:13956.

44. Pereira JD, et al. (2010) Ezh2, the histone methyltransferase of PRC2, regulates the balance between self-renewal and differentiation in the cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(36):15957–15962.

45. Sher F, et al. (2008) Differentiation of neural stem cells into oligodendrocytes: involvement of the polycomb group protein Ezh2. *Stem Cells Dayt Ohio* 26(11):2875–2883.

46. Sher F, Boddeke E, Copray S (2011) Ezh2 expression in astrocytes induces their dedifferentiation toward neural stem cells. *Cell Reprogramming* 13(1):1–6.

47. Subramanian A, et al. (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(43):15545–15550.

48. Cheng ASL, et al. (2011) EZH2-mediated concordant repression of Wnt antagonists promotes β-catenin-dependent hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 71(11):4028–4039.

49. Lee TI, et al. (2006) Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell* 125(2):301–313.

50. Velichutina I, et al. (2010) EZH2-mediated epigenetic silencing in germinal center B cells contributes to proliferation and lymphomagenesis. *Blood* 116(24):5247–5255.

51. Bracken AP, Dietrich N, Pasini D, Hansen KH, Helin K (2006) Genome-wide mapping of Polycomb target genes unravels their roles in cell fate transitions. *Genes Dev* 20(9):1123–1136.

Figure Legends

Figure 1. *Ezh2* ablation in the adrenal cortex results in up-regulation of PRC2 target genes. A- immunohistochemical detection of EZH2 (a-b, E14.5) and H3K27me3 (c-d, E18.5) together with GFP expressed from the mTmG locus following Sf1:Cre-mediated recombination, in both wild-type (a,c, *Sf1:Cre,mTmG,Ezh2 +/+*) and knockout adrenals (b,d, *Sf1:Cre,mTmG,Ezh2 Fl/Fl*). Ad: adrenal, Scalebars: 50µm **B-** Heatmap representing the median centred expression of the significantly deregulated genes (FDR<0.1) in 2 month-old female EZH2 knockout adrenals (n=4), compared with wild-type littermates (n=3). Expression data were extracted from micro-array analyses using Affymetrix chips. **C-** Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) of micro-array gene expression data, using curated EZH2/PRC2 target gene lists.

Figure 2. EZH2 ablation is associated with primary glucocorticoid insufficiency and aberrant zonal differentiation. A- Haematoxylin & eosin staining of 2 month-old wild-type and Ezh2 KO adrenals, showing a marked difference in size, cortical hypoplasia and dysplasia and misplaced adrenal medulla. Ca: capsule, Co: cortex, M: medulla. Scalebars: 200µm. **B-** adrenal weight and **C-** relative cortical cell surface in 2 month-old wild-type (black bar) and Ezh2 KO adrenals (grey bar). **D-** plasma corticosterone, **E-** ACTH, **F-** aldosterone, **G-** renin activity in 2 month-old wild-type (Black bar) and Ezh2 KO adrenals (grey bar). **H-** Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) of micro-array gene expression data, using curated zona fasciculata and zona glomerulosa-specific gene lists. **I-** Immunohistochemical detection of AKR1B7 (zF, a-b), Dab2 (zG, c-d), Cyp11b2 (zG) and co-immunostaining for AKR1B7 and DAB2 in 2 month-old wild-type and Ezh2 KO adrenals. M: medulla, zF: zona fasciculata, zG: zona glomerulosa. White arrowheads show cells with co-staining for DAB2 and AKR1B7, star show

misplaced DAB2-positive cells. Scalebars: 50µm **J-** RTqPCR analysis of accumulation of mRNAs encoding steroidogenic enzymes (*Cyp11b1*, *Cyp21*, *Hsd3b1*, *Cyp11b2*), zone-specific markers (*Akr1b7*, *Dab2*) and Angiotensin II receptors (*At1a*, *At1b*) in 2 month-old wild-type and Ezh2 KO adrenals. Bars represent the mean expression in 7 animals per group ± SEM. ns, not significant, * p <0.05.

Figure 3. *Ezh2* ablation is associated with mild induction of canonical WNT/β-catenin signalling. A- Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) of micro-array gene expression data, using a curated WNT pathway regulators and targets gene list (3). **B-** Heatmap representing the median centred expression of significantly deregulated WNT regulators and target genes (FDR <0.1) in 2 month-old Ezh2 KO compared with wild-type adrenals. **C-** RTqPCR analysis of accumulation of mRNAs encoding canonical WNT target genes in 2 month-old wild-type and Ezh2 KO adrenals. Bars represent the mean expression in 7 animals per group ± SEM. Ns, not significant, ** p <0.01. **D-** Immunohistochemical detection of the canonical WNT target gene LEF1 in 2 month-old wild-type and Ezh2 KO adrenals. zF: zona fasciculata, zG: zona glomerulosa, Ca: capsule. Scalebars: 50µm.

Figure 4. EZH2 programs the capacity of adrenal steroidogenic cells to respond to PKA signalling. A- Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) of micro-array gene expression data, using curated steroidogenesis and cholesterol synthesis (mevalonate pathway) genes lists. **B-** Immunohistochemical detection of Pan-PKA substrates (a-b) and phosphorylated CREB protein together with GFP (cells of the steroidogenic lineage, c-d) in 2 month-old wild-type and Ezh2 KO adrenals. **C-** Western-blot analysis of P-CREB accumulation in seven 2 month-old wild-type and Ezh2 KO adrenals. Graph shows quantification of P-CREB over CREB signal. **D-** ELISA quantification of basal and cAMP-induced PKA activity in adrenal extracts from 4 wild-type and 4 Ezh2 KO 2 month-old

adrenals. **E-** Heatmap representing the median centred expression of significantly deregulated PKA pathway regulators (FDR <0.1) in 2 month-old Ezh2 KO compared with wild-type adrenals. **F-** RTqPCR analysis of accumulation of mRNAs encoding inhibitors of PKA signalling pathway in 2 month-old wild-type and Ezh2 KO adrenals. Bars represent the mean expression in 7 animals per group ± SEM. **G-** Chromatin immunoprecipitation (ChIP) of H3K27me3 and EZH2 on the regulatory regions of PKA pathway inhibitors in 2 month-old wild-type and Ezh2 KO adrenals. Enrichments were normalised to input for each experiment and are expressed as relative enrichment of the same marks on the regulatory regions of the housekeeping gene GAPDH. **H-** Immunohistochemical detection of EZH2 in E15.5, E18.5, 1 month and 6 months wild-type adrenals. Ca: capsule, Co: cortex, zF: zona fasciculata. **I-** Co-immunostaining for DAB2 (zG) and AKR1b7 (zF) in E18.5 wild-type and Ezh2 KO adrenals. White arrowheads show cell staining for both DAB2 and AKR1B7, star shows a misplaced DAB2-positive cell. **J-K** RTqPCR analysis of accumulation of mRNAs encoding zonal differentiation markers (K) and PKA signalling inhibitors (L) in 2 month-old wild-type and Ezh2 KO adrenals. Bars represent the mean expression in 7 animals per group ± SEM. **L-** Co-immunostaining for EZH2, DAB2 (zG) and AKR1B7 (zF) in a 2 month-old wild type adrenal. M: medulla. Arrowheads show EZH2-positive cells. **M-** Co-immunostaining for EZH2 and Ki67 in a 2 month-old wild type adrenal. Arrowheads show cells staining for both EZH2 and Ki67. Stars show cells only staining for EZH2. ns, not significant, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$. Scalebars: 50 µm.

Figure 5. *Ezh2* ablation is associated with accumulation of cells with characteristics of adrenal progenitors. A- Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) of micro-array gene expression data, using a curated list of adrenal progenitors-associated genes. **B-** haematoxylin-eosin staining (a-b) and immunohistochemical detection of the

capsular marker NR2F2 (c-d) in 2 month-old wild-type and Ezh2 KO adrenals. **C-** Heatmap representing the median centred expression of significantly deregulated progenitors-associated genes (FDR <0.1) in 2 month-old Ezh2 KO compared with wild-type adrenals. Ca: capsule, zG: sona glomerulosa, zF: zona fasciculata **D-** RNAscope in situ hybridisation showing expression of *Shh* (homeostatic progenitors, a-b) and *Gli1* (supraphysiological progenitors, c-d) and immunohistochemistry for WT1 (e-f) and GATA4 (g-h) in 2 month-old wild-type and Ezh2 KO adrenals. **E-F-** RTqPCR analysis of accumulation of mRNAs encoding key actors in Hedgehog pathway (E) and markers of supraphysiological progenitors (F) in 2 month-old wild-type and Ezh2 KO adrenals. Bars represent the mean expression in 7 animals per group ± SEM. **G-** Co-immunostaining of WT1 and GATA4 in a 2 month-old Ezh2 KO adrenal. Ca: capsule, zG: zona glomerulosa, zF: zona fasciculata. **H-** RTqPCR analysis of accumulation of mRNAs encoding markers of gonadal-like differentiation in 2 month-old wild-type and Ezh2 KO adrenals. Bars represent the mean expression in 7 animals per group ± SEM. ns, not significant, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$. Scalebars: 50 µm.

Figure 6. EZH2 prevents dedifferentiation of steroidogenic cells towards a progenitor-like phenotype. A- Immunohistochemical analysis of GATA4 and WT1 expression in E14.5 (a-d) and E18.5 (e-h) wild-type (a,c,e,g) and Ezh2 KO (b,d,f,f) embryos. Ca: capsule, Ad: adrenal, Kid: kidney. **B-** RTqPCR analysis of accumulation of mRNAs encoding *Wt1* and *Gata4* in E14.5 and E18.5 wild-type and Ezh2 KO adrenals. Bars represent the mean expression in 14 (E14.5) and 6 (E18.5) animals per group ± SEM. **C-** Immunohistochemical analysis of Ki67 expression in 2 month-old wild-type and Ezh2 KO adrenals. M: medulla, Co: cortex. **D-** Number of cortical Ki67-positive cells in Ezh2 KO relative to wild-type adrenals. Bars represent the mean expression in 6 (E14.5) animals per group ± SEM (left panel). RTqPCR analysis of accumulation of mRNAs

encoding *Ki67* in 2 month-old wild-type and Ezh2 KO adrenals. Bars represent the mean expression in 7 animals per group ± SEM. **E-** Co-immunostaining of GATA4 and Ki67 in 2 month-old wild-type and Ezh2 KO adrenals. Ca: capsule, Co: cortex. **F-** Chromatin immunoprecipitation (ChIP) of H3K27me3 and EZH2 on the regulatory regions of *Gata4* and *Wt1* in 2 month-old wild-type and Ezh2 KO adrenals. Enrichments were normalised to input for each experiment and are expressed as relative enrichment of the same marks on the regulatory regions of the housekeeping gene GAPDH. **G-** Co-immunostaining of Ezh2 and GFP (cells of the steroidogenic lineage) in 2 month-old wild-type (a) and Ezh2 KO (b) adrenals. White arrowheads show EZH2-positive capsular cells. Ca: capsule, Co: cortex, M: medulla. **H-** Co-immunostaining of SF1 (actual steroidogenic cells), GATA4 and GFP (cells of the steroidogenic lineage) in 2 month-old wild-type (a, bearing Sf1:Cre and the mTmG reporter) and Ezh2 KO (b) adrenals. Right panels show different overlays of the region delineated by the dashed rectangle to the left. **I-** Co-immunostaining of SF1 (actual steroidogenic cells), GATA4 and GFP (cells of the steroidogenic lineage) in a 12 month-old wild-type adrenal (bearing *Sf1:Cre* and the mTmG reporter). Right panels show different overlays of the region delineated by the dashed rectangle to the left. Scalebars in A, E, G, H, I: 50 µm. Scalebars in C: 200 µm.

Figure S1 related to Figure 1. A- Immunohistochemical detection of H3K27me3 together with GFP expressed from the mTmG locus, following Sf1:Cre-mediated recombination, in 2 month-old wild-type (a, *Sf1:Cre,mTmG,Ezh2 +/+*) and Ezh2 KO female adrenals (b, *Sf1:Cre,mTmG,Ezh2 Fl/Fl*). Ca: capsule, Co: cortex, M: medulla. Scalebars: 50 µm **B-** Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) of micro-array gene expression data (2 month-old knockout *versus* wild-type adrenals), using curated EZH2/PRC2 target gene lists.

Figure S2 related to Figure 4. A- RTqPCR analysis of accumulation of mRNAs encoding the ACTH receptor *Mc2r* and the accessory protein *Mrap* in 2 month-old wild-type and Ezh2 KO adrenals. Bars represent the mean expression in 7 animals per group ± SEM. ns, not significant. **B-** Table recapitulating analysis of publically available ChIP sequencing data for EZH2 (E) and H3K27me3(H) in 14 cell lines and for genes encoding phosphodiesterases (*Pde1a-Pde11a*) and regulatory subunits of PKA. An orange box indicates the presence of a binding peak for either EZH2 and/or H3K27me3 within -2/+2kb from the transcription start site of each gene. A colour code in the leftmost lane indicates substrate specificity for cAMP (orange), cGMP (grey) or both (green). HeLa: Human cervix cancer, LNCaP Abl: Human castration resistant prostate cancer lymph node metastasis cells, K562: Human CML, ProES: Human primary fetal liver proerythroblasts, DND41: Human T cell leukaemia, h1_hesc: Human embryonic stem cells, hepG2: Human hepatocellular carcinoma, EC: Human primary epithelial cell, HSMM: Human skeletal muscle myoblast, HUVEC: Human umbilical vein endothelial cells, NHA: normal Human astrocyte cells, NHDF-Ad: adult Human dermal fibroblasts, NHEK: Human dermal keratinocyte, NHLF: Human lung fibroblast. **C-** Immunohistochemical detection of H3K27me3 in E15.5, E18.5, 1 month and 6 months adrenals from wild-type mice. Scalebars: 50 µm.

Figure S3 related to Figure 6. A- Hematoxylin-eosin staining of 2 month-old wild-type and Ezh2 KO testes and ovaries. **B-** Plasma LH and FSH concentrations in 2 month-old wild-type and Ezh2 KO female mice. ns, not significant.

Figure S4 related to Figure 6. A- Co-immunostaining of EZH2 and GFP (cells of the steroidogenic lineage) in E14.5 (A-b), E18.5(c-d) and 14dpp (e-f) wild-type (a,c,e) and Ezh2 KO (b,d,f) adrenals. White arrowheads show EZH2-positive capsular cells. Ca: capsule, Co: cortex. **B-** Co-immunostaining of WT1 and GFP (a-b, cells of the

steroidogenic lineage) and WT1 and SF1 (c-d) in 2 month-old wild-type (a,c) and Ezh2 KO (b,d) female adrenals. White arrowheads show scarce WT1-positive cells in wild-type adrenals. Scalebars: 50 μm.

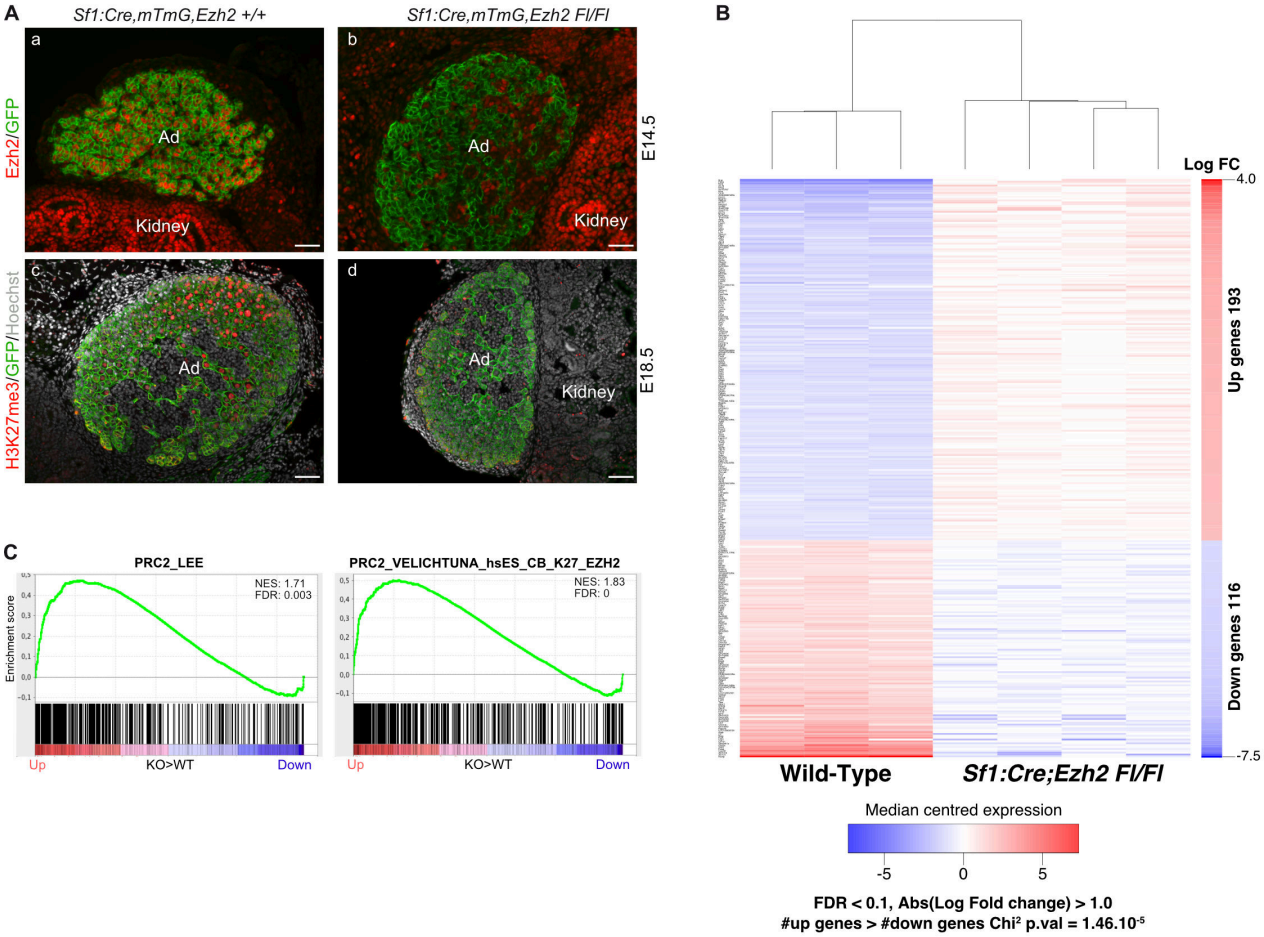

A
Sf1:Cre,mTmG,Ezh2 +/+
Sf1:Cre,mTmG,Ezh2 Fl/Fl
a
b
c
d
Ezh2/GFP
H3K27me3/GFP/Hoechst
Ad
Kidney
E14.5
E18.5
C
PRC2_LEE
NES: 1.71
FDR: 0.003
PRC2_VELICHTUNA_hsES_CB_K27_EZH2
NES: 1.83
FDR: 0
Enrichment score
Up
KO>WT
Down
B
Log FC
4.0
-7.5
Up genes 193
Down genes 116
Wild-Type
Sf1:Cre;Ezh2 Fl/Fl
Median centred expression
-5
0
5
FDR < 0.1, Abs(Log Fold change) > 1.0
#up genes > #down genes Chi² p.val = 1.46.10-5

Figure 1.

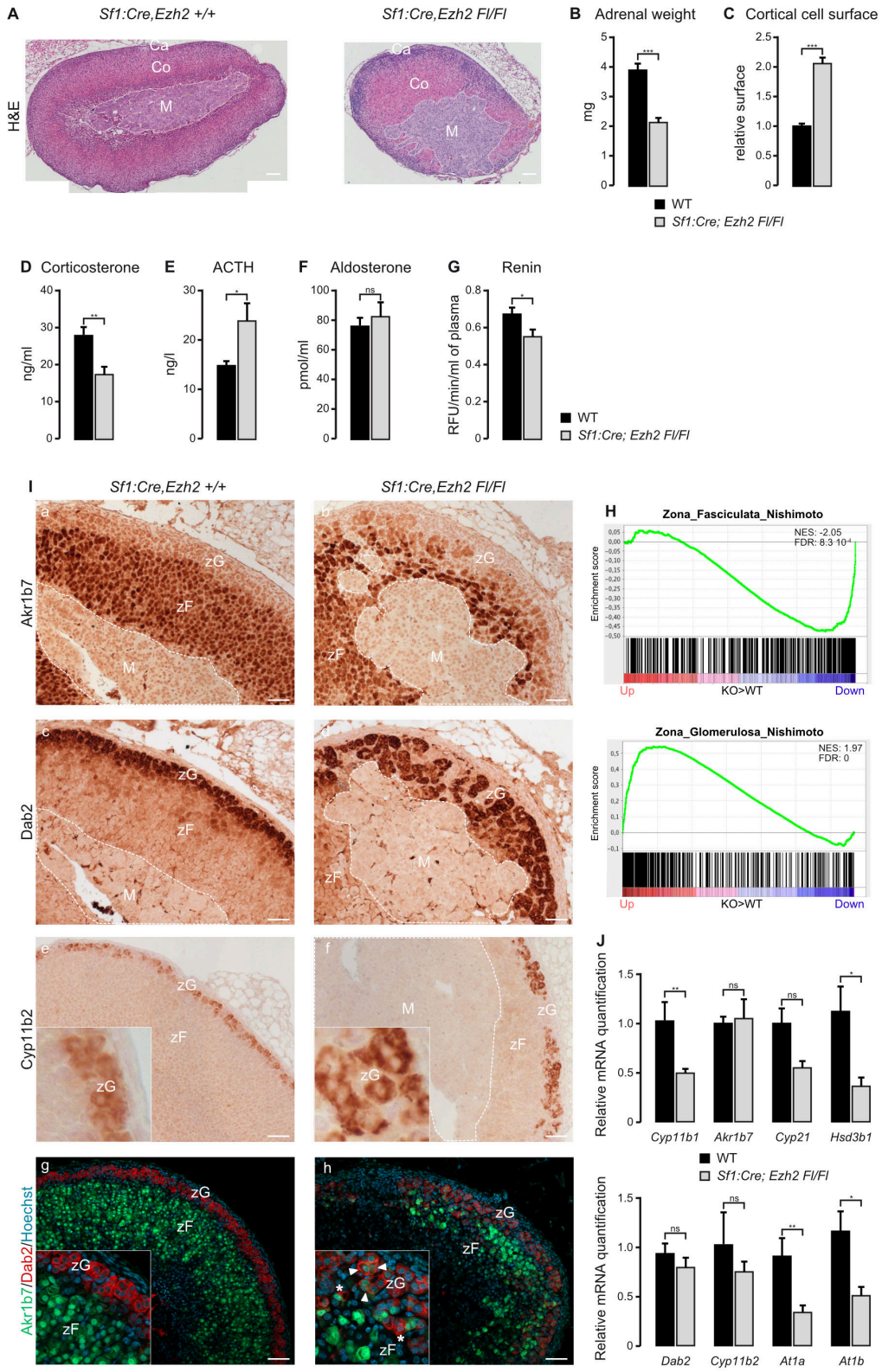

A
Sf1:Cre,Ezh2 +/+
Sf1:Cre,Ezh2 Fl/Fl
H&E
Ca
Co
M
B Adrenal weight
mg
C Cortical cell surface
relative surface
WT
Sf1:Cre; Ezh2 Fl/Fl
D Corticosterone
ng/ml
E ACTH
ng/l
F Aldosterone
pmol/ml
G Renin
RFU/min/ml of plasma
I
Akr1b7
Dab2
Cyp11b2
Akr1b7/Dab2/Hoechst
zG
zF
H
Zona_Fasciculata_Nishimoto
NES: -2.05
Zona_Glomerulosa_Nishimoto
NES: 1.97
FDR: 0
Enrichment score
Up
KO>WT
Down
J
Relative mRNA quantification
Cyp11b1
Akr1b7
Cyp21
Hsd3b1
Dab2
Cyp11b2
At1a
At1b

Figure 2.

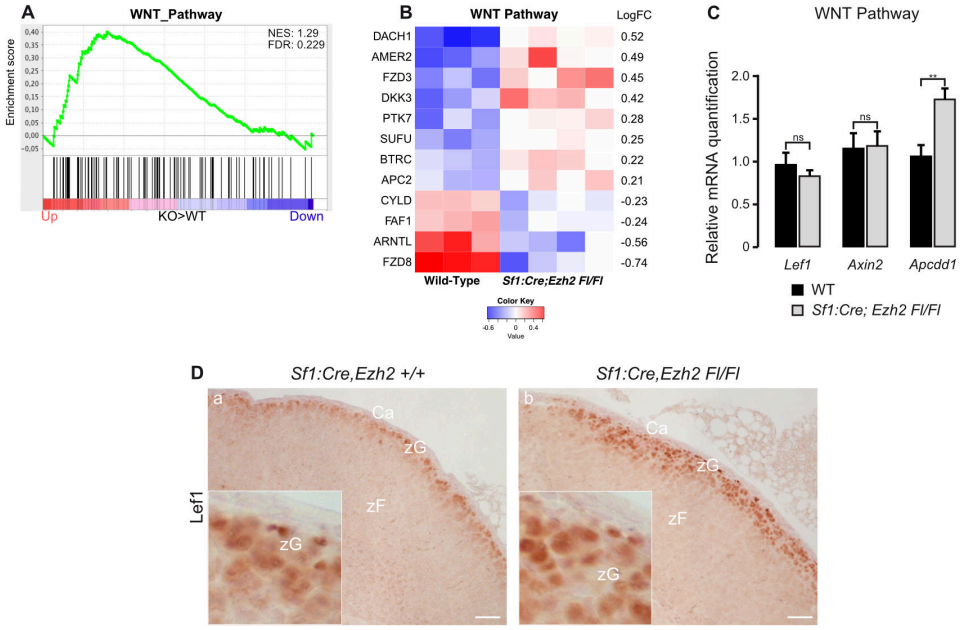

A
WNT_Pathway
NES: 1.29
FDR: 0.229
Enrichment score
Up
KO>WT
Down
B
WNT Pathway
LogFC
DACH1
AMER2
FZD3
DKK3
PTK7
SUFU
BTRC
APC2
CYLD
FAF1
ARNTL
FZD8
0.52
0.49
0.45
0.42
0.28
0.25
0.22
0.21
-0.23
-0.24
-0.56
-0.74
Wild-Type
Sf1:Cre;Ezh2 Fl/Fl
Color Key
Value
C
WNT Pathway
Relative mRNA quantification
ns
ns
**
Lef1
Axin2
Apcdd1
WT
Sf1:Cre; Ezh2 Fl/Fl
D
Sf1:Cre,Ezh2 +/+
Sf1:Cre,Ezh2 Fl/Fl
Lef1
a
b
Ca
zG
zF
zG

Figure 3.

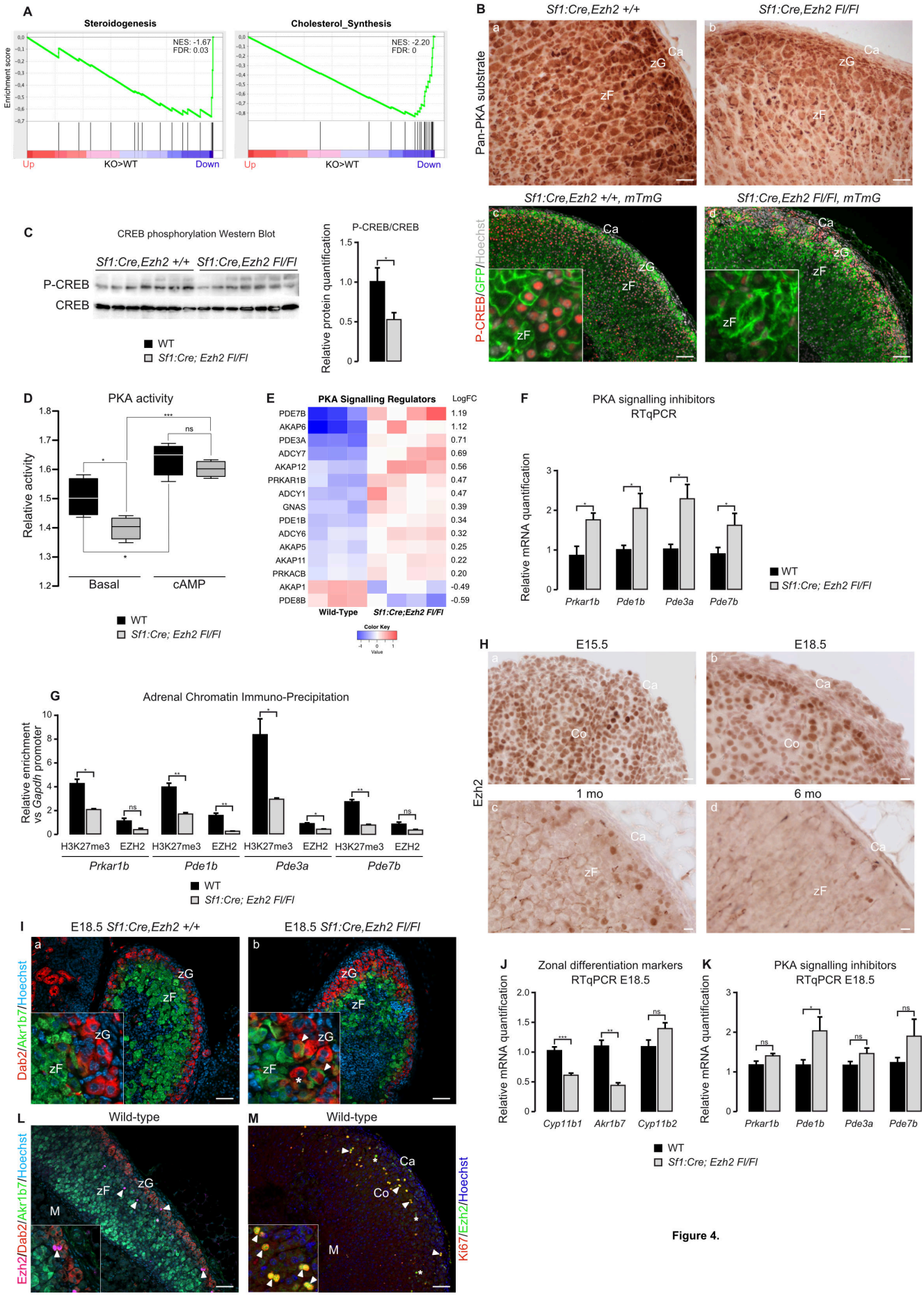

A
Steroidogenesis
Cholesterol_Synthesis
NES: -1.67
FDR: 0.03
NES: -2.20
FDR: 0
Enrichment score
Up
KO>WT
Down
B
Sf1:Cre,Ezh2 +/+
Sf1:Cre,Ezh2 Fl/Fl
Pan-PKA substrate
Ca
zG
zF
Sf1:Cre,Ezh2 +/+, mTmG
Sf1:Cre,Ezh2 Fl/Fl, mTmG
P-CREB/GFP/Hoechst
C
CREB phosphorylation Western Blot
Sf1:Cre,Ezh2 +/+
Sf1:Cre,Ezh2 Fl/Fl
P-CREB
CREB
WT
Sf1:Cre; Ezh2 Fl/Fl
P-CREB/CREB
Relative protein quantification
D
PKA activity
Relative activity
Basal
cAMP
ns
E
PKA Signalling Regulators
LogFC
PDE7B 1.19
AKAP6 1.12
PDE3A 0.71
ADCY7 0.69
AKAP12 0.56
PRKAR1B 0.47
ADCY1 0.47
GNAS 0.39
PDE1B 0.34
ADCY6 0.32
AKAP5 0.25
AKAP11 0.22
PRKACB 0.20
AKAP1 -0.49
PDE8B -0.59
Wild-Type
Sf1:Cre;Ezh2 Fl/Fl
Color Key
Value
F
PKA signalling inhibitors
RTqPCR
Relative mRNA quantification
Prkar1b
Pde1b
Pde3a
Pde7b
WT
Sf1:Cre; Ezh2 Fl/Fl
G
Adrenal Chromatin Immuno-Precipitation
Relative enrichment vs Gapdh promoter
H3K27me3
EZH2
Prkar1b
Pde1b
Pde3a
Pde7b
WT
Sf1:Cre; Ezh2 Fl/Fl
H
E15.5
E18.5
1 mo
6 mo
Ezh2
Co
I
E18.5 Sf1:Cre,Ezh2 +/+
E18.5 Sf1:Cre,Ezh2 Fl/Fl
Dab2/Akr1b7/Hoechst
J
Zonal differentiation markers
RTqPCR E18.5
Relative mRNA quantification
Cyp11b1
Akr1b7
Cyp11b2
K
PKA signalling inhibitors
RTqPCR E18.5
Prkar1b
Pde1b
Pde3a
Pde7b
WT
Sf1:Cre; Ezh2 Fl/Fl
L
Wild-type
Ezh2/Dab2/Akr1b7/Hoechst
M
M
Wild-type
Ki67/Ezh2/Hoechst

Figure 4.

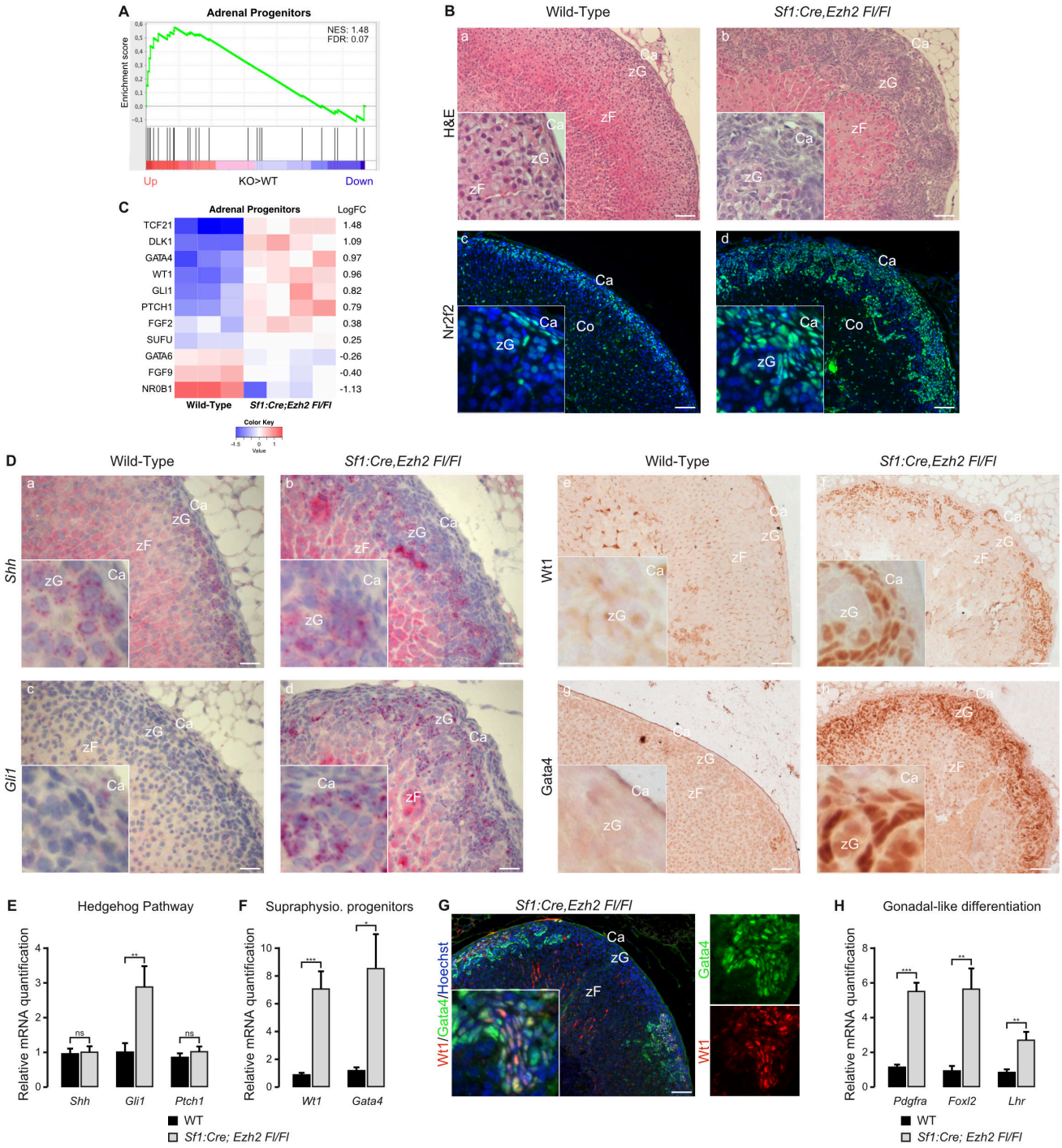

A
Adrenal Progenitors
NES: 1.48
FDR: 0.07
Enrichment score
Up
KO>WT
Down
B
Wild-Type
Sf1:Cre,Ezh2 Fl/Fl
H&E
Nr2f2
Ca
zG
zF
Co
C
Adrenal Progenitors
LogFC
TCF21 1.48
DLK1 1.09
GATA4 0.97
WT1 0.96
GLI1 0.82
PTCH1 0.79
FGF2 0.38
SUFU 0.25
GATA6 -0.26
FGF9 -0.40
NR0B1 -1.13
Wild-Type
Sf1:Cre;Ezh2 Fl/Fl
Color Key
Value
D
Wild-Type
Sf1:Cre,Ezh2 Fl/Fl
Shh
Gli1
Wt1
Gata4
E
Hedgehog Pathway
Relative mRNA quantification
Shh
Gli1
Ptch1
ns
WT
Sf1:Cre; Ezh2 Fl/Fl
F
Supraphysio. progenitors
Wt1
Gata4
G
Sf1:Cre,Ezh2 Fl/Fl
Wt1/Gata4/Hoechst
Gata4
Wt1
H
Gonadal-like differentiation
Pdgfra
Foxl2
Lhr

Figure 5.

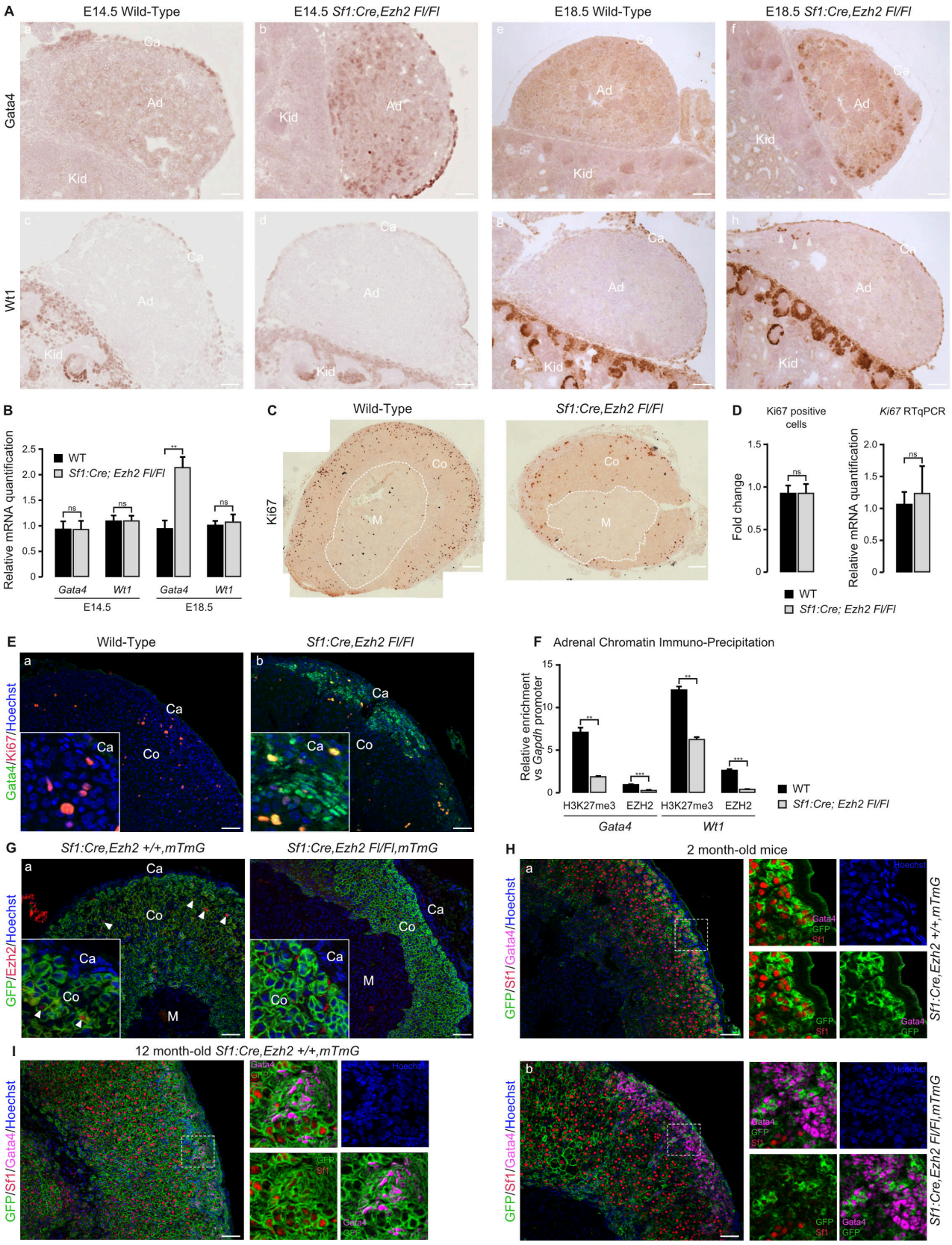
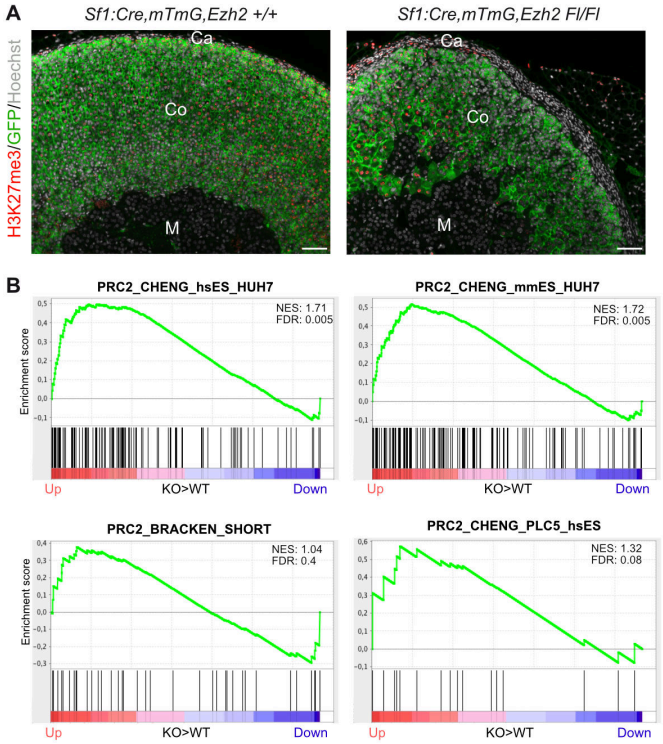
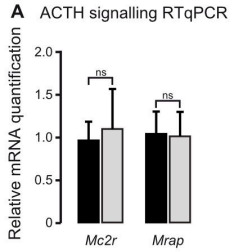
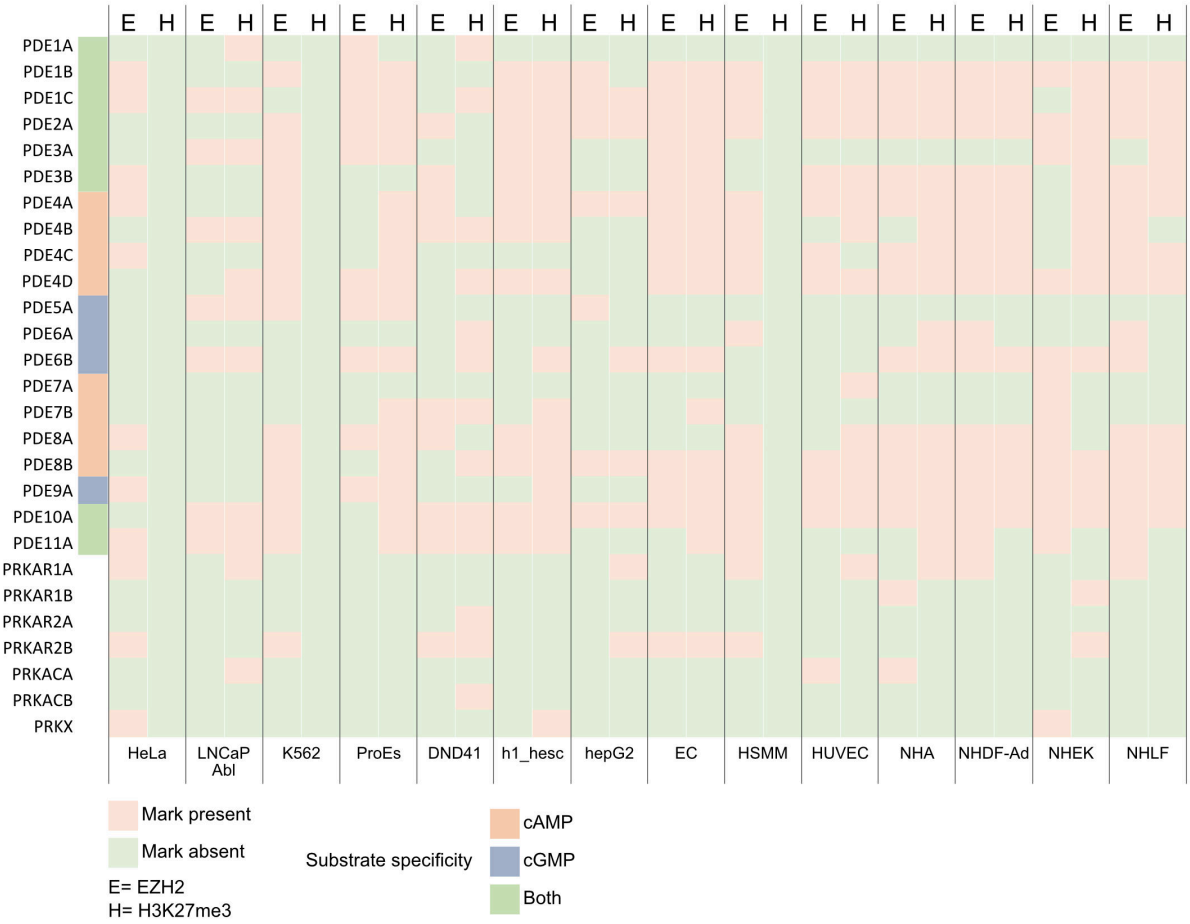

A
E14.5 Wild-Type
E14.5 Sf1:Cre,Ezh2 Fl/Fl
E18.5 Wild-Type
E18.5 Sf1:Cre,Ezh2 Fl/Fl
Gata4
Wt1
Ca
Ad
Kid
B
Relative mRNA quantification
WT
Sf1:Cre; Ezh2 Fl/Fl
ns
**
Gata4
Wt1
E14.5
E18.5
C
Wild-Type
Sf1:Cre,Ezh2 Fl/Fl
Ki67
Co
M
D
Ki67 positive cells
Ki67 RTqPCR
Fold change
Relative mRNA quantification
E
Wild-Type
Sf1:Cre,Ezh2 Fl/Fl
Gata4/Ki67/Hoechst
F
Adrenal Chromatin Immuno-Precipitation
Relative enrichment vs Gapdh promoter
H3K27me3
EZH2
***
G
Sf1:Cre,Ezh2 +/+,mTmG
Sf1:Cre,Ezh2 Fl/Fl,mTmG
GFP/Ezh2/Hoechst
H
2 month-old mice
GFP/Sf1/Gata4/Hoechst
I
12 month-old Sf1:Cre,Ezh2 +/+,mTmG

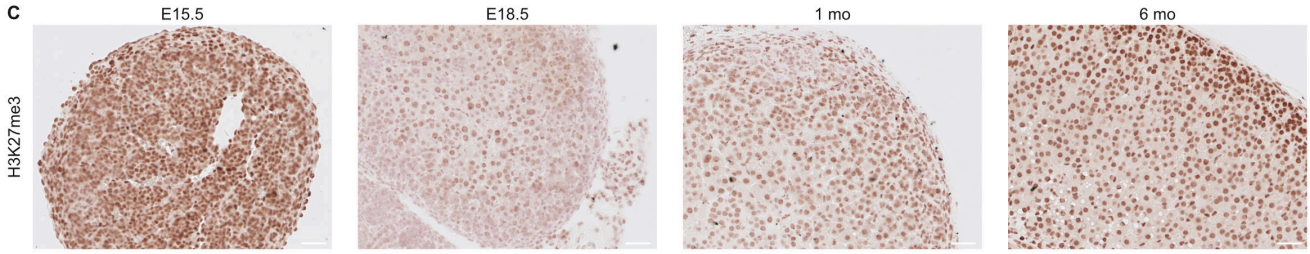
Figure 6.



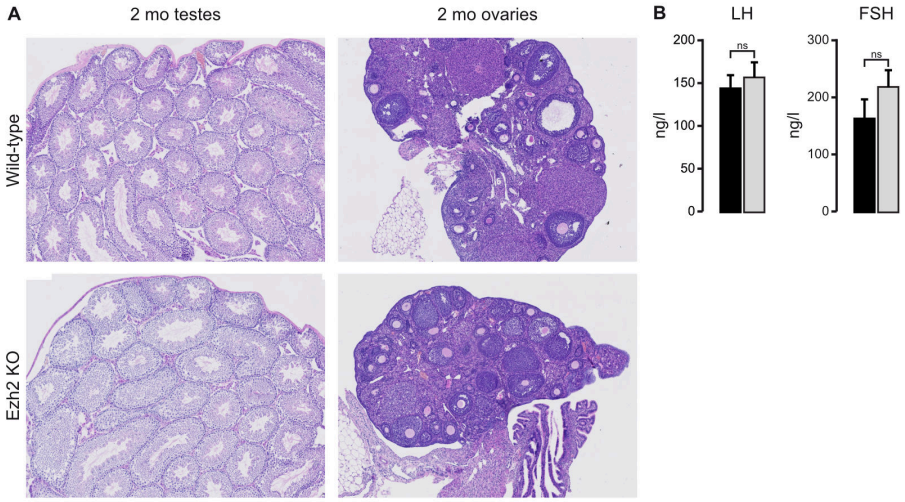
Supplementary Figure 1.



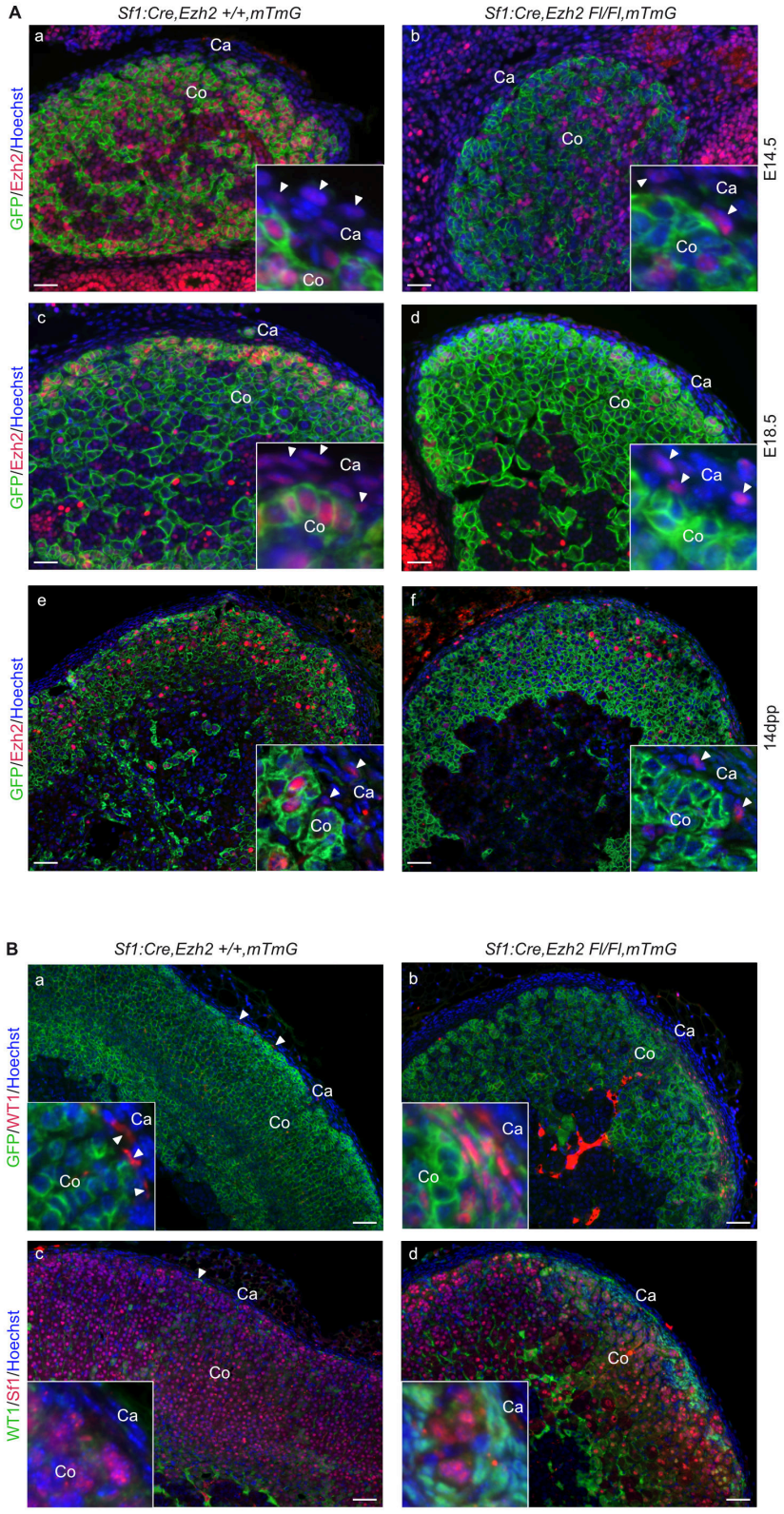




Supplementary Figure 2.



Supplementray Figure 3.



Supplementary Figure 4.

Références bibliographiques

Abdel-Wahab, O., Pardanani, A., Patel, J., Wadleigh, M., Lasho, T., Heguy, A., Beran, M., Gilliland, D.G., Levine, R.L., and Tefferi, A. (2011). Concomitant analysis of EZH2 and ASXL1 mutations in myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and blast-phase myeloproliferative neoplasms. Leukemia *25*, 1200–1202.

Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., and Kemler, R. (1997). beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. EMBO J. *16*, 3797–3804.

Achermann, J.C., Ito, M., Ito, M., Hindmarsh, P.C., and Jameson, J.L. (1999). A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans. Nat. Genet. *22*, 125–126.

Achermann, J.C., Ozisik, G., Ito, M., Orun, U.A., Harmanci, K., Gurakan, B., and Jameson, J.L. (2002). Gonadal determination and adrenal development are regulated by the orphan nuclear receptor steroidogenic factor-1, in a dose-dependent manner. J. Clin. Endocrinol. Metab. *87*, 1829–1833.

Acton, S.L., Scherer, P.E., Lodish, H.F., and Krieger, M. (1994). Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. J. Biol. Chem. *269*, 21003–21009.

Aguilera, G. (2011). HPA axis responsiveness to stress: implications for healthy aging. Exp. Gerontol. *46*, 90–95.

Ahlgren, R., Suske, G., Waterman, M.R., and Lund, J. (1999). Role of Sp1 in cAMP-dependent transcriptional regulation of the bovine CYP11A gene. J. Biol. Chem. *274*, 19422–19428.

Ai, S., Peng, Y., Li, C., Gu, F., Yu, X., Yue, Y., Ma, Q., Chen, J., Lin, Z., Zhou, P., et al. (2017). EED orchestration of heart maturation through interaction with HDACs is H3K27me3-independent.

Åkerström, T., Maharjan, R., Sven Willenberg, H., Cupisti, K., Ip, J., Moser, A., Stålberg, P., Robinson, B., Alexander Iwen, K., Dralle, H., et al. (2016). Activating mutations in CTNNB1 in aldosterone producing adenomas. Sci. Rep. *6*, 19546.

Albiger, N.M., Regazzo, D., Rubin, B., Ferrara, A.M., Rizzati, S., Taschin, E., Ceccato, F., Arnaldi, G., Pecori Giraldi, F., Stigliano, A., et al. (2017). A multicenter experience on the prevalence of ARMC5 mutations in patients with primary bilateral macronodular adrenal hyperplasia: from genetic characterization to clinical phenotype. Endocrine *55*, 959–968.

Alekseyenko, A.A., Gorchakov, A.A., Kharchenko, P.V., and Kuroda, M.I. (2014). Reciprocal interactions of human C10orf12 and C17orf96 with PRC2 revealed by BioTAP-XL cross-linking and affinity purification. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *111*, 2488–2493.

Allolio, B., and Fassnacht, M. (2006). Clinical review: Adrenocortical carcinoma: clinical update. J. Clin. Endocrinol. Metab. *91*, 2027–2037.

Almeida, M.Q., and Stratakis, C.A. (2010). Carney complex and other conditions associated with micronodular adrenal hyperplasias. Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. *24*, 907–914.

Alpy, F., and Tomasetto, C. (2014). START ships lipids across interorganelle space. Biochimie *96*, 85–95.

Al-Salameh, A., Cohen, R., and Desailloud, R. (2014). Overview of the genetic determinants of primary aldosteronism. Appl. Clin. Genet. *7*, 67–79.

Antonini, S.R., Baldacchino, V., Tremblay, J., Hamet, P., and Lacroix, A. (2006). Expression of ACTH receptor pathway genes in glucose-dependent insulinotrophic peptide (GIP)-dependent Cushing's syndrome. Clin. Endocrinol. (Oxf.) *64*, 29–36.

Antonysamy, S., Condon, B., Druzina, Z., Bonanno, J.B., Gheyi, T., Zhang, F., MacEwan, I., Zhang, A., Ashok, S., Rodgers, L., et al. (2013). Structural Context of Disease-Associated Mutations and Putative Mechanism of Autoinhibition Revealed by X-Ray Crystallographic Analysis of the EZH2-SET Domain. PLOS ONE *8*, e84147.

Arakane, F., King, S.R., Du, Y., Kallen, C.B., Walsh, L.P., Watari, H., Stocco, D.M., and Strauss, J.F. (1997). Phosphorylation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) modulates its steroidogenic activity. J. Biol. Chem. *272*, 32656–32662.

Araujo Castro, M., McIver, B., and Valderrabano, P. (2018). A thyrotropin-secreting pituitary adenoma treated with radiosurgery: Long-term outcomes. Endocrinol. Diabetes Nutr. *65*, 237–238.

Ardehali, M.B., Anselmo, A., Cochrane, J.C., Kundu, S., Sadreyev, R.I., and Kingston, R.E. (2017). Polycomb Repressive Complex 2 Methylates Elongin A to Regulate Transcription. Mol. Cell *68*, 872-884.e6.

Assié, G., Guillaud-Bataille, M., Ragazzon, B., Bertagna, X., Bertherat, J., and Clauser, E. (2010). The pathophysiology, diagnosis and prognosis of adrenocortical tumors revisited by transcriptome analyses. Trends Endocrinol. Metab. TEM *21*, 325–334.

Assie, G., Giordano, T.J., and Bertherat, J. (2012). Gene expression profiling in adrenocortical neoplasia. Mol. Cell. Endocrinol. *351*, 111–117.

Assié, G., Libé, R., Espiard, S., Rizk-Rabin, M., Guimier, A., Luscap, W., Barreau, O., Lefèvre, L., Sibony, M., Guignat, L., et al. (2013). ARMC5 mutations in macronodular adrenal hyperplasia with Cushing's syndrome. N. Engl. J. Med. *369*, 2105–2114.

Assié, G., Letouzé, E., Fassnacht, M., Jouinot, A., Luscap, W., Barreau, O., Omeiri, H., Rodriguez, S., Perlemoine, K., René-Corail, F., et al. (2014). Integrated genomic characterization of adrenocortical carcinoma. Nat. Genet. *46*, 607–612.

Au, S.L.-K., Wong, C.C.-L., Lee, J.M.-F., Wong, C.-M., and Ng, I.O.-L. (2013). EZH2-Mediated H3K27me3 Is Involved in Epigenetic Repression of Deleted in Liver Cancer 1 in Human Cancers. PLoS ONE *8*.

Auchus, R.J., Lee, T.C., and Miller, W.L. (1998). Cytochrome b5 augments the 17,20-lyase activity of human P450c17 without direct electron transfer. J. Biol. Chem. *273*, 3158–3165.

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.

Bae, W.K., Kang, K., Yu, J.H., Yoo, K.H., Factor, V.M., Kaji, K., Matter, M., Thorgeirsson, S., and Hennighausen, L. (2015). The methyltransferases enhancer of zeste homolog (EZH) 1 and EZH2 control hepatocyte homeostasis and regeneration. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *29*, 1653–1662.

Ballaré, C., Lange, M., Lapinaite, A., Martin, G.M., Morey, L., Pascual, G., Liefke, R., Simon, B., Shi, Y., Gozani, O., et al. (2012). Phf19 links methylated Lys36 of histone H3 to regulation of Polycomb activity. Nat. Struct. Mol. Biol. *19*, 1257–1265.

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.

Banerjee, R., Russo, N., Liu, M., Van Tubergen, E., and D'Silva, N.J. (2012). Rap1 and its regulatory proteins: the tumor suppressor, oncogene, tumor suppressor gene axis in head and neck cancer. Small GTPases *3*, 192–197.

Barker, N., Tan, S., and Clevers, H. (2013). Lgr proteins in epithelial stem cell biology. Dev. Camb. Engl. *140*, 2484–2494.

Barlaskar, F.M., Spalding, A.C., Heaton, J.H., Kuick, R., Kim, A.C., Thomas, D.G., Giordano, T.J., Ben-Josef, E., and Hammer, G.D. (2009). Preclinical targeting of the type I insulin-like growth factor receptor in adrenocortical carcinoma. J. Clin. Endocrinol. Metab. *94*, 204–212.

Barreau, O., Assié, G., Wilmot-Roussel, H., Ragazzon, B., Baudry, C., Perlemoine, K., René-Corail, F., Bertagna, X., Dousset, B., Hamzaoui, N., et al. (2013). Identification of a CpG island methylator phenotype in adrenocortical carcinomas. J. Clin. Endocrinol. Metab. *98*, E174-184.

Barrett, P.Q., Bollag, W.B., Isales, C.M., McCarthy, R.T., and Rasmussen, H. (1989). Role of calcium in angiotensin II-mediated aldosterone secretion. Endocr. Rev. *10*, 496–518.

Bassett, M.H., White, P.C., and Rainey, W.E. (2004). The regulation of aldosterone synthase expression. Mol. Cell. Endocrinol. *217*, 67–74.

Batisse-Lignier, M., Sahut-Barnola, I., Tissier, F., Dumontet, T., Mathieu, M., Drelon, C., Pointud, J.-C., Damon-Soubeyrand, C., Marceau, G., Kemeny, J.-L., et al. (2017). P53/Rb inhibition induces metastatic adrenocortical carcinomas in a preclinical transgenic model. Oncogene *36*, 4445–4456.

Baudin, E., and Endocrine Tumor Board of Gustave Roussy (2015). Adrenocortical carcinoma. Endocrinol. Metab. Clin. North Am. *44*, 411–434.

Beke, L., Nuytten, M., Van Eynde, A., Beullens, M., and Bollen, M. (2007). The gene encoding the prostatic tumor suppressor PSP94 is a target for repression by the Polycomb group protein EZH2. Oncogene *26*, 4590–4595.

Bellantone, R., Ferrante, A., Boscherini, M., Lombardi, C.P., Crucitti, P., Crucitti, F., Favia, G., Borrelli, D., Boffi, L., Capussotti, L., et al. (1997). Role of reoperation in recurrence of adrenal cortical carcinoma: results from 188 cases collected in the Italian National Registry for Adrenal Cortical Carcinoma. Surgery *122*, 1212–1218.

Benini, S., Perbal, B., Zambelli, D., Colombo, M.P., Manara, M.C., Serra, M., Parenza, M., Martinez, V., Picci, P., and Scotlandi, K. (2005). In Ewing's sarcoma CCN3(NOV) inhibits proliferation while promoting migration and invasion of the same cell type. Oncogene *24*, 4349–4361.

Bergman, D., Halje, M., Nordin, M., and Engström, W. (2013). Insulin-like growth factor 2 in development and disease: a mini-review. Gerontology *59*, 240–249.

Beringer, M., Pisano, P., Di Carlo, V., Blanco, E., Chammas, P., Vizán, P., Gutiérrez, A., Aranda, S., Payer, B., Wierer, M., et al. (2016). EPOP Functionally Links Elongin and Polycomb in Pluripotent Stem Cells. Mol. Cell *64*, 645–658.

Bernal, J.A., Luna, R., Espina, A., Lázaro, I., Ramos-Morales, F., Romero, F., Arias, C., Silva, A., Tortolero, M., and Pintor-Toro, J.A. (2002). Human securin interacts with p53 and modulates p53-mediated transcriptional activity and apoptosis. Nat. Genet. *32*, 306–311.

Berruti, A., Terzolo, M., Pia, A., Angeli, A., and Dogliotti, L. (1998). Mitotane associated with etoposide, doxorubicin, and cisplatin in the treatment of advanced adrenocortical carcinoma. Italian Group for the Study of Adrenal Cancer. Cancer *83*, 2194–2200.

Berruti, A., Ferrero, A., Sperone, P., Daffara, F., Reimondo, G., Papotti, M., Dogliotti, L., Angeli, A., and Terzolo, M. (2008). Emerging drugs for adrenocortical carcinoma. Expert Opin. Emerg. Drugs *13*, 497–509.

Berteaux, N., Lottin, S., Monté, D., Pinte, S., Quatannens, B., Coll, J., Hondermarck, H., Curgy, J.-J., Dugimont, T., and Adriaenssens, E. (2005). H19 mRNA-like noncoding RNA promotes breast cancer cell proliferation through positive control by E2F1. J. Biol. Chem. *280*, 29625–29636.

Berthon, A., Sahut-Barnola, I., Lambert-Langlais, S., de Joussineau, C., Damon-Soubeyrand, C., Louiset, E., Taketo, M.M., Tissier, F., Bertherat, J., Lefrançois-Martinez, A.-M., et al. (2010). Constitutive ß-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, M.-C., Plouin, P.-F., Skah, S., et al. (2014). WNT/ß-catenin signalling is activated in aldosterone-producing adenomas and controls aldosterone production. Hum. Mol. Genet. *23*, 889–905.

Berthon, A., Faucz, F.R., Espiard, S., Drougat, L., Bertherat, J., and Stratakis, C.A. (2017). Age-dependent effects of Armc5 haploinsufficiency on adrenocortical function. Hum. Mol. Genet. *26*, 3495–3507.

Beuschlein, F., Boulkroun, S., Osswald, A., Wieland, T., Nielsen, H.N., Lichtenauer, U.D., Penton, D., Schack, V.R., Amar, L., Fischer, E., et al. (2013). Somatic mutations in ATP1A1 and ATP2B3 lead to aldosterone-producing adenomas and secondary hypertension. Nat. Genet. *45*, 440–444, 444e1-2.

Beuschlein, F., Fassnacht, M., Assié, G., Calebiro, D., Stratakis, C.A., Osswald, A., Ronchi, C.L., Wieland, T., Sbiera, S., Faucz, F.R., et al. (2014). Constitutive Activation of PKA Catalytic Subunit in Adrenal Cushing's Syndrome. N. Engl. J. Med. *370*, 1019–1028.

Beuschlein, F., Weigel, J., Saeger, W., Kroiss, M., Wild, V., Daffara, F., Libé, R., Ardito, A., Al Ghuzlan, A., Quinkler, M., et al. (2015). Major prognostic role of Ki67 in localized adrenocortical carcinoma after complete resection. J. Clin. Endocrinol. Metab. *100*, 841–849.

Bilimoria, K.Y., Shen, W.T., Elaraj, D., Bentrem, D.J., Winchester, D.J., Kebebew, E., and Sturgeon, C. (2008). Adrenocortical carcinoma in the United States: treatment utilization and prognostic factors. Cancer *113*, 3130–3136.

Biliya, S., and Bulla, L.A. (2010). Genomic imprinting: the influence of differential methylation in the two sexes. Exp. Biol. Med. Maywood NJ *235*, 139–147.

Bird, A. (2007). Perceptions of epigenetics.

Bland, M.L., Fowkes, R.C., and Ingraham, H.A. (2004). Differential requirement for steroidogenic factor-1 gene dosage in adrenal development versus endocrine function. Mol. Endocrinol. Baltim. Md *18*, 941–952.

Bloch, K. (1965). The biological synthesis of cholesterol. Science *150*, 19–28.

Bochem, A.E., Holleboom, A.G., Romijn, J.A., Hoekstra, M., Dallinga-Thie, G.M., Motazacker, M.M., Hovingh, G.K., Kuivenhoven, J.A., and Stroes, E.S.G. (2013). High density lipoprotein as a source of cholesterol for adrenal steroidogenesis: a study in individuals with low plasma HDL-C. J. Lipid Res. *54*, 1698–1704.

Boland, G.W.L., Blake, M.A., Hahn, P.F., and Mayo-Smith, W.W. (2008). Incidental adrenal lesions: principles, techniques, and algorithms for imaging characterization. Radiology *249*, 756–775.

Bond, C.E., McKeone, D.M., Kalimutho, M., Bettington, M.L., Pearson, S.-A., Dumenil, T.D., Wockner, L.F., Burge, M., Leggett, B.A., and Whitehall, V.L.J. (2016). RNF43 and ZNRF3 are commonly altered in serrated pathway colorectal tumorigenesis. Oncotarget *7*, 70589–70600.

Bonnet, S., Gaujoux, S., Launay, P., Baudry, C., Chokri, I., Ragazzon, B., Libé, R., René-Corail, F., Audebourg, A., Vacher-Lavenu, M.-C., et al. (2011). Wnt/ß-catenin pathway activation in adrenocortical adenomas is frequently due to somatic CTNNB1-activating mutations, which are associated with larger and nonsecreting tumors: a study in cortisol-secreting and -nonsecreting tumors. J. Clin. Endocrinol. Metab. *96*, E419-426.

Bonnet-Serrano, F., and Bertherat, J. (2018). Genetics of tumors of the adrenal cortex. Endocr. Relat. Cancer *25*, R131–R152.

Bornstein, S.R., Ehrhart-Bornstein, M., Usadel, H., Böckmann, M., and Scherbaum, W.A. (1991). Morphological evidence for a close interaction of chromaffin cells with cortical cells within the adrenal gland. Cell Tissue Res. *265*, 1–9.

Bornstein, S.R., Gonzalez-Hernandez, J.A., Ehrhart-Bornstein, M., Adler, G., and Scherbaum, W.A. (1994). Intimate contact of chromaffin and cortical cells within the human adrenal gland forms the cellular basis for important intraadrenal interactions. J. Clin. Endocrinol. Metab. *78*, 225–232.

Bornstein, S.R., Tajima, T., Eisenhofer, G., Haidan, A., and Aguilera, G. (1999). Adrenomedullary function is severely impaired in 21-hydroxylase-deficient mice. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *13*, 1185–1194.

Bose, H.S., Sugawara, T., Strauss, J.F., Miller, W.L., and International Congenital Lipoid Adrenal Hyperplasia Consortium (1996). The pathophysiology and genetics of congenital lipoid adrenal hyperplasia. N. Engl. J. Med. *335*, 1870–1878.

Bose, M., Whittal, R.M., Miller, W.L., and Bose, H.S. (2008). Steroidogenic activity of StAR requires contact with mitochondrial VDAC1 and phosphate carrier protein. J. Biol. Chem. *283*, 8837–8845.

Bougeard, G., Sesboüé, R., Baert-Desurmont, S., Vasseur, S., Martin, C., Tinat, J., Brugières, L., Chompret, A., de Paillerets, B.B., Stoppa-Lyonnet, D., et al. (2008). Molecular basis of the Li-Fraumeni syndrome: an update from the French LFS families. J. Med. Genet. *45*, 535–538.

Boulkroun, S., Beuschlein, F., Rossi, G.-P., Golib-Dzib, J.-F., Fischer, E., Amar, L., Mulatero, P., Samson-Couterie, B., Hahner, S., Quinkler, M., et al. (2012). Prevalence, clinical, and molecular correlates of KCNJ5 mutations in primary aldosteronism. Hypertens. Dallas Tex 1979 *59*, 592–598.

Bourdeau, I., Oble, S., Magne, F., Lévesque, I., Cáceres-Gorriti, K.Y., Nolet, S., Awadalla, P., Tremblay, J., Hamet, P., Fragoso, M.C.B.V., et al. (2016). ARMC5 mutations in a large French-Canadian family with cortisol-secreting ß-adrenergic/vasopressin responsive bilateral macronodular adrenal hyperplasia. Eur. J. Endocrinol. *174*, 85–96.

Bracken, A.P., Pasini, D., Capra, M., Prosperini, E., Colli, E., and Helin, K. (2003). EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. EMBO J. *22*, 5323–5335.

Bracken, A.P., Dietrich, N., Pasini, D., Hansen, K.H., and Helin, K. (2006). Genome-wide mapping of Polycomb target genes unravels their roles in cell fate transitions. Genes Dev. *20*, 1123–1136.

Brien, G.L., Gambero, G., O'Connell, D.J., Jerman, E., Turner, S.A., Egan, C.M., Dunne, E.J., Jurgens, M.C., Wynne, K., Piao, L., et al. (2012). Polycomb PHF19 binds H3K36me3 and recruits PRC2 and demethylase NO66 to embryonic stem cell genes during differentiation. Nat. Struct. Mol. Biol. *19*, 1273–1281.

Britsch, S., Li, L., Kirchhoff, S., Theuring, F., Brinkmann, V., Birchmeier, C., and Riethmacher, D. (1998). The ErbB2 and ErbB3 receptors and their ligand, neuregulin-1, are essential for development of the sympathetic nervous system. Genes Dev. *12*, 1825–1836.

Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. Science *232*, 34–47.

Brown, J.L., Mucci, D., Whiteley, M., Dirksen, M.L., and Kassis, J.A. (1998). The Drosophila Polycomb group gene pleiohomeotic encodes a DNA binding protein with homology to the transcription factor YY1. Mol. Cell *1*, 1057–1064.

Cai, L., Rothbart, S.B., Lu, R., Xu, B., Chen, W.-Y., Tripathy, A., Rockowitz, S., Zheng, D., Patel, D.J., Allis, C.D., et al. (2013). An H3K36 methylation-engaging Tudor motif of polycomb-like proteins mediates PRC2 complex targeting. Mol. Cell *49*, 571–582.

Cao, R., and Zhang, Y. (2004). The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. Curr. Opin. Genet. Dev. *14*, 155–164.

Cao, R., Wang, H., He, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Zhang, Y. (2008). Role of hPHF1 in H3K27 methylation and Hox gene silencing. Mol. Cell. Biol. *28*, 1862–1872.

Cao, Y., He, M., Gao, Z., Peng, Y., Li, Y., Li, L., Zhou, W., Li, X., Zhong, X., Lei, Y., et al. (2014). Activating hotspot L205R mutation in PRKACA and adrenal Cushing's syndrome. Science *344*, 913–917.

Cardoso, C., Mignon, C., Hetet, G., Grandchamps, B., Fontes, M., and Colleaux, L. (2000). The human EZH2 gene: genomic organisation and revised mapping in 7q35 within the critical region for malignant myeloid disorders. Eur. J. Hum. Genet. EJHG *8*, 174–180.

Carelli, F.N., Sharma, G., and Ahringer, J. Broad Chromatin Domains: An Important Facet of Genome Regulation. BioEssays *39*, 1700124.

Caretti, G., Di Padova, M., Micales, B., Lyons, G.E., and Sartorelli, V. (2004). The Polycomb Ezh2 methyltransferase regulates muscle gene expression and skeletal muscle differentiation. Genes Dev. *18*, 2627–2638.

Caron, K.M., Soo, S.C., Wetsel, W.C., Stocco, D.M., Clark, B.J., and Parker, K.L. (1997). Targeted disruption of the mouse gene encoding steroidogenic acute regulatory protein provides insights into congenital lipoid adrenal hyperplasia. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *94*, 11540–11545.

Casanova, M., Preissner, T., Cerase, A., Poot, R., Yamada, D., Li, X., Appanah, R., Bezstarosti, K., Demmers, J., Koseki, H., et al. (2011). Polycomblike 2 facilitates the recruitment of PRC2 Polycomb group complexes to the inactive X chromosome and to target loci in embryonic stem cells. Dev. Camb. Engl. *138*, 1471–1482.

Cha, T.-L., Zhou, B.P., Xia, W., Wu, Y., Yang, C.-C., Chen, C.-T., Ping, B., Otte, A.P., and Hung, M.-C. (2005). Akt-mediated phosphorylation of EZH2 suppresses methylation of lysine 27 in histone H3. Science *310*, 306–310.

Chabre, O., Libé, R., Assie, G., Barreau, O., Bertherat, J., Bertagna, X., Feige, J.-J., and Cherradi, N. (2013). Serum miR-483-5p and miR-195 are predictive of recurrence risk in adrenocortical cancer patients. Endocr. Relat. Cancer *20*, 579–594.

Chanderbhan, R.F., Kharroubi, A.T., Noland, B.J., Scallen, T.J., and Vahouny, G.V. (1986). Sterol carrier protein2: further evidence for its role in adrenal steroidogenesis. Endocr. Res. *12*, 351–370.

Chang, C.-J., Yang, J.-Y., Xia, W., Chen, C.-T., Xie, X., Chao, C.-H., Woodward, W.A., Hsu, J.-M., Hortobagyi, G.N., and Hung, M.-C. (2011). EZH2 promotes

expansion of breast tumor initiating cells through activation of RAF1-β-catenin signaling. Cancer Cell *19*, 86–100.

Chao, W., and D'Amore, P.A. (2008). IGF2: epigenetic regulation and role in development and disease. Cytokine Growth Factor Rev. *19*, 111–120.

Chapman, A., Durand, J., Ouadi, L., and Bourdeau, I. (2011). Identification of genetic alterations of AXIN2 gene in adrenocortical tumors. J. Clin. Endocrinol. Metab. *96*, E1477-1481.

Charalampopoulos, I., Dermitzaki, E., Vardouli, L., Tsatsanis, C., Stournaras, C., Margioris, A.N., and Gravanis, A. (2005). Dehydroepiandrosterone sulfate and allopregnanolone directly stimulate catecholamine production via induction of tyrosine hydroxylase and secretion by affecting actin polymerization. Endocrinology *146*, 3309–3318.

Chen, C.-C., and Lau, L.F. (2009). Functions and Mechanisms of Action of CCN Matricellular Proteins. Int. J. Biochem. Cell Biol. *41*, 771–783.

Chen, P.-C., Cheng, H.-C., and Tang, C.-H. (2013). CCN3 promotes prostate cancer bone metastasis by modulating the tumor-bone microenvironment through RANKL-dependent pathway. Carcinogenesis *34*, 1669–1679.

Chen, S., Bohrer, L.R., Rai, A.N., Pan, Y., Gan, L., Zhou, X., Bagchi, A., Simon, J.A., and Huang, H. (2010). Cyclin-dependent kinases regulate epigenetic gene silencing through phosphorylation of EZH2. Nat. Cell Biol. *12*, 1108–1114.

Choi, M., Scholl, U.I., Yue, P., Björklund, P., Zhao, B., Nelson-Williams, C., Ji, W., Cho, Y., Patel, A., Men, C.J., et al. (2011). K+ channel mutations in adrenal aldosterone-producing adenomas and hereditary hypertension. Science *331*, 768–772.

Chong, J.A., Tapia-Ramírez, J., Kim, S., Toledo-Aral, J.J., Zheng, Y., Boutros, M.C., Altshuller, Y.M., Frohman, M.A., Kraner, S.D., and Mandel, G. (1995). REST: a mammalian silencer protein that restricts sodium channel gene expression to neurons. Cell *80*, 949–957.

Chou, R.-H., Yu, Y.-L., and Hung, M.-C. (2011). The roles of EZH2 in cell lineage commitment. Am. J. Transl. Res. *3*, 243–250.

Chung, K.-F., Qin, N., Androutsellis-Theotokis, A., Bornstein, S.R., and Ehrhart-Bornstein, M. (2011). Effects of dehydroepiandrosterone on proliferation and differentiation of chromaffin progenitor cells. Mol. Cell. Endocrinol. *336*, 141–148.

Clark, B.J. (2012). The mammalian START domain protein family in lipid transport in health and disease. J. Endocrinol. *212*, 257–275.

Clark, A.J., and Weber, A. (1994). Molecular insights into inherited ACTH resistance syndromes. Trends Endocrinol. Metab. TEM *5*, 209–214.

Clark, A.J.L., Grossman, A., and McLoughlin, L. (1993). Familial glucocorticoid deficiency associated with point mutation in the adrenocorticotropin receptor. The Lancet *341*, 461–462.

Clemmons, D.R. (1997). Insulin-like growth factor binding proteins and their role in controlling IGF actions. Cytokine Growth Factor Rev. *8*, 45–62.

Collins, R.E., Tachibana, M., Tamaru, H., Smith, K.M., Jia, D., Zhang, X., Selker, E.U., Shinkai, Y., and Cheng, X. (2005). In Vitro and in Vivo Analyses of a Phe/Tyr Switch Controlling Product Specificity of Histone Lysine Methyltransferases. J. Biol. Chem. *280*, 5563–5570.

Collinson, A., Collier, A.J., Morgan, N.P., Sienerth, A.R., Chandra, T., Andrews, S., and Rugg-Gunn, P.J. (2016). Deletion of the Polycomb-Group Protein EZH2 Leads to Compromised Self-Renewal and Differentiation Defects in Human Embryonic Stem Cells. Cell Rep. *17*, 2700–2714.

Comet, I., Riising, E.M., Leblanc, B., and Helin, K. (2016). Maintaining cell identity: PRC2-mediated regulation of transcription and cancer. Nat. Rev. Cancer *16*, 803–810.

Copeland, R.A., Solomon, M.E., and Richon, V.M. (2009). Protein methyltransferases as a target class for drug discovery. Nat. Rev. Drug Discov. *8*, 724–732.

Couture, J.-F., Dirk, L.M.A., Brunzelle, J.S., Houtz, R.L., and Trievel, R.C. (2008). Structural origins for the product specificity of SET domain protein methyltransferases. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *105*, 20659–20664.

Czermin, B., Melfi, R., McCabe, D., Seitz, V., Imhof, A., and Pirrotta, V. (2002). Drosophila Enhancer of Zeste/ESC Complexes Have a Histone H3 Methyltransferase Activity that Marks Chromosomal Polycomb Sites. Cell *111*, 185–196.

Daidoh, H., Morita, H., Mune, T., Murayama, M., Hanafusa, J., Ni, H., Shibata, H., and Yasuda, K. (1995). Responses of plasma adrenocortical steroids to low dose ACTH in normal subjects. Clin. Endocrinol. (Oxf.) *43*, 311–315.

De Haan, G., and Gerrits, A. (2007). Epigenetic control of hematopoietic stem cell aging the case of Ezh2. Ann. N. Y. Acad. Sci. *1106*, 233–239.

De Stefani, D., Bononi, A., Romagnoli, A., Messina, A., De Pinto, V., Pinton, P., and Rizzuto, R. (2012). VDAC1 selectively transfers apoptotic Ca2+ signals to mitochondria. Cell Death Differ. *19*, 267–273.

Deb, G., Thakur, V.S., and Gupta, S. (2013). Multifaceted role of EZH2 in breast and prostate tumorigenesis: epigenetics and beyond. Epigenetics *8*, 464–476.

Demeure, M.J., Coan, K.E., Grant, C.S., Komorowski, R.A., Stephan, E., Sinari, S., Mount, D., and Bussey, K.J. (2013a). PTTG1 Over-expression in

Adrenocortical Cancer is Associated with Poor Survival and Represents a Potential Therapeutic Target. Surgery *154*, 1405–1416.

Demeure, M.J., Coan, K.E., Grant, C.S., Komorowski, R.A., Stephan, E., Sinari, S., Mount, D., and Bussey, K.J. (2013b). PTTG1 overexpression in adrenocortical cancer is associated with poor survival and represents a potential therapeutic target. Surgery *154*, 1405–1416; discussion 1416.

Diaz, E., Machutta, C.A., Chen, S., Jiang, Y., Nixon, C., Hofmann, G., Key, D., Sweitzer, S., Patel, M., Wu, Z., et al. (2012). Development and validation of reagents and assays for EZH2 peptide and nucleosome high-throughput screens. J. Biomol. Screen. *17*, 1279–1292.

Dierks, A., Lichtenauer, U.D., Sackmann, S., Spyroglou, A., Shapiro, I., Geyer, M., Manonopoulou, J., Reincke, M., Hantel, C., and Beuschlein, F. (2010). Identification of adrenal genes regulated in a potassium-dependent manner. J. Mol. Endocrinol. *45*, 193–206.

Dietrich, N., Lerdrup, M., Landt, E., Agrawal-Singh, S., Bak, M., Tommerup, N., Rappsilber, J., Södersten, E., and Hansen, K. (2012). REST–Mediated Recruitment of Polycomb Repressor Complexes in Mammalian Cells. PLoS Genet. *8*.

DiGiammarino, E.L., Lee, A.S., Cadwell, C., Zhang, W., Bothner, B., Ribeiro, R.C., Zambetti, G., and Kriwacki, R.W. (2002). A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. Nat. Struct. Biol. *9*, 12–16.

Doghman, M., Arhatte, M., Thibout, H., Rodrigues, G., De Moura, J., Grosso, S., West, A.N., Laurent, M., Mas, J.-C., Bongain, A., et al. (2007a). Nephroblastoma overexpressed/cysteine-rich protein 61/connective tissue growth factor/nephroblastoma overexpressed gene-3 (NOV/CCN3), a selective adrenocortical cell proapoptotic factor, is down-regulated in childhood adrenocortical tumors. J. Clin. Endocrinol. Metab. *92*, 3253–3260.

Doghman, M., Karpova, T., Rodrigues, G.A., Arhatte, M., De Moura, J., Cavalli, L.R., Virolle, V., Barbry, P., Zambetti, G.P., Figueiredo, B.C., et al. (2007a). Increased steroidogenic factor-1 dosage triggers adrenocortical cell proliferation and cancer. Mol. Endocrinol. Baltim. Md *21*, 2968–2987.

Doghman, M., Arhatte, M., Thibout, H., Rodrigues, G., De Moura, J., Grosso, S., West, A.N., Laurent, M., Mas, J.C., Bongain, A., et al. (2007b). Nephroblastoma overexpressed/cysteine-rich protein 61/connective tissue growth factor/nephroblastoma overexpressed gene-3 (NOV/CCN3), a selective adrenocortical cell proapoptotic factor, is down-regulated in childhood adrenocortical tumors. J Clin Endocrinol Metab *92*, 3253–3260.

Doghman, M., Madoux, F., Hodder, P., and Lalli, E. (2010a). Identification and characterization of steroidogenic factor-1 inverse agonists. Methods Enzymol. *485*, 3–23.

Doghman, M., El Wakil, A., Cardinaud, B., Thomas, E., Wang, J., Zhao, W., Peralta-Del Valle, M.H.C., Figueiredo, B.C., Zambetti, G.P., and Lalli, E. (2010b). Regulation of insulin-like growth factor-mammalian target of rapamycin signaling by microRNA in childhood adrenocortical tumors. Cancer Res. *70*, 4666–4675.

Doghman, M., Figueiredo, B.C., Volante, M., Papotti, M., and Lalli, E. (2013). Integrative analysis of SF-1 transcription factor dosage impact on genome-wide binding and gene expression regulation. Nucleic Acids Res. *41*, 8896–8907.

Doghman-Bouguerra, M., and Lalli, E. (2017). The ER-mitochondria couple: In life and death from steroidogenesis to tumorigenesis. Mol. Cell. Endocrinol. *441*, 176–184.

Doupe, A.J., Landis, S.C., and Patterson, P.H. (1985). Environmental influences in the development of neural crest derivatives: glucocorticoids, growth factors, and chromaffin cell plasticity. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *5*, 2119–2142.

Drelon, C., Berthon, A., Ragazzon, B., Tissier, F., Bandiera, R., Sahut-Barnola, I., de Joussineau, C., Batisse-Lignier, M., Lefrançois-Martinez, A.-M., Bertherat, J., et al. (2012). Analysis of the role of Igf2 in adrenal tumour development in transgenic mouse models. PloS One *7*, e44171.

Drelon, C., Berthon, A., Sahut-Barnola, I., Mathieu, M., Dumontet, T., Rodriguez, S., Batisse-Lignier, M., Tabbal, H., Tauveron, I., Lefrançois-Martinez, A.-M., et al. (2016a). PKA inhibits WNT signalling in adrenal cortex zonation and prevents malignant tumour development. Nat. Commun. *7*, 12751.

Drelon, C., Berthon, A., Mathieu, M., Ragazzon, B., Kuick, R., Tabbal, H., Septier, A., Rodriguez, S., Batisse-Lignier, M., Sahut-Barnola, I., et al. (2016b). EZH2 is overexpressed in adrenocortical carcinoma and is associated with disease progression. Hum. Mol. Genet. *25*, 2789–2800.

Dumontet, T., Sahut-Barnola, I., Septier, A., Montanier, N., Plotton, I., Roucher-Boulez, F., Ducros, V., Lefrançois-Martinez, A.-M., Pointud, J.-C., Zubair, M., et al. (2018). PKA signaling drives reticularis differentiation and sexually dimorphic adrenal cortex renewal. JCI Insight *3*.

Duregon, E., Volante, M., Giorcelli, J., Terzolo, M., Lalli, E., and Papotti, M. (2013). Diagnostic and prognostic role of steroidogenic factor 1 in adrenocortical carcinoma: a validation study focusing on clinical and pathologic correlates. Hum. Pathol. *44*, 822–828.

Duxbury, M.S., Ito, H., Zinner, M.J., Ashley, S.W., and Whang, E.E. (2004). RNA interference targeting the M2 subunit of ribonucleotide reductase enhances pancreatic adenocarcinoma chemosensitivity to gemcitabine. Oncogene *23*, 1539–1548.

Ehrhart-Bornstein, M., Breidert, M., Guadanucci, P., Wozniak, W., Bocian-Sobkowska, J., Malendowicz, L.K., and Bornstein, S.R. (1997). 17 alpha-

Hydroxylase and chromogranin A in 6th week human fetal adrenals. Horm. Metab. Res. Horm. Stoffwechselforschung Horm. Metab. *29*, 30–32.

Ehrhart-Bornstein, M., Hinson, J.P., Bornstein, S.R., Scherbaum, W.A., and Vinson, G.P. (1998). Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. Endocr. Rev. *19*, 101–143.

Else, T., Kim, A.C., Sabolch, A., Raymond, V.M., Kandathil, A., Caoili, E.M., Jolly, S., Miller, B.S., Giordano, T.J., and Hammer, G.D. (2014). Adrenocortical carcinoma. Endocr. Rev. *35*, 282–326.

Erhardt, S., Su, I.-H., Schneider, R., Barton, S., Bannister, A.J., Perez-Burgos, L., Jenuwein, T., Kouzarides, T., Tarakhovsky, A., and Surani, M.A. (2003). Consequences of the depletion of zygotic and embryonic enhancer of zeste 2 during preimplantation mouse development. Dev. Camb. Engl. *130*, 4235–4248.

Eriksson, S., and Martin, D.W. (1981). Ribonucleotide reductase in cultured mouse lymphoma cells. Cell cycle-dependent variation in the activity of subunit protein M2. J. Biol. Chem. *256*, 9436–9440.

Escajadillo, T., and Sewer, M. (2014). AKAP13 coordinates cAMP signaling and glucocorticoid production in H295R human adrenocortical cells (612.2). FASEB J. *28*, 612.2.

Espiard, S., Drougat, L., Libé, R., Assié, G., Perlemoine, K., Guignat, L., Barrande, G., Brucker-Davis, F., Doullay, F., Lopez, S., et al. (2015). ARMC5 Mutations in a Large Cohort of Primary Macronodular Adrenal Hyperplasia: Clinical and Functional Consequences. J. Clin. Endocrinol. Metab. *100*, E926-935.

Evinger, M.J., Towle, A.C., Park, D.H., Lee, P., and Joh, T.H. (1992). Glucocorticoids stimulate transcription of the rat phenylethanolamine N-methyltransferase (PNMT) gene in vivo and in vitro. Cell. Mol. Neurobiol. *12*, 193–215.

Fagugli, R.M., and Taglioni, C. (2011). Changes in the Perceived Epidemiology of Primary Hyperaldosteronism.

Fan, T., Jiang, S., Chung, N., Alikhan, A., Ni, C., Lee, C.-C.R., and Hornyak, T.J. (2011). EZH2-dependent suppression of a cellular senescence phenotype in melanoma cells by inhibition of p21/CDKN1A expression. Mol. Cancer Res. MCR *9*, 418–429.

Fang, Z., Gong, C., Liu, H., Zhang, X., Mei, L., Song, M., Qiu, L., Luo, S., Zhu, Z., Zhang, R., et al. (2015). E2F1 promote the aggressiveness of human colorectal cancer by activating the ribonucleotide reductase small subunit M2. Biochem. Biophys. Res. Commun. *464*, 407–415.

Faria, A.M., and Almeida, M.Q. (2012). Differences in the molecular mechanisms of adrenocortical tumorigenesis between children and adults. Mol. Cell. Endocrinol. *351*, 52–57.

Farrell, J.J., Moughan, J., Wong, J.L., Regine, W.F., Schaefer, P., Benson, A.B., Macdonald, J.S., Liu, X., Yen, Y., Lai, R., et al. (2016). Precision Medicine and Pancreatic Cancer: A Gemcitabine Pathway Approach. Pancreas *45*, 1485–1493.

Fassnacht, M., and Allolio, B. (2009a). Clinical management of adrenocortical carcinoma. Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. *23*, 273–289.

Fassnacht, M., Libé, R., Kroiss, M., and Allolio, B. (2011). Adrenocortical carcinoma: a clinician's update. Nat. Rev. Endocrinol. *7*, 323–335.

Fassnacht, M., Terzolo, M., Allolio, B., Baudin, E., Haak, H., Berruti, A., Welin, S., Schade-Brittinger, C., Lacroix, A., Jarzab, B., et al. (2012). Combination chemotherapy in advanced adrenocortical carcinoma. N. Engl. J. Med. *366*, 2189–2197.

Fassnacht, M., Kroiss, M., and Allolio, B. (2013). Update in adrenocortical carcinoma. J. Clin. Endocrinol. Metab. *98*, 4551–4564.

Fatchiyah, null, Zubair, M., Shima, Y., Oka, S., Ishihara, S., Fukui-Katoh, Y., and Morohashi, K. (2006). Differential gene dosage effects of Ad4BP/SF-1 on target tissue development. Biochem. Biophys. Res. Commun. *341*, 1036–1045.

Fay, A.P., Elfiky, A., Teló, G.H., McKay, R.R., Kaymakcalan, M., Nguyen, P.L., Vaidya, A., Ruan, D.T., Bellmunt, J., and Choueiri, T.K. (2014). Adrenocortical Carcinoma: The Management of Metastatic Disease. Crit. Rev. Oncol. Hematol. *92*, 123–132.

Feinberg, A.P., Ohlsson, R., and Henikoff, S. (2006). The epigenetic progenitor origin of human cancer. Nat. Rev. Genet. *7*, 21–33.

Ferraz-de-Souza, B., Martin, F., Mallet, D., Hudson-Davies, R.E., Cogram, P., Lin, L., Gerrelli, D., Beuschlein, F., Morel, Y., Huebner, A., et al. (2009). CBP/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich C-terminal domain, 2, and pre-B-cell leukemia transcription factor 1 in human adrenal development and disease. J. Clin. Endocrinol. Metab. *94*, 678–683.

Figueiredo, B.C., Sandrini, R., Zambetti, G.P., Pereira, R.M., Cheng, C., Liu, W., Lacerda, L., Pianovski, M.A., Michalkiewicz, E., Jenkins, J., et al. (2006). Penetrance of adrenocortical tumours associated with the germline TP53 R337H mutation. J. Med. Genet. *43*, 91–96.

Flemming, W. (1882). Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung (Leipzig: F.C.W. Vogel).

Fonseca, A.L., Kugelberg, J., Starker, L.F., Scholl, U., Choi, M., Hellman, P., Åkerström, G., Westin, G., Lifton, R.P., Björklund, P., et al. (2012). Comprehensive DNA methylation analysis of benign and malignant adrenocortical tumors. Genes. Chromosomes Cancer *51*, 949–960.

Ford, C.E., Henry, C., Llamosas, E., Djordjevic, A., and Hacker, N. (2016). Wnt signalling in gynaecological cancers: A future target for personalised medicine? Gynecol. Oncol. *140*, 345–351.

Fossom, L.H., Sterling, C.R., and Tank, A.W. (1992). Regulation of tyrosine hydroxylase gene transcription rate and tyrosine hydroxylase mRNA stability by cyclic AMP and glucocorticoid. Mol. Pharmacol. *42*, 898–908.

de Fraipont, F., El Atifi, M., Cherradi, N., Le Moigne, G., Defaye, G., Houlgatte, R., Bertherat, J., Bertagna, X., Plouin, P.-F., Baudin, E., et al. (2005). Gene expression profiling of human adrenocortical tumors using complementary deoxyribonucleic Acid microarrays identifies several candidate genes as markers of malignancy. J. Clin. Endocrinol. Metab. *90*, 1819–1829.

Frangini, A., Sjöberg, M., Roman-Trufero, M., Dharmalingam, G., Haberle, V., Bartke, T., Lenhard, B., Malumbres, M., Vidal, M., and Dillon, N. (2013). The Aurora B Kinase and the Polycomb Protein Ring1B Combine to Regulate Active Promoters in Quiescent Lymphocytes. Mol. Cell *51*, 647–661.

Fukunaga-Kalabis, M., Martinez, G., Telson, S.M., Liu, Z.-J., Balint, K., Juhasz, I., Elder, D.E., Perbal, B., and Herlyn, M. (2008). Downregulation of CCN3 expression as a potential mechanism for melanoma progression. Oncogene *27*, 2552–2560.

Fülöp, L., Rajki, A., Katona, D., Szanda, G., and Spät, A. (2013). Extramitochondrial OPA1 and adrenocortical function. Mol. Cell. Endocrinol. *381*, 70–79.

Gagliardi, L., Hotu, C., Casey, G., Braund, W.J., Ling, K.-H., Dodd, T., Manavis, J., Devitt, P.G., Cutfield, R., Rudzki, Z., et al. (2009). Familial vasopressin-sensitive ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia (VPs-AIMAH): clinical studies of three kindreds. Clin. Endocrinol. (Oxf.) *70*, 883–891.

Gao, Z., Zhang, J., Bonasio, R., Strino, F., Sawai, A., Parisi, F., Kluger, Y., and Reinberg, D. (2012). PCGF homologs, CBX proteins, and RYBP define functionally distinct PRC1 family complexes. Mol. Cell *45*, 344–356.

Gao, Z.-H., Suppola, S., Liu, J., Heikkilä, P., Jänne, J., and Voutilainen, R. (2002). Association of H19 promoter methylation with the expression of H19 and IGF-II genes in adrenocortical tumors. J. Clin. Endocrinol. Metab. *87*, 1170–1176.

Gatta-Cherifi, B., Chabre, O., Murat, A., Niccoli, P., Cardot-Bauters, C., Rohmer, V., Young, J., Delemer, B., Du Boullay, H., Verger, M.F., et al. (2012). Adrenal involvement in MEN1. Analysis of 715 cases from the Groupe d'etude des Tumeurs Endocrines database. Eur. J. Endocrinol. *166*, 269–279.

Gaujoux, S., Grabar, S., Fassnacht, M., Ragazzon, B., Launay, P., Libé, R., Chokri, I., Audebourg, A., Royer, B., Sbiera, S., et al. (2011). ß-catenin activation is associated with specific clinical and pathologic characteristics and a poor outcome in adrenocortical carcinoma. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *17*, 328–336.

Germano, A., Rapa, I., Volante, M., Lo Buono, N., Carturan, S., Berruti, A., Terzolo, M., and Papotti, M. (2014). Cytotoxic activity of gemcitabine, alone or in combination with mitotane, in adrenocortical carcinoma cell lines. Mol. Cell. Endocrinol. *382*, 1–7.

Germano, A., Rapa, I., Volante, M., De Francia, S., Migliore, C., Berruti, A., Papotti, M., and Terzolo, M. (2015). RRM1 modulates mitotane activity in adrenal cancer cells interfering with its metabolization. Mol. Cell. Endocrinol. *401*, 105–110.

Gicquel, C., Raffin-Sanson, M.L., Gaston, V., Bertagna, X., Plouin, P.F., Schlumberger, M., Louvel, A., Luton, J.P., and Le Bouc, Y. (1997). Structural and functional abnormalities at 11p15 are associated with the malignant phenotype in sporadic adrenocortical tumors: study on a series of 82 tumors. J. Clin. Endocrinol. Metab. *82*, 2559–2565.

Gicquel, C., Bertagna, X., Gaston, V., Coste, J., Louvel, A., Baudin, E., Bertherat, J., Chapuis, Y., Duclos, J.M., Schlumberger, M., et al. (2001). Molecular markers and long-term recurrences in a large cohort of patients with sporadic adrenocortical tumors. Cancer Res. *61*, 6762–6767.

Giordano, T.J., Thomas, D.G., Kuick, R., Lizyness, M., Misek, D.E., Smith, A.L., Sanders, D., Aljundi, R.T., Gauger, P.G., Thompson, N.W., et al. (2003). Distinct transcriptional profiles of adrenocortical tumors uncovered by DNA microarray analysis. Am. J. Pathol. *162*, 521–531.

Glazer, R.I., Hartman, K.D., Knode, M.C., Richard, M.M., Chiang, P.K., Tseng, C.K.H., and Marquez, V.E. (1986). 3-Deazaneplanocin: A new and potent inhibitor of S-adenosylhomocysteine hydrolase and its effects on human promyelocytic leukemia cell line HL-60. Biochem. Biophys. Res. Commun. *135*, 688–694.

Glover, A.R., Zhao, J.T., Gill, A.J., Weiss, J., Mugridge, N., Kim, E., Feeney, A.L., Ip, J.C., Reid, G., Clarke, S., et al. (2015). MicroRNA-7 as a tumor suppressor and novel therapeutic for adrenocortical carcinoma. Oncotarget *6*, 36675–36688.

Goh, G., Scholl, U.I., Healy, J.M., Choi, M., Prasad, M.L., Nelson-Williams, C., Kunstman, J.W., Kuntsman, J.W., Korah, R., Suttorp, A.-C., et al. (2014). Recurrent activating mutation in PRKACA in cortisol-producing adrenal tumors. Nat. Genet. *46*, 613–617.

Gonzalez, M.E., Moore, H.M., Li, X., Toy, K.A., Huang, W., Sabel, M.S., Kidwell, K.M., and Kleer, C.G. (2014). EZH2 expands breast stem cells through activation of NOTCH1 signaling. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *111*, 3098–3103.

Goodman, R., Edgar, D., Thoenen, H., Wechsler, W., and Herschman, H. (1978). Glucocorticoid induction of tyrosine hydroxylase in a continous cell line of rat pheochromocytoma. J. Cell Biol. *78*, R1-7.

Grant, N.J., Hepp, R., Krause, W., Aunis, D., Oehme, P., and Langley, K. (1999). Differential expression of SNAP-25 isoforms and SNAP-23 in the adrenal gland. J. Neurochem. *72*, 363–372.

Grolmusz, V.K., Karászi, K., Micsik, T., Tóth, E.A., Mészáros, K., Karvaly, G., Barna, G., Szabó, P.M., Baghy, K., Matkó, J., et al. (2016). Cell cycle dependent RRM2 may serve as proliferation marker and pharmaceutical target in adrenocortical cancer. Am. J. Cancer Res. *6*, 2041–2053.

Groussin, L., Kirschner, L.S., Vincent-Dejean, C., Perlemoine, K., Jullian, E., Delemer, B., Zacharieva, S., Pignatelli, D., Carney, J.A., Luton, J.P., et al. (2002). Molecular analysis of the cyclic AMP-dependent protein kinase A (PKA) regulatory subunit 1A (PRKAR1A) gene in patients with Carney complex and primary pigmented nodular adrenocortical disease (PPNAD) reveals novel mutations and clues for pathophysiology: augmented PKA signaling is associated with adrenal tumorigenesis in PPNAD. Am. J. Hum. Genet. *71*, 1433–1442.

Guaraldi, F., and Salvatori, R. (2012). Cushing syndrome: maybe not so uncommon of an endocrine disease. J. Am. Board Fam. Med. JABFM *25*, 199–208.

Guccione, E., Bassi, C., Casadio, F., Martinato, F., Cesaroni, M., Schuchlautz, H., Lüscher, B., and Amati, B. (2007). Methylation of histone H3R2 by PRMT6 and H3K4 by an MLL complex are mutually exclusive. Nature *449*, 933–937.

Guillaud-Bataille, M., Ragazzon, B., de Reyniès, A., Chevalier, C., Francillard, I., Barreau, O., Steunou, V., Guillemot, J., Tissier, F., Rizk-Rabin, M., et al. (2014). IGF2 promotes growth of adrenocortical carcinoma cells, but its overexpression does not modify phenotypic and molecular features of adrenocortical carcinoma. PloS One *9*, e103744.

Guimier, A., Ragazzon, B., Assié, G., Tissier, F., Dousset, B., Bertherat, J., and Gaujoux, S. (2013). AXIN genetic analysis in adrenocortical carcinomas updated. J. Endocrinol. Invest. *36*, 1000–1003.

Gunawan, M., Venkatesan, N., Loh, J.T., Wong, J.F., Berger, H., Neo, W.H., Li, L.Y.J., La Win, M.K., Yau, Y.H., Guo, T., et al. (2015). The methyltransferase Ezh2 controls cell adhesion and migration through direct methylation of the extranuclear regulatory protein talin. Nat. Immunol. *16*, 505–516.

Gupta, N., Wang, H., McLeod, T.L., Naus, C.C., Kyurkchiev, S., Advani, S., Yu, J., Perbal, B., and Weichselbaum, R.R. (2001). Inhibition of glioma cell growth and tumorigenic potential by CCN3 (NOV). Mol. Pathol. MP *54*, 293–299.

Gupta, R.A., Shah, N., Wang, K.C., Kim, J., Horlings, H.M., Wong, D.J., Tsai, M.-C., Hung, T., Argani, P., Rinn, J.L., et al. (2010). Long non-coding RNA HOTAIR

reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. Nature *464*, 1071–1076.

Gwynne, J.T., and Hess, B. (1980). The role of high density lipoproteins in rat adrenal cholesterol metabolism and steroidogenesis. J. Biol. Chem. *255*, 10875–10883.

Haidan, A., Bornstein, S.R., Glasow, A., Uhlmann, K., Lübke, C., and Ehrhart-Bornstein, M. (1998). Basal steroidogenic activity of adrenocortical cells is increased 10-fold by coculture with chromaffin cells. Endocrinology *139*, 772–780.

Half, E., Bercovich, D., and Rozen, P. (2009). Familial adenomatous polyposis. Orphanet J. Rare Dis. *4*, 22.

Han, Z., Xing, X., Hu, M., Zhang, Y., Liu, P., and Chai, J. (2007). Structural Basis of EZH2 Recognition by EED. Structure *15*, 1306–1315.

Hao, H.-X., Xie, Y., Zhang, Y., Charlat, O., Oster, E., Avello, M., Lei, H., Mickanin, C., Liu, D., Ruffner, H., et al. (2012). ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner. Nature *485*, 195–200.

Harlan, R.E. (1988). Regulation of neuropeptide gene expression by steroid hormones. Mol. Neurobiol. *2*, 183–200.

Hasegawa, T., Zhao, L., Caron, K.M., Majdic, G., Suzuki, T., Shizawa, S., Sasano, H., and Parker, K.L. (2000). Developmental roles of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) as revealed by StAR knockout mice. Mol. Endocrinol. Baltim. Md *14*, 1462–1471.

Hassan, A.B. (2003). Keys to the Hidden Treasures of the Mannose 6-Phosphate/Insulin-Like Growth Factor 2 Receptor. Am. J. Pathol. *162*, 3–6.

Hatano, O., Takakusu, A., Nomura, M., and Morohashi, K. (1996). Identical origin of adrenal cortex and gonad revealed by expression profiles of Ad4BP/SF-1. Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech. *1*, 663–671.

Hattangady, N.G., Olala, L.O., Bollag, W.B., and Rainey, W.E. (2012). Acute and chronic regulation of aldosterone production. Mol. Cell. Endocrinol. *350*, 151–162.

Hauri, S., Comoglio, F., Seimiya, M., Gerstung, M., Glatter, T., Hansen, K., Aebersold, R., Paro, R., Gstaiger, M., and Beisel, C. (2016). A high density map for navigating the human Polycomb complexome. BioRxiv 059964.

He, A., Shen, X., Ma, Q., Cao, J., von Gise, A., Zhou, P., Wang, G., Marquez, V.E., Orkin, S.H., and Pu, W.T. (2012). PRC2 directly methylates GATA4 and represses its transcriptional activity. Genes Dev. *26*, 37–42.

He, Y., Selvaraju, S., Curtin, M.L., Jakob, C.G., Zhu, H., Comess, K.M., Shaw, B., The, J., Lima-Fernandes, E., Szewczyk, M.M., et al. (2017). The EED protein-

protein interaction inhibitor A-395 inactivates the PRC2 complex. Nat. Chem. Biol. *13*, 389–395.

Heaton, J.H., Wood, M.A., Kim, A.C., Lima, L.O., Barlaskar, F.M., Almeida, M.Q., Fragoso, M.C.B.V., Kuick, R., Lerario, A.M., Simon, D.P., et al. (2012). Progression to Adrenocortical Tumorigenesis in Mice and Humans through Insulin-Like Growth Factor 2 and β-Catenin. Am. J. Pathol. *181*, 1017–1033.

Henning, J.E.K., Deutschbein, T., Altieri, B., Steinhauer, S., Kircher, S., Sbiera, S., Wild, V., Schlötelburg, W., Kroiss, M., Perotti, P., et al. (2017). Gemcitabine-Based Chemotherapy in Adrenocortical Carcinoma: A Multicenter Study of Efficacy and Predictive Factors. J. Clin. Endocrinol. Metab. *102*, 4323–4332.

Hermsen, I.G., Fassnacht, M., Terzolo, M., Houterman, S., den Hartigh, J., Leboulleux, S., Daffara, F., Berruti, A., Chadarevian, R., Schlumberger, M., et al. (2011). Plasma concentrations of o,p'DDD, o,p'DDA, and o,p'DDE as predictors of tumor response to mitotane in adrenocortical carcinoma: results of a retrospective ENS@T multicenter study. J. Clin. Endocrinol. Metab. *96*, 1844–1851.

Herrera-Merchan, A., Arranz, L., Ligos, J.M., de Molina, A., Dominguez, O., and Gonzalez, S. (2012). Ectopic expression of the histone methyltransferase Ezh2 in haematopoietic stem cells causes myeloproliferative disease. Nat. Commun. *3*, 623.

Hescot, S., Slama, A., Lombès, A., Paci, A., Remy, H., Leboulleux, S., Chadarevian, R., Trabado, S., Amazit, L., Young, J., et al. (2013). Mitotane alters mitochondrial respiratory chain activity by inducing cytochrome c oxidase defect in human adrenocortical cells. Endocr. Relat. Cancer *20*, 371–381.

Hescot, S., Amazit, L., Lhomme, M., Travers, S., DuBow, A., Battini, S., Boulate, G., Namer, I.J., Lombes, A., Kontush, A., et al. (2017). Identifying mitotane-induced mitochondria-associated membranes dysfunctions: metabolomic and lipidomic approaches. Oncotarget *8*, 109924–109940.

Hibi, K., Nakamura, H., Hirai, A., Fujikake, Y., Kasai, Y., Akiyama, S., Ito, K., and Takagi, H. (1996). Loss of H19 imprinting in esophageal cancer. Cancer Res. *56*, 480–482.

Higashijima, M., Nawata, H., Kato, K.-I., and Ibayashi, H. (1987). Studies on Lipoprotein and Adrenal Steroidogenesis: I. Roles of Low Density Lipoprotein- and High Density Lipoprotein-Cholesterol in Steroid Production in Cultured Human Adrenocortical Cells. Endocrinol. Jpn. *34*, 635–645.

Hoekstra, M., Meurs, I., Koenders, M., Out, R., Hildebrand, R.B., Kruijt, J.K., Van Eck, M., and Van Berkel, T.J.C. (2008). Absence of HDL cholesteryl ester uptake in mice via SR-BI impairs an adequate adrenal glucocorticoid-mediated stress response to fasting. J. Lipid Res. *49*, 738–745.

Hoekstra, M., Ye, D., Hildebrand, R.B., Zhao, Y., Lammers, B., Stitzinger, M., Kuiper, J., Van Berkel, T.J.C., and Van Eck, M. (2009). Scavenger receptor class B type I-mediated uptake of serum cholesterol is essential for optimal adrenal glucocorticoid production. J. Lipid Res. *50*, 1039–1046.

Hoekstra, M., Korporaal, S.J.A., van der Sluis, R.J., Hirsch-Reinshagen, V., Bochem, A.E., Wellington, C.L., Van Berkel, T.J.C., Kuivenhoven, J.A., and Van Eck, M. (2013). LCAT deficiency in mice is associated with a diminished adrenal glucocorticoid function. J. Lipid Res. *54*, 358–364.

Hofland, J., Hofland, L.J., van Koetsveld, P.M., Steenbergen, J., de Herder, W.W., van Eijck, C.H., de Krijger, R.R., van Nederveen, F.H., van Aken, M.O., de Groot, J.W., et al. (2013). ACTH-independent macronodular adrenocortical hyperplasia reveals prevalent aberrant in vivo and in vitro responses to hormonal stimuli and coupling of arginine-vasopressin type 1a receptor to 11ß-hydroxylase. Orphanet J. Rare Dis. *8*, 142.

Holoch, D., and Margueron, R. (2017). Mechanisms Regulating PRC2 Recruitment and Enzymatic Activity. Trends Biochem. Sci. *42*, 531–542.

Holthuis, J.C.M., and Levine, T.P. (2005). Lipid traffic: floppy drives and a superhighway. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *6*, 209–220.

Honda, S., Morohashi, K., Nomura, M., Takeya, H., Kitajima, M., and Omura, T. (1993). Ad4BP regulating steroidogenic P-450 gene is a member of steroid hormone receptor superfamily. J. Biol. Chem. *268*, 7494–7502.

Hu, Y., Lao, L., Mao, J., Jin, W., Luo, H., Charpentier, T., Qi, S., Peng, J., Hu, B., Marcinkiewicz, M.M., et al. (2017). Armc5 deletion causes developmental defects and compromises T-cell immune responses. Nat. Commun. *8*, 13834.

Huang, S., Litt, M., and Felsenfeld, G. (2005). Methylation of histone H4 by arginine methyltransferase PRMT1 is essential in vivo for many subsequent histone modifications. Genes Dev. *19*, 1885–1893.

Hunkapiller, J., Shen, Y., Diaz, A., Cagney, G., McCleary, D., Ramalho-Santos, M., Krogan, N., Ren, B., Song, J.S., and Reiter, J.F. (2012). Polycomb-like 3 promotes polycomb repressive complex 2 binding to CpG islands and embryonic stem cell self-renewal. PLoS Genet. *8*, e1002576.

Ikeda, Y., Shen, W.H., Ingraham, H.A., and Parker, K.L. (1994). Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. Mol. Endocrinol. Baltim. Md *8*, 654–662.

Illingworth, D.R., Kenny, T.A., and Orwoll, E.S. (1982). Adrenal function in heterozygous and homozygous hypobetalipoproteinemia. J. Clin. Endocrinol. Metab. *54*, 27–33.

J Nowak, A., Alfieri, C., U Stirnimann, C., Rybin, V., Baudin, F., Ly-Hartig, N., Lindner, D., and W Müller, C. (2011). Chromatin-modifying Complex Component

Nurf55/p55 Associates with Histones H3 and H4 and Polycomb Repressive Complex 2 Subunit Su(z)12 through Partially Overlapping Binding Sites. J. Biol. Chem. *286*, 23388–23396.

Jacobs, J.J.L., and van Lohuizen, M. (2002). Polycomb repression: from cellular memory to cellular proliferation and cancer. Biochim. Biophys. Acta *1602*, 151–161.

Jasińska, M., Owczarek, J., and Orszulak-Michalak, D. (2007). Statins: a new insight into their mechanisms of action and consequent pleiotropic effects. Pharmacol. Rep. PR *59*, 483–499.

Jenuwein, T., and Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. Science *293*, 1074–1080.

Jiang, W., Jimenez, G., Wells, N.J., Hope, T.J., Wahl, G.M., Hunter, T., and Fukunaga, R. (1998). PRC1: a human mitotic spindle-associated CDK substrate protein required for cytokinesis. Mol. Cell *2*, 877–885.

Jiao, L., and Liu, X. (2015). Structural basis of histone H3K27 trimethylation by an active polycomb repressive complex 2. Science *350*, aac4383.

Jin, P., Janjua, M.U., Zhang, Q., Dong, C.-S., Yang, Y., and Mo, Z.-H. (2018). Extensive ARMC5 genetic variance in primary bilateral macronodular adrenal hyperplasia that started with exophthalmos: a case report. J. Med. Case Reports *12*, 13.

Johnson, K., Liu, L., Majdzadeh, N., Chavez, C., Chin, P.C., Morrison, B., Wang, L., Park, J., Chugh, P., Chen, H.-M., et al. (2005). Inhibition of neuronal apoptosis by the cyclin-dependent kinase inhibitor GW8510: identification of 3' substituted indolones as a scaffold for the development of neuroprotective drugs. J. Neurochem. *93*, 538–548.

Jouinot, A., Assie, G., Libe, R., Fassnacht, M., Papathomas, T., Barreau, O., de la Villeon, B., Faillot, S., Hamzaoui, N., Neou, M., et al. (2017). DNA Methylation Is an Independent Prognostic Marker of Survival in Adrenocortical Cancer. J. Clin. Endocrinol. Metab. *102*, 923–932.

Juhlin, C.C., Goh, G., Healy, J.M., Fonseca, A.L., Scholl, U.I., Stenman, A., Kunstman, J.W., Brown, T.C., Overton, J.D., Mane, S.M., et al. (2015). Whole-exome sequencing characterizes the landscape of somatic mutations and copy number alterations in adrenocortical carcinoma. J. Clin. Endocrinol. Metab. *100*, E493-502.

Kandutsch, A.A., and Russell, A.E. (1960). Preputial gland tumor sterols. 3. A metabolic pathway from lanosterol to cholesterol. J. Biol. Chem. *235*, 2256–2261.

Keeney, D.S., Jenkins, C.M., and Waterman, M.R. (1995). Developmentally regulated expression of adrenal 17 alpha-hydroxylase cytochrome P450 in the mouse embryo. Endocrinology *136*, 4872–4879.

Kerkhofs, T.M.A., Ettaieb, M.H.T., Hermsen, I.G.C., and Haak, H.R. (2015). Developing treatment for adrenocortical carcinoma. Endocr. Relat. Cancer *22*, R325-338.

Ketel, C.S., Andersen, E.F., Vargas, M.L., Suh, J., Strome, S., and Simon, J.A. (2005). Subunit contributions to histone methyltransferase activities of fly and worm polycomb group complexes. Mol. Cell. Biol. *25*, 6857–6868.

Khalil, A.M., Guttman, M., Huarte, M., Garber, M., Raj, A., Rivea Morales, D., Thomas, K., Presser, A., Bernstein, B.E., van Oudenaarden, A., et al. (2009). Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 11667–11672.

Kiefer, J.C. (2007). Epigenetics in development. Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat. *236*, 1144–1156.

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.

Kim, E., Kim, M., Woo, D.-H., Shin, Y., Shin, J., Chang, N., Oh, Y.T., Kim, H., Rheey, J., Nakano, I., et al. (2013a). Phosphorylation of EZH2 activates STAT3 signaling via STAT3 methylation and promotes tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells. Cancer Cell *23*, 839–852.

Kim, E., Ilagan, J.O., Liang, Y., Daubner, G.M., Lee, S.C.-W., Ramakrishnan, A., Li, Y., Chung, Y.R., Micol, J.-B., Murphy, M.E., et al. (2015). SRSF2 Mutations Contribute to Myelodysplasia by Mutant-Specific Effects on Exon Recognition. Cancer Cell *27*, 617–630.

Kim, W., Bird, G.H., Neff, T., Guo, G., Kerenyi, M.A., Walensky, L.D., and Orkin, S.H. (2013b). Targeted disruption of the EZH2-EED complex inhibits EZH2-dependent cancer. Nat. Chem. Biol. *9*, 643–650.

Kirschner, L.S., Sandrini, F., Monbo, J., Lin, J.P., Carney, J.A., and Stratakis, C.A. (2000). Genetic heterogeneity and spectrum of mutations of the PRKAR1A gene in patients with the carney complex. Hum. Mol. Genet. *9*, 3037–3046.

Klauke, K., Radulović, V., Broekhuis, M., Weersing, E., Zwart, E., Olthof, S., Ritsema, M., Bruggeman, S., Wu, X., Helin, K., et al. (2013). Polycomb Cbx family members mediate the balance between haematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. Nat. Cell Biol. *15*, 353–362.

Kleer, C.G., Cao, Q., Varambally, S., Shen, R., Ota, I., Tomlins, S.A., Ghosh, D., Sewalt, R.G.A.B., Otte, A.P., Hayes, D.F., et al. (2003). EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *100*, 11606–11611.

Klymenko, T., Papp, B., Fischle, W., Köcher, T., Schelder, M., Fritsch, C., Wild, B., Wilm, M., and Müller, J. (2006). A Polycomb group protein complex with sequence-specific DNA-binding and selective methyl-lysine-binding activities. Genes Dev. *20*, 1110–1122.

Knutson, S.K., Wigle, T.J., Warholic, N.M., Sneeringer, C.J., Allain, C.J., Klaus, C.R., Sacks, J.D., Raimondi, A., Majer, C.R., Song, J., et al. (2012). A selective inhibitor of EZH2 blocks H3K27 methylation and kills mutant lymphoma cells. Nat. Chem. Biol. *8*, 890–896.

Knutson, S.K., Warholic, N.M., Wigle, T.J., Klaus, C.R., Allain, C.J., Raimondi, A., Porter Scott, M., Chesworth, R., Moyer, M.P., Copeland, R.A., et al. (2013). Durable tumor regression in genetically altered malignant rhabdoid tumors by inhibition of methyltransferase EZH2. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *110*, 7922–7927.

Kogo, R., Shimamura, T., Mimori, K., Kawahara, K., Imoto, S., Sudo, T., Tanaka, F., Shibata, K., Suzuki, A., Komune, S., et al. (2011). Long noncoding RNA HOTAIR regulates polycomb-dependent chromatin modification and is associated with poor prognosis in colorectal cancers. Cancer Res. *71*, 6320–6326.

Köhler, C., and Villar, C.B.R. (2008). Programming of gene expression by Polycomb group proteins. Trends Cell Biol. *18*, 236–243.

Kohlmaier, A., Savarese, F., Lachner, M., Martens, J., Jenuwein, T., and Wutz, A. (2004). A chromosomal memory triggered by Xist regulates histone methylation in X inactivation. PLoS Biol. *2*, E171.

Konze, K.D., Ma, A., Li, F., Barsyte-Lovejoy, D., Parton, T., Macnevin, C.J., Liu, F., Gao, C., Huang, X.-P., Kuznetsova, E., et al. (2013). An orally bioavailable chemical probe of the Lysine Methyltransferases EZH2 and EZH1. ACS Chem. Biol. *8*, 1324–1334.

Korpaisarn, S., Trachoo, O., Panthan, B., Aroonroch, R., Suvikapakornkul, R., and Sriphrapradang, C. (2017). A Novel PRKAR1A Mutation Identified in a Patient with Isolated Primary Pigmented Nodular Adrenocortical Disease. Case Rep. Oncol. *10*, 769–776.

Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. Cell *128*, 693–705.

Kraemer, F.B., Shen, W.-J., Patel, S., Osuga, J.-I., Ishibashi, S., and Azhar, S. (2007). The LDL receptor is not necessary for acute adrenal steroidogenesis in mouse adrenocortical cells. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. *292*, E408-412.

Kretz, M., and Meister, G. (2014). RNA binding of PRC2: promiscuous or well ordered? Mol. Cell *55*, 157–158.

Kretzschmar, K., and Clevers, H. (2017). Wnt/ß-catenin signaling in adult mammalian epithelial stem cells. Dev. Biol. *428*, 273–282.

Ku, M., Koche, R.P., Rheinbay, E., Mendenhall, E.M., Endoh, M., Mikkelsen, T.S., Presser, A., Nusbaum, C., Xie, X., Chi, A.S., et al. (2008). Genomewide analysis of PRC1 and PRC2 occupancy identifies two classes of bivalent domains. PLoS Genet. *4*, e1000242.

Kulis, M., and Esteller, M. (2010). DNA methylation and cancer. Adv. Genet. *70*, 27–56.

Kulshrestha, A., and Suman, S. (2018). Common module analysis reveals prospective targets and mechanisms of pediatric adrenocortical adenoma and carcinoma. Oncol. Lett. *15*, 3267–3272.

Kuzmichev, A., Jenuwein, T., Tempst, P., and Reinberg, D. (2004). Different EZH2-containing complexes target methylation of histone H1 or nucleosomal histone H3. Mol. Cell *14*, 183–193.

Lacroix, A. (2009). ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia. Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. *23*, 245–259.

Lacroix, A., Hamet, P., and Boutin, J.M. (1999). Leuprolide acetate therapy in luteinizing hormone--dependent Cushing's syndrome. N. Engl. J. Med. *341*, 1577–1581.

Lacroix, A., Bourdeau, I., Lampron, A., Mazzuco, T.L., Tremblay, J., and Hamet, P. (2010). Aberrant G-protein coupled receptor expression in relation to adrenocortical overfunction. Clin. Endocrinol. (Oxf.) *73*, 1–15.

Lacroix, A., Feelders, R.A., Stratakis, C.A., and Nieman, L.K. (2015). Cushing's syndrome. Lancet Lond. Engl. *386*, 913–927.

Lala, D.S., Rice, D.A., and Parker, K.L. (1992). Steroidogenic factor I, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu-factor I. Mol. Endocrinol. Baltim. Md *6*, 1249–1258.

Lalli, E., and Figueiredo, B.C. (2015). Pediatric adrenocortical tumors: what they can tell us on adrenal development and comparison with adult adrenal tumors. Front. Endocrinol. *6*, 23.

Lambert-Langlais, S., Pointud, J.-C., Lefrançois-Martinez, A.-M., Volat, F., Manin, M., Coudoré, F., Val, P., Sahut-Barnola, I., Ragazzon, B., Louiset, E., et al. (2009). Aldo Keto Reductase 1B7 and Prostaglandin F2α Are Regulators of Adrenal Endocrine Functions. PLoS ONE *4*.

Lan, F., and Shi, Y. (2009). Epigenetic regulation: methylation of histone and non-histone proteins. Sci. China C Life Sci. *52*, 311–322.

Landeira, D., Sauer, S., Poot, R., Dvorkina, M., Mazzarella, L., Jørgensen, H.F., Pereira, C.F., Leleu, M., Piccolo, F.M., Spivakov, M., et al. (2010). Jarid2 is a PRC2 component in embryonic stem cells required for multi-lineage

differentiation and recruitment of PRC1 and RNA Polymerase II to developmental regulators. Nat. Cell Biol. *12*, 618–624.

Laplante, M., and Sabatini, D.M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. Cell *149*, 274–293.

Latronico, A.C., and Chrousos, G.P. (1997). Extensive personal experience: adrenocortical tumors. J. Clin. Endocrinol. Metab. *82*, 1317–1324.

Latronico, A.C., Pinto, E.M., Domenice, S., Fragoso, M.C.V.B., Martin, R.M., Zerbini, M.C.N., Lucon, A.M., and Mendonca, B.B. (2001). An inherited mutation outside the highly conserved DNA-binding domain of the p53 tumor suppressor protein in children and adults with sporadic adrenocortical tumors.

Lau, S.K., and Weiss, L.M. (2009). The Weiss system for evaluating adrenocortical neoplasms: 25 years later. Hum. Pathol. *40*, 757–768.

Lau, W. de, 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.

Lee, J.T., and Gu, W. (2010). The multiple levels of regulation by p53 ubiquitination. Cell Death Differ. *17*, 86–92.

Lee, J.M., Lee, J.S., Kim, H., Kim, K., Park, H., Kim, J.-Y., Lee, S.H., Kim, I.S., Kim, J., Lee, M., et al. (2012). EZH2 generates a methyl degron that is recognized by the DCAF1/DDB1/CUL4 E3 ubiquitin ligase complex. Mol. Cell *48*, 572–586.

Lee, S., Hwang, R., Lee, J., Rhee, Y., Kim, D.J., Chung, U.-I., and Lim, S.-K. (2005). Ectopic expression of vasopressin V1b and V2 receptors in the adrenal glands of familial ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia. Clin. Endocrinol. (Oxf.) *63*, 625–630.

Lefebvre, H., Contesse, V., Delarue, C., Kuhn, J.-M., and Vaudry, H. (1998). The 5-HT<Subscript>4</Subscript> Receptor in the Adrenal Gland. In 5-HT4 Receptors in the Brain and Periphery, (Springer, Berlin, Heidelberg), pp. 195–211.

Lehmann, T.P., Wrzesiński, T., and Jagodziński, P.P. (2013). The effect of mitotane on viability, steroidogenesis and gene expression in NCI-H295R adrenocortical cells. Mol. Med. Rep. *7*, 893–900.

Lejon, S., Thong, S.Y., Murthy, A., AlQarni, S., Murzina, N.V., Blobel, G.A., Laue, E.D., and Mackay, J.P. (2011). Insights into Association of the NuRD Complex with FOG-1 from the Crystal Structure of an RbAp48·FOG-1 Complex. J. Biol. Chem. *286*, 1196–1203.

Lerario, A.M., Moraitis, A., and Hammer, G.D. (2014). Genetics and epigenetics of adrenocortical tumors. Mol. Cell. Endocrinol. *386*, 67–84.

Lev, S. (2010). Non-vesicular lipid transport by lipid-transfer proteins and beyond. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *11*, 739–750.

Levine, S.S., King, I.F.G., and Kingston, R.E. (2004). Division of labor in polycomb group repression. Trends Biochem. Sci. *29*, 478–485.

Lewis, C.S., Voelkel-Johnson, C., and Smith, C.D. (2016). Suppression of c-Myc and RRM2 expression in pancreatic cancer cells by the sphingosine kinase-2 inhibitor ABC294640. Oncotarget *7*, 60181–60192.

Li, C., Zheng, J., Chen, S., Huang, B., Li, G., Feng, Z., Wang, J., and Xu, S. (2018a). RRM2 promotes the progression of human glioblastoma. J. Cell. Physiol. *233*, 6759–6767.

Li, G., Margueron, R., Ku, M., Chambon, P., Bernstein, B.E., and Reinberg, D. (2010). Jarid2 and PRC2, partners in regulating gene expression. Genes Dev. *24*, 368–380.

Li, H., Degenhardt, B., Tobin, D., Yao, Z.X., Tasken, K., and Papadopoulos, V. (2001). Identification, localization, and function in steroidogenesis of PAP7: a peripheral-type benzodiazepine receptor- and PKA (RIalpha)-associated protein. Mol. Endocrinol. Baltim. Md *15*, 2211–2228.

Li, J., Pang, J., Liu, Y., Zhang, J., Zhang, C., Shen, G., and Song, L. (2018b). Suppression of RRM2 inhibits cell proliferation, causes cell cycle arrest and promotes the apoptosis of human neuroblastoma cells and in human neuroblastoma RRM2 is suppressed following chemotherapy. Oncol. Rep. *40*, 355–360.

Li, X., Gonzalez, M.E., Toy, K., Filzen, T., Merajver, S.D., and Kleer, C.G. (2009). Targeted overexpression of EZH2 in the mammary gland disrupts ductal morphogenesis and causes epithelial hyperplasia. Am. J. Pathol. *175*, 1246–1254.

Libé, R. (2015). Adrenocortical carcinoma (ACC): diagnosis, prognosis, and treatment. Front. Cell Dev. Biol. *3*.

Libè, R., Groussin, L., Tissier, F., Elie, C., René-Corail, F., Fratticci, A., Jullian, E., Beck-Peccoz, P., Bertagna, X., Gicquel, C., et al. (2007). Somatic TP53 mutations are relatively rare among adrenocortical cancers with the frequent 17p13 loss of heterozygosity. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *13*, 844–850.

Libé, R., Fratticci, A., Coste, J., Tissier, F., Horvath, A., Ragazzon, B., Rene-Corail, F., Groussin, L., Bertagna, X., Raffin-Sanson, M.L., et al. (2008). Phosphodiesterase 11A (PDE11A) and Genetic Predisposition to Adrenocortical Tumors. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *14*, 4016–4024.

Libé, R., Coste, J., Guignat, L., Tissier, F., Lefebvre, H., Barrande, G., Ajzenberg, C., Tauveron, I., Clauser, E., Dousset, B., et al. (2010). Aberrant cortisol regulations in bilateral macronodular adrenal hyperplasia: a frequent finding in

a prospective study of 32 patients with overt or subclinical Cushing's syndrome. Eur. J. Endocrinol. *163*, 129–138.

Lin, C.G., Leu, S.-J., Chen, N., Tebeau, C.M., Lin, S.-X., Yeung, C.-Y., and Lau, L.F. (2003). CCN3 (NOV) is a novel angiogenic regulator of the CCN protein family. J. Biol. Chem. *278*, 24200–24208.

Lin, Y., Hou, X., Shen, W.-J., Hanssen, R., Khor, V.K., Cortez, Y., Roseman, A.N., Azhar, S., and Kraemer, F.B. (2016). SNARE-Mediated Cholesterol Movement to Mitochondria Supports Steroidogenesis in Rodent Cells. Mol. Endocrinol. Baltim. Md *30*, 234–247.

Litt, M., Qiu, Y., and Huang, S. (2009). Histone arginine methylations: their roles in chromatin dynamics and transcriptional regulation. Biosci. Rep. *29*, 131–141.

Liu, J., Heikkilä, P., Meng, Q.H., Kahri, A.I., Tikkanen, M.J., and Voutilainen, R. (2000). Expression of low and high density lipoprotein receptor genes in human adrenals. Eur. J. Endocrinol. *142*, 677–682.

Liu, L., Wang, J.-F., Fan, J., Rao, Y.-S., Liu, F., Yan, Y.-E., and Wang, H. (2016). Nicotine Suppressed Fetal Adrenal StAR Expression via YY1 Mediated-Histone Deacetylation Modification Mechanism. Int. J. Mol. Sci. *17*.

Loriaux, D.L. (2017). Diagnosis and Differential Diagnosis of Cushing's Syndrome. N. Engl. J. Med. *377*, e3.

Lotfi, C.F., and Armelin, H.A. (1998). c-Fos protein is a mediator in mitogenic response to ACTH. Endocr. Res. *24*, 421–424.

Louiset, E., Duparc, C., Young, J., Renouf, S., Tetsi Nomigni, M., Boutelet, I., Libé, R., Bram, Z., Groussin, L., Caron, P., et al. (2013). Intraadrenal corticotropin in bilateral macronodular adrenal hyperplasia. N. Engl. J. Med. *369*, 2115–2125.

Lu, C., Han, H.D., Mangala, L.S., Ali-Fehmi, R., Newton, C.S., Ozbun, L., Armaiz-Pena, G.N., Hu, W., Stone, R.L., Munkarah, A., et al. (2010). Regulation of tumor angiogenesis by EZH2. Cancer Cell *18*, 185–197.

Luger, K. (2006). Dynamic nucleosomes. Chromosome Res. Int. J. Mol. Supramol. Evol. Asp. Chromosome Biol. *14*, 5–16.

Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 A resolution. Nature *389*, 251–260.

Luo, M., Li, Z., Wang, W., Zeng, Y., Liu, Z., and Qiu, J. (2013). Long non-coding RNA H19 increases bladder cancer metastasis by associating with EZH2 and inhibiting E-cadherin expression. Cancer Lett. *333*, 213–221.

Luo, X., Ikeda, Y., and Parker, K.L. (1994). A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. Cell *77*, 481–490.

Ma, Y., Zhang, P., Wang, F., Yang, J., Yang, Z., and Qin, H. (2010). The relationship between early embryo development and tumourigenesis. J. Cell. Mol. Med. *14*, 2697–2701.

MacDonald, B.T., Tamai, K., and He, X. (2009). Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. Dev. Cell *17*, 9–26.

Maenner, S., Blaud, M., Fouillen, L., Savoye, A., Marchand, V., Dubois, A., Sanglier-Cianférani, S., Dorsselaer, A.V., Clerc, P., Avner, P., et al. (2010). 2-D Structure of the A Region of Xist RNA and Its Implication for PRC2 Association. PLOS Biol. *8*, e1000276.

Mai, P.L., Best, A.F., Peters, J.A., DeCastro, R.M., Khincha, P.P., Loud, J.T., Bremer, R.C., Rosenberg, P.S., and Savage, S.A. (2016). Risks of first and subsequent cancers among TP53 mutation carriers in the National Cancer Institute Li-Fraumeni syndrome cohort. Cancer *122*, 3673–3681.

Malkin, D., Li, F.P., Strong, L.C., Fraumeni, J.F., Nelson, C.E., Kim, D.H., Kassel, J., Gryka, M.A., Bischoff, F.Z., and Tainsky, M.A. (1990). Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. Science *250*, 1233–1238.

Mallen-St Clair, J., Soydaner-Azeloglu, R., Lee, K.E., Taylor, L., Livanos, A., Pylayeva-Gupta, Y., Miller, G., Margueron, R., Reinberg, D., and Bar-Sagi, D. (2012). EZH2 couples pancreatic regeneration to neoplastic progression. Genes Dev. *26*, 439–444.

Manna, P.R., Dyson, M.T., and Stocco, D.M. (2009). Regulation of the steroidogenic acute regulatory protein gene expression: present and future perspectives. Mol. Hum. Reprod. *15*, 321–333.

Mansmann, G., Lau, J., Balk, E., Rothberg, M., Miyachi, Y., and Bornstein, S.R. (2004). The clinically inapparent adrenal mass: update in diagnosis and management. Endocr. Rev. *25*, 309–340.

Margueron, R., and Reinberg, D. (2011). The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. Nature *469*, 343–349.

Margueron, R., Li, G., Sarma, K., Blais, A., Zavadil, J., Woodcock, C.L., Dynlacht, B.D., and Reinberg, D. (2008). Ezh1 and Ezh2 maintain repressive chromatin through different mechanisms. Mol. Cell *32*, 503–518.

Margueron, R., Justin, N., Ohno, K., Sharpe, M.L., Son, J., Drury, W.J., Voigt, P., Martin, S.R., Taylor, W.R., De Marco, V., et al. (2009). Role of the polycomb protein EED in the propagation of repressive histone marks. Nature *461*, 762–767.

Martin, C., and Zhang, Y. (2005). The diverse functions of histone lysine methylation. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *6*, 838–849.

Martin, G., Pilon, A., Albert, C., Valle, M., W. Hum, D., Fruchart, J., Najib, J., Clavey, V., and Staels, B. (1999). Comparison of expression and regulation of the high-density lipoprotein receptor SR-BI and the low-density lipoprotein receptor in human adrenocortical carcinoma NCI-H295 cells. Eur. J. Biochem. FEBS *261*, 481–491.

Martinerie, C., Gicquel, C., Louvel, A., Laurent, M., Schofield, P.N., and Le Bouc, Y. (2001). Altered expression of novH is associated with human adrenocortical tumorigenesis. J. Clin. Endocrinol. Metab. *86*, 3929–3940.

Martínez-Balbás, M.A., Tsukiyama, T., Gdula, D., and Wu, C. (1998a). Drosophila NURF-55, a WD repeat protein involved in histone metabolism. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *95*, 132–137.

Martínez-Balbás, M.A., Tsukiyama, T., Gdula, D., and Wu, C. (1998b). Drosophila NURF-55, a WD repeat protein involved in histone metabolism. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *95*, 132–137.

Mattos, G.E., Jacysyn, J.F., Amarante-Mendes, G.P., and Lotfi, C.F.P. (2011). Comparative effect of FGF2, synthetic peptides 1-28 N-POMC and ACTH on proliferation in rat adrenal cell primary cultures. Cell Tissue Res. *345*, 343–356.

McCabe, M.T., Ott, H.M., Ganji, G., Korenchuk, S., Thompson, C., Van Aller, G.S., Liu, Y., Graves, A.P., Della Pietra, A., Diaz, E., et al. (2012). EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations. Nature *492*, 108–112.

McEwan, P.E., Vinson, G.P., and Kenyon, C.J. (1999). Control of adrenal cell proliferation by AT1 receptors in response to angiotensin II and low-sodium diet. Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab. *276*, E303–E309.

Mcknight, G.S., Clegg, C.H., Uhler, M.D., Chrivia, J.C., Cadd, G.G., Correll, L.A., and Otten, A.D. (1988). Analysis of the cAMP-Dependent Protein Kinase System Using Molecular Genetic Approaches. In Proceedings of the 1987 Laurentian Hormone Conference, J.H. Clark, ed. (Boston: Academic Press), pp. 307–335.

Meier, R.K., and Clark, B.J. (2012). Angiotensin II-Dependent Transcriptional Activation of Human Steroidogenic Acute Regulatory Protein Gene by a 25-kDa cAMP-Responsive Element Modulator Protein Isoform and Yin Yang 1. Endocrinology *153*, 1256–1268.

Menzies, R.I., Zhao, X., Mullins, L.J., Mullins, J.J., Cairns, C., Wrobel, N., Dunbar, D.R., Bailey, M.A., and Kenyon, C.J. (2017). Transcription controls growth, cell kinetics and cholesterol supply to sustain ACTH responses. Endocr. Connect. *6*, 446–457.

Merke, D.P., and Bornstein, S.R. (2005). Congenital adrenal hyperplasia. The Lancet *365*, 2125–2136.

Mesiano, S., and Jaffe, R.B. (1997). Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. Endocr. Rev. *18*, 378–403.

Mesiano, S., Mellon, S.H., and Jaffe, R.B. (1993). Mitogenic action, regulation, and localization of insulin-like growth factors in the human fetal adrenal gland. J. Clin. Endocrinol. Metab. *76*, 968–976.

Mete, O., Gucer, H., Kefeli, M., and Asa, S.L. (2018). Diagnostic and Prognostic Biomarkers of Adrenal Cortical Carcinoma. Am. J. Surg. Pathol. *42*, 201–213.

Metherell, L.A., Chapple, J.P., Cooray, S., David, A., Becker, C., Rüschendorf, F., Naville, D., Begeot, M., Khoo, B., Nürnberg, P., et al. (2005). Mutations in MRAP, encoding a new interacting partner of the ACTH receptor, cause familial glucocorticoid deficiency type 2. Nat. Genet. *37*, 166–170.

Michalkiewicz, E., Sandrini, R., Figueiredo, B., Miranda, E.C.M., Caran, E., Oliveira-Filho, A.G., Marques, R., Pianovski, M. a. D., Lacerda, L., Cristofani, L.M., et al. (2004). Clinical and outcome characteristics of children with adrenocortical tumors: a report from the International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. *22*, 838–845.

Midzak, A., and Papadopoulos, V. (2014). Binding domain-driven intracellular trafficking of sterols for synthesis of steroid hormones, bile acids and oxysterols. Traffic Cph. Den. *15*, 895–914.

Miller, W.L. (2005). Minireview: regulation of steroidogenesis by electron transfer. Endocrinology *146*, 2544–2550.

Miller, W.L., and Bose, H.S. (2011). Early steps in steroidogenesis: intracellular cholesterol trafficking. J. Lipid Res. *52*, 2111–2135.

Min, J., Feng, Q., Li, Z., Zhang, Y., and Xu, R.-M. (2003). Structure of the catalytic domain of human DOT1L, a non-SET domain nucleosomal histone methyltransferase. Cell *112*, 711–723.

Min, J., Zaslavsky, A., Fedele, G., McLaughlin, S.K., Reczek, E.E., De Raedt, T., Guney, I., Strochlic, D.E., Macconaill, L.E., Beroukhim, R., et al. (2010). An oncogene-tumor suppressor cascade drives metastatic prostate cancer by coordinately activating Ras and nuclear factor-kappaB. Nat. Med. *16*, 286–294.

Miranda, T.B., Cortez, C.C., Yoo, C.B., Liang, G., Abe, M., Kelly, T.K., Marquez, V.E., and Jones, P.A. (2009). DZNep is a global histone methylation inhibitor that reactivates developmental genes not silenced by DNA methylation. Mol. Cancer Ther. *8*, 1579–1588.

Miyamura, N., Taguchi, T., Murata, Y., Taketa, K., Iwashita, S., Matsumoto, K., Nishikawa, T., Toyonaga, T., Sakakida, M., and Araki, E. (2002). Inherited

adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia with abnormal cortisol secretion by vasopressin and catecholamines: detection of the aberrant hormone receptors on adrenal gland. Endocrine *19*, 319–326.

Montgomery, N.D., Yee, D., Chen, A., Kalantry, S., Chamberlain, S.J., Otte, A.P., and Magnuson, T. (2005). The murine polycomb group protein Eed is required for global histone H3 lysine-27 methylation. Curr. Biol. CB *15*, 942–947.

Moore, A.W., Schedl, A., McInnes, L., Doyle, M., Hecksher-Sorensen, J., and Hastie, N.D. (1998). YAC transgenic analysis reveals Wilms' tumour 1 gene activity in the proliferating coelomic epithelium, developing diaphragm and limb. Mech. Dev. *79*, 169–184.

Morin, R.D., Johnson, N.A., Severson, T.M., Mungall, A.J., An, J., Goya, R., Paul, J.E., Boyle, M., Woolcock, B.W., Kuchenbauer, F., et al. (2010). Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. Nat. Genet. *42*, 181–185.

Morohaku, K., Pelton, S.H., Daugherty, D.J., Butler, W.R., Deng, W., and Selvaraj, V. (2014). Translocator protein/peripheral benzodiazepine receptor is not required for steroid hormone biosynthesis. Endocrinology *155*, 89–97.

Morohashi, K., Honda, S., Inomata, Y., Handa, H., and Omura, T. (1992). A common trans-acting factor, Ad4-binding protein, to the promoters of steroidogenic P-450s. J. Biol. Chem. *267*, 17913–17919.

Morohashi, K., Zanger, U.M., Honda, S., Hara, M., Waterman, M.R., and Omura, T. (1993). Activation of CYP11A and CYP11B gene promoters by the steroidogenic cell-specific transcription factor, Ad4BP. Mol. Endocrinol. Baltim. Md *7*, 1196–1204.

Müller, J., and Kassis, J.A. (2006). Polycomb response elements and targeting of Polycomb group proteins in Drosophila. Curr. Opin. Genet. Dev. *16*, 476–484.

Müller, J., Hart, C.M., Francis, N.J., Vargas, M.L., Sengupta, A., Wild, B., Miller, E.L., O'Connor, M.B., Kingston, R.E., and Simon, J.A. (2002). Histone methyltransferase activity of a Drosophila Polycomb group repressor complex. Cell *111*, 197–208.

Musselman, C.A., Avvakumov, N., Watanabe, R., Abraham, C.G., Lalonde, M.-E., Hong, Z., Allen, C., Roy, S., Nuñez, J.K., Nickoloff, J., et al. (2012). Molecular basis for H3K36me3 recognition by the Tudor domain of PHF1. Nat. Struct. Mol. Biol. *19*, 1266–1272.

Muzumdar, M.D., Tasic, B., Miyamichi, K., Li, L., and Luo, L. (2007). A global double-fluorescent Cre reporter mouse. Genes. N. Y. N 2000 *45*, 593–605.

Nan, X., Potma, E.O., and Xie, X.S. (2006). Nonperturbative chemical imaging of organelle transport in living cells with coherent anti-stokes Raman scattering microscopy. Biophys. J. *91*, 728–735.

Nekrasov, M., Wild, B., and Müller, J. (2005). Nucleosome binding and histone methyltransferase activity of Drosophila PRC2. EMBO Rep. *6*, 348–353.

Nekrasov, M., Klymenko, T., Fraterman, S., Papp, B., Oktaba, K., Köcher, T., Cohen, A., Stunnenberg, H.G., Wilm, M., and Müller, J. (2007). Pcl-PRC2 is needed to generate high levels of H3-K27 trimethylation at Polycomb target genes. EMBO J. *26*, 4078–4088.

Ng, S.S., Yue, W.W., Oppermann, U., and Klose, R.J. (2009). Dynamic protein methylation in chromatin biology. Cell. Mol. Life Sci. CMLS *66*, 407–422.

Niehrs, C. (2012). The complex world of WNT receptor signalling. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *13*, 767–779.

Nikoleishvili, D., Koberidze, G., Kutateladze, M., Zumbadze, G., and Mariamidze, A. (2018). BILATERAL ADRENOCORTICAL CARCINOMA: CASE REPORT AND REVIEW OF LITERATURE. Georgian Med. News 19–24.

Nikoloski, G., Langemeijer, S.M.C., Kuiper, R.P., Knops, R., Massop, M., Tönnissen, E.R.L.T.M., Heijden, A. van der, Scheele, T.N., Vandenberghe, P., Witte, T. de, et al. (2010). Somatic mutations of the histone methyltransferase gene *EZH2* in myelodysplastic syndromes. Nat. Genet. *42*, 665–667.

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.

Nussdorfer, G.G. (1996). Paracrine control of adrenal cortical function by medullary chromaffin cells. Pharmacol. Rev. *48*, 495–530.

Olins, A.L., and Olins, D.E. (1974). Spheroid chromatin units (v bodies). Science *183*, 330–332.

O'Loghlen, A., Muñoz-Cabello, A.M., Gaspar-Maia, A., Wu, H.-A., Banito, A., Kunowska, N., Racek, T., Pemberton, H.N., Beolchi, P., Lavial, F., et al. (2012). MicroRNA regulation of Cbx7 mediates a switch of Polycomb orthologs during ESC differentiation. Cell Stem Cell *10*, 33–46.

Özata, D.M., Caramuta, S., Velázquez-Fernández, D., Akçakaya, P., Xie, H., Höög, A., Zedenius, J., Bäckdahl, M., Larsson, C., and Lui, W.-O. (2011). The role of microRNA deregulation in the pathogenesis of adrenocortical carcinoma. Endocr. Relat. Cancer *18*, 643–655.

Özeş, A.R., Pulliam, N., Ertosun, M.G., Yılmaz, Ö., Tang, J., Çopuroğlu, E., Matei, D., Özeş, O.N., and Nephew, K.P. (2018). Protein kinase A-mediated phosphorylation regulates STAT3 activation and oncogenic EZH2 activity. Oncogene *37*, 3589–3600.

Paatela, H., Wang, F., Vihma, V., Savolainen-Peltonen, H., Mikkola, T.S., Turpeinen, U., Hämäläinen, E., Jauhiainen, M., and Tikkanen, M.J. (2016).

Steroid sulfatase activity in subcutaneous and visceral adipose tissue: a comparison between pre- and postmenopausal women. Eur. J. Endocrinol. *174*, 167–175.

Pasini, D., Bracken, A.P., Jensen, M.R., Denchi, E.L., and Helin, K. (2004). Suz12 is essential for mouse development and for EZH2 histone methyltransferase activity. EMBO J. *23*, 4061–4071.

Pasini, D., Hansen, K.H., Christensen, J., Agger, K., Cloos, P.A.C., and Helin, K. (2008). Coordinated regulation of transcriptional repression by the RBP2 H3K4 demethylase and Polycomb-Repressive Complex 2. Genes Dev. *22*, 1345–1355.

Pasini, D., Cloos, P.A.C., Walfridsson, J., Olsson, L., Bukowski, J.-P., Johansen, J.V., Bak, M., Tommerup, N., Rappsilber, J., and Helin, K. (2010). JARID2 regulates binding of the Polycomb repressive complex 2 to target genes in ES cells. Nature *464*, 306–310.

Pasmant, E., Sabbagh, A., Masliah-Planchon, J., Ortonne, N., Laurendeau, I., Melin, L., Ferkal, S., Hernandez, L., Leroy, K., Valeyrie-Allanore, L., et al. (2011). Role of noncoding RNA ANRIL in genesis of plexiform neurofibromas in neurofibromatosis type 1. J. Natl. Cancer Inst. *103*, 1713–1722.

Patel, D., Boufraqech, M., Jain, M., Zhang, L., He, M., Gesuwan, K., Gulati, N., Nilubol, N., Fojo, T., and Kebebew, E. (2013). MiR-34a and miR-483-5p are candidate serum biomarkers for adrenocortical tumors. Surgery *154*, 1224–1228; discussion 1229.

Patterson, E.E., Holloway, A.K., Weng, J., Fojo, T., and Kebebew, E. (2011). MicroRNA profiling of adrenocortical tumors reveals miR-483 as a marker of malignancy. Cancer *117*, 1630–1639.

Pei, L. (2001). Identification of c-myc as a down-stream target for pituitary tumor-transforming gene. J. Biol. Chem. *276*, 8484–8491.

Pelletier, G. (2008). Expression of steroidogenic enzymes and sex-steroid receptors in human prostate. Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. *22*, 223–228.

Pemberton, H., Anderton, E., Patel, H., Brookes, S., Chandler, H., Palermo, R., Stock, J., Rodriguez-Niedenführ, M., Racek, T., de Breed, L., et al. (2014). Genome-wide co-localization of Polycomb orthologs and their effects on gene expression in human fibroblasts. Genome Biol. *15*, R23.

Peng, J.C., Valouev, A., Swigut, T., Zhang, J., Zhao, Y., Sidow, A., and Wysocka, J. (2009). Jarid2/Jumonji coordinates control of PRC2 enzymatic activity and target gene occupancy in pluripotent cells. Cell *139*, 1290–1302.

Perbal, B. (2004). CCN proteins: multifunctional signalling regulators. Lancet Lond. Engl. *363*, 62–64.

Perbal, B., Zuntini, M., Zambelli, D., Serra, M., Sciandra, M., Cantiani, L., Lucarelli, E., Picci, P., and Scotlandi, K. (2008). Prognostic value of CCN3 in osteosarcoma. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *14*, 701–709.

Pereira, J.D., Sansom, S.N., Smith, J., Dobenecker, M.-W., Tarakhovsky, A., and Livesey, F.J. (2010). Ezh2, the histone methyltransferase of PRC2, regulates the balance between self-renewal and differentiation in the cerebral cortex. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 15957–15962.

Pereira, S.S., Morais, T., Costa, M.M., Monteiro, M.P., and Pignatelli, D. (2013). The emerging role of the molecular marker p27 in the differential diagnosis of adrenocortical tumors. Endocr. Connect. *2*, 137–145.

Pianovski, M.A.D., Maluf, E.M.C.P., de Carvalho, D.S., Ribeiro, R.C., Rodriguez-Galindo, C., Boffetta, P., Zancanella, P., and Figueiredo, B.C. (2006). Mortality rate of adrenocortical tumors in children under 15 years of age in Curitiba, Brazil. Pediatr. Blood Cancer *47*, 56–60.

Pignatelli, D., Ferreira, J., Vendeira, P., Magalhães, M.C., and Vinson, G.P. (2002). Proliferation of capsular stem cells induced by ACTH in the rat adrenal cortex. Endocr. Res. *28*, 683–691.

Pinto, E.M., Chen, X., Easton, J., Finkelstein, D., Liu, Z., Pounds, S., Rodriguez-Galindo, C., Lund, T.C., Mardis, E.R., Wilson, R.K., et al. (2015a). Genomic landscape of pediatric adrenocortical tumors. Nat. Commun. *6*, 6302.

Poli, G., Guasti, D., Rapizzi, E., Fucci, R., Canu, L., Bandini, A., Cini, N., Bani, D., Mannelli, M., and Luconi, M. (2013). Morphofunctional effects of mitotane on mitochondria in human adrenocortical cancer cells. Endocr. Relat. Cancer *20*, 537–550.

Portoso, M., Ragazzini, R., Brenčič, Ž., Moiani, A., Michaud, A., Vassilev, I., Wassef, M., Servant, N., Sargueil, B., and Margueron, R. (2017). PRC2 is dispensable for HOTAIR-mediated transcriptional repression. EMBO J. *36*, 981–994.

Prinz, W.A. (2010). Lipid trafficking sans Vesicles: where, why, how? Cell *143*, 870–874.

Qi, W., Chan, H., Teng, L., Li, L., Chuai, S., Zhang, R., Zeng, J., Li, M., Fan, H., Lin, Y., et al. (2012). Selective inhibition of Ezh2 by a small molecule inhibitor blocks tumor cells proliferation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *109*, 21360–21365.

Qi, W., Zhao, K., Gu, J., Huang, Y., Wang, Y., Zhang, H., Zhang, M., Zhang, J., Yu, Z., Li, L., et al. (2017). An allosteric PRC2 inhibitor targeting the H3K27me3 binding pocket of EED. Nat. Chem. Biol. *13*, 381–388.

Qiu, W., Yang, Z., Fan, Y., and Zheng, Q. (2016). ZNRF3 is downregulated in papillary thyroid carcinoma and suppresses the proliferation and invasion of

papillary thyroid cancer cells. Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med. *37*, 12665–12672.

Qu, Y., Lu, D., Jiang, H., Chi, X., and Zhang, H. (2016). EZH2 is required for mouse oocyte meiotic maturation by interacting with and stabilizing spindle assembly checkpoint protein BubRI. Nucleic Acids Res. *44*, 7659–7672.

Raaphorst, F.M., van Kemenade, F.J., Blokzijl, T., Fieret, E., Hamer, K.M., Satijn, D.P., Otte, A.P., and Meijer, C.J. (2000). Coexpression of BMI-1 and EZH2 polycomb group genes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. Am. J. Pathol. *157*, 709–715.

Raedt, T.D., Beert, E., Pasmant, E., Luscan, A., Brems, H., Ortonne, N., Helin, K., Hornick, J.L., Mautner, V., Kehrer-Sawatzki, H., et al. (2014). PRC2 loss amplifies Ras-driven transcription and confers sensitivity to BRD4-based therapies. Nature *514*, 247–251.

Ragazzon, B., Lefrançois-Martinez, A.-M., Val, P., Sahut-Barnola, I., Tournaire, C., Chambon, C., Gachancard-Bouya, J.-L., Begue, R.-J., Veyssière, G., and Martinez, A. (2006). Adrenocorticotropin-dependent changes in SF-1/DAX-1 ratio influence steroidogenic genes

expression in a novel model of glucocorticoid-producing adrenocortical cell lines derived from targeted tumorigenesis. Endocrinology *147*, 1805–1818.

Ragazzon, B., Libé, R., Gaujoux, S., Assié, G., Fratticci, A., Launay, P., Clauser, E., Bertagna, X., Tissier, F., de Reyniès, A., et al. (2010). Transcriptome analysis reveals that p53 and {beta}-catenin alterations occur in a group of aggressive adrenocortical cancers. Cancer Res. *70*, 8276–8281.

Ragazzon, B., Assié, G., and Bertherat, J. (2011). Transcriptome analysis of adrenocortical cancers: from molecular classification to the identification of new treatments. Endocr. Relat. Cancer *18*, R15-27.

Ragazzon, B., Libé, R., Assié, G., Tissier, F., Barreau, O., Houdayer, C., Perlemoine, K., Audebourg, A., Clauser, E., René-Corail, F., et al. (2014). Mass-array screening of frequent mutations in cancers reveals RB1 alterations in aggressive adrenocortical carcinomas. Eur. J. Endocrinol. *170*, 385–391.

Rainey, W.E., and Nakamura, Y. (2008). Regulation of the Adrenal Androgen Biosynthesis. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. *108*, 281–286.

Rainey, W.E., Shay, J.W., and Mason, J.I. (1986). ACTH induction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, cholesterol biosynthesis, and steroidogenesis in primary cultures of bovine adrenocortical cells. J. Biol. Chem. *261*, 7322–7326.

Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D., et al. (2000). Regulation of

chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. Nature *406*, 593–599.

Reines, D., Conaway, J.W., and Conaway, R.C. (1996). The RNA polymerase II general elongation factors. Trends Biochem. Sci. *21*, 351–355.

de Reyniès, A., Assié, G., Rickman, D.S., Tissier, F., Groussin, L., René-Corail, F., Dousset, B., Bertagna, X., Clauser, E., and Bertherat, J. (2009). Gene expression profiling reveals a new classification of adrenocortical tumors and identifies molecular predictors of malignancy and survival. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. *27*, 1108–1115.

Richards, E.J. (2006). Inherited epigenetic variation--revisiting soft inheritance. Nat. Rev. Genet. *7*, 395–401.

Richon, V.M., Johnston, D., Sneeringer, C.J., Jin, L., Majer, C.R., Elliston, K., Jerva, L.F., Scott, M.P., and Copeland, R.A. (2011). Chemogenetic analysis of human protein methyltransferases. Chem. Biol. Drug Des. *78*, 199–210.

Riley, T., Sontag, E., Chen, P., and Levine, A. (2008). Transcriptional control of human p53-regulated genes. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *9*, 402–412.

Ringrose, L., and Paro, R. (2004). Epigenetic regulation of cellular memory by the Polycomb and Trithorax group proteins. Annu. Rev. Genet. *38*, 413–443.

Rinn, J.L., Kertesz, M., Wang, J.K., Squazzo, S.L., Xu, X., Brugmann, S.A., Goodnough, L.H., Helms, J.A., Farnham, P.J., Segal, E., et al. (2007). Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. Cell *129*, 1311–1323.

Ronchi, C.L., Sbiera, S., Leich, E., Henzel, K., Rosenwald, A., Allolio, B., and Fassnacht, M. (2013). Single nucleotide polymorphism array profiling of adrenocortical tumors--evidence for an adenoma carcinoma sequence? PloS One *8*, e73959.

Rosati, R., Cerrato, F., Doghman, M., Pianovski, M.A.D., Parise, G.A., Custódio, G., Zambetti, G.P., Ribeiro, R.C., Riccio, A., Figueiredo, B.C., et al. (2008). High frequency of loss of heterozygosity at 11p15 and IGF2 overexpression are not related to clinical outcome in childhood adrenocortical tumors positive for the R337H TP53 mutation. Cancer Genet. Cytogenet. *186*, 19–24.

Rosenfield, R.L. (2005). Hirsutism and the variable response of the pilosebaceous unit to androgen. J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. *10*, 205–208.

Ross, S.E., Hemati, N., Longo, K.A., Bennett, C.N., Lucas, P.C., Erickson, R.L., and MacDougald, O.A. (2000). Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. Science *289*, 950–953.

Ruggiero, C., Doghman-Bouguerra, M., Sbiera, S., Sbiera, I., Parsons, M., Ragazzon, B., Morin, A., Robidel, E., Favier, J., Bertherat, J., et al. (2017).

Dosage-dependent regulation of VAV2 expression by steroidogenic factor-1 drives adrenocortical carcinoma cell invasion. Sci. Signal. *10*.

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.

Sahasrabuddhe, A.A., Chen, X., Chung, F., Velusamy, T., Lim, M.S., and Elenitoba-Johnson, K.S.J. (2015). Oncogenic Y641 mutations in EZH2 prevent Jak2/ß-TrCP-mediated degradation. Oncogene *34*, 445–454.

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.

Samani, A.A., Yakar, S., LeRoith, D., and Brodt, P. (2007). The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights. Endocr. Rev. *28*, 20–47.

Saramäki, O.R., Tammela, T.L.J., Martikainen, P.M., Vessella, R.L., and Visakorpi, T. (2006). The gene for polycomb group protein enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) is amplified in late-stage prostate cancer. Genes. Chromosomes Cancer *45*, 639–645.

Sato, Y., Maekawa, S., Ishii, R., Sanada, M., Morikawa, T., Shiraishi, Y., Yoshida, K., Nagata, Y., Sato-Otsubo, A., Yoshizato, T., et al. (2014). Recurrent somatic mutations underlie corticotropin-independent Cushing's syndrome. Science *344*, 917–920.

Sbiera, S., Leich, E., Liebisch, G., Sbiera, I., Schirbel, A., Wiemer, L., Matysik, S., Eckhardt, C., Gardill, F., Gehl, A., et al. (2015). Mitotane Inhibits Sterol-O-Acyl Transferase 1 Triggering Lipid-Mediated Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Adrenocortical Carcinoma Cells. Endocrinology *156*, 3895–3908.

Scheuermann, J.C., de Ayala Alonso, A.G., Oktaba, K., Ly-Hartig, N., McGinty, R.K., Fraterman, S., Wilm, M., Muir, T.W., and Müller, J. (2010). Histone H2A deubiquitinase activity of the Polycomb repressive complex PR-DUB. Nature *465*, 243–247.

Schmitges, F.W., Prusty, A.B., Faty, M., Stützer, A., Lingaraju, G.M., Aiwazian, J., Sack, R., Hess, D., Li, L., Zhou, S., et al. (2011). Histone methylation by PRC2 is inhibited by active chromatin marks. Mol. Cell *42*, 330–341.

Schmitz, K.J., Helwig, J., Bertram, S., Sheu, S.Y., Suttorp, A.C., Seggewiss, J., Willscher, E., Walz, M.K., Worm, K., and Schmid, K.W. (2011). Differential

expression of microRNA-675, microRNA-139-3p and microRNA-335 in benign and malignant adrenocortical tumours. J. Clin. Pathol. *64*, 529–535.

Schoenherr, C.J., and Anderson, D.J. (1995). The neuron-restrictive silencer factor (NRSF): a coordinate repressor of multiple neuron-specific genes. Science *267*, 1360–1363.

Schuettengruber, B., Chourrout, D., Vervoort, M., Leblanc, B., and Cavalli, G. (2007). Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. Cell *128*, 735–745.

Schwartz, Y.B., and Pirrotta, V. (2008). Polycomb complexes and epigenetic states. Curr. Opin. Cell Biol. *20*, 266–273.

Shao, Z., Raible, F., Mollaaghababa, R., Guyon, J.R., Wu, C.T., Bender, W., and Kingston, R.E. (1999). Stabilization of chromatin structure by PRC1, a Polycomb complex. Cell *98*, 37–46.

Shen, X., Liu, Y., Hsu, Y.-J., Fujiwara, Y., Kim, J., Mao, X., Yuan, G.-C., and Orkin, S.H. (2008). EZH1 mediates methylation on histone H3 lysine 27 and complements EZH2 in maintaining stem cell identity and executing pluripotency. Mol. Cell *32*, 491–502.

Sher, F., Rössler, R., Brouwer, N., Balasubramaniyan, V., Boddeke, E., and Copray, S. (2008). Differentiation of neural stem cells into oligodendrocytes: involvement of the polycomb group protein Ezh2. Stem Cells Dayt. Ohio *26*, 2875–2883.

Shi, B., Liang, J., Yang, X., Wang, Y., Zhao, Y., Wu, H., Sun, L., Zhang, Y., Chen, Y., Li, R., et al. (2007). Integration of estrogen and Wnt signaling circuits by the polycomb group protein EZH2 in breast cancer cells. Mol. Cell. Biol. *27*, 5105–5119.

Shin, Y.J., and Kim, J.-H. (2012). The role of EZH2 in the regulation of the activity of matrix metalloproteinases in prostate cancer cells. PloS One *7*, e30393.

Sicard, F., Ehrhart-Bornstein, M., Corbeil, D., Sperber, S., Krug, A.W., Ziegler, C.G., Rettori, V., McCann, S.M., and Bornstein, S.R. (2007). Age-dependent regulation of chromaffin cell proliferation by growth factors, dehydroepiandrosterone (DHEA), and DHEA sulfate. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 2007–2012.

Sierzega, M., Pach, R., Kulig, P., Legutko, J., and Kulig, J. (2017). Prognostic Implications of Expression Profiling for Gemcitabine-Related Genes (hENT1, dCK, RRM1, RRM2) in Patients With Resectable Pancreatic Adenocarcinoma Receiving Adjuvant Chemotherapy. Pancreas *46*, 684–689.

Simon, J.A., and Kingston, R.E. (2009). Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *10*, 697–708.

Simon, J.A., and Lange, C.A. (2008). Roles of the EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics. Mutat. Res. *647*, 21–29.

Simon, C., Chagraoui, J., Krosl, J., Gendron, P., Wilhelm, B., Lemieux, S., Boucher, G., Chagnon, P., Drouin, S., Lambert, R., et al. (2012). A key role for EZH2 and associated genes in mouse and human adult T-cell acute leukemia. Genes Dev. *26*, 651–656.

Sin, W.C., Bechberger, J.F., Rushlow, W.J., and Naus, C.C. (2008). Dose-dependent differential upregulation of CCN1/Cyr61 and CCN3/NOV by the gap junction protein Connexin43 in glioma cells. J. Cell. Biochem. *103*, 1772–1782.

Smith, V.E., Franklyn, J.A., and McCabe, C.J. (2010). Pituitary tumor-transforming gene and its binding factor in endocrine cancer. Expert Rev. Mol. Med. *12*, e38.

Sneeringer, C.J., Scott, M.P., Kuntz, K.W., Knutson, S.K., Pollock, R.M., Richon, V.M., and Copeland, R.A. (2010). Coordinated activities of wild-type plus mutant EZH2 drive tumor-associated hypertrimethylation of lysine 27 on histone H3 (H3K27) in human B-cell lymphomas. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 20980–20985.

Soccio, R.E., and Breslow, J.L. (2003). StAR-related lipid transfer (START) proteins: mediators of intracellular lipid metabolism. J. Biol. Chem. *278*, 22183–22186.

Soderling, S.H., and Beavo, J.A. (2000). Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions. Curr. Opin. Cell Biol. *12*, 174–179.

Son, J., Shen, S.S., Margueron, R., and Reinberg, D. (2013). Nucleosome-binding activities within JARID2 and EZH1 regulate the function of PRC2 on chromatin. Genes Dev. *27*, 2663–2677.

Song, J.-J., Garlick, J.D., and Kingston, R.E. (2008). Structural basis of histone H4 recognition by p55. Genes Dev. *22*, 1313–1318.

Song, Q., Xu, Y., Yang, C., Chen, Z., Jia, C., Chen, J., Zhang, Y., Lai, P., Fan, X., Zhou, X., et al. (2014). miR-483-5p promotes invasion and metastasis of lung adenocarcinoma by targeting RhoGDI1 and ALCAM. Cancer Res. *74*, 3031–3042.

Soon, P.S.H., Libe, R., Benn, D.E., Gill, A., Shaw, J., Sywak, M.S., Groussin, L., Bertagna, X., Gicquel, C., Bertherat, J., et al. (2008). Loss of heterozygosity of 17p13, with possible involvement of ACADVL and ALOX15B, in the pathogenesis of adrenocortical tumors. Ann. Surg. *247*, 157–164.

Soon, P.S.H., Tacon, L.J., Gill, A.J., Bambach, C.P., Sywak, M.S., Campbell, P.R., Yeh, M.W., Wong, S.G., Clifton-Bligh, R.J., Robinson, B.G., et al. (2009). miR-195

and miR-483-5p Identified as Predictors of Poor Prognosis in Adrenocortical Cancer. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *15*, 7684–7692.

Spät, A., and Hunyady, L. (2004). Control of aldosterone secretion: a model for convergence in cellular signaling pathways. Physiol. Rev. *84*, 489–539.

Srinivasan, L., Pan, X., and Atchison, M.L. (2005). Transient requirements of YY1 expression for PcG transcriptional repression and phenotypic rescue. J. Cell. Biochem. *96*, 689–699.

Steegmaier, M., Oorschot, V., Klumperman, J., and Scheller, R.H. (2000). Syntaxin 17 is abundant in steroidogenic cells and implicated in smooth endoplasmic reticulum membrane dynamics. Mol. Biol. Cell *11*, 2719–2731.

Steenblock, C., Rubin de Celis, M.F., Androutsellis-Theotokis, A., Sue, M., Delgadillo Silva, L.F., Eisenhofer, G., Andoniadou, C.L., and Bornstein, S.R. (2017). Adrenal cortical and chromaffin stem cells: Is there a common progeny related to stress adaptation? Mol. Cell. Endocrinol. *441*, 156–163.

Stocco, D.M. (2001). StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. Annu. Rev. Physiol. *63*, 193–213.

Storbeck, K.-H., Swart, A.C., Goosen, P., and Swart, P. (2013). Cytochrome b5: novel roles in steroidogenesis. Mol. Cell. Endocrinol. *371*, 87–99.

Strahl, B.D., and Allis, C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. Nature *403*, 41–45.

Stratakis, C.A. (2000). Genetics of Peutz-Jeghers syndrome, Carney complex and other familial lentiginoses. Horm. Res. *54*, 334–343.

Su, I. -hsi., Dobenecker, M.-W., Dickinson, E., Oser, M., Basavaraj, A., Marqueron, R., Viale, A., Reinberg, D., Wülfing, C., and Tarakhovsky, A. (2005). Polycomb group protein ezh2 controls actin polymerization and cell signaling. Cell *121*, 425–436.

Südhof, T.C., and Rothman, J.E. (2009). Membrane Fusion: Grappling with SNARE and SM Proteins. Science *323*, 474–477.

Sugawara, T., Kiriakidou, M., McAllister, J.M., Holt, J.A., Arakane, F., and Strauss, J.F. (1997). Regulation of expression of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene: a central role for steroidogenic factor 1. Steroids *62*, 5–9.

Sunahara, R.K., Dessauer, C.W., and Gilman, A.G. (1996). Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. *36*, 461–480.

Suzuki, S., Tatsuno, I., Oohara, E., Nakayama, A., Komai, E., Shiga, A., Kono, T., Takiguchi, T., Higuchi, S., Sakuma, I., et al. (2015). GERMLINE DELETION OF

ARMC5 IN FAMILIAL PRIMARY MACRONODULAR ADRENAL HYPERPLASIA. Endocr. Pract. Off. J. Am. Coll. Endocrinol. Am. Assoc. Clin. Endocrinol. *21*, 1152–1160.

Swarnakar, S., Temel, R.E., Connelly, M.A., Azhar, S., and Williams, D.L. (1999). Scavenger Receptor Class B, Type I, Mediates Selective Uptake of Low Density Lipoprotein Cholesteryl Ester. J. Biol. Chem. *274*, 29733–29739.

Szabó, D.R., Luconi, M., Szabó, P.M., Tóth, M., Szücs, N., Horányi, J., Nagy, Z., Mannelli, M., Patócs, A., Rácz, K., et al. (2014). Analysis of circulating microRNAs in adrenocortical tumors. Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol. *94*, 331–339.

Tan, J., Yang, X., Zhuang, L., Jiang, X., Chen, W., Lee, P.L., Karuturi, R.K.M., Tan, P.B.O., Liu, E.T., and Yu, Q. (2007). Pharmacologic disruption of Polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells. Genes Dev. *21*, 1050–1063.

Tan, J., Yan, Y., Wang, X., Jiang, Y., and Xu, H.E. (2014). EZH2: biology, disease, and structure-based drug discovery. Acta Pharmacol. Sin. *35*, 161–174.

Tanaka, H., Arakawa, H., Yamaguchi, T., Shiraishi, K., Fukuda, S., Matsui, K., Takei, Y., and Nakamura, Y. (2000). Tanaka H, Arakawa H, Yamaguchi T, Shiraishi K, Fukuda S, Matsui K, Takei Y, Nakamura YA ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. Nature 404: 42-49. Nature *404*, 42–49.

Tanaka, S., Miyagi, S., Sashida, G., Chiba, T., Yuan, J., Mochizuki-Kashio, M., Suzuki, Y., Sugano, S., Nakaseko, C., Yokote, K., et al. (2012). Ezh2 augments leukemogenicity by reinforcing differentiation blockage in acute myeloid leukemia. Blood *120*, 1107–1117.

Tang, X., Milyavsky, M., Shats, I., Erez, N., Goldfinger, N., and Rotter, V. (2004). Activated p53 suppresses the histone methyltransferase EZH2 gene. Oncogene *23*, 5759–5769.

Taskén, K., and Aandahl, E.M. (2004). Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. Physiol. Rev. *84*, 137–167.

Tee, M.K., Dong, Q., and Miller, W.L. (2008). Pathways leading to phosphorylation of p450c17 and to the posttranslational regulation of androgen biosynthesis. Endocrinology *149*, 2667–2677.

Terzolo, M., Angeli, A., Fassnacht, M., Daffara, F., Tauchmanova, L., Conton, P.A., Rossetto, R., Buci, L., Sperone, P., Grossrubatscher, E., et al. (2007). Adjuvant mitotane treatment for adrenocortical carcinoma. N. Engl. J. Med. *356*, 2372–2380.

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.

Tirosh, A., Hannah-Shmouni, F., Lyssikatos, C., Belyavskaya, E., Zilbermint, M., Abraham, S.B., Lodish, M.B., and Stratakis, C.A. (2017). Obesity and the diagnostic accuracy for primary aldosteronism. J. Clin. Hypertens. Greenwich Conn *19*, 790–797.

Tissier, F., Louvel, A., Grabar, S., Hagnéré, A.-M., Bertherat, J., Vacher-Lavenu, M.-C., Dousset, B., Chapuis, Y., Bertagna, X., and Gicquel, C. (2004). Cyclin E correlates with malignancy and adverse prognosis in adrenocortical tumors. Eur. J. Endocrinol. *150*, 809–817.

Tissier, F., Cavard, C., Groussin, L., Perlemoine, K., Fumey, G., Hagneré, A.-M., René-Corail, F., Jullian, E., Gicquel, C., Bertagna, X., et al. (2005). Mutations of beta-catenin in adrenocortical tumors: activation of the Wnt signaling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumors. Cancer Res. *65*, 7622–7627.

Tóth, I.E., Szalay, K.S., Szabó, D., and Pill, J. (1990). Effect of a cholesterol synthesis inhibitor (BM 15.766) in the presence and absence of HDL on corticosteroidogenesis of isolated zona glomerulosa and fasciculata cells. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. *37*, 687–691.

Truax, A.D., Thakkar, M., and Greer, S.F. (2012). Dysregulated recruitment of the histone methyltransferase EZH2 to the class II transactivator (CIITA) promoter IV in breast cancer cells. PloS One *7*, e36013.

Tu, L.N., Morohaku, K., Manna, P.R., Pelton, S.H., Butler, W.R., Stocco, D.M., and Selvaraj, V. (2014). Peripheral benzodiazepine receptor/translocator protein global knock-out mice are viable with no effects on steroid hormone biosynthesis. J. Biol. Chem. *289*, 27444–27454.

Tu, S., Yuan, G.-C., and Shao, Z. (2017). The PRC2-binding long non-coding RNAs in human and mouse genomes are associated with predictive sequence features. Sci. Rep. *7*, 41669.

Upadhyay, A.K., and Cheng, X. (2011). Dynamics of Histone Lysine Methylation: Structures of Methyl Writers and Eraser. Prog. Drug Res. Fortschritte Arzneimittelforschung Progres Rech. Pharm. *67*, 107–124.

Vahouny, G.V., Chanderbhan, R., Noland, B.J., Irwin, D., Dennis, P., Lambeth, J.D., and Scallen, T.J. (1983). Sterol carrier protein2. Identification of adrenal sterol carrier protein2 and site of action for mitochondrial cholesterol utilization. J. Biol. Chem. *258*, 11731–11737.

Vakoc, C.R., Sachdeva, M.M., Wang, H., and Blobel, G.A. (2006). Profile of histone lysine methylation across transcribed mammalian chromatin. Mol. Cell. Biol. *26*, 9185–9195.

Val, P., Lefrançois-Martinez, A.-M., Veyssière, G., and Martinez, A. (2003). SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues. Nucl. Recept. *1*, 8.

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.

Vandamme, J., Völkel, P., Rosnoblet, C., Le Faou, P., and Angrand, P.-O. (2011). Interaction proteomics analysis of polycomb proteins defines distinct PRC1 complexes in mammalian cells. Mol. Cell. Proteomics MCP *10*, M110.002642.

Varambally, S., Dhanasekaran, S.M., Zhou, M., Barrette, T.R., Kumar-Sinha, C., Sanda, M.G., Ghosh, D., Pienta, K.J., Sewalt, R.G.A.B., Otte, A.P., et al. (2002). The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. Nature *419*, 624–629.

Venkatesan, N., Wong, J.F., Tan, K.P., Chung, H.H., Yau, Y.H., Cukuroglu, E., Allahverdi, A., Nordenskiöld, L., Göke, J., Geifman-Shochat, S., et al. (2018). EZH2 promotes neoplastic transformation through VAV interaction-dependent extranuclear mechanisms. Oncogene *37*, 461–477.

Vezzosi, D., Cartier, D., Régnier, C., Otal, P., Bennet, A., Parmentier, F., Plantavid, M., Lacroix, A., Lefebvre, H., and Caron, P. (2007). Familial adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia with aberrant serotonin and vasopressin adrenal receptors. Eur. J. Endocrinol. *156*, 21–31.

Vezzosi, D., Bertherat, J., and Groussin, L. (2010). Pathogenesis of benign adrenocortical tumors. Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. *24*, 893–905.

Vezzosi, D., Libé, R., Baudry, C., Rizk-Rabin, M., Horvath, A., Levy, I., René-Corail, F., Ragazzon, B., Stratakis, C.A., Vandecasteele, G., et al. (2012). Phosphodiesterase 11A (PDE11A) gene defects in patients with acth-independent macronodular adrenal hyperplasia (AIMAH): functional variants may contribute to genetic susceptibility of bilateral adrenal tumors. J. Clin. Endocrinol. Metab. *97*, E2063-2069.

Vidal, V., Sacco, S., Rocha, A.S., da Silva, F., Panzolini, C., Dumontet, T., Doan, T.M.P., Shan, J., Rak-Raszewska, A., Bird, T., et al. (2016). The adrenal capsule is a signaling center controlling cell renewal and zonation through Rspo3. Genes Dev. *30*, 1389–1394.

Viré, E., Brenner, C., Deplus, R., Blanchon, L., Fraga, M., Didelot, C., Morey, L., Van Eynde, A., Bernard, D., Vanderwinden, J.-M., et al. (2006). The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. Nature *439*, 871–874.

van der Vlag, J., and Otte, A.P. (1999). Transcriptional repression mediated by the human polycomb-group protein EED involves histone deacetylation. Nat. Genet. *23*, 474–478.

Volante, M., Terzolo, M., Fassnacht, M., Rapa, I., Germano, A., Sbiera, S., Daffara, F., Sperone, P., Scagliotti, G., Allolio, B., et al. (2012). Ribonucleotide reductase large subunit (RRM1) gene expression may predict efficacy of adjuvant mitotane in adrenocortical cancer. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *18*, 3452–3461.

Waddington, C.H. (1942). Canalization of Development and the Inheritance of Acquired Characters. Nature *150*, 563–565.

Walczak, E.M., and Hammer, G.D. (2015). Regulation of the adrenocortical stem cell niche: implications for disease. Nat. Rev. Endocrinol. *11*, 14–28.

Walker, E., Chang, W.Y., Hunkapiller, J., Cagney, G., Garcha, K., Torchia, J., Krogan, N.J., Reiter, J.F., and Stanford, W.L. (2010). Polycomb-like 2 associates with PRC2 and regulates transcriptional networks during mouse embryonic stem cell self-renewal and differentiation. Cell Stem Cell *6*, 153–166.

Wang, D.H., and Du, Y. (1995). Distinct mechanisms of upregulation of type 1A angiotensin II receptor gene expression in kidney and adrenal gland. Hypertens. Dallas Tex 1979 *26*, 1134–1137.

Wang, H., Wang, L., Erdjument-Bromage, H., Vidal, M., Tempst, P., Jones, R.S., and Zhang, Y. (2004). Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. Nature *431*, 873–878.

Wang, L., Jin, Q., Lee, J.-E., Su, I. -hsi., and Ge, K. (2010). Histone H3K27 methyltransferase Ezh2 represses Wnt genes to facilitate adipogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 7317–7322.

Wang, N., Li, Y., and Zhou, J. (2018). Downregulation of ribonucleotide reductase subunits M2 induces apoptosis and G1 arrest of cervical cancer cells. Oncol. Lett. *15*, 3719–3725.

Wang, Z., Schones, D.E., and Zhao, K. (2009). Characterization of human epigenomes. Curr. Opin. Genet. Dev. *19*, 127–134.

Wassef, M., and Margueron, R. (2016). The Multiple Facets of PRC2 Alterations in Cancers. J. Mol. Biol.

Wassef, M., Rodilla, V., Teissandier, A., Zeitouni, B., Gruel, N., Sadacca, B., Irondelle, M., Charruel, M., Ducos, B., Michaud, A., et al. (2015). Impaired PRC2 activity promotes transcriptional instability and favors breast tumorigenesis. Genes Dev. *29*, 2547–2562.

Wasserman, J.D., Novokmet, A., Eichler-Jonsson, C., Ribeiro, R.C., Rodriguez-Galindo, C., Zambetti, G.P., and Malkin, D. (2015). Prevalence and functional

consequence of TP53 mutations in pediatric adrenocortical carcinoma: a children's oncology group study. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. *33*, 602–609.

Watari, H., Arakane, F., Moog-Lutz, C., Kallen, C.B., Tomasetto, C., Gerton, G.L., Rio, M.C., Baker, M.E., and Strauss, J.F. (1997). MLN64 contains a domain with homology to the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) that stimulates steroidogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *94*, 8462–8467.

Weber, M.M., Fottner, C., Schmidt, P., Brodowski, K.M., Gittner, K., Lahm, H., Engelhardt, D., and Wolf, E. (1999). Postnatal overexpression of insulin-like growth factor II in transgenic mice is associated with adrenocortical hyperplasia and enhanced steroidogenesis. Endocrinology *140*, 1537–1543.

Weigand, I., Ronchi, C.L., Rizk-Rabin, M., Dalmazi, G.D., Wild, V., Bathon, K., Rubin, B., Calebiro, D., Beuschlein, F., Bertherat, J., et al. (2017). Differential expression of the protein kinase A subunits in normal adrenal glands and adrenocortical adenomas. Sci. Rep. *7*, 49.

Wiencke, J.K., Zheng, S., Morrison, Z., and Yeh, R.-F. (2008). Differentially expressed genes are marked by histone 3 lysine 9 trimethylation in human cancer cells. Oncogene *27*, 2412–2421.

Wilkin, F., Gagné, N., Paquette, J., Oligny, L.L., and Deal, C. (2000). Pediatric adrenocortical tumors: molecular events leading to insulin-like growth factor II gene overexpression. J. Clin. Endocrinol. Metab. *85*, 2048–2056.

Wong, W., and Scott, J.D. (2004). AKAP signalling complexes: focal points in space and time. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *5*, 959–970.

Wong, D.L., Lesage, A., Siddall, B., and Funder, J.W. (1992). Glucocorticoid regulation of phenylethanolamine N-methyltransferase in vivo. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *6*, 3310–3315.

Woo, C.J., Kharchenko, P.V., Daheron, L., Park, P.J., and Kingston, R.E. (2010). A region of the human HOXD cluster that confers polycomb-group responsiveness. Cell *140*, 99–110.

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.

Wu, S.C., and Zhang, Y. (2011). Cyclin-dependent kinase 1 (CDK1)-mediated phosphorylation of enhancer of zeste 2 (Ezh2) regulates its stability. J. Biol. Chem. *286*, 28511–28519.

Wu, H., Zeng, H., Dong, A., Li, F., He, H., Senisterra, G., Seitova, A., Duan, S., Brown, P.J., Vedadi, M., et al. (2013). Structure of the catalytic domain of EZH2

reveals conformational plasticity in cofactor and substrate binding sites and explains oncogenic mutations. PloS One *8*, e83737.

Wu, L., Runkle, C., Jin, H.-J., Yu, J., Li, J., Yang, X., Kuzel, T., Lee, C., and Yu, J. (2014). CCN3/NOV gene expression in human prostate cancer is directly suppressed by the androgen receptor. Oncogene *33*, 504–513.

Xi, H., Yu, Y., Fu, Y., Foley, J., Halees, A., and Weng, Z. (2007). Analysis of overrepresented motifs in human core promoters reveals dual regulatory roles of YY1. Genome Res. *17*, 798–806.

Xiao, B., Wilson, J.R., and Gamblin, S.J. (2003). SET domains and histone methylation. Curr. Opin. Struct. Biol. *13*, 699–705.

Xu, H., Xu, K., He, H.H., Zang, C., Chen, C.-H., Chen, Y., Qin, Q., Wang, S., Wang, C., Hu, S., et al. (2016). Integrative Analysis Reveals the Transcriptional Collaboration between EZH2 and E2F1 in the Regulation of Cancer-Related Gene Expression. Mol. Cancer Res. MCR *14*, 163–172.

Xu, K., Wu, Z.J., Groner, A.C., He, H.H., Cai, C., Lis, R.T., Wu, X., Stack, E.C., Loda, M., Liu, T., et al. (2012). EZH2 oncogenic activity in castration-resistant prostate cancer cells is Polycomb-independent. Science *338*, 1465–1469.

Yamagishi, M., and Uchimaru, K. (2017). Targeting EZH2 in cancer therapy. Curr. Opin. Oncol. *29*, 375–381.

Yamamoto, K., Sonoda, M., Inokuchi, J., Shirasawa, S., and Sasazuki, T. (2004). Polycomb group suppressor of zeste 12 links heterochromatin protein 1alpha and enhancer of zeste 2. J. Biol. Chem. *279*, 401–406.

Yan, J., Li, B., Lin, B., Lee, P.T., Chung, T.-H., Tan, J., Bi, C., Lee, X.T., Selvarajan, V., Ng, S.-B., et al. (2016). EZH2 phosphorylation by JAK3 mediates a switch to noncanonical function in natural killer/T-cell lymphoma. Blood *128*, 948–958.

Yap, D.B., Chu, J., Berg, T., Schapira, M., Cheng, S.-W.G., Moradian, A., Morin, R.D., Mungall, A.J., Meissner, B., Boyle, M., et al. (2011). Somatic mutations at EZH2 Y641 act dominantly through a mechanism of selectively altered PRC2 catalytic activity, to increase H3K27 trimethylation. Blood *117*, 2451–2459.

Yoshimura, H., Matsuda, Y., Yamamoto, M., Kamiya, S., and Ishiwata, T. (2018). Expression and role of long non-coding RNA H19 in carcinogenesis. Front. Biosci. Landmark Ed. *23*, 614–625.

Yu, H., Ma, M., Yan, J., Xu, L., Yu, J., Dai, J., Xu, T., Tang, H., Wu, X., Li, S., et al. (2017). Identification of coexistence of BRAF V600E mutation and EZH2 gain specifically in melanoma as a promising target for combination therapy. J. Transl. Med. *15*, 243.

Yu, L., Zhang, J., Guo, X., Chen, X., He, Z., and He, Q. (2018). ARMC5 mutations in familial and sporadic primary bilateral macronodular adrenal hyperplasia. PloS One *13*, e0191602.

Zee, B.M., Levin, R.S., Xu, B., LeRoy, G., Wingreen, N.S., and Garcia, B.A. (2010). In vivo residue-specific histone methylation dynamics. J. Biol. Chem. *285*, 3341–3350.

Zemke, M., Draganova, K., Klug, A., Schöler, A., Zurkirchen, L., Gay, M.H.-P., Cheng, P., Koseki, H., Valenta, T., Schübeler, D., et al. (2015). Loss of Ezh2 promotes a midbrain-to-forebrain identity switch by direct gene derepression and Wnt-dependent regulation. BMC Biol. *13*, 103.

Zhang, Y., and Reinberg, D. (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. Genes Dev. *15*, 2343–2360.

Zhang, H., Liu, X., Warden, C.D., Huang, Y., Loera, S., Xue, L., Zhang, S., Chu, P., Zheng, S., and Yen, Y. (2014). Prognostic and therapeutic significance of ribonucleotide reductase small subunit M2 in estrogen-negative breast cancers. BMC Cancer *14*, 664.

Zhang, T., Zhao, C., Luo, L., Xiang, J., Sun, Q., Cheng, J., and Chen, D. (2013). The clinical and prognostic significance of CCN3 expression in patients with cervical cancer. Adv. Clin. Exp. Med. Off. Organ Wroclaw Med. Univ. *22*, 839–845.

Zhao, J., Sun, B.K., Erwin, J.A., Song, J.-J., and Lee, J.T. (2008). Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X-chromosome. Science *322*, 750–756.

Zheng, S., Cherniack, A.D., Dewal, N., Moffitt, R.A., Danilova, L., Murray, B.A., Lerario, A.M., Else, T., Knijnenburg, T.A., Ciriello, G., et al. (2016). Comprehensive Pan-Genomic Characterization of Adrenocortical Carcinoma. Cancer Cell *29*, 723–736.

Zheng, S., Wang, X., Weng, Y.-H., Jin, X., Ji, J.-L., Guo, L., Hu, B., Liu, N., Cheng, Q., Zhang, J., et al. (2018). siRNA Knockdown of RRM2 Effectively Suppressed Pancreatic Tumor Growth Alone or Synergistically with Doxorubicin. Mol. Ther. Nucleic Acids *12*, 805–816.

Zhou, C., Wawrowsky, K., Bannykh, S., Gutman, S., and Melmed, S. (2009). E2F1 induces pituitary tumor transforming gene (PTTG1) expression in human pituitary tumors. Mol. Endocrinol. Baltim. Md *23*, 2000–2012.

Zhou, L., Sun, K., Zhao, Y., Zhang, S., Wang, X., Li, Y., Lu, L., Chen, X., Chen, F., Bao, X., et al. (2015). Linc-YY1 promotes myogenic differentiation and muscle regeneration through an interaction with the transcription factor YY1. Nat. Commun. *6*, 10026.

Zhu, X., and Birnbaumer, L. (1996). G protein subunits and the stimulation of phospholipase C by Gs-and Gi-coupled receptors: Lack of receptor selectivity of Galpha(16) and evidence for a synergic interaction between Gbeta gamma and the alpha subunit of a receptor activated G protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *93*, 2827–2831.

Ziegler, C.G., Sicard, F., Lattke, P., Bornstein, S.R., Ehrhart-Bornstein, M., and Krug, A.W. (2008). Dehydroepiandrosterone induces a neuroendocrine phenotype in nerve growth factor-stimulated chromaffin pheochromocytoma PC12 cells. Endocrinology *149*, 320–328.

Zipser, R.D., Speckart, P.F., Zia, P.K., Edmiston, W.A., Lau, F.Y., and Horton, R. (1976). The effect of ACTH and cortisol on aldosterone and cortisol clearance and distribution in plasma and whole blood. J. Clin. Endocrinol. Metab. *43*, 1101–1109.

Zsippai, A., Szabó, D.R., Tömböl, Z., Szabó, P.M., Eder, K., Pállinger, E., Gaillard, R.C., Patócs, A., Tóth, S., Falus, A., et al. (2012). Effects of mitotane on gene expression in the adrenocortical cell line NCI-H295R: a microarray study. Pharmacogenomics *13*, 1351–1361.