



**HAL**  
open science

# Impact de l'activation de la voie de signalisation Wnt/Beta-Caténine sur l'expression des microARN dans le carcinome corticosurrénalien

Justine Cristante

## ► To cite this version:

Justine Cristante. Impact de l'activation de la voie de signalisation Wnt/Beta-Caténine sur l'expression des microARN dans le carcinome corticosurrénalien. Biologie cellulaire. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2022. Français. NNT : 2022GRALV064 . tel-04280398

**HAL Id: tel-04280398**

**<https://theses.hal.science/tel-04280398v1>**

Submitted on 11 Nov 2023

**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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES**

École doctorale : CSV- Chimie et Sciences du Vivant

Spécialité : Biologie cellulaire

Unité de recherche : Biologie et Biotechnologie pour la Santé

**Impact de l'activation de la voie de signalisation Wnt/Beta-Caténine sur l'expression des microARN dans le carcinome corticosurrénalien**

**Impact of activation of the Wnt/Beta-Catenin signaling pathway on the expression of microRNAs in adrenocortical carcinoma**

Présentée par :

**Justine CRISTANTE**

Direction de thèse :

**Nadia CHERRADI**  
INSERM

Directrice de thèse

Rapporteurs :

**Christophe GROSSET**

DIRECTEUR DE RECHERCHE, INSERM DELEGATION NOUVELLE-AQUITAINE

**Pierre VAL**

DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS DELEGATION RHONE AUVERGNE

Thèse soutenue publiquement le **10 novembre 2022**, devant le jury composé de :

**Nadia CHERRADI**

DIRECTEUR DE RECHERCHE, INSERM DELEGATION AUVERGNE-  
RHONE-ALPES

Directrice de thèse

**Christophe GROSSET**

DIRECTEUR DE RECHERCHE, INSERM DELEGATION NOUVELLE-  
AQUITAINE

Rapporteur

**Pierre VAL**

DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS DELEGATION RHONE  
AUVERGNE

Rapporteur

**Claire VOURC'H**

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, UNIVERSITE GRENOBLE  
ALPES

Présidente

**Jérôme BERTHERAT**

PROFESSEUR DES UNIVERSITES - PRATICIEN HOSPITALIER,  
UNIVERSITE DE PARIS-CITE

Examineur

Invités :

**Olivier CHABRE**

PROFESSEUR DES UNIVERSITES - PRATICIEN HOSPITALIER, Université Grenoble Alpes





## Résumé

Le carcinome corticosurrénalien (CCS) est un cancer rare, agressif et de mauvais pronostic. Les options thérapeutiques sont limitées et les chimiothérapies, thérapies ciblées et immunothérapies n'améliorent pas la survie globale des patients. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires qui sous-tendent la physiopathologie du CCS est donc indispensable, afin de développer de nouvelles thérapies plus efficaces. Deux grandes études de génomique intégrées des CCS ont montré qu'il existait une activation aberrante de la voie Wnt/ $\beta$ -Caténine dans environ 40% des CCS, en lien avec des mutations somatiques et des délétions homozygotes de deux gènes clés : CTNNB1 ( $\beta$ -Caténine) et ZNRF3. Par ailleurs, elles ont permis l'identification de signature de microARN spécifiques aux CCS de bon et de mauvais pronostics. Les microARN (miRs) sont de petits ARN non codants, d'environ 20 nucléotides, dont le rôle majeur est la régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique. Notre équipe a identifié deux miRs surexprimés dans les CCS agressifs et associés au mauvais pronostic : miR-139-5p et miR-483-5p.

L'objectif de ma thèse était de déterminer l'impact de l'activation aberrante de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -Caténine sur l'expression des miRs dans le CCS, en particulier sur miR-139-5p et miR-483-5p.

La lignée cellulaire de CCS H295R présente une activation constitutive de la voie Wnt/ $\beta$ -Caténine en lien avec une mutation activatrice de la  $\beta$ -Caténine. Nous avons montré que l'extinction de l'expression de la  $\beta$ -Caténine dans cette lignée modulait l'expression de 54 miRs, en diminuant l'expression de 42 d'entre eux (77.8%). Parmi les miRs dont l'expression était impactée par la diminution de la  $\beta$ -Caténine, on retrouvait notamment miR-139-5p mais pas miR-483-5p, ainsi que plusieurs miRs du locus chromosomique 14q32, locus connu pour être impliqué dans la carcinogenèse dans d'autres cancers. Nous avons ensuite montré que la diminution de miR-139-5p était corrélée à celle de son gène hôte, PDE2A, récemment identifié comme une cible de la  $\beta$ -Caténine. Par ailleurs, la diminution de miR-139-5p induit l'augmentation de la protéine NDRG4, un des gènes cibles de miR-139-5p identifié par notre équipe.

Nous avons ensuite analysé les données publiques de transcriptome et de miRnome des cohortes de patients COMETE-ENSAT et TCGA. Nous avons montré que les patients présentant une mutation somatique ou une altération moléculaire de CTNNB1 ou ZNRF3 avaient un niveau de miR-139-5p et de PDE2A significativement plus élevé et un niveau d'expression de NDRG4 significativement plus bas que les autres patients. Nous avons également montré que le niveau d'expression de miR-139-5p est parfaitement corrélé à celui de son gène hôte PDE2A chez les patients. Toutefois, l'analyse d'un sous-groupe de patients présentant un haut niveau de miR-139-5p sans altération génomique identifiée de CTNNB1 ou ZNRF3 nous a permis de découvrir que le niveau d'expression du facteur de transcription LEF1, un partenaire de la  $\beta$ -Caténine, était associé à l'expression de miR-139-5p, indépendamment du statut mutationnel de la voie Wnt/ $\beta$ -Caténine. Par ailleurs, les patients présentant un haut niveau d'expression de LEF1 présentaient une moins bonne survie globale que ceux avec un bas niveau de LEF1. De manière intéressante, le niveau d'expression de LEF1 était un meilleur prédicteur de survie globale que la présence d'altérations moléculaires de CTNNB1 ou ZNRF3.

Ainsi, mon travail de thèse constitue la première analyse globale de la modulation du miRnome par la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -Caténine dans le CCS et d'une manière générale dans le cancer. L'expression de miR-139-5p, un miR associé au mauvais pronostic, est contrôlée par le niveau d'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -Caténine, en corrélation avec son gène hôte PDE2A. Par ailleurs, nous avons identifié LEF1 comme un nouveau marqueur pronostic de survie dans le CCS.

**Mots clés :** carcinome corticosurrénalien, voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -Caténine, microARN, pronostic, miR-139-5p

## Abstract

Adrenocortical carcinoma (ACC) is a rare and aggressive cancer with a poor prognosis. Treatment options are limited and chemotherapies, targeted therapies and immunotherapies do not improve the overall survival of patients. A better understanding of the molecular mechanisms underlying the pathophysiology of ACC is therefore essential to develop therapies that are more effective. Two large integrated genomic studies of ACC have shown that the aberrant activation of the Wnt/ $\beta$ -Catenin pathway was present in about 40% of ACC, due to somatic mutations and homozygous deletions of two key genes: CTNNB1 ( $\beta$ -Catenin) and ZNRF3. In addition, they allowed the identification of microRNA signatures specific to ACC with good or poor prognosis. MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs of about 20 nucleotides which play a major role in the post-transcriptional regulation of gene expression. Our team has identified two miRNAs overexpressed in aggressive ACC and associated with poor prognosis: miR-139-5p and miR-483-5p.

The objective of my thesis was to determine the impact of the aberrant activation of the Wnt/ $\beta$ -Catenin signaling pathway on miRNA expression, in particular on miR-139-5p and miR-483-5p.

The ACC H295R cell line exhibits a constitutive activation of the Wnt/ $\beta$ -Catenin pathway due to an activating mutation of  $\beta$ -Catenin. We showed that silencing  $\beta$ -Catenin expression in H295R cells changes the expression of 54 miRNAs, by decreasing the expression of 42 of them (77.8%). Among the miRNAs whose expression was impacted by the repression of  $\beta$ -Catenin, we identified miR-139-5p, as well as several miRNAs from the chromosomal imprinted locus 14q32 which is known to be involved in carcinogenesis in other cancers. We subsequently showed that the decrease in miR-139-5p was correlated with that of its host gene, PDE2A, a recently identified target gene of  $\beta$ -Catenin. Furthermore, the decrease in miR-139-5p was accompanied by an increase in NDRG4, one of the target genes of miR-139-5p identified by our team.

We then analysed publicly available transcriptome and miRnome data from the COMETE-ENSAT and TCGA patient cohorts. We found that patients with somatic mutations or molecular alterations in CTNNB1 or ZNRF3 genes had significantly higher miR-139-5p and PDE2A levels and significantly lower NDRG4 expression levels as compared to the other patients. We also showed that the expression level of miR-139-5p was highly correlated with that of its host gene PDE2A in patients. However, by analysing a subgroup of patients with high miR-139-5p levels without identified genomic alterations in CTNNB1 or ZNRF3, we found that the expression level of the transcription factor LEF1, a partner of  $\beta$ -Catenin, was associated with miR-139-5p expression, independently of the mutational status of the Wnt/ $\beta$ -Catenin pathway. Furthermore, patients with high levels of LEF1 had worse overall survival than those with low levels of LEF1. Interestingly, LEF1 expression level was a better predictor of overall survival than the presence of CTNNB1 or ZNRF3 molecular alterations.

In conclusion, my thesis work represents the first global analysis of Wnt/ $\beta$ -Catenin signaling-mediated regulation of the miRnome in ACC and in cancer in general. The expression of miR-139-5p, a miRNA associated with poor prognosis in ACC, is tightly controlled by Wnt/ $\beta$ -Catenin signaling, in correlation with its host gene PDE2A. Furthermore, we identified LEF1, a major transcription factor of the pathway, as a new prognostic marker for ACC patient survival.

**Keywords:** adrenocortical carcinoma, Wnt/ $\beta$ -Catenin signaling pathway, microRNAs, prognosis, miR-139-5p





# Remerciements

Arrivée en Novembre 2019 au CEA pour 3 ans de thèse de sciences, l'heure est venue de conclure cette période de sciences fondamentales et de retourner exercer mon métier de médecin. Avoir l'occasion de réaliser une thèse de sciences à temps plein a été une véritable chance : j'ai pu découvrir pleinement la recherche, le plaisir du travail bien fait et des résultats robustes, les nouvelles perspectives, mais aussi les frustrations qui en découlent parfois. Je retourne à la médecine satisfaite de clore ce chapitre de ma vie, mais espère avoir l'occasion de poursuivre, au moins en partie, les travaux entrepris au sein du laboratoire.

## Aux membres du jury

Je remercie sincèrement le Dr. Christophe Grosset et le Dr. Pierre Val d'avoir accepté de lire et de critiquer mon travail et d'en être rapporteurs. Merci au Pr. Claire Voure'h d'avoir accepté de faire partie de mon jury en tant qu'examinatrice. Un grand merci au Pr. Jérôme Bertherat, qui après m'avoir accueillie 6 mois dans son service d'Endocrinologie à Paris, me fait l'honneur de juger mon travail scientifique.

Un grand merci également au Pr. Olivier Chabre, invité du jury, pour son soutien sans faille depuis le début de mon internat, ses conseils avisés et sa confiance. J'espère être à la hauteur de vos attentes en tant que future cheffe de clinique du service puis en tant que future hospitalo-universitaire d'Endocrinologie.

Enfin, un immense merci au Dr. Nadia Cherradi, pour son encadrement tout au long de ces 3 ans de thèse. Merci pour ta confiance et ta disponibilité. Ces 3 ans ont été émaillés de rebondissements qui ont rendu la thèse pas toujours facile, entre Covid et péripéties administratives au sein du laboratoire. J'ai pleinement conscience que gérer à la fois 2 doctorantes et être présente pour le reste de l'équipe, et du laboratoire dans son ensemble, dans les moments de crise a dû te demander une énergie folle. Je te remercie d'avoir toujours été présente dans l'encadrement dans ces moments de rush. Merci d'avoir partagé tes connaissances et de m'avoir patiemment expliqué certaines notions « de base », qui pouvaient sembler évidentes mais que je n'avais pas du fait de mon cursus. Merci également d'avoir su t'adapter lorsque je t'ai annoncé ma grossesse. Certains moments de la thèse n'ont pas été faciles, la fin a été un peu bousculée par le calendrier, mais j'espère que tu es fière du résultat ! J'espère pouvoir continuer à collaborer au sein de l'équipe et te souhaite beaucoup de bonheur dans la suite de ta vie professionnelle et personnelle.

Bien que ne faisant pas partie du jury, je tiens à remercier les membres de mon CSI : les Drs. Antoine Martinez et Bruno Ragazzon, ainsi que le Pr Guillaume Assié, qui ont pu voir la progression de mon travail, le juger et le critiquer de manière très constructive. Vos questions m'ont permis d'avancer dans la bonne direction et je vous remercie pour votre soutien et votre bienveillance.

## Aux membres du laboratoire

Un grand merci à Jean-Jacques Feige, Sabine Bailly et Catherine Picard de m'avoir accueillie au sein de BCI / BioSanté.



### *Aux membres de new-IMAC*

Un grand merci à Josiane Denis, qui m'a formée dès mon arrivée et m'a appris patiemment l'ensemble des techniques sur lesquelles je parlais de zéro. Merci pour tes conseils, pour nos discussions. Merci pour ta douceur et pour ton investissement dans le laboratoire.

Merci également à Laurent Guyon, pour m'avoir formée à l'analyse RNA Seq, pour m'avoir aidée lorsque je n'arrivais pas à démêler les nœuds des jeux de données avec lesquels j'ai travaillé. Merci également pour ton aide dans l'interprétation des données et pour tes directives. Merci pour ton soutien et nos discussions, ton aide dans les moments pas faciles de ma vie personnelle. Je te souhaite le meilleur pour la suite.

Merci au reste de l'équipe IMAC : Odile Filhol-Cochet et Claude Cochet pour vos suggestions lors des réunions IMAC. Votre investissement dans votre travail est remarquable et je suis très contente d'avoir pu *a minima* collaborer un peu avec vous. Merci à Cathy Pillet pour tes conseils avisés sur certaines techniques et pour ta gentillesse. Merci à Christophe Battail, Pauline Bazelle et Florian Jeanneret pour votre gentillesse, même si nous avons peu collaboré ensemble pendant cette thèse.

### *A l'ensemble du laboratoire*

Merci à l'ensemble du laboratoire BCI, en particulier Agnès Castan et Emmanuelle Tillet, qui m'ont donné de précieux conseils. Merci pour votre expertise et les réponses que vous m'avez apportées : merci d'avoir toujours été là pour répondre à mes questions, bien que n'étant pas de « mon équipe ».

Merci évidemment aux autres membres du laboratoire : Nadia Alfaïdy, pour ta gentillesse et tes conseils. Nicolas Lemaitre pour nos discussions et la gestion des plastiques, c'était un plaisir de manger le midi avec toi. Merci, pêle-mêle, à Fred Sergent, Aude Salomon, Nicolas Ricard, Mohammed Benharouga, Martial Delion, Christel Marquette, Claire Bouvard, Daniel Vittet, Mariela Subileau, Florence Rivera, Dzenis, Paul Machillot, Laura Clauzier, Elisa Migliorini, Violaine Simon, Isabelle Vilgrain, ...

Merci également à Christine Cogne, superwoman du laboratoire, qui a toujours tout ce dont on a besoin. Merci pour ta gentillesse et nos repas « tupperware » du midi. Merci à l'ensemble des gestionnaires, Marie-Pierre, Virginie et aujourd'hui Isabelle, sans qui rien ne serait possible.

### *Aux doctorants, post-doctorants et stagiaires*

Merci évidemment à Soha Reda El Sayed, co-thésarde de choc : tu m'auras sans cesse impressionnée par ta capacité à effectuer un grand nombre d'expériences en un temps réduit et par ta rigueur scientifique. Félicitations pour ton titre de docteur, je suis contente d'avoir pu partager ces 3 ans à tes côtés ! J'espère que tu trouveras une suite de carrière qui te convienne et te souhaite beaucoup de bonheur dans ta vie personnelle.

Merci aux autres doctorants du laboratoire, en particulier Constance Collet, collègue de bureau d'un jour, et Irinka Seraudie, pour votre soutien et nos discussions. Vous m'avez été d'une aide précieuse pendant cette thèse et contribué à en faire un beau moment. Merci à Olivia Garnier, Margaux Digonnet, Kévin Gémy, Tala Al Tabosh, Mohammad Al Tarass, Martina Rossi, Charlotte Garot, Jean Le Pennec, Valia Kodhr, Hadi Younes.

Merci à Roland Abi Nahed pour ton aide à mon arrivée au laboratoire, ta passion scientifique et tes explications toujours très précises.

Merci à Louise, Béa, Morgane, stagiaires de choc et futures doctorantes du labo ! Merci à Clément Ambre et Fabien Scholastique, les deux stagiaires médecins encadrés en dernière année, sans qui certains résultats n'auraient pas été possibles. Une petite pensée pour Lorraine, arrivée un peu plus tard et avec qui j'aurai un peu moins collaboré !

### **A ma famille et mes amis**

Papa, Maman, Ugo et Pépé, je ne vais pas faire des remerciements aussi larmoyants que dans ma thèse de médecine, mais merci pour votre soutien pendant ces 3 ans. Merci Papa et Maman de m'avoir permis de « retourner au bercail » et d'avoir juste à mettre les pieds sous la table pour me soulager de mes aller-retours à Toulouse

Merci à Lulu, Aurélie, Clara, Camille, Marine pour votre soutien dans ces 3 ans. Merci à Quentin pour sa gestion hors pair de mes gardes au SAU et pour nos discussions sur le sujet ! Merci aux François pour les sorties bar même si elles sont de moins en moins fréquentes. Merci aux anciennes co-internes d'endoc pour nos rares mais précieuses retrouvailles.

### **A mon Flo et à sa famille**

Merci mon amour pour ton soutien pendant ces 3 ans. Je sais à quel point ils auront été parfois difficiles pour toi, entre la distance et l'incompréhension parfois de mon investissement dans le projet. Je crois que nous avons surmonté avec brio cette épreuve. Merci de me donner l'occasion de mener la vie personnelle dont je rêve et de fonder une famille avec toi.

Merci à Marie et Jean-Marc de m'avoir accueillie dans leur famille au sens large et lors de mes WE toulousains. Merci pour vos conseils sur la thèse, votre gentillesse et votre soutien.



# Table des matières

<b>RESUME</b> .....	<b>3</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>4</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>7</b>
<b>TABLE DES MATIERES</b> .....	<b>11</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>17</b>
<b>LISTE DES TABLES</b> .....	<b>18</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	<b>19</b>
<b>1 - INTRODUCTION</b> .....	<b>25</b>
I) LA GLANDE SURRENALE : GENERALITES .....	27
1. <i>Structure et développement</i> .....	27
1.1 Anatomie et structure.....	27
1.2 Mécanismes moléculaires de la zonation surrénalienne.....	30
2. <i>Sécrétion hormonale</i> .....	31
2.1 Sécrétion des hormones stéroïdiennes .....	31
2.1.1 Les protéines et enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse .....	33
2.1.2 Etapes communes de la stéroïdogénèse .....	36
2.1.3 Synthèse des minéralocorticoïdes .....	37
2.1.4 Synthèse des glucocorticoïdes .....	38
2.1.5 Synthèse des androgènes surrénaliens .....	40
2.1.6 Régulation de l'expression des gènes de la stéroïdogénèse .....	41
2.2 Sécrétion des catécholamines .....	43
II) TUMEURS DE LA GLANDE SURRENALE .....	45
1. <i>Tumeurs de la médullosurrénale</i> .....	45
1.1 Phéochromocytome (PCC).....	46
1.2 Neuroblastome .....	46
2. <i>Tumeurs bénignes de la corticosurrénale : hyperplasies, pathologies nodulaires et adénomes</i> .....	47
2.1 Hyperplasies.....	47
2.2 Pathologies nodulaires .....	48
2.3 Adénomes.....	53

2.3.1	Adénomes non-fonctionnels .....	54
2.3.2	Adénomes producteurs d'aldostérone (adénomes de Conn) .....	54
2.3.3	Adénomes producteurs de cortisol (APCo) .....	56
3.	<i>Tumeur maligne : le carcinome corticosurrénalien (CCS)</i> .....	58
3.1	Epidémiologie .....	58
3.2	Syndromes de prédisposition génétique.....	59
3.2.1	Syndrome de Li-Fraumeni.....	59
3.2.2	Syndrome de Lynch.....	59
3.2.3	Néoplasie endocrinienne multiple de type 1 (NEM1).....	60
3.2.4	Autres syndromes.....	60
3.3	Evaluation du stade du CCS (« Staging »).....	61
3.4	Diagnostic .....	63
3.4.1	Présentation clinique.....	63
3.4.2	Critères radiologiques .....	64
3.4.3	Critères histologiques .....	66
3.5	Pronostic.....	71
3.5.1	Lié au stade de la tumeur .....	71
3.5.2	Lié à la qualité de l'exérèse .....	73
3.5.3	Lié au statut hormonal .....	73
3.5.4	Lié au Ki67.....	73
3.5.5	Autres marqueurs .....	74
3.5.6	Risque de récurrence.....	75
3.6	Traitement .....	75
3.6.1	Traitement chirurgical .....	75
3.6.2	Traitements médicamenteux.....	77
3.6.3	Traitements locorégionaux .....	80
3.7	Altérations génomiques et moléculaires dans le CCS .....	82
3.7.1	Altérations génomiques : mutations somatiques et pertes d'hétérozygotie .....	82
3.7.2	Transcriptome .....	86
3.7.3	MiRnome.....	88
3.7.4	Méthylome .....	89
3.7.5	Classification moléculaire intégrée : valeur pronostique .....	90
III)	LES MICROARN, ACTEURS CLES DE LA REGULATION DE L'EXPRESSION GENIQUE .....	93
1.	<i>Interférence par l'ARN</i> .....	93
2.	<i>Les microARN</i> .....	97

2.1	Nomenclature.....	97
2.2	Biogenèse des miRs : voie canonique.....	98
2.3	Régulation de l'expression des gènes par les miRs .....	101
2.3.1	Appariement du miR et de son ARNm cible au sein du complexe RISC.....	101
2.3.2	Répression traductionnelle et déstabilisation de l'ARNm (déadénylation).....	104
2.3.3	Dégradation de l'ARNm cible.....	107
2.3.4	Identification des ARNm cibles .....	107
2.4	MicroARN et cancer.....	107
2.5	MicroARN et CCS.....	109
2.5.1	miR-139-5p.....	113
2.5.2	miR-483-5p .....	114
IV)	VOIE WNT/ $\beta$ -CATENINE.....	117
1.	<i>Acteurs communs des voies Wnt canonique et non-canonique</i> .....	117
1.1	Wnt.....	117
1.2	Frizzled.....	118
1.3	Dishevelled.....	119
2.	<i>Voies Wnt non canoniques</i> .....	119
2.1	Voie Planar cell plolarity (PCP).....	119
2.2	Voie du calcium.....	120
3.	<i>Voie canonique Wnt/<math>\beta</math>-Caténine</i> .....	121
3.1	Les différents acteurs de la voie .....	121
3.1.1	LRP5/6 .....	121
3.1.2	ZNRF3/RNF43 .....	123
3.1.3	$\beta$ -Caténine .....	124
3.1.4	Complexe de dégradation de la $\beta$ -Caténine (Axine / APC / GSK3 $\beta$ / CK1 $\alpha$ ) et $\beta$ -TRCP <sup>393,394</sup> .....	126
3.1.5	Effecteurs nucléaires : TCF/LEF.....	128
3.2	Voie de signalisation.....	130
3.2.1	Etat « Off ».....	130
3.2.2	Etat « On » .....	133
3.3	Implication de la voie Wnt/ $\beta$ -Caténine dans le cancer .....	136
3.3.1	$\beta$ -Caténine .....	136
3.3.2	ZNRF3/RNF43 .....	137
3.3.3	APC .....	138
3.3.4	Autres composants.....	138
	<b>2 - PROJET DE THESE ET OBJECTIFS .....</b>	<b>143</b>

<b>3 - RESULTATS .....</b>	<b>147</b>
I) ARTICLE 1 .....	149
1. Introduction de l'article 1.....	149
2. Article 1 .....	150
3. Discussion de l'article.....	202
II) RESULTATS COMPLEMENTAIRES : GENERATION D'UNE LIGNEE DE CELLULES H295R EXPRIMANT DE FAÇON INDUCTIBLE UNE EPONGE A MiR-139-5P (MiR-SPONGE) POUR UNE UTILISATION <i>IN VIVO</i> . .....	207
<b>4 - CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>213</b>
I) IMPACT DE L'ACTIVATION DE LA VOIE WNT/ $\beta$ -CATENINE SUR L'EXPRESSION DES MiRS DANS LE CCS. 215	
II) ASPECTS PRONOSTIQUES .....	217
III) ASPECTS THERAPEUTIQUES .....	219
<b>ANNEXES .....</b>	<b>223</b>
I) ARTICLE 2 : REVUE « MICRORNA THERAPEUTICS IN CANCER: CURRENT ADVANCES AND CHALLENGES » .....	225
II) ARTICLE 3 : « EARLY POSTOPERATIVE CIRCULATING MiR-483-5P IS A PROGNOSIS MARKER FOR ADRENOCORTICAL CANCER ».....	257
III) PRODUCTION SCIENTIFIQUE.....	271
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>275</b>







## Liste des figures

Figure 1 : Situation anatomique des glandes surrénales

Figure 2 : Coupe histologique de la glande surrénale

Figure 3 : Représentation schématique de la stéroïdogénèse surrénalienne

Figure 4 : Principaux acteurs contrôlant la stéroïdogénèse

Figure 5 : Schéma de la synthèse des catécholamines

Figure 6 : Nouvelle classification des pathologies nodulaires surrénaliennes selon l'OMS 2022

Figure 7 : Classification HISTALDO des lésions bénignes produisant de l'aldostérone

Figure 8 : Survie spécifique selon la classification du stade tumoral ENSAT 2008 / AJCC 8ème édition

Figure 9 : Algorithme simplifié du traitement du CCS

Figure 10 : Principales mutations somatiques identifiées dans le CCS

Figure 11 : Courbe de survie selon le profil d'altération chromosomique

Figure 12 : Courbe de survie globale en fonction de la classification basée sur le transcriptome

Figure 13 : Caractérisation pan-génomique des CCS

Figure 14 : Biogenèse des différents systèmes d'interférence par l'ARN

Figure 15 : Du pri-miR au miR mature simple brin

Figure 16 : Localisation génomique des miRs

Figure 17 : Types d'interaction miR-ARNm

Figure 18 : Régulation de l'expression génique par le complexe RISC-miR

Figure 19 : Voies Wnt non-canoniques

Figure 20 : Schéma du corécepteur LRP5/6 et de son interaction avec Frizzled et Dishevelled

Figure 21 : Schéma du corécepteur ZNRF3/RNF43 et de son interaction avec Frizzled

Figure 22 : Structure de la  $\beta$ -Caténine et relation avec quelques partenaires principaux

Figure 23 : Schéma des protéines Axine et APC

Figure 24 : Schéma général du facteur de transcription TCF/LEF

Figure 25 : Voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -Caténine en l'absence de ligand

Figure 26 : Voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -Caténine en présence du ligand Wnt

Figure 27 : Transduction de l'éponge à miR-139-5p dans les cellules H295R

Figure 28 : Induction de l'éponge à miR-139-5p dans une population de cellules H295R polyclonale après 7 jours de traitement à la Doxycycline

Figure 29 : Induction de l'éponge à miR-139-5p dans une population de cellules H295R monoclonale après 7 jours de traitement à la Doxycycline à 2 $\mu$ g/mL

## Liste des tables

Tableau 1 : Liste des cytochromes P450 impliqués dans la stéroïdogénèse surrénalienne

Tableau 2 : Liste des HSDs impliquées dans la stéroïdogénèse surrénalienne

Tableau 3 : Principales tumeurs surrénaliennes

Tableau 4 : Altérations génétiques dans les pathologies corticosurrénaliennes macro et micronodulaires bilatérales responsables d'une sécrétion de cortisol

Tableau 5 : Principaux types d'adénomes surrénaliens

Tableau 6 : Principaux syndromes de prédisposition génétique aux CCS

Tableau 7 : Classification TNM du CCS

Tableau 8 : Correspondance entre les classifications ENSAT 2008/ AJCC 8ème édition et le stade de la maladie

Tableau 9 : Principales explorations à réaliser en cas de suspicion de CCS

Tableau 10 : Score de Weiss non modifié

Tableau 11 : Score de Lin-Weiss-Bisceglia

Tableau 12 : Scores alternatifs de diagnostic du CCS

Tableau 13 : Niveaux de risque de récurrence du CCS

Tableau 14 : Les différents acteurs du système d'interférence par l'ARN

Tableau 15 : Critères d'identification d'un nouveau miR

Tableau 16 : Principaux miRs identifiés comme étant dérégulés dans les CCS

Tableau 17 : Autres miRs identifiés comme étant dérégulés dans les CCS

## Liste des abréviations

18-FDG : 18-FluoroDeoxyGlucose  
18-FDOPA : 18-FluoroDOPAmine  
AA : Acide(s) Aminé(s)  
ACTH : Hormone AdrenoCorticoTropique ou corticotropine  
ADN : Acide DésoxyriboNucléique  
Ago2 : Argonaute 2  
AJCC : American Joint Committee on Cancer  
AKR : Aldo-Keto Reductase  
AMPc : Adenosine 3',5'MonoPhosphate Cyclique  
AngII : Angiotensine II  
APA : Adénome(s) producteur(s) d'Aldostérone  
APC : Adenomatous Polyposis Coli  
APCo : Adénome(s) Producteur(s) de Cortisol  
ARN : Acide RiboNucléique (en anglais : RNA)  
ARNnc : ARN non codant  
ARNi : interférence par l'ARN  
ARNm : ARN messenger  
ARN pol : ARN polymérase  
ATI : récepteur à l'AngioTensine de type I  
ATP1A1 : ATPase Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> Transporting Subunit Alpha 1  
ATP2B3 : ATPase Plasma Membrane Ca<sup>2+</sup> Transporting 3  
β-Cat : β-Caténine  
β-TRCP : β-Transducin Repeat Containing E3 ubiquitin Protein ligase  
*C. Elegans* : *Caenorhabditis elegans*  
Ca<sup>2+</sup> : ion Calcium  
CACNA1D : Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 D  
CACNA1H : Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 H  
CAM : Cell Adhesion Molecules  
CaMK : CalModulin dependant Kinases  
Cn : Calcineurine  
CCS : Carcinome CorticoSurrénalien  
CIMP : CpG Island Methylator Phenotype  
Cited2 : CBP/p300 Interacting Transactivator with ED-rich tail 2

CK1 : Casein Kinase 1  
CLCN2 : Chloride voltage-gated Channel 2  
CRD : Cystein-Rich Domain  
CREB : cAMP Response Element Binding protein  
CRH : Corticotropin-Releasing Hormone  
CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4  
CTNNB1 : Catenin Beta 1  
Daam1 : Disheveled-associated activator of morphogenesis 1  
DAG : Diacylglycerol  
DAX : DIX-of-AXin  
Dax-1 : Dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1  
DEP : Dishevelled, Egl-10, Pleckstrin  
DGCR8 : Protéine « DiGeorge Critical Region 8 »  
DHEA : DéhydroEpiAndrostérone  
DIX : Dishevelled and aXin  
DKK : Dickkopf-related protein  
DOC : DéOxycorticostérone  
Dvl : Dishevelled  
ESE : European Society of Endocrinologie / Société Européenne d'Endocrinologie  
EDP : Etoposide, Doxorubicine, sel de Platine  
EGR2 : Early Growth Response 2  
Emx2 : Empty spiracles2  
ENSAT : European Network for the Study of Adrenal Tumors  
EZH2 : Enhancer of Zeste Homolog 2  
FadE : Fetal zone specific Sf1 enhancer  
FDX1/ADX : Ferredoxin  
FDXR/ADXR : Ferredoxin-Reductase  
Fz : Frizzled  
Gata4 : Gata binding protein 4  
GC : Glucocorticoïde  
Gli1 : GLI-Kruppel family member 1  
GR : Récepteur aux Glucocorticoïdes  
GSK3 $\beta$  : Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$   
HCS : Hyperplasie Congénitale des Surrénales

HDL : High Density Lipoprotein  
HMG-box : High-Mobility Group box  
HTA : HyperTension Artérielle  
HMiBS : Hyperplasie Micronodulaire Bilatérale des Surrénales  
HPBMS : Hyperplasie Primaire Bilatérale Macronodulaire des Surrénales  
HR : Hazard Ratio  
HS : Hormones Stéroïdiennes  
HSD : HydroxyStéroïde Déshydrogénase  
i-MAD : isolated Micronodular Adrenocortical Disease  
IC95 : Intervalle de Confiance à 95%  
IGF2 : Insulin-like Growth Factor 2  
IGFR1 : Insulin-like Growth Factor Receptor 1  
IP3 : Inositol Tri-Phosphate  
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique  
JNK : Kinase JUN-N-terminal  
KCNJ5 : Potassium Inwardly Rectifying Channel Subfamily J Member 5  
L-DOPA : L-Dihydroxyphenylalanine  
LDL : Low Density Lipoprotein  
LDL-R : Low Density Lipoprotein Receptor  
LEF : Lymphoid Enhancer Factor  
LGR4/5 : Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled Receptor 4/5  
Lim1 : Lin 11 Islet 1 and Mec-3 homeobox gene 1  
LRP5/6 : Low-density lipoprotein Receptor-related Protein 5/6  
m<sup>7</sup>G : coiffe 7-methylGuanosine  
MAPK : MAP Kinase  
MC : MinéraloCorticoïde  
MC2R : Récepteur de sous-type 2 de la MélanoCortine  
MiBAH : Micronodular Bilateral Adrenal Hyperplasia  
miR / miRs / miRNA : microARN(s)  
MMCSi : Maladie Micronodulaire CorticoSurrénalienne isolée  
MNCSP : Maladie Nodulaire CorticoSurrénalienne Pigmentée  
MR : Récepteur aux Minéralocorticoïdes  
NAD : Nicotinamide Adenine Dinucleotide (forme réduite : NADH ; forme oxydée : NAD<sup>+</sup>)  
NADP : Nicotinamide Adenine Dinucleotide phosphate (forme réduite : NADPH ; forme oxydée : NADP<sup>+</sup>)

NEM1 : Néoplasie Endocrinienne Multiple de type 1  
NEM2 : Néoplasie Endocrinienne Multiple de type 2  
NFκB : Nuclear Factor Kappa B  
NF1 : NeuroFibromatose de type 1  
NFAT : Nuclear Factor of Activated T-cells  
NPA : Nodule Producteur d'Aldostérone  
NR4A2 : Nuclear Receptor subfamily 4 group A member 2  
OH- : hydroxy  
OMS : Organisation Mondiale de la Santé  
PAF : Polypose Adénomateuse Familiale  
PAG : Primordium AdrénoGonadique  
PCC : PhéoChromoCytome  
PCP : Planar Cell Polarity  
PCSMaB : Pathologie CorticoSurrénalienne Macronodulaire Bilatérale  
PCSMiB : Pathologie CorticoSurrénalienne Micronodulaire Bilatérale  
PCSNS : Pathologie CorticoSurrénalienne Nodulaire Sporadique  
PD-1 : Programmed cell Death protein 1 (PD-1)  
PD-L1 : Programmed cell Death protein Ligand 1 (PD-1)  
PDE : PhosphoDiEstérase  
PKA : Protéine Kinase A  
PKC : Protéine Kinase C  
PLC : PhosphoLipase C  
PMBAH : Primary Macronodular Bilateral Adrenal Hyperplasia  
PPNAD : Primary Pigmented Nodular Adrenocortical Disease  
POMC : ProOpioMélanoCortine  
POR : P450 Oxydo-Reductase  
PDZ : Post synaptic density protein, **Drosophila** disc large tumor suppressor, and **Zonula** occludens-1 protein  
RAR : Rapport Aldostérone sur Rénine  
RCPG : Récepteur(s) Couplé(s) aux Protéines G  
RE : Réticulum Endoplasmique  
RGS : Regulators of G-protein Signaling  
RISC : RNA-Induced Silencing Complex  
RNF43 : RiNg Finger protein 43  
ROK : RhO-Kinase

Rspo : R-spondine  
SAMP : Sérine-Alanine-Méthionine-Proline  
SCF : SKP1-Cullin-F-Box  
SCP2 : Sterol Carrier Protein 2  
SDHB : Succinate DésHydrogénase B  
SDHEA : DéHydroEpiAndrostérone Sulfatée  
SDR : Short-chain Dehydrogenase/Reductase  
SF-1 : Steroidogenic Factor-1  
SFE : Société Française d'Endocrinologie  
siRNA : small-interfering RNA  
shRNA : short-hairpin RNA  
Shh : Sonic Hedgehog  
SRA : Système Rénine Angiotensine  
SR-B1 : Scavenger Receptor class B type 1  
SRC-1 : Steroid Receptor Coactivator-1  
StAR : Steroidogenic Acute Regulatory protein  
TCF : T-Cell Factor  
TDM : TomoDensitoMétrie  
TEP : Tomographie par Emission de Position  
TLE : Transducin-Like Enhancer of split  
TNM : Tumor (T) Node (N) Metastasis (M)  
TRBP : Trans-activation-responsive RNA-Binding Protein  
TSPO : TranSlocator PrOtein ou protéine de translocation  
UH : Unités Hounsfield  
VHL : (maladie de) Von Hippel Lindau  
wg : wingless  
Wnt4 : wingless-type MMTV integration site family member 4  
Wt-1 : Wilms tumor 1  
Z/R : ZNRF3/RNF43  
ZF : Zone Fasciculée  
ZG : Zone Glomérulée  
ZNRF3 : ZiNc and Ring Finger 3  
ZR : Zone Réticulée





# 1 - Introduction

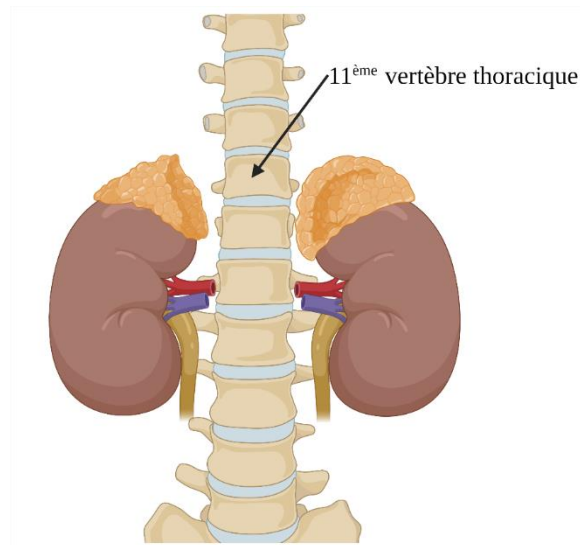


## D) La glande surrénale : généralités

### 1. *Structure et développement*<sup>1,2</sup>

#### 1.1 Anatomie et structure

Les glandes surrénales sont des glandes rétro-péritonéales, paires, coiffant le pôle supérieur des reins (Figure 1). Situées en regard de la 11<sup>ème</sup> et 12<sup>ème</sup> vertèbre thoracique, elles sont contenues dans le fascia rénal, au sein d'une loge fibreuse qui leur est propre, et sont séparées du rein par du tissu adipeux et un septum conjonctif appelé septum inter-surréno-rénal. Elles mesurent environ 4 à 6 cm de long et 2 à 3 cm de large, et pèsent entre 5 et 10g. Leur morphologie est légèrement différente : la surrénale droite est plutôt pyramidale ; la surrénale gauche est plus allongée et plate, souvent dite « en bonnet phrygien », et est un peu plus bas-située.



**Figure 1 : Situation anatomique des glandes surrénales**

La glande surrénale est composée de deux parties, le cortex et la médulla, qui ont une origine embryologique différente (Figure 2)<sup>1,3-5</sup> :

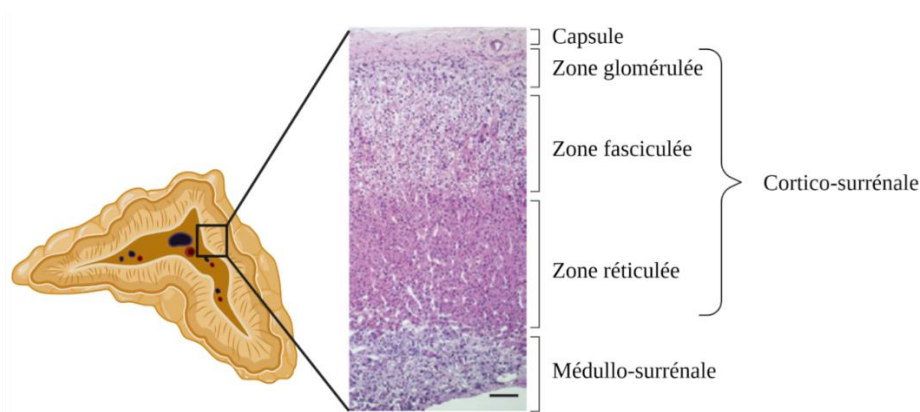
- Le cortex (ou corticosurrénale) est responsable de la synthèse des hormones stéroïdes à partir du cholestérol. Il se développe à partir d'une ébauche mésoblastique commune aux futurs reins, surrénales et gonades. A la 4<sup>ème</sup> semaine, le métanéphros, qui forme les futurs reins, se sépare du primordium adrénogonadique (PAG), qui donnera naissance aux surrénales et aux gonades<sup>6</sup>, sous

l'influence des facteurs de transcription « empty spiracles2 » (Emx2), « Lin 11 Islet 1 and Mec-3 homeobox gene 1 » (Lim1), « Wilms tumor 1 » (Wt-1), « wingless-type MMTV integration site family member 4 » (Wnt4), « Dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1 » (Dax-1), « Gata binding protein 4 » (Gata4) et « Steroidogenic Factor-1 » (SF-1)<sup>7,8</sup>. Dès la 5<sup>ème</sup> semaine du développement, le PAG se divise en une ébauche surrénalienne, qui va migrer en rétropéritonéal et qui formera le cortex primitif de la glande, et en ébauche gonadique, migrant en antérieur dans le péritoine. Les deux ébauches expriment toutes les deux SF-1, Wt-1 et Wnt4. Wt-1 va permettre la surexpression de SF-1 dans l'ébauche surrénalienne par rapport à l'ébauche gonadique, notamment grâce à son cofacteur CBP/p300 Interacting Transactivator with ED-rich tail 2 (Cited2)<sup>9</sup>. Une fois la surexpression de SF-1 initiée, l'expression de Wt-1 va progressivement diminuer, tandis que l'expression de SF-1 et de Cited2 se maintient. L'expression de Gata4 va également diminuer dans l'ébauche surrénalienne par rapport à l'ébauche gonadique<sup>8</sup>. Par la suite, l'ébauche surrénalienne va exprimer de façon spécifique le facteur de transcription « Fetal zone specific Sf1 enhancer » (FadE) permettant notamment de maintenir l'expression de SF-1 en l'absence de Wt-1<sup>10</sup>. Autour de la 7<sup>ème</sup> semaine, une seconde vague de cellules mésothéliales va entourer ce cortex primitif, formant ainsi le cortex définitif. Vers la fin de la grossesse, apparaît la zone transitionnelle, zone intermédiaire entre les deux zones citées ci-dessus. A la naissance, le cortex fœtal régresse très rapidement dans les 2 premières semaines de vie, de plus de la moitié de sa taille, jusqu'à sa disparition totale entre 6 mois et 1 an. Le cortex définitif se différencie progressivement en 3 couches morphologiquement et fonctionnellement distinctes après la naissance, jusqu'à l'âge d'environ 3 ans avec de l'extérieur vers l'intérieur :

- La zone glomérulée ou *zona glomerulosa* (ZG), qui sécrète les hormones minéralocorticoïdes dont la principale est l'aldostérone. Elle représente environ 10% de la masse du cortex surrénalien.
- La zone fasciculée ou *zona fasciculata* (ZF), qui sécrète les hormones glucocorticoïdes, dont la principale est le cortisol. Elle représente environ 75% de la masse du cortex surrénalien.
- La zone réticulée ou *zona reticularis* (ZR), qui sécrète les androgènes tels que le déhydroépiandrostérone (DHEA) et son dérivé sulfaté (SDHEA), indispensable à la production de la testostérone et des œstrogènes surrénaliens. Elle représente environ 15% de la masse du cortex surrénalien.

Toutefois, celle-ci ne sera fonctionnelle que vers 6-8 ans.

- La médulla (ou médullosurrénale), qui est responsable de la sécrétion des catécholamines telles que l'adrénaline et la noradrénaline. Elle se développe à partir des cellules ectodermiques de la crête neurale, dont certaines vont se différencier en cellules endocrines nommées cellules chromaffines, car elles sont colorées par les sels de chrome en histologie. Ces cellules chromaffines sont dispersées dans l'embryon, mais vers la 10<sup>ème</sup> semaine de gestation, une partie d'entre elles vont se regrouper, migrer et coloniser la partie centrale du cortex fœtal pour devenir la future médulla.



**Figure 2 : Coupe histologique de la glande surrénale**  
Adapté de Monticone et al, *Nature Reviews Endocrinology*, 2012

## 1.2 Mécanismes moléculaires de la zonation surrénalienne

Pendant des années, le mécanisme de zonation surrénalienne a été très controversé, avec deux modèles s'affrontant : le modèle de migration centripète<sup>11</sup> et le modèle de zonation par lignées indépendantes<sup>12</sup>. Dans le modèle centripète, des progéniteurs capsulaires et sous-capsulaires se différencient pour devenir des cellules de la ZG, puis migrent vers le centre de la glande et se différencient progressivement en cellules de la ZF. Dans le modèle de zonation, chaque zone se développe indépendamment et est maintenue par des progéniteurs spécifiques de chaque zone. Depuis les années 2010, la compréhension de la zonation surrénalienne a beaucoup progressé et le modèle de migration centripète est aujourd'hui le modèle privilégié<sup>13</sup>. Le pool de progéniteurs surrénaux sous-capsulaires permettant le renouvellement des cellules du cortex est d'origine diverse : d'origine fœtale ou adulte, exprimant ou non SF-1, exprimant ou non Wt-1<sup>8</sup>... Une partie de ces cellules et leur migration centripète est sous le contrôle de Sonic Hedgehog (Shh), via son action sur les cellules exprimant GLI-Kruppel family member 1 (Gli1)<sup>8,14</sup>. Le facteur de transcription SF-1 est le facteur clé permettant la différenciation des progéniteurs capsulaires et sous-capsulaires en cellules de la ZG puis leur migration centripète et la différenciation en cellules de la ZF, ainsi que la croissance et le maintien du cortex surrénaux<sup>13,15</sup>. Toutefois, il semble exister un mécanisme de maintien de la ZF indépendant de l'expression de SF-1.

Le développement et le maintien de la zonation surrénalienne repose sur un antagonisme entre la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -Caténine, responsable de l'identité glomérulée et la voie Protéine Kinase A/Adénosine 3',5' MonoPhosphate cyclique (PKA/AMPC), responsable de l'identité fasciculée et réticulée<sup>16-23</sup>. En effet, les cellules de la ZG sont positives au marquage  $\beta$ -Caténine<sup>16,23</sup> : la voie Wnt/ $\beta$ -Caténine contrôle la production d'aldostérone et stimule l'expression de l'aldostérone synthase CYP11B2<sup>18</sup>. De plus, il a été montré que Wnt4 et la R-Spondine 3 étaient nécessaires à l'homéostasie de la ZG<sup>24,25</sup>. Les cellules de la ZF expriment le récepteur de l'hormone adrénocorticotrophique (ACTH), qui induit une activation de la voie PKA/AMPC dans la ZF<sup>26</sup>. La stimulation de la surrénale murine par l'ACTH diminue la

signalisation Wnt et induit une inhibition de la différenciation de la ZG<sup>19</sup>. La signalisation PKA, en synergie avec la sécrétion d'androgènes, est aussi responsable du développement de la ZR<sup>27</sup>. L'antagonisme entre les deux voies de signalisation obéit à une régulation très fine : ainsi, un modèle murin de gain de fonction de  $\beta$ -Caténine au niveau surrénalien aboutit à une expansion de la ZG tandis qu'un modèle de perte de fonction de Zinc And Ring Finger 3 (ZNRIF3), un co-répresseur de la voie Wnt/ $\beta$ -Caténine, aboutit de manière inattendue à une expansion de la ZF<sup>21</sup>, tout comme les modèles d'activation constitutive de PKA<sup>19</sup>. ZNRIF3 serait essentiel au maintien de la zonation par son action sur un gradient de signalisation Wnt. Il a été montré plus récemment que l'action de la  $\beta$ -Caténine dans la ZG était en fait lié à un blocage de la différenciation des cellules de la ZG vers la ZF et non pas à une augmentation de la prolifération des cellules de la ZG : ce blocage pourrait passer par l'inhibition de la voie AMPc/PKA par la phosphodiesterase A2 (PDE2A)<sup>22</sup>, la phosphodiesterase principale dans la ZF<sup>28-30</sup>. Il a par ailleurs été montré récemment que l'histone méthyltransférase Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) était cruciale dans l'identité fasciculée, en régulant la signalisation PKA/AMPc, notamment en inhibant les phosphodiesterases 1B, 3A et 7A dans la ZF, sans affecter la voie Wnt<sup>20</sup>.

## **2. Sécrétion hormonale**

### *2.1 Sécrétion des hormones stéroïdiennes<sup>5,31</sup>*

Les hormones stéroïdiennes constituent une large famille de molécules, sécrétées principalement par les glandes surrénales, mais aussi par les gonades, le cerveau ou le placenta. Les hormones stéroïdiennes (HS) sont divisées en sous-familles en fonction de leurs caractéristiques biochimiques, mais surtout en fonction du récepteur sur lequel elles se lient pour exercer leur action. Elles possèdent toutes une structure moléculaire basée sur un noyau cyclopentane-perhydrophenanthrene, qui est aussi présent dans la molécule de cholestérol, précurseur commun dont dérivent toutes les HS. L'ensemble de la stéroïdogénèse est récapitulée dans la Figure 3 et le contrôle de leur sécrétion dans la Figure 4.



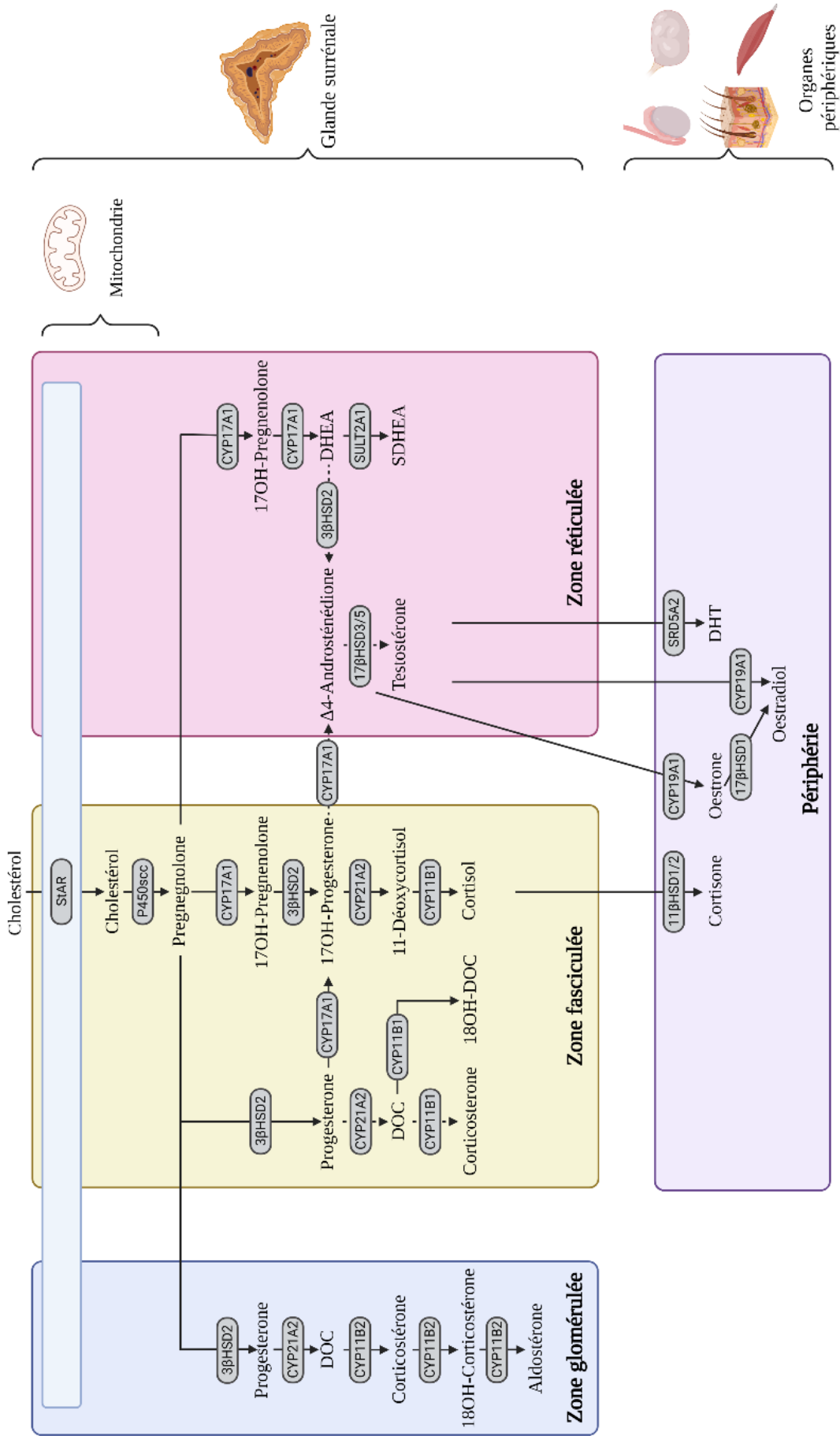
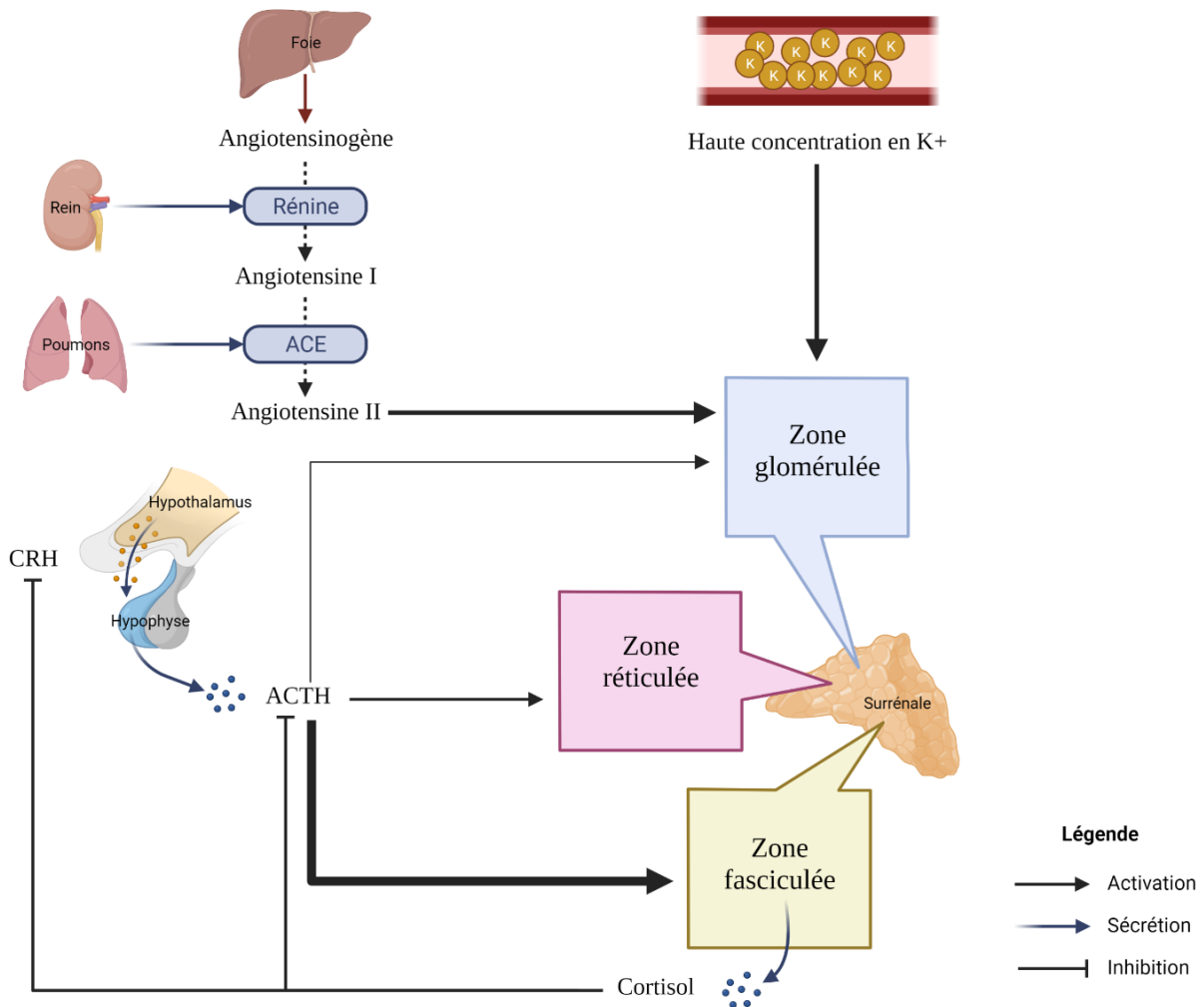


Figure 3 : Représentation schématique de la stéroïdogénèse surrénalienne



**Figure 4 : Principaux acteurs contrôlant la stéroïdogénèse**

L'épaisseur de la ligne indique l'intensité du contrôle

### 2.1.1 Les protéines et enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse

- **La protéine StAR :** au sein des cellules productrices d'HS, le cholestérol d'abord est acheminé dans la membrane externe de la mitochondrie puis passe dans la membrane interne de la mitochondrie grâce à la protéine Steroidogenic Acute Regulatory (StAR). Cette protéine, dont le mécanisme d'action est encore imparfaitement compris, est fondamentale dans la stéroïdogénèse. Bien qu'il semble exister une possibilité de stéroïdogénèse indépendante de StAR, on considère généralement que StAR est limitante pour la synthèse des HS, notamment dans le cadre de leur production « aigüe ». En effet, contrairement à d'autres glandes endocrines, les glandes surrénales ne possèdent pas de réserve hormonale. En cas de « stress physiologique » nécessitant une plus grande quantité d'HS, il est alors indispensable pour le

corps d'être capable d'en produire rapidement, cette adaptation étant dépendante de StAR. Ainsi, toute anomalie dans le transport du cholestérol, de sa production à son acheminement dans la membrane interne de la mitochondrie, est responsable de pathologies associées à une insuffisance surrénalienne primitive.

- **Les cytochromes P450** : il s'agit d'un terme générique désignant une famille de 57 enzymes spécialisées dans l'oxydation. Ces enzymes comportent 500 acides aminés (AA) et possèdent un groupement « hème » unique, qui leur permet d'activer l'oxygène et de catalyser une hydroxylation des stéroïdes à partir des électrons présents dans la forme réduite de la nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP, forme réduite : NADPH). Leur nom de P450 provient de leur capacité à absorber la lumière à une longueur d'onde de 450nm dans leur forme réduite. Les gènes codant ces enzymes sont les gènes *CYP*. On distingue deux formes de cytochromes en fonction de leur localisation et des cofacteurs permettant le transfert d'électrons du NADPH vers le cytochrome P450 : les cytochromes P450 de type 1 sont localisés dans la mitochondrie et ont pour cofacteurs la ferredoxine (aussi appelée adrenodoxine, FDX1/ADX) ou la ferredoxine-reductase (FDXR/ADXR) ; les cytochromes P450 de type 2 sont localisés dans le réticulum endoplasmique et ont pour cofacteur la P450-oxidoreductase (POR). Six cytochromes P450 sont impliqués dans la stéroïdogénèse (Tableau 1). Dans le cadre de la stéroïdogénèse, les réactions d'oxydation catalysées par les cytochromes P450 sont à sens unique et irréversibles, et chaque cytochrome catalyse une réaction unique qui lui est propre.

- **Les hydroxystéroïdes déshydrogénases (HSDs)** : ces enzymes sont également spécialisées dans l'oxydo-réduction, mais n'ont pas de groupement « hème » et utilisent soit le nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) ou le NADP pour effectuer leur réaction d'oxydoréduction. Les HSD peuvent être classées selon leur fonctionnalité et/ou leur structure. Au niveau fonctionnel, bien qu'elles soient en théorie capables d'effectuer des réactions d'oxydation ou de réduction, en pratique, les HSDs ont souvent une action préférentielle.

Ainsi, on distingue les déshydrogénases, qui utilisent la forme oxydée du NAD (NAD<sup>+</sup>) pour oxyder les stéroïdes ; et les réductases, qui utilisent le NADPH pour réduire les stéroïdes. Au niveau structurel, les HSDs sont classées soit en « short-chain dehydrogenase/reductase » (SDR), soit en « aldo-keto reductase » (AKR). Les principales HSDs impliquées dans la stéroïdogénèse sont listées dans le Tableau 2.

Cytochrome	Type	Rôle
P450 side-chain cleavage (scc) = CYP11A1 = cholesterol desmolase	Type 1	Coupe la chaîne latérale du cholestérol dans la membrane interne de la mitochondrie : convertit le cholestérol en prégnénone.
P45011β = CYP11B1 = 11β-hydroxylase	Type 1	- Convertit le 11-Déoxycortisol en cortisol - Convertit la déoxycorticostérone (DOC) en corticostérone - Peut convertir la corticostérone en 18OH-corticostérone
P450c11AS = CYP11B2 = aldostérone synthase	Type 1	- Convertit la DOC en corticostérone - Convertit la corticostérone en 18OH-corticostérone - Convertit la 18OH-corticostérone en aldostérone
P450c17 = CYP17A1 = 17α-hydroxylase/17,20-lyase	Type 2	- Convertit la prégnénone en 17hydroxy(OH)-prégnénone (activité 17α-hydroxylase) - Convertit la progestérone en 17OH-progestérone (activité 17α-hydroxylase) - Convertit la 17OH-prégnénone en DHEA (activité 17,20-lyase) - Convertit la 17OH-progestérone en Δ4-androsténédione (activité 17,20-lyase)
P450c21 = CYP21A2 = 21α-hydroxylase	Type 2	- Convertit la progestérone en DOC - Convertit la 17OH-progestérone en 11-déoxycortisol
P450aro = CYP19A1 = aromatasase	Type 2	- Convertit la Δ4-androsténédione en œstrone - Convertit la testostérone en œstradiol

**Tableau 1 : Liste des cytochromes P450 impliqués dans la stéroïdogénèse**

HSD	Type	Rôle
3βHSD2 = HSD3B2 = 3β-hydroxystéroïde déshydrogénase type 2	Dehydrogenase / SDR	- Convertit la prégnénone en progestérone - Convertit la 17OH-prégnénone en 17-OH progestérone - Convertit la DHEA en Δ4-androsténédione - Convertit l'androsténédiol en testostérone
11βHSD1 = HSD11B1 = 11β-hydroxystéroïde déshydrogénase type 1	Réductase (+++) et déshydrogénase (+) / SDR	- Convertit la corticostérone en cortisol - Peut aussi convertir le cortisol en corticostérone, mais cette action déshydrogénase est très marginale
11βHSD2 = HSD11B2 = 11β-hydroxystéroïde déshydrogénase type 2	Déshydrogénase / SDR	- Convertit le cortisol en corticostérone
17βHSD1 = HSD17B1 = 17β-hydroxystéroïde déshydrogénase type 1	Réductase / SDR	- Convertit l'œstrone en œstradiol
17βHSD5 = HSD17B5 = 17β-hydroxystéroïde déshydrogénase type 5 = AKR1C3	Réductase / AKR	- Convertit la Δ4-androsténédione en testostérone (action majoritaire dans la surrénale, mais minoritaire par rapport à la 17βHSD3 testiculaire)

**Tableau 2 : Liste des HSDs impliquées dans la stéroïdogénèse surrénalienne**

### 2.1.2 Étapes communes de la stéroïdogénèse

Le cholestérol nécessaire à la synthèse des stéroïdes est apporté par l'alimentation, la biosynthèse hépatique/intestinale et la synthèse *de novo* par la cellule au sein du réticulum endoplasmique (RE). Le cholestérol est une molécule hydrophobe, elle est donc transportée dans la circulation sanguine sous forme estérifiée par des lipoprotéines, les Low Density Lipoproteins (LDLs) et les High Density Lipoproteins (HDLs)<sup>32</sup>. Toutefois, il est important de noter que chez l'Homme, contrairement au rongeur, les LDLs sont la principale source d'apport de cholestérol aux cellules. Cependant, la contribution des HDLs, longtemps sous-estimée, est aujourd'hui considérée comme non-négligeable<sup>33</sup>. Les HDLs seraient plutôt chargés du retour du cholestérol des cellules vers le foie<sup>34</sup>.

Les LDLs vont délivrer le cholestérol à la cellule en se liant à leur récepteur LDL (LDL-R). Celui-ci est alors internalisé, libéré du cholestérol et recyclé à la membrane<sup>35</sup>. Les HDLs délivrent le cholestérol à la cellule en se liant à leur récepteur Scavenger Receptor class B type 1 (SR-B1), qui n'est pas internalisé<sup>36</sup>. De façon intéressante, l'expression de LDL-R dans la surrénale est contrôlée par l'ACTH<sup>37</sup> tandis que l'expression de SR-B1 est contrôlée à la fois par l'Angiotensine II (AngII) et l'ACTH<sup>38,39</sup>.

La synthèse *de novo* de cholestérol au sein de la cellule, à partir d'Acétyl CoA, est réalisée grâce à l'HMG-CoA synthase et l'HMG-CoA réductase : elle permet de répondre à une demande aiguë et accrue en stéroïdes<sup>40</sup>.

Une fois dans le cytoplasme, le cholestérol est déestérifié, et est transporté au niveau de la membrane externe de la mitochondrie par la protéine Sterol Carrier Protein 2 (SCP2)<sup>41</sup>. Le transport de la membrane externe à la membrane interne de la mitochondrie se fait par la protéine StAR<sup>42</sup> : cette étape est fondamentale. En effet, les souris KO pour StAR meurent peu après la naissance d'une insuffisance surrénalienne<sup>43</sup>. Le maintien en vie de ces souris par supplémentation en hormones corticostéroïdes conduit à une accumulation de lipides dans les tissus stéroïdogènes, montrant l'importance de StAR dans la régulation du transfert intra-mitochondrial de cholestérol<sup>44</sup>. La protéine de translocation du cholestérol (TSPO) a pendant

longtemps été décrite comme une deuxième protéine de régulation de l'entrée de cholestérol dans la mitochondrie, mais son rôle est aujourd'hui remis en question<sup>45</sup>.

La première étape de la stéroïdogénèse débute avec la conversion de cholestérol en prégnénolone au sein de la mitochondrie par la P450<sub>scc</sub>. L'expression de la P450<sub>scc</sub> est une condition *sine qua none* pour que la cellule soit qualifiée de stéroïdogène. La prégnénolone sera ensuite soit convertie en 17-hydroxy(OH)-prégnénolone par la 17 $\alpha$ -hydroxylase, soit en progestérone par la 3 $\beta$ HSD2.

### 2.1.3 Synthèse des minéralocorticoïdes<sup>46,47</sup>

La synthèse des minéralocorticoïdes (MC) a lieu dans la ZG de la glande surrénale. Cette zone exprime le récepteur à l'angiotensine de type I (ATI), CYP11B2 et n'exprime pas CYP17A1<sup>46</sup>. La synthèse des MC débute par la conversion de la prégnénolone en progestérone par la 3 $\beta$ HSD2. La progestérone est ensuite hydroxylée par CYP21A2, produisant ainsi la déoxycorticostérone (DOC), ayant déjà une action minéralocorticoïde. La DOC est ensuite convertie en aldostérone via 3 étapes successives, toutes catalysées par CYP11B2. D'abord, CYP11B2 effectue la 11 $\beta$ -hydroxylation de la DOC, ce qui aboutit à la production de corticostérone. Ensuite, CYP11B2 va hydroxyler la corticostérone en 18-hydroxycorticostérone. Enfin, la 18-hydroxycorticostérone est convertie en aldostérone, le principal minéralocorticoïde, qui agira en périphérie via son récepteur, le récepteur aux minéralocorticoïdes (MR) (Figure 3).

La synthèse des MC est régulée principalement par le système rénine-angiotensine (SRA)<sup>48</sup> (Figure 4) : en cas d'hypotension artérielle ou d'hypovolémie, le rein va augmenter sa production de rénine. Cette dernière va cliver l'angiotensinogène, produit par le foie, en angiotensine I. L'angiotensine I est biologiquement inactive, jusqu'à sa conversion en angiotensine II (Ang II) par l'enzyme de conversion de l'angiotensine, présente notamment au niveau des poumons. L'AngII va alors permettre de restaurer un débit sanguin normal en provoquant une vasoconstriction vasculaire quasi-immédiate, mais aussi en stimulant la production surrénalienne d'aldostérone via les récepteurs AT1 présents au sein de la ZG, via

un mécanisme calcium-dépendant<sup>49</sup>. La liaison de l'AngII à son récepteur va provoquer une activation de la phospholipase C, stimulant la production d'inositol triphosphate, permettant ainsi le relargage du pool de calcium intracellulaire, notamment via le RE<sup>50</sup>. Cette augmentation de calcium va activer la calmoduline, qui va à son tour entraîner l'activation de protéines kinases (les Calmodulin Dependant Kinases, CaMK). Les CaMK vont à leur tour phosphoryler des protéines cibles, notamment StAR<sup>51,52</sup> mais aussi le récepteur nucléaire NURR-1, un des régulateurs de la transcription de CYP11B2<sup>53</sup>.

La stimulation par l'AngII et la mobilisation du pool intracellulaire de calcium va entraîner un mécanisme de compensation d'efflux de calcium. Cet efflux de calcium va déclencher un nouvel influx de calcium, cette fois d'origine extracellulaire par des canaux voltage-dépendants, qui va d'une part maintenir l'activation des CaMK et d'autre part activer la voie PKC via la production de diacylglycérol : la PKC activée va alors entraîner la phosphorylation de protéines d'aval qui permettent de maintenir la réponse cellulaire à l'AngII<sup>50</sup>.

Par ailleurs, la production d'aldostérone est également contrôlée dans une moindre mesure par la concentration extracellulaire de potassium via la régulation de l'entrée de calcium par des canaux calciques voltage-dépendants<sup>46,51</sup> et donc via la régulation de la production d'aldostérone en lien avec la voie calcium/calmoduline. Enfin, la production d'aldostérone est en partie régulée par l'axe hypothalamo-hypophysaire via l'ACTH (Figure 4), qui a selon les circonstances, tantôt un effet activateur, tantôt un effet inhibiteur de la production d'aldostérone<sup>54-57</sup>.

#### 2.1.4 Synthèse des glucocorticoïdes<sup>58</sup>

La synthèse des glucocorticoïdes (GC) a lieu dans la ZF de la glande surrénale, qui exprime CYP21A2, CYP17A1 et CYP11B1 mais pas CYP11B2<sup>31</sup>. A noter que l'activité de CYP17A1 dans la ZF est principalement dédiée à la 17 $\alpha$ -hydroxylation, son activité de 17,20 lyase étant très faible : ainsi, la ZF est destinée à produire des GC mais peu d'androgènes. Le cortisol est produit par deux circuits parallèles (Figure 3). Dans le premier cas, la prégnénolone subit une

17 $\alpha$ -hydroxylation par CYP17A1, qui la convertit en 17-hydroxyprégnénone. Cette dernière est ensuite convertie en 17OH-progesterone par la 3 $\beta$ HSD2. Dans le second cas, la progesterone est produite à partir de la prégnénone grâce à la 3 $\beta$ HSD2. La progesterone est ensuite 17 $\alpha$ -hydroxylée par CYP17A1 en 17OH-progesterone. Puis, dans les deux cas, la 17OH-progesterone est convertie en 11-déoxycortisol (aussi appelé composé S) par CYP21A2, qui sera lui-même transformé en cortisol grâce à CYP11B1<sup>5</sup>. De manière plus marginale, la progesterone peut être convertie en DOC par CYP21A2, celle-ci étant ensuite transformée en corticostérone par CYP11B1.

La sécrétion de cortisol par la ZF est contrôlée par l'axe hypothalamo-hypophysaire<sup>58</sup>, avec un rétrocontrôle permanent du niveau de GC circulant sur cet axe<sup>59,60</sup> (Figure 4). Au niveau hypothalamique, la production de Corticotropin-releasing hormone (CRH) va stimuler la production de pro-opiomélanocortine (POMC), qui sera clivée en ACTH et  $\beta$ -lipotropine par la prohormone convertase 1. L'ACTH est ensuite relarguée dans la circulation par exocytose et va se lier au récepteur de sous-type 2 de la mélanocortine (MC2R), un récepteur de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Cette interaction va augmenter les niveaux intracellulaires d'adénosine 3',5'monophosphate cyclique (AMPc), qui vont alors se fixer sur les 2 sous-unités régulatrices de la protéine kinase A (PKA), libérant ainsi ses 2 sous-unités catalytiques<sup>61</sup>. Ces dernières vont alors phosphoryler le facteur de transcription cAMP response element binding protein (CREB). Ce processus résulte en l'augmentation de l'entrée de cholestérol dans la cellule et la transcription de P450<sub>scc</sub>, CYP17A1, CYP21A2 et CYP11B1<sup>58</sup>. L'ensemble aboutit à une augmentation de la sécrétion de cortisol. L'AMPc peut être hydrolysé en AMP non actif par les phosphodiésterases : la baisse des concentrations d'AMPc provoque la reformation de la PKA sous forme tétramérique inactive et limite donc la synthèse de cortisol. En périphérie, le cortisol exerce son action via le récepteur aux GC (GR). Mais il est aussi capable de stimuler le récepteur aux MC (MR), avec une affinité beaucoup plus importante que l'aldostérone : on parle de l'effet minéralocorticoïde du cortisol, le MR ayant par ailleurs une affinité plus grande pour le cortisol que le GR. Afin d'éviter la stimulation continue du MR par



le cortisol, les tissus périphériques possèdent la 11 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogenase de type 2 (11 $\beta$ HSD2), qui va convertir le cortisol en corticostérone, non reconnue par le MR<sup>62,63</sup> : la sélectivité du récepteur MR est donc médiée par cette enzyme « protectrice »<sup>64</sup>. Enfin, au niveau cérébral et hypophysaire, les GC stimulent à la fois le MR et le GR<sup>65</sup>. La stimulation du MR au niveau cérébral par les GC permet notamment la régulation du rythme circadien.

#### 2.1.5 Synthèse des androgènes surrénaliens<sup>66-68</sup>

La synthèse des androgènes surrénaliens se fait dans la zone réticulée. Cette zone exprime le MC2R et CYP17A1 mais très peu CYP11B1 et CYP21A2<sup>31</sup>. Ainsi, elle produit peu de GC et sa fonction est tournée vers la synthèse de DHEA. Une fois la prégnénone convertie en 17OH-prégnénone par CYP17A1, une seconde 17 $\alpha$ -hydroxylation par CYP17A1 permet de produire de la DHEA à partir de la 17OH-progesterone nouvellement formée<sup>5</sup>. La sulfotransferase SULT2A1 permettra ensuite la production de SDHEA par sulfonation de la DHEA.

Cette zone exprime également modérément 3 $\beta$ HSD2 : au fur et à mesure que la DHEA s'accumule, une petite partie est convertie en  $\Delta$ 4-androsténédione. Cette dernière est ensuite convertie en testostérone par la 17 $\beta$ HSD, mais la quantité de testostérone produite au niveau surrénalien reste faible<sup>69</sup>. Il est à noter que la 17 $\beta$ HSD possède plusieurs isoformes, notamment la 17 $\beta$ HSD3 et 5. La 17 $\beta$ HSD3 a un rôle majeur dans la conversion de  $\Delta$ 4-androsténédione en testostérone alors que l'activité de la 17 $\beta$ HSD5 est beaucoup plus modérée. Toutefois, il semblerait que la 17 $\beta$ HSD5 soit beaucoup plus exprimée au niveau surrénalien que la 17 $\beta$ HSD3, qui est, elle, plutôt exprimée au niveau testiculaire. La synthèse de testostérone surrénalienne relèverait donc plus probablement de l'action de la 17 $\beta$ HSD5.

Si CYP17A1 catalyse la 17 $\alpha$ -hydroxylation de la prégnénone et de la progesterone avec une efficacité identique, elle produit en revanche 50 fois plus de DHEA à partir de la 17OH-prégnénone que de  $\Delta$ 4-androsténédione à partir de la 17OH-progesterone. La production de  $\Delta$ 4-androsténédione par ce biais est donc également assez faible.

Les androgènes exercent leur action via le récepteur aux androgènes (AR). Les androgènes surrénaliens (exceptée la testostérone) sont considérés comme des androgènes « faibles » car

ils ont une affinité peu importante voire nulle pour l'AR<sup>70-72</sup>, mais peuvent être métabolisés en androgènes plus puissants tels que testostérone et dihydrotestostérone dans d'autres organes<sup>73</sup>. Chez l'homme, le testicule est le principal producteur d'androgènes, notamment de testostérone et dihydrotestostérone, tandis que chez la femme, la sécrétion est assurée en partie par les glandes surrénales, mais surtout, avant la ménopause, par les ovaires avec une métabolisation *in situ* en œstrogènes. Toutefois, la sécrétion androgénique surrénalienne est d'importance particulière pendant la période fœtale, où la DHEA produite par le cortex primitif, qui comporte une large partie similaire à la ZR, va permettre de contribuer au pool androgénique fœtal. Ces androgènes sont convertis en œstrogènes par l'aromatase placentaire, prévenant ainsi la virilisation des fœtus féminin et de la femme enceinte<sup>74</sup>. Si à la naissance, la synthèse de GC et MC est immédiate, la synthèse des androgènes est très faible : en effet, la ZR involue largement à la naissance et sécrète principalement de la DHEA et de la  $\Delta^4$ -androsténédione<sup>75</sup>. Elle se développera de nouveau vers 6 à 8 ans, lors de l'adrénarchie<sup>72</sup>, où elle secrètera des androgènes surrénaux de façon plus importante, du fait de l'augmentation de l'activité 17,20 lyase de CYP17A1. Cette adrénarchie débute en moyenne 2 ans avant l'activation de l'axe gonadotrope responsable de la puberté proprement dite. S'il est clair que l'adrénarchie est indépendante de la puberté centrale, les mécanismes qui la régulent et permettent son initiation sont imparfaitement compris<sup>74,76</sup>. On sait néanmoins que le tropisme de cette zone est notamment régulé par l'ACTH<sup>76</sup> (Figure 4). La leptine pourrait également jouer un rôle en stimulant l'activité 17,20 lyase de CYP17A1, via une phosphorylation de cette dernière<sup>77</sup>. Une autre hypothèse est l'auto-régulation par le cortisol intra-surrénalien : l'augmentation du cortisol pendant l'enfance pourrait inhiber la 3 $\beta$ HSD2 et ainsi augmenter la sécrétion de DHEA, contribuant à l'initiation de l'adrénarchie<sup>78</sup>.

#### 2.1.6 Régulation de l'expression des gènes de la stéroïdogénèse

L'expression des gènes de la stéroïdogénèse est principalement contrôlée par l'ACTH<sup>79-81</sup> et l'AngII<sup>82</sup>.

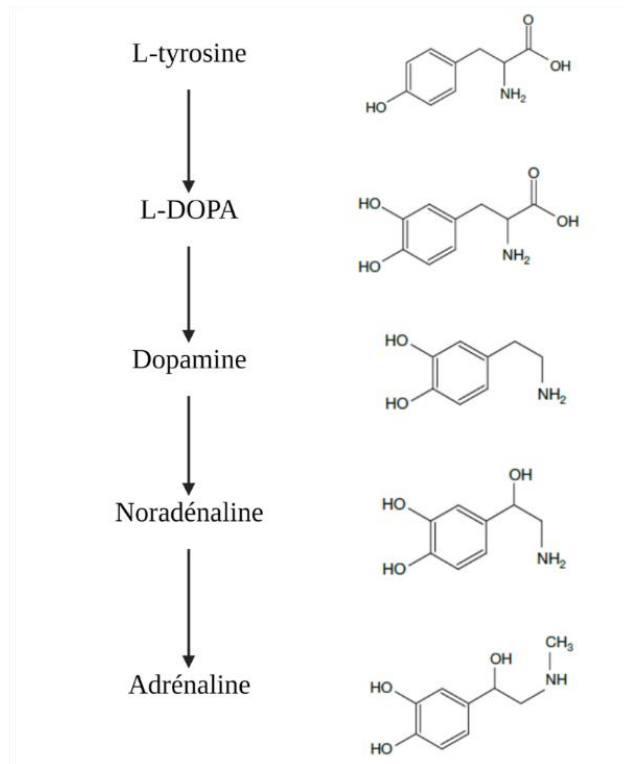
L'ACTH active les enzymes et les facteurs de transcription de la stéroïdogénèse à toutes les étapes (détaillé dans une revue relativement récente par Ruggiero et al<sup>79</sup>). Au niveau de la synthèse du cholestérol, elle accroît le pool de cholestérol libre en inhibant l'AcylCoenzymeA-cholesterol acyltransferase. L'ACTH induit la phosphorylation/expression de plusieurs facteurs de transcription dont l'action concertée et l'interaction avec différents éléments cis-régulateurs stimulent l'expression de la protéine StAR et des enzymes de la stéroïdogénèse.

Ainsi, la stimulation par l'ACTH induit une réponse « aigüe » consistant en la transcription de StAR dans les minutes suivant la stimulation par les facteurs de transcription de réponse à l'AMPc de la famille CREB (CREB ou cAMP-Response Element Binding protein, CREM ou cAMP Responsive Element Modulator, ATF ou Activating Transcription Factor). La réponse à une stimulation chronique (de l'ordre de plusieurs jours) se traduit par une augmentation de l'expression des enzymes CYP11A1, CYP11B1, CYP11B2, 3 $\beta$ HSD, du MC2R, via l'augmentation du facteur de transcription SF-1, régulateur clé du développement des surrénales et des gonades, et de l'expression des gènes spécifiques des tissus stéroïdogènes. SF-1 est impliqué dans l'expression basale et induite des CYP11A1, CYP11B1, CYP17, 3 $\beta$ HSD2, StAR, MC2R dans la ZF<sup>79</sup> et de CYP11B2 dans la ZG<sup>83</sup>. Il agit également en amont en modulant l'expression de SR-B1, SCP2 et l'HMGCoA-synthase. D'autres facteurs de transcription telles que les protéines de liaison CCAT/Enhancer-Binding Proteins (C/EBPs) et les familles de facteurs de transcription AP-1 et Sp1/Sp3 participent également à la régulation de l'expression des gènes de la stéroïdogénèse en réponse à l'ACTH<sup>79</sup>.

L'AngII promeut la transcription de gènes cibles tels que StAR, la 3 $\beta$ HSD, CYP11B2 sans affecter l'expression de CYP11B1, notamment via l'augmentation de l'expression de facteurs de transcription comme Nuclear Receptor subfamily 4 group A member 2 (NR4A2 ou NURR1) ou Early Growth Response 2 (EGR2)<sup>84</sup>. Elle induit également le recrutement de certains facteurs de transcription communs avec l'ACTH comme CREB et ATF1. Selon le contexte, elle peut également augmenter ou diminuer l'expression de son récepteur AT1.

## 2.2 Sécrétion des catécholamines<sup>85,86</sup>

Les catécholamines sont des hormones dites « sympathomimétiques », représentées par la dopamine, l'adrénaline et la noradrénaline. Au niveau surrénalien, les deux principales catécholamines sécrétées sont l'adrénaline et la noradrénaline, produites par la médulla à partir de la L-tyrosine (Figure 5). Cet acide aminé est apporté de manière exogène par la nourriture ou synthétisé de façon endogène par le foie à partir de Phénylalanine. La L-tyrosine est ensuite transformée en dihydroxyphénylalanine (L-DOPA) par la tyrosine hydroxylase. La L-DOPA est ensuite décarboxylée en dopamine. Cette dernière est ensuite convertie en noradrénaline, qui est produite directement au sein des granules des cellules chromaffines. Une petite partie de cette noradrénaline diffuse de ces granules vers le cytoplasme. Elle peut alors être recapturée au sein des granules ou être transformée en adrénaline dans le cytoplasme, par la phényléthanolamine N-méthyltransférase, dont l'expression est contrôlée par le niveau de GC. La production d'adrénaline dépend donc entièrement de cette « fuite » de noradrénaline. La sécrétion des catécholamines est principalement sous le contrôle des fibres nerveuses cholinergiques : l'acétylcholine sécrétée par ces nerfs va se fixer sur les récepteurs nicotinerigiques des cellules chromaffines, modifiant la perméabilité de la membrane des cellules au calcium. L'afflux intracellulaire de calcium permettrait ensuite le relargage de l'adrénaline par exocytose.



**Figure 5 : Schéma de la synthèse des catécholamines**  
 Adapté de Schulz et al, *Frontiers of Hormone Research*, 2004

**En conclusion, la glande surrénale est une glande paire produisant des hormones stéroïdes et des catécholamines. La régulation de sa zonation est complexe et dépend notamment d'un antagonisme très fin entre les voies de signalisation Wnt/ $\beta$ -Caténine (identité glomérulée) et PKA/AMPC (identité fasciculée et réticulée). Cet antagonisme pourrait faire intervenir PDE2A en tant qu'inhibiteur de la voie PKA/AMPC au sein de la ZG. La régulation de la zonation fait intervenir de nombreux facteurs de transcription, qui régulent également finement la stéroïdogénèse par les différentes zones du cortex surrénalien.**

## II) Tumeurs de la glande surrénale

La glande surrénale peut être le siège de tumeurs, bénignes ou malignes. Du fait de son caractère endocrinien, ces tumeurs peuvent être fonctionnelles (ou sécrétantes, c'est-à-dire qu'elles sécrètent des hormones) ou non. Les tumeurs surrénaliennes regroupent des entités très variées, résumées dans le tableau 3. Leur prévalence autopsique est estimée autour de 1 à 2% (0.34-8.7%)<sup>87</sup>. Les récents progrès de l'imagerie et la réalisation croissante de scanners abdominaux ont augmenté la découverte fortuite de tumeurs surrénaliennes sur un examen réalisé initialement pour une autre pathologie : ces tumeurs de découverte fortuite sont qualifiées d'incidentalomes. La prévalence d'incidentalome surrénalien découvert à l'imagerie est également estimée à 1% (0.7 à 8.7%)<sup>87</sup>, mais est en fait variable selon l'âge : ainsi, à l'âge de 50 ans, la prévalence radiologique des incidentalomes surrénaliens est de l'ordre de 3%, mais de presque 10% chez les sujets âgés<sup>88</sup>.

<b>Tumeurs médullosurrénaliennes</b>		<b>Tumeurs corticosurrénaliennes</b>	
<i>Bénignes</i>	<i>Malignes</i>	<i>Bénignes</i>	<i>Malignes</i>
- Phéochromocytome - Ganglioneurome	- Phéochromocytome - Neuroblastome - Ganglioneuroblastome	- Adénome * Non fonctionnel * produisant de l'aldostérone (de Conn) * produisant du cortisol * produisant des androgènes * avec sécrétion hormonale mixte - Hyperplasie - Kyste - Myélolipome	- Carcinome cortico-surrénalien (CCS) - Métastase d'un autre primitif

**Tableau 3 : Principales tumeurs surrénaliennes**

### 1. *Tumeurs de la médullosurrénale*

Comme développé dans la première partie de la thèse, la médullosurrénale est composée des cellules issues des crêtes neurales, dont certaines vont se différencier en cellules endocrines chromaffines. Les tumeurs de cette zone neuro-endocrine peuvent se développer au dépend des

cellules endocrines chromaffines (phéochromocytome) ou des cellules nerveuses (neuroblastome, ganglioneurome, ganglioneuroblastome).

### *1.1 Phéochromocytome (PCC)<sup>89-91</sup>*

Les PCC ont une incidence de l'ordre de 2-8/million de personne/an, avec un pic entre 40 et 60 ans, touchant les hommes et les femmes de manière égale. Les circonstances diagnostiques des PCC sont variables : un syndrome clinique d'excès de catécholamines, ou lors de l'évaluation d'un incidentalome surrénalien ou encore dans le cadre d'un dépistage familial. Environ 40% des patients présentent un syndrome clinique franc associant hypertension et épisodes paroxystiques de tachycardie, céphalées et sueurs (ces symptômes formant la « Triade de Ménard »). On estime qu'environ 10% à 15% des PCC sont malins. La majorité des PCC sont sporadiques, mais 10 à 20% peuvent survenir dans le cas de maladies génétiques, les 4 plus communes étant la néoplasie endocrinienne multiple de type 2 (NEM2), la maladie de Von Hippel Lindau (VHL), la neurofibromatose de type 1 (NF1) et les mutations de la succinate déshydrogénase B (SDHB). Le diagnostic repose sur le dosage des catécholamines urinaires / plasmatiques, qui sont élevées dans 75% des cas. L'imagerie confirme la présence d'une tumeur surrénalienne (tomodensitométrie (TDM), imagerie par résonance magnétique (IRM)) et aide au diagnostic fonctionnel (scintigraphie au MIBG, tomographie par émission de positon (TEP) au 18-fluorodeoxyglucose (FDG) ou à la 18-fluorodopamine (18-FDOPA)). Le traitement repose sur l'exérèse chirurgicale après préparation du patient pour éviter une crise adrénargique par relargage de catécholamines lors de l'opération.

### *1.2 Neuroblastome<sup>92</sup>*

Le neuroblastome est une tumeur quasi-exclusivement pédiatrique, la majorité des cas étant diagnostiquée avant 5 ans. Il s'agit du cancer pédiatrique le plus fréquent, avec une survie globale inférieure à 40%. La présentation la plus fréquente est une masse abdominale non douloureuse. Le traitement repose principalement sur une exérèse chirurgicale, qui doit souvent

être complétée en fonction du niveau de risque par une chimiothérapie, une MIBG-thérapie ou des thérapies ciblées.

## ***2. Tumeurs bénignes de la corticosurrénale : hyperplasies, pathologies nodulaires et adénomes***

Les avancées dans la compréhension de la tumorigenèse surrénalienne au niveau physiopathologique et moléculaire ont amené récemment à une grande refonte de la classification des tumeurs surrénaliennes par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS)<sup>93</sup>. Cette nouvelle classification 2022 colle au plus près avec le type histo-pathologique de prolifération au sein du cortex surrénalien et distingue désormais les hyperplasies, les maladies nodulaires, les adénomes et les carcinomes<sup>93</sup>.

### *2.1 Hyperplasies*

Auparavant, les hyperplasies regroupaient un spectre large de pathologies allant de l'hyperplasie au sens propre à l'organisation des cellules en nodules, notamment :

- l'hyperplasie primaire macronodulaire bilatérale des surrénales (HPMBS, de l'anglais « primary macronodular bilateral adrenal hyperplasia » ou PMBAH),
- l'hyperplasie micronodulaire bilatérale des surrénales (HMBS, de l'anglais « micronodular bilateral adrenal hyperplasia ou MiBAH),
- l'hyperplasie congénitale des surrénales (HCS),
- l'hyperplasie secondaire à une sécrétion d'ACTH<sup>94</sup>,
- l'hyperplasie bilatérale des surrénales (dans le cas des hyperaldostéronismes primaires)...

La nouvelle classification de l'OMS ne valide plus le terme d'« hyperplasie nodulaire » pour les nodules corticaux non fonctionnels, du fait de la nature clonale de la prolifération cellulaire qui sous-tend leur formation. Ainsi ces nodules, auparavant regroupés au sein des hyperplasies,



sont désormais désignés sous le terme de « maladie corticosurrénalienne nodulaire sporadique ».

Pour les mêmes raisons, les termes historiques d'« hyperplasie bilatérale macronodulaire / micronodulaire des surrénales » sont désignées par le terme « maladie micro ou macronodulaire du cortex surrénalien » et classifiées au sein des tumeurs bénignes. Enfin, les hyperplasies bilatérales des surrénales, dans le cadre du diagnostic d'hyperaldostéronisme, ont été séparées en plusieurs entités selon la classification HISTALDO.

Ainsi, dans la nouvelle classification de l'OMS 2022, le terme d'hyperplasie n'est associé qu'à l'HCS et l'hyperplasie surrénalienne « diffuse ».

- L'HCS est une pathologie de transmission récessive caractérisée par un dysfonctionnement d'une enzyme de la stéroïdogénèse<sup>94</sup>. On dénombre 7 types d'HCS en fonction de l'enzyme ou du co-facteur enzymatique dysfonctionnel : P450<sub>scc</sub>, StAR, CYP21A2 (sous-type le plus fréquent), CYP11A1, CYP11B1, 3βHSD2 et POR. Le déficit en glucocorticoïdes induit une élévation chronique de l'ACTH, qui va en retour stimuler la croissance du cortex surrénalien, produisant ainsi une hyperplasie.

- L'hyperplasie surrénalienne diffuse est en lien avec une stimulation du cortex de la glande par une sécrétion inappropriée d'ACTH, qu'elle soit d'origine hypophysaire, en lien avec une tumeur hypothalamique ou en lien avec une sécrétion ectopique d'ACTH<sup>93</sup>.

- Enfin, très rarement, on peut décrire une hyperplasie diffuse de la ZG, sans nodule, produisant de l'aldostérone, caractérisée par un marquage CYP11B2 d'au moins 50% des cellules.

## *2.2 Pathologies nodulaires*

Avec la nouvelle classification OMS 2022, l'HPBMS et l'HMIBS font donc partie de la nouvelle catégorie des pathologies nodulaires de la surrénale. Ceci est notamment en lien avec la présence d'altérations génétiques impliquées dans la formation de ces tumeurs (Tableau 4)<sup>95,96</sup>.

Le groupe des pathologies nodulaires est ainsi divisé en :

- pathologie corticosurrénaliennne nodulaire sporadique (PCSNS),
- pathologie corticosurrénaliennne macronodulaire bilatérale (PCSMaB, remplace l'ancienne HPBMS) (Figure 6).
- pathologie corticosurrénaliennne micronodulaire bilatérale (PCSMiB, remplace l'ancienne HMiBS). La PCSMiB est elle-même sous-divisée en :
  - « Maladie nodulaire corticosurrénaliennne pigmentée » (MNCSP, de l'anglais « primary pigmented nodular adrenocortical disease » ou PPNAD)
  - et en « Maladie micronodulaire corticosurrénaliennne isolée » (MMCSi, de l'anglais « isolated micronodular adrenocortical disease » ou i-MAD).

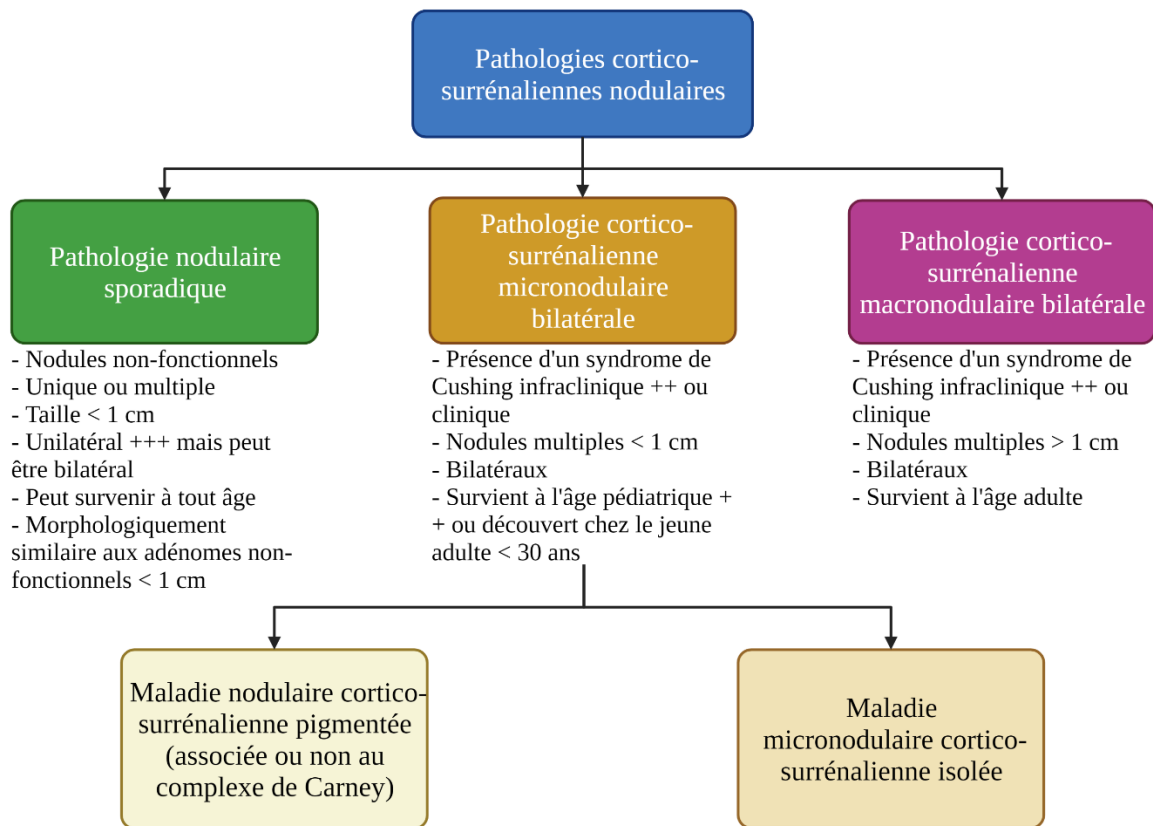
PCSMaB	PCSMiB	
	<i>MNCSP</i>	<i>MMCS-i</i>
ARMC5 KDM1A MEN1 APC FH GNAS1	PRKAR1A CNC2 locus 2p16 CTNNB1	PDE11A PDE8B PRKACA

**Tableau 4 : Altérations génétiques dans les pathologies corticosurréaliennnes macro et micronodulaires bilatérales responsables d'une sécrétion de cortisol**

Au plan clinique, brièvement :

- La PCSMaB est une pathologie en général sporadique, apparaissant autour de 50 ans, caractérisée par des nodules de plus de 1 cm, dans les deux glandes surrénales. Certaines formes pédiatriques sont associées au syndrome de McCune-Albright. Les patients peuvent présenter un hypercorticisme clinique (syndrome de Cushing) mais ont plus souvent une sécrétion infraclinique de cortisol. De manière plus rare, la PCSMaB peut être associée à une sécrétion hormonale mixte, avec aldostérone ou androgènes. Au niveau génétique, les PCSMaB sporadiques ou familiales présentent une mutation de ARMC5 dans 25 à 55% des cas<sup>97,98</sup>, de GNAS1<sup>99</sup> ou de sous-types variés des récepteurs couplés aux protéines G<sup>94</sup>. Les formes syndromiques sont en lien avec des mutations de MEN1, APC ou de FH.

- La MNCSP est la forme la plus commune de PCSMiB, caractérisée par des surrénales envahies par de multiples micronodules de taille inférieure à 1 cm, pigmentés par de la lipofuscine et avec une atrophie internodulaire à l'examen histologique. Elle se manifeste en général avant 3 ans, mais est en fait souvent diagnostiquée chez le jeune adulte. Comme la PCSMaB, elle peut se manifester par un syndrome de Cushing clinique ou infraclinique. La MNCSP peut être sporadique, familiale, mais est dans 60% des cas en lien avec un complexe de Carney. Le complexe de Carney est un syndrome de transmission autosomique dominant associant une pigmentation tachetée de la peau (lentigines ou nevi bleus), des myxomes et des troubles endocriniens divers (acromégalie, tumeurs thyroïdiennes, tumeurs testiculaires...), dans 80% des cas, dû à une mutation de PRKAR1A.
- La MMCSi a des caractéristiques cliniques et morphologiques identiques à la MNCSP mais présente des micronodules non pigmentés et ne présente pas d'atrophie inter-nodulaire. Cette pathologie est en réalité très rare.



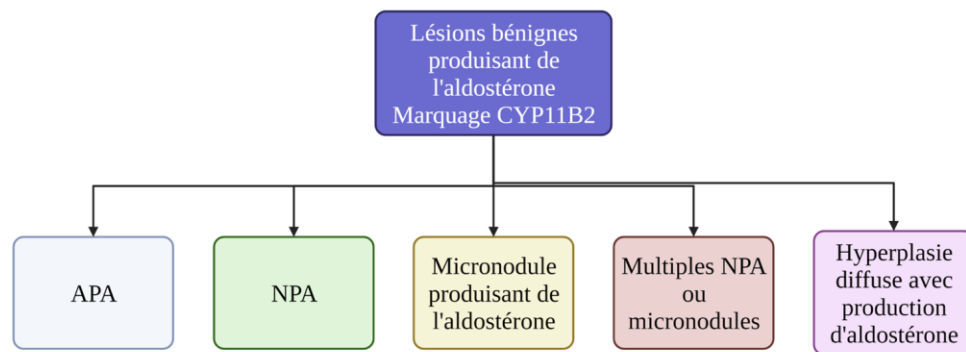
**Figure 6 : Nouvelle classification des pathologies nodulaires surréaliennes selon l'OMS 2022**

Adapté de Mete et al, *Endocrine Pathology*, 2022

On peut également ajouter à cette catégorie les nodules produisant de l'aldostérone : la nouvelle classification OMS distingue les adénomes producteurs d'aldostérone (APA) des nodules producteurs d'aldostérone (NPA), eux-mêmes distingués des micronodules producteurs d'aldostérone (anciennement dénommés « Cluster cellulaire producteur d'aldostérone », de l'anglais « Aldosterone producing cell clusters »). Cette classification est basée sur la classification HISTALDO<sup>100</sup> (Figure 7). Pour résumer, cette classification détermine la nature nodule / adénome en fonction de la typologie du marquage CYP11B2 en immunohistochimie. L'APA est décrit en 2.3.2.

Le NPA et le micronodule mesurent moins de 1 cm et présentent un gradient de réactivité du marquage CYP11B2, qui est plus intense à l'extérieur. Ils sont distingués l'un de l'autre par leur architecture et par la coloration hématoxyline-éosine (H&E) : le NPA présente une

architecture similaire à l'APA, en 3 zones (ZG, ZF et ZR-like) et peut être différencié du tissu sain adjacent à la coloration H&E ; le micronodule est exclusivement composé d'une ZG-like et n'est pas différenciable du tissu sain adjacent avec la coloration H&E<sup>100</sup>. Lorsqu'il existe plusieurs NPA ou micronodules, il était d'usage de parler d' « hyperplasie nodulaire » ou d' « hyperplasie bilatérale des surrénales » (à différencier de la PCSMaB). Pour les mêmes raisons que celles détaillées en 2.1, ce terme doit être abandonné au profit du terme « multiples NPA / micronodules produisant de l'aldostérone ». La distinction histologique entre ces différentes entités peut paraître anecdotique puisque la traduction clinique reste un hyperaldostéronisme primaire, mais est en fait d'importance pour le clinicien. Ainsi les APA et les NPA sont définis comme des sous-types d'histologie « classique », les autres formes (micronodules, NPA/micronodules multiples et hyperplasie) étant des sous-types d'histologie « non classique ». Il a été montré que les formes classiques avaient une durée d'hypertension plus courte, un meilleur index de latéralisation, un potassium plus élevé au cours du suivi, un rapport aldostérone sur rénine (RAR) plus bas et une rémission biologique complète beaucoup plus fréquente.



Taille et nombre	Nodule unique $\geq$ 1 cm	Nodule unique < 1 cm	Nodule unique < 1 cm	Nodules multiples < 1 cm	Pas de nodule
Visible en H&E	Oui	Oui	Non	Dépend si NPA ou micronodule	/
Marquage CYP11B2	Intense, hétérogène ou homogène	Gradient de l'extérieur vers l'intérieur	Gradient de l'extérieur vers l'intérieur	Gradient de l'extérieur vers l'intérieur	Continu, au moins 50% des cellules
Architecture	ZG, ZF et ZR-like Possible hyperplasie paradoxale du tissu sain adjacent	ZG, ZF et ZR-like	ZG-like	Dépend si NPA ou micronodule	
Ancien nom			Cluster cellulaire producteur d'aldostérone	Hyperplasie micronodulaire ou hyperplasie bilatérale des surrénales	

**Figure 7 : Classification HISTALDO des lésions bénignes produisant de l'aldostérone**

Adapté de Mete et al, *Endocrine Pathology*, 2022

### 2.3 Adénomes

Les adénomes sont des tumeurs surrénaliennes bénignes. Ils peuvent sécréter du cortisol, de l'aldostérone ou être non fonctionnels. La sécrétion isolée de stéroïdes sexuels ne sera pas détaillée ici car elle reste exceptionnelle. Les différents types d'adénomes sont résumés dans le tableau 5.

Au niveau histologique, ils se présentent comme des tumeurs homogènes bien délimitées et souvent enrichies en cellules surrénaliennes riches en lipides, ce qui leur donne une couleur jaune. Il existe des variantes histologiques tels que les « adénomes noirs » qui sont pigmentés par la lipofuscine ou les adénomes à cellules oncocytaires, de teinte brune. Ils représentent 80% des incidentalomes surrénaux<sup>88</sup>.

### 2.3.1 Adénomes non-fonctionnels

Ces adénomes sont par définition cliniquement silencieux et représentent la grande majorité des adénomes (75%)<sup>88</sup>. Il s'agit donc exclusivement d'incidentalomes, découverts de façon fortuite à l'imagerie. Les différentes sociétés savantes ayant émis des recommandations quant à leur prise en charge s'accordent à dire que l'évaluation initiale doit comporter un test de freinage à la Dexaméthasone 1mg (cf. page 51) et une mesure des catécholamines plasmatiques ou urinaires à titre systématique<sup>88,101,102</sup>. Une évaluation du RAR est proposée chez les patients avec hypertension et / ou hypokaliémie. Le traitement de ces adénomes repose sur l'abstention thérapeutique en cas d'adénome < 4cm. Pour les adénomes  $\geq$  4 cm, une chirurgie peut être proposée<sup>88,101,102</sup>, avec quelques nuances entre les différentes sociétés au niveau du seuil de taille devant faire indiquer la chirurgie (4cm vs 6 cm vs augmentation de taille de 20%). En cas d'exérèse, on recommande de confirmer l'origine surrénalienne par immunomarquage SF-1<sup>93</sup>.

### 2.3.2 Adénomes producteurs d'aldostérone (adénomes de Conn)

L'hyperaldostéronisme primaire a été décrit par JW Conn en 1955<sup>103</sup> et est la cause la plus fréquente d'hypertension artérielle (HTA) secondaire (entre 10 et 25%). Pourtant, il est estimé que moins d'1% des patients avec hyperaldostéronisme primaire sont diagnostiqués<sup>104</sup>. Outre l'hypertension, l'hyperaldostéronisme primaire peut provoquer une hypokaliémie, des céphalées, une asthénie, une polyuro-polydipsie. Le diagnostic repose sur une élévation de l'aldostérone et du RAR<sup>105,106</sup>. La Société Française d'Endocrinologie (SFE) indique que si le RAR est supérieur au seuil diagnostique (selon unité de mesure) et l'aldostérone augmentée au-delà de 550pmol/L, le diagnostic est affirmé. Dans certaines situations de diagnostic incertain, un test de confirmation par charge sodée intraveineuse doit être réalisé<sup>106</sup>. Les APA sont responsable d'environ 40% des hyperaldostéronismes primaires<sup>107</sup> et représentent 2.5% des adénomes surrénaux<sup>88</sup>. De ce fait, la découverte d'une tumeur d'allure bénigne à la TDM

Type d' adénome	Fréquence	Présentation clinique	Diagnostic	Mutations somatiques
Adénome non-fonctionnel	75%	Aucun signe	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Suppression du cortisol après test à la dexaméthasone 1mg</li> <li>- Normalité des catécholamines plasmatiques et / ou urinaires</li> <li>- RAR normal et aldostérone normale</li> </ul>	CTNNB1
Adénome producteur d' aldostérone	12%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hypertension</li> <li>- Hypokaliémie</li> <li>- Asthénie</li> <li>- Polyuro-polydipsie</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- RAR &gt; seuil diagnostic</li> <li>- Aldostérone &gt; 550pmol/L</li> </ul>	KCNJ5 CACNA1D CACNA1H CLCN2 ATP1A1 ATP2B3
Adénome producteur de cortisol	2.5%	Syndrome de Cushing	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Elévation du cortisol urinaire des 24h OU</li> <li>- Absence de freinage du cortisol après test à la dexaméthasone 1mg OU</li> <li>- Elevation du cortisol salivaire à minuit</li> </ul>	PRKACA GNAS PRKAR1A PDE8B CTNNB1

**Tableau 5 : Principaux types d'adénomes surrénaliens**



peut être un simple incidentalome surrénalien et ne pas être la cause de l'hyperaldostéronisme. Il est donc préconisé de réaliser un cathétérisme des veines surrénaliennes après 35 ans pour s'assurer que l'hypersécrétion est unilatérale, est bien due à l'adénome visible à l'imagerie et qu'il est possible d'envisager un traitement chirurgical. Cet examen n'est pas nécessaire avant 35 ans. Si le diagnostic d'APA est confirmé, une chirurgie surrénalienne peut être envisagée. Sinon, on proposera un traitement médical, par Spironolactone en 1<sup>ère</sup> intention.

Au plan histologique, l'APA mesure au moins 1 cm (on parle de microadénome s'il mesure moins de 1 cm), et est composé de cellules claires et/ou de cellules éosinophiles compactes, avec une architecture pouvant évoquer une ZG, ZF et ZR-like<sup>100</sup>. Le marquage CYP11B2 est intense, hétérogène ou homogène. Le tissu surrénalien environnant l'APA est souvent composé d'une ZG hyperplasique, négative pour le marquage CYP11B2 : on parle d'hyperplasie paradoxale.

Au plan génétique, il a été montré que les APA étaient en lien avec des mutations somatiques dont la plupart sont responsables de mutations de canaux ioniques ou d'ATPase : Potassium Inwardly Rectifying Channel Subfamily J Member 5 (KCNJ5), Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 D (CACNA1D), Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 H (CACNA1H), Chloride Voltage-Gated Channel 2 (CLCN2), ATPase Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> Transporting Subunit Alpha 1 (ATP1A1) ou encore ATPase Plasma Membrane Ca<sup>2+</sup> Transporting 3 (ATP2B3)<sup>108</sup>. Certains APA possèdent aussi une mutation de Catenin Beta 1 (CTNNB1), le gène de la β-Caténine, mais nécessitent une seconde mutation pour être capables de produire de l'aldostérone.

### 2.3.3 Adénomes producteurs de cortisol (APCo)

Les APCo sont la cause la plus fréquente d'hypercorticisme (ou syndrome de Cushing) ACTH-indépendant, représentant environ 1/3 des syndromes de Cushing cliniques. Le syndrome de Cushing se caractérise par un spectre clinique varié avec des signes spécifiques tels que des vergetures pourpres, une fragilité cutanée avec un risque accru d'hématomes, une érythrose faciale, une amyotrophie des cuisses et du panicule adipeux fessier<sup>109</sup>. Les patients peuvent

aussi présenter des signes non-spécifiques tels qu'une fatigue, une prise de poids, des difficultés de concentration, un syndrome dépressif, l'accumulation de graisse en arrière du cou (« bosse de bison »), un visage rond dit « lunaire », des troubles du cycle menstruel, des difficultés de cicatrisation ou encore une peau fine. Le syndrome de Cushing peut enfin être compliqué d'hypertension, de diabète de type 2, de dyslipidémie, d'ostéoporose (parfois sévère, avec fractures) et est grevé par une importante morbidité cardiaque, ainsi qu'une susceptibilité aux infections opportunistes et aux thromboses<sup>110,111</sup>. La description de l'ensemble de ces symptômes peut sembler typique, et pourtant, rares sont les patients présentant l'ensemble des signes. De fait, leur association à divers degrés rend le diagnostic difficile. On estime qu'il existe en moyenne un délai de 2 à 4 ans entre les premiers signes cliniques et le diagnostic<sup>112,113</sup>. Le diagnostic d'hypercorticisme d'origine surrénalienne est basé sur la confirmation d'une hypersécrétion de cortisol associée à un niveau abaissé d'ACTH. L'hypersécrétion de cortisol peut être dépistée par une élévation du cortisol urinaire des 24h sur deux prélèvements OU sur l'absence de freinage du cortisol après test à la dexaméthasone 1mg OU sur l'élévation du cortisol salivaire à minuit (2 prélèvements)<sup>109</sup>. Devant un tel tableau biologique, le diagnostic d'adénome sera confirmé par un scanner surrénalien en coupe fine, montrant une image de tumeur surrénalienne avec critères de bénignité : densité < 10 unités Hounsfield (UH), wash out absolu > 60 % ou wash out relatif > 40%<sup>88</sup>.

L'augmentation croissante des incidentalomes surrénaliens à l'imagerie et leur exploration hormonale a accru le nombre de découverte d'hypercorticisme dit « infraclinique » : les patients présentent une sécrétion modérée et non contrôlée de cortisol, pouvant impacter ou non les paramètres métaboliques des patients (diabète, hypertension, dyslipidémie), mais sans autre signe clinique. L'hypercorticisme infraclinique est également associé à une plus grande mortalité et une plus grande morbidité cardiovasculaire<sup>114,115</sup>. Les différentes sociétés savantes recommandent donc toutes la réalisation d'un test de freinage à la Dexaméthasone 1mg devant un incidentalome pour éliminer un APCo : ce test repose sur le rétrocontrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire. En effet, l'administration de 1mg de Dexaméthasone entre 22h et

23h doit inhiber l'ACTH et le pic de sécrétion matinal de cortisol. Un APCo est formellement éliminé si le cortisol à 8h le lendemain de la prise de Dexaméthasone est  $< 50\text{nmol/L}$ <sup>88</sup>.

Une fois le diagnostic d'APCo posé, le traitement repose sur l'exérèse chirurgicale de la surrénale adénomateuse<sup>116</sup>.

Au plan histologique, l'APCo est caractérisé par une atrophie corticale, avec notamment une ZF très fine voire absente<sup>93</sup>.

Les avancées génétiques récentes ont permis de montrer que les APCo possédaient fréquemment des mutations somatiques : environ 30% à 40% des APCo ont une mutation de PRKACA<sup>117,118</sup>, le gène codant pour la sous-unité catalytique C $\alpha$  la PKA, ce qui provoque une activité constitutive de la voie PKA/AMPC. De façon intéressante, cette activation de la voie de signalisation PKA est retrouvée plutôt dans les APCo responsable d'un syndrome de Cushing clinique ; ces APCo présentent par ailleurs une haute expression des microARN (miRs) du cluster DLK1-MEG3 (locus 14q32)<sup>119</sup>. Par ailleurs, une activation de la voie Wnt/ $\beta$ -Caténine a été retrouvée dans 25% des APCo, plutôt associée à une sécrétion infraclinique de cortisol. De façon plus marginale, des mutations somatiques de GNAS, PRKAR1A et PDE8B ont également été retrouvées<sup>117</sup>.

### **3. Tumeur maligne : le carcinome corticosurrénalien (CCS)**

#### *3.1 Epidémiologie*

Le CCS est un cancer rare du cortex surrénalien. Sur les plus anciennes séries, son incidence est estimée entre 0.7 et 2 cas par millions d'habitant par an<sup>120,121</sup>. Une série plus récente, publiée en 2018, a identifié 2014 cas de CCS entre 1973 et 2014 aux Etats-Unis, soit une incidence de 1.02 par million d'habitant par an<sup>122</sup>. Par ailleurs, on estime que les CCS représentent 15% des incidentalomes surrénaliens<sup>123,124</sup>.

Le pic d'incidence se situe entre 40 et 60 ans, avec une légère prédominance de la maladie chez les femmes (60% des cas diagnostiqués)<sup>120-122,125</sup> et une nette prédominance chez les patients caucasiens<sup>121,122</sup>.

Chez les enfants, le CCS représente 0.2% des cancers pédiatriques et son incidence est estimée à 0.2-0.38 cas par million d'habitants par an<sup>126</sup>. Cette incidence est 10 fois plus élevée dans le sud du Brésil<sup>127,128</sup>, en lien avec une forte proportion de mutation germinale de TP53<sup>129</sup>, en particulier la mutation R337H. Là encore, il existe une prédominance de la maladie chez les petites filles<sup>127,130,131</sup>.

### 3.2 Syndromes de prédisposition génétique

Les CCS de l'adulte sont dans la grande majorité des cas sporadiques, mais peuvent dans environ 10% des cas être liés à un syndrome de prédisposition génétique<sup>132</sup> (Tableau 6). Les syndromes de prédisposition génétique surviennent dans le cadre de mutations germinales, transmises de façon héréditaire ou étant apparues *de novo*. Outre les CCS en lien avec des mutations germinales, une grande partie des CCS sporadiques possède des altérations moléculaires et génétiques somatiques : cet aspect sera développé en point 1-II.3.7.

#### 3.2.1 Syndrome de Li-Fraumeni

Ce syndrome, décrit pour la première fois en 1969<sup>133</sup>, est lié à une mutation germinale du gène suppresseur de tumeur TP53<sup>134</sup>, localisé sur le chromosome 17p13 et impliqué dans la réponse au stress cellulaire. Les cancers les plus fréquemment associés à ce syndrome sont le CCS, le cancer du sein, les tumeurs du système nerveux central, les ostéosarcomes et les sarcomes des tissus mous. Environ 5% des adultes présentant un CCS ont une mutation germinale de TP53<sup>135</sup>, dont environ 25% sont des mutations *de novo*<sup>132</sup>. Chez l'enfant toutefois, plus de 50% des CCS sont en lien avec une mutation germinale de TP53<sup>136</sup>. Comme mentionné dans le point 1-II.3.1, la prévalence de la mutation de TP53 est particulièrement importante dans la région du Brésil du Sud.

#### 3.2.2 Syndrome de Lynch<sup>137</sup>

Le syndrome de Lynch a été décrit en 1966<sup>138</sup> et est lié à une mutation germinale des gènes impliqués dans la réparation des mésappariements de l'ADN : MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2. Le processus de mésappariement survient lors de la répllication de l'ADN : lors de la synthèse

du nouveau brin d'ADN, un nucléotide incorrect va être incorporé et les deux bases de l'ADN ne seront pas complémentaires. Afin d'éviter la réplication en série de cette erreur, les gènes de réparation du mésappariement constituent un mécanisme de protection en reconnaissant et corrigeant la base erronée. Le dysfonctionnement d'un de ces gènes peut causer des altérations dans les séquences répétitives du génomes, appelées séquences microsatellites : on parle alors d'instabilité des microsatellites. Le cancer le plus fréquent en lien avec ce syndrome est le cancer colorectal, suivi par le cancer de l'endomètre. Le CCS a une prévalence de l'ordre de 0.47 à 3.2% dans les patients atteints d'un syndrome de Lynch<sup>126</sup> et environ 3% des patients avec CCS ont une mutation dans les gènes responsable du syndrome de Lynch<sup>132</sup>.

### 3.2.3 Néoplasie endocrinienne multiple de type 1 (NEM1)

La NEM1 est liée à une mutation du gène suppresseur de tumeur de la ménine, localisé sur le chromosome 11q13, et impliqué dans la régulation de la transcription<sup>139</sup>. Elle associe des adénomes parathyroïdiens, des tumeurs hypophysaires et des tumeurs neuroendocrines pancréatiques. Dans de rares cas, elle peut être responsable de CCS. On estime qu'environ 1.4% des patients atteints de NEM1 développent un CCS<sup>140,141</sup>.

### 3.2.4 Autres syndromes

Les autres syndromes seront détaillés très succinctement car leur prévalence est inférieure à 1%.

- La **polypose adénomateuse familiale (PAF)** est une maladie autosomique dominante en lien avec une mutation du gène suppresseur de tumeur Adenomatous Polyposis Coli (APC), membre du complexe de dégradation de la  $\beta$ -Caténine. Les mutations d'APC provoquent une activation constitutive de la voie de signalisation  $\beta$ -Caténine, fréquemment activée dans les cancers. Ce point sera développé dans le point 1-III. La survenue de CCS dans la PAF reste rare, cantonnée à des cas cliniques rapportés dans la littérature<sup>142</sup>. Une étude sur 311 patients atteints de PAF n'a trouvé qu'un seul patient atteint de CCS<sup>143</sup>.

- Le **syndrome de Beckwith-Wiedemann** est un syndrome diagnostiqué dans l'enfance, lié à une altération de la région chromosomique 11p15.5, aboutissant à une surexpression d'Insulin-

Like Growth Factor 2 (IGF2), gène surexprimé dans plus de 80% des CCS. Il se manifeste par une macrosomie fœtale, une héli-hypertrophie, une macroglossie et une viscéralomégalie, et est associé à un risque plus important de tumeurs embryonnaire et de CCS<sup>144</sup>. Environ 1-5% des patients atteints de ce syndrome présentent un CCS<sup>142</sup>.

- Le **complexe de Carney** est lié à une mutation du gène PRKAR1A, comme déjà mentionné en 2.2. La prévalence des CCS dans cette pathologie est très rare, avec seulement quelques cas décrits dans la littérature<sup>145</sup>.

- La **neurofibromatose de type 1** est une maladie autosomique dominante liée à une mutation du gène suppresseur de tumeur NF1, localisé sur le chromosome 17q11 et codant pour la neurofibromine. Elle se manifeste par des tâches cutanées café-au-lait, des neurofibromes, et des sarcomes. Une dizaine de cas de CCS chez des patients atteints de neurofibromatose de type 1 sont rapportés dans la littérature<sup>142,146</sup>.

Syndrome	Mutation germinale	Prévalence
Li-Fraumeni	TP53	≈ 5% chez l'adulte, ≥ 50% chez l'enfant
Lynch	MLH1, MSH2, MSH6, PMS2	≈ 3 %
NEM1	MEN1	≈ 1.5%
Polypose adénomateuse familiale	APC	< 1%
Syndrome de Beckwith Wiedemann	H19, IGF2	< 1%
Complexe de Carney	PRKAR1A	< 1%
Neurofibromatose de type 1	NF1	< 1%

**Tableau 6 : Principaux syndromes de prédisposition génétique aux CCS**

### 3.3 Evaluation du stade du CCS (« Staging »)

La détermination du stade du CCS est un élément décisionnel majeur pour le traitement et un élément déterminant du pronostic. Un premier staging pré-opératoire est réalisé, guidant la décision de traitement. Ce staging est affiné en per et post-opératoire, notamment grâce l'ensemble des éléments anatomopathologiques (découverte d'un envahissement ganglionnaire

par exemple). Il est un élément important de la classification pronostique des patients selon leur risque de récurrence : cet aspect sera abordé en point 1-II.3.5.6.

Comme pour d'autres cancers, le stade tumoral est basé sur la classification Tumor (T) Node (N) Metastasis (M). Le T évalue la taille de la tumeur et son extension locale, le N évalue la présence d'envahissement ganglionnaire et le M évalue la présence de métastase (Tableau 7). Aux différents TNM correspond un stade, coté entre I et IV. La classification américaine initiale de l'American Joint Committee on Cancer (AJCC) a été adaptée pour correspondre aux stades proposés par le réseau de recherche européen sur les tumeurs de la surrenales ENSAT (European Network for the Study of Adrenal Tumors) (Tableau 8)<sup>147,148</sup>. En effet, la classification ENSAT 2008 permettait de mieux stratifier les patients selon leur pronostic. Le stade I et le stade II correspondent aux tumeurs limitées à la surrenale, sans envahissement ganglionnaire ni métastase à distance. Le stade III correspond aux formes intermédiaires : il inclut les tumeurs limitées à la surrenale avec envahissement ganglionnaire et les tumeurs avec envahissement de la graisse péri-surrénalienne, des organes ou des structures vasculaires de voisinage, avec envahissement ganglionnaire ou non, mais toujours sans métastase à distance. Le stade IV correspond aux CCS avec métastases à distance, quelle que soit la taille et le statut d'envahissement ganglionnaire.

<i>T</i>	T1 : tumeur localisée $\leq 5$ cm T2 : tumeur localisée $> 5$ cm T3 : infiltration de la graisse péri-surrénalienne, quelle que soit la taille T4 : invasion d'un ou plusieurs organe(s) adjacent(s) quelle que soit la taille de la tumeur OU présence d'un thrombus veineux dans la veine cave ou la veine rénale.
<i>N</i>	N0 : absence d'envahissement ganglionnaire N1 : présence d'envahissement ganglionnaire
<i>M</i>	M0 : absence de métastase à distance M1 : présence de métastase(s) à distance

**Tableau 7 : Classification TNM du CCS**

T1, N0, M0	Stade I
T2, N0, M0	Stade II
T3-T4, N0, M0 Tous T, N1, M0	Stade III
Tous T, tous N, M1	Stade IV

**Tableau 8 : Correspondance entre les classifications ENSAT 2008 / AJCC 8<sup>ème</sup> édition et le stade de la maladie**

Adapté de Fassnacht et al, *Cancer*, 2009  
et de Amini et al, AJCC Cancer Manual Staging 8th edition, 2018, Suisse : Springer International Publishing

### 3.4 Diagnostic

#### 3.4.1 Présentation clinique

Nous avons déjà évoqué le diagnostic fortuit de CCS lors de l'exploration d'un incidentalome surrénalien, dont les critères scannographiques ne sont pas en faveur de la bénignité. Outre ce mode de révélation fortuit, les CCS se manifestent par un syndrome tumoral et / ou par un syndrome d'hypersécrétion hormonale.

- Le **syndrome tumoral** est présent chez environ 30% des patients, en lien avec la présence d'une masse abdominale, et se manifeste par une douleur abdominale, dorsale, une masse palpable ou des signes de compression locaux ou en lien avec des métastases<sup>125,149</sup>. En effet, à la découverte, le CCS a dans l'immense majorité des cas une taille entre 4 et 30 cm, avec une taille moyenne de 11.4 à 14 cm<sup>125,150-153</sup>. Par ailleurs, entre 50 et 71% des patients sont diagnostiqués à un stade localement avancé ou métastatique, dont 20-30% avec des métastases à distance<sup>120,121,147,154-156</sup>. Les métastases à distance sont principalement localisées aux poumons, au foie et à l'os<sup>147,155-157</sup>. Toutefois, ce mode de révélation est relativement tardif.

- Le **syndrome d'hypersécrétion hormonale** est beaucoup plus fréquent, présent chez 50 à 70% des patients<sup>125,149,158</sup>. Le syndrome d'hypersécrétion le plus fréquent est l'hypercorticisme, associé ou non à une autre sécrétion hormonale : il représente environ 88% des syndromes d'hypersécrétion, et est associé dans environ 47% des cas à une hypersécrétion d'androgènes<sup>125</sup>. L'existence d'une sécrétion bi- ou tri-hormonale est fortement évocatrice de malignité, les



tumeurs bénignes ne pouvant sécréter qu'un seul type de stéroïde. Les CCS produisant du cortisol sont associés à une plus forte mortalité et un plus haut risque de récurrence<sup>158</sup>.

Les hypersécrétions d'aldostérone et d'œstrogènes (seules ou associées à une sécrétion de cortisol ou d'androgènes) représentent respectivement moins de 10% et 5% des hypersécrétions.

Cliniquement, l'hypercorticisme va se traduire par un syndrome de Cushing ACTH-indépendant, dont nous avons déjà détaillé les caractéristiques dans la partie 2.3.3.

L'hypersécrétion d'androgènes chez la femme va se traduire par une « virilisation » avec des symptômes tels que l'hirsutisme, l'acné ou l'aménorrhée.

Les explorations hormonales devant une suspicion de CCS sont résumées dans le tableau 9, page 59.

#### 3.4.2 Critères radiologiques

La TDM, l'IRM et la TEP-18FDG sont les 3 éléments clés de l'imagerie dans le CCS. La TDM et l'IRM sont surtout utiles pour le diagnostic d'exclusion du CCS.

- La **TDM** est très utile pour distinguer les CCS des adénomes. Comme mentionné dans le point 1-II.2.3.3, les adénomes ont un haut contenu en graisse, ce qui se traduit par une densité spontanée inférieure à 10 UH. Par ailleurs, ils captent et éliminent rapidement le produit de contraste scannographique : ce phénomène est appelé « wash out ». Un wash out relatif supérieur à 40% ou absolu supérieur à 60% est en faveur de la bénignité<sup>88</sup>. Par opposition, une tumeur ne respectant pas ces 3 critères est un potentiel CCS.

- L'**IRM** peut apporter un complément à la TDM en cas de tumeur de densité spontanée supérieure à 10 UH. On utilise alors les séquences dites « de phase » et « en opposition de phase ». Une diminution du signal observée dans la séquence « en opposition de phase » est en faveur d'un adénome, alors qu'une absence de diminution de signal est en faveur d'une lésion maligne ou d'un phéochromocytome<sup>159</sup>.

- La **TEP-18FDG** se base sur la captation de FDG marqué par les différents organes. Si tous les organes ont besoin de glucose pour fonctionner, les tumeurs malignes vont avoir une

captation de glucose plus élevée que les organes sains ou les tumeurs bénignes. Cette technique peut toutefois être prise en défaut car tout processus consommateur de glucose va entraîner une hypercaptation du 18FDG (processus inflammatoire, cicatrisation, tumeur bénigne hyperfonctionnelle...). Ainsi, certains adénomes et phéochromocytomes peuvent aussi présenter une hypercaptation de 18FDG. Pour le CCS, on utilise le rapport « surrénale sur foie ». Un seuil de 1.8 pour ce rapport possède une sensibilité de 87% et une spécificité de 91%<sup>159</sup>. Du fait de ces performances imparfaites, l'utilisation systématique du TEP-18FDG dans le diagnostic des CCS n'est pas recommandé par la Société Européenne d'Endocrinologie (European Society of Endocrinology, ESE)<sup>123</sup>.

En plus de l'apport de l'imagerie pour le diagnostic de CCS, ces diverses modalités radiologiques sont utiles pour le bilan d'extension. Les explorations radiologiques devant une suspicion de CCS sont résumées dans le tableau 9.

<b>Explorations hormonales</b>	
Diagnostic d'hypercorticisme	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Test de freinage à la Dexaméthasone 1mg si syndrome de Cushing absent ou modéré</li> <li>- Cortisol urinaire des 24h si syndrome de Cushing clinique évident</li> <li>- ACTH (si hypercorticisme confirmé)</li> </ul>
Diagnostic d'hypersécrétion de stéroïdes sexuels	<ul style="list-style-type: none"> <li>- SDHEA</li> <li>- 17OH-progestérone</li> <li>- <math>\Delta</math>4-androsténédione</li> <li>- Testostérone chez la femme</li> <li>- 17<math>\beta</math>-œstradiol chez l'homme ou chez la femme ménopausée</li> <li>- 11-Déoxycortisol</li> </ul>
Diagnostic d'hyperaldostéronisme	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Potassium</li> <li>- RAR chez les patients avec hypertension ou hypokaliémie</li> </ul>
Élimination d'un phéochromocytome	- Dosage des catécholamines urinaires ou plasmatiques
<b>Explorations morphologiques</b>	
Diagnostic	<ul style="list-style-type: none"> <li>- TDM surrénalien</li> <li>+/- IRM surrénalienne</li> <li>- TEP-18FDG (désaccord des experts sur ce point)</li> </ul>
Bilan d'extension	<ul style="list-style-type: none"> <li>- TDM thoracique</li> <li>- TEP-18FDG (désaccord des experts sur ce point)</li> <li>- IRM cérébrale si suspicion de métastase cérébrale</li> <li>- Imagerie osseuse si suspicion de métastase osseuse</li> </ul>

**Tableau 9 : Principales explorations à réaliser en cas de suspicion de CCS**

Adapté de Fassnacht et al, *Eur J Endocrinol*, 2018

- Enfin, la biopsie de la tumeur assistée par l'imagerie n'est pas recommandée<sup>88,123</sup> du fait de difficultés à établir un diagnostic histologique sur ce type de prélèvement, du risque hémorragique et surtout du risque de dissémination métastatique. La biopsie n'est envisagée que si (1) la lésion est non-sécrétante ET (2) la lésion n'a pas pu être déterminée formellement comme étant une lésion bénigne à l'imagerie ET (3) l'histologie a une importance particulière pour le traitement, en particulier chez les patients avec une autre pathologie cancéreuse pré-existante<sup>88</sup>.

### 3.4.3 Critères histologiques

*Le diagnostic de tumeur d'origine corticosurrénalienne* (par opposition aux métastases surrénaliennes d'un autre primitif) repose sur l'analyse des marqueurs immunohistochimiques. La coloration H&E permet en général de bien différencier une tumeur corticosurrénalienne d'une tumeur d'une autre origine. En cas de doute, l'usage d'un immunomarquage Steroidogenic Factor-1 (SF-1) est recommandé. Ce marqueur est positif dans les tumeurs corticosurrénalienne et est le marqueur le plus performant avec une sensibilité de 98% et une spécificité de 100%<sup>123</sup>.

En cas d'indisponibilité de ce marqueur, l'utilisation combinée de marqueurs tels que inhibine alpha, melan-A et calrétinine est recommandée<sup>123</sup>. Ces marqueurs sont positifs dans entre 65 et 92.5% des cas de CCS<sup>160</sup>. D'autres marqueurs tels que SRC-1 (Steroid Receptor Coactivator-1) sont positifs dans plus de 90% des CCS<sup>160</sup>. Enfin, les CCS n'expriment pas ou peu la chromogranine A (5% des cas)<sup>160</sup>, ce qui permet de les différencier des phéochromocytomes.

*Le diagnostic de malignité d'une tumeur corticosurrénalienne* de l'adulte repose sur l'utilisation de scores anatomopathologiques, le plus utilisé étant le score de Weiss, publié en 1984<sup>161</sup>. Le score de Weiss, détaillé dans le tableau 10, comporte 9 items, chacun cotant pour 1 point s'il est présent. Le diagnostic de CCS est porté sur un score de Weiss supérieur ou égal à 3. Un score de Weiss  $\geq 3$  a une sensibilité de 100% et une spécificité de 96% pour diagnostiquer

la malignité<sup>151</sup>. Toutefois, le score n'a jamais fait l'objet d'une validation en bonne et due forme, de l'avis même de la Société Européenne d'Endocrinologie<sup>123</sup>.

Il existe plusieurs sous-types de CCS, avec en plus du sous-type classique, des variants oncocytaire, myxoïde ou sarcomatoïde<sup>93,162</sup>. Pour ces variants, l'utilisation du score de Weiss n'est pas toujours appropriée<sup>162,163</sup>.

- Le **variant oncocytaire** est composé d'au moins 50% de cellules oncocytaires, c'est-à-dire possédant un cytoplasme éosinophile. Le score de Weiss n'est pas utilisable dans sa forme classique car 3 des critères du score (haut grade nucléaire, architecture diffuse et < 25% de cellules claires) sont intrinsèquement liés à la nature oncocytaire du CCS. L'utilisation du score de Lin-Weiss-Bisceglia est donc recommandée (Tableau 11)<sup>162,164</sup>. Ce score définit 3 critères majeurs et 4 critères mineurs. La présence d'un critère majeur suffit à affirmer la malignité, l'absence de tous les critères affirme la bénignité. La présence d'un critère mineur classe la tumeur comme « de potentiel malin incertain » ou « borderline ».

<b>Critère</b>
<i>Architectural</i> Nécrose Architecture diffuse > 30% du volume tumoral ≤ 25% de cellules claires
<i>Cytologique</i> Haut grade nucléaire (grade 3 et 4 de Fuhrman et al, <i>Am J Surg Pathol</i> , 1982) > 5 mitoses pour 50 par champs (fort grossissement) Présence de mitoses atypiques
<i>D'invasion</i> Présence d'invasion capsulaire Présence d'invasion veineuse Présence d'invasion lymphatique

**Tableau 10 : Score de Weiss non modifié**

Chaque item vaut 1 point lorsqu'il est présent. Un score  $\geq 3$  pose le diagnostic de CCS.  
Adapté de Weiss, *Am J Surg Pathol*, 1984 et de Papotti et al, *Horm Canc*, 2011

<b>Critère</b>
<i>Majeur</i> > 5 mitoses pour 50 champs (fort grossissement) Présence de mitoses atypiques Présence d'invasion veineuse
<i>Mineur</i> Nécrose Présence d'invasion capsulaire Présence d'invasion lymphatique Tumeur de grande taille (> 10 cm et / ou > 200 g)

**Tableau 11 : Score de Lin-Weiss-Bisceglia**

Adapté de Bisceglia, *Int J Surg Pathol*, 2004

- Le **variant myxoïde** est caractérisé par des dépôts et un stroma myxoïdes (mucineux). Ce stroma rend difficile l'analyse des critères d'invasion du score de Weiss. De fait, il a été proposé de considérer les tumeurs myxoïdes comme suspectes de malignité *a priori*<sup>163</sup>.

- Le **variant sarcomatoïde** est très rare, caractérisé par une composante mésenchymateuse, avec moins de 30 cas rapportés dans la littérature<sup>165</sup>. Il est caractérisé par une perte de la différenciation corticale. Son diagnostic ne pose en général aucun problème.

De plus, en population pédiatrique, le score de Weiss est difficilement applicable puisque les critères d'architecture diffuse, de pourcentage de cellules claires et d'invasion lymphatique semblent moins pertinents.

Un autre problématique du score de Weiss est celle de sa reproductibilité. En effet, certains paramètres sont subjectifs et l'application du score de Weiss n'est pas toujours aisée<sup>163</sup>. En particulier, le grade nucléaire, l'architecture diffuse et l'invasion lymphatique sont les critères les moins reproductibles entre les différents pathologistes<sup>151,166</sup>.

De plus, certaines tumeurs avec un score de Weiss égal à 3 ne récidivent pas, ce qui est un argument pour leur bénignité<sup>151,153</sup>. De fait, environ 10% des tumeurs sont dites « suspectes », difficilement classifiables ou classifiées différemment selon l'anatomopathologiste réalisant l'examen, avec un potentiel de malignité indéterminé. Pour améliorer la précision du diagnostic, plusieurs autres scores ont été proposés (Tableau 12) :

- Le **score de Weiss modifié**, ne prenant en compte que les 5 critères les plus reproductibles entre les pathologistes<sup>151</sup>. Ce score est coté sur 7 et chaque item est pondéré selon sa valeur diagnostique par un modèle de régression. Un score  $\geq 3$  définit la malignité.
- L'**algorithme de la réticuline** basé sur l'intégrité ou non du réseau de réticuline des tumeurs et 3 critères du score de Weiss (nombre de mitose, nécrose, invasion veineuse). La malignité est affirmée en cas d'altération du réseau de réticuline associée à la présence d'au moins un des 3 critères du score de Weiss. Ce score est présenté par ses auteurs comme ayant une sensibilité et une spécificité de 100%. L'évaluation de ce score sur une seconde cohorte a montré que la concordance entre pathologiste était de 75-86% pour l'algorithme de la réticuline, 88% pour le score de Weiss lorsqu'il était  $\geq 3$  mais seulement 24% si le score de Weiss était  $< 3$ <sup>167</sup>.
- Le **score d'Helsinki** a été initialement développé pour prédire efficacement le potentiel métastatique des tumeurs. Là encore, il s'agit d'un score composite basé sur le Ki67 et sur les critères les plus reproductibles du score de Weiss (nécrose et nombre de mitose), pondérés grâce à un modèle de régression logistique. Un score  $\geq 8.5$  diagnostique un CCS métastatique avec une sensibilité de 100% et une spécificité de 99.4%.

<b>Score de Weiss revisité</b>	
<i>Item</i>	<i>Score</i>
> 5 mitoses pour 50 champs (fort grossissement)	2
≤ 25% de cellules claires	2
Présence de mitoses atypiques	1
Nécrose	1
Présence d'invasion capsulaire	1
<b>Algorithme de la réticuline</b>	
Altération du réseau de réticuline +  Au moins un des 3 critères suivants : - > 5 mitoses pour 50 par champs (fort grossissement) - Nécrose - Présence d'invasion veineuse	
<b>Score d'Helsinki</b>	
<i>Item</i>	<i>Score</i>
Ki67 (en %)	Valeur du Ki67
> 5 mitoses pour 50 champs (fort grossissement)	3
Présence de nécrose	5

**Tableau 12 : Scores alternatifs de diagnostic du CCS**

Le score de Weiss revisité définit la malignité comme un score  $\geq 3$

L'algorithme de la réticuline définit la malignité comme l'altération du réseau de réticuline associé à au moins un des 3 critères présentés

Le score d'Helsinki diagnostique les CCS métastatiques pour un score  $\geq 8.5$

Le Ki67 a également été proposé comme marqueur de malignité mais le seuil diagnostique proposé pour discriminer les adénomes des carcinomes varie selon les cohortes<sup>168-172</sup>, avec des performances diagnostiques différentes en termes de sensibilité et spécificité. De plus, la concordance inter-observateurs entre les différents pathologistes dans l'estimation du Ki67 est loin d'être excellente<sup>172</sup>. Enfin, une étude a montré que le Ki67 était corrélé avec la taille de la tumeur et non avec le diagnostic de CCS<sup>173</sup>.

De fait, les recommandations de l'ESE préconisent l'emploi du score de Weiss classique, même si l'usage de ces scores alternatifs est possible<sup>123</sup>.

Par ailleurs, la classification OMS 2022 apporte quelques nouveautés dans le diagnostic histologique du CCS<sup>93</sup> et réaffirme certaines constatations de la classification 2017<sup>162</sup> :

- Elle souligne l'impact diagnostique de l'angio-invasion microscopique, définie par la présence d'un microthrombus pouvant contenir des plaquettes, en lien avec l'invasion tumorale au sein du vaisseau. Ainsi, la nouvelle classification OMS met en lumière l'apport diagnostique du marqueur CD61 (qui marque les plaquettes) dans le diagnostic de CCS.

- Elle propose l'utilisation des scores d'Helsinki et l'algorithme de la réticuline en complément du score de Weiss pour le diagnostic de CCS. Elle valide l'utilisation du score de Lin-Weiss-Bisceglia dans le CCS oncoytaire.

- Elle réaffirme que la présence d'un marquage IGF2 dans les granules juxtanucléaires est un excellent outil diagnostique (présent chez environ 80% des CCS).

### *3.5 Pronostic*

Le CCS est grevé d'une mortalité importante et son pronostic est sombre. La survie à 5 ans varie entre 12 et 40% selon les études<sup>120,121,154,157</sup> et la médiane de survie est estimée entre 14 et 28 mois<sup>120,122</sup>. Par ailleurs, le taux de récurrence est élevé, autour de 70%, et survient en général dans les 3 premières années<sup>125,157</sup>.

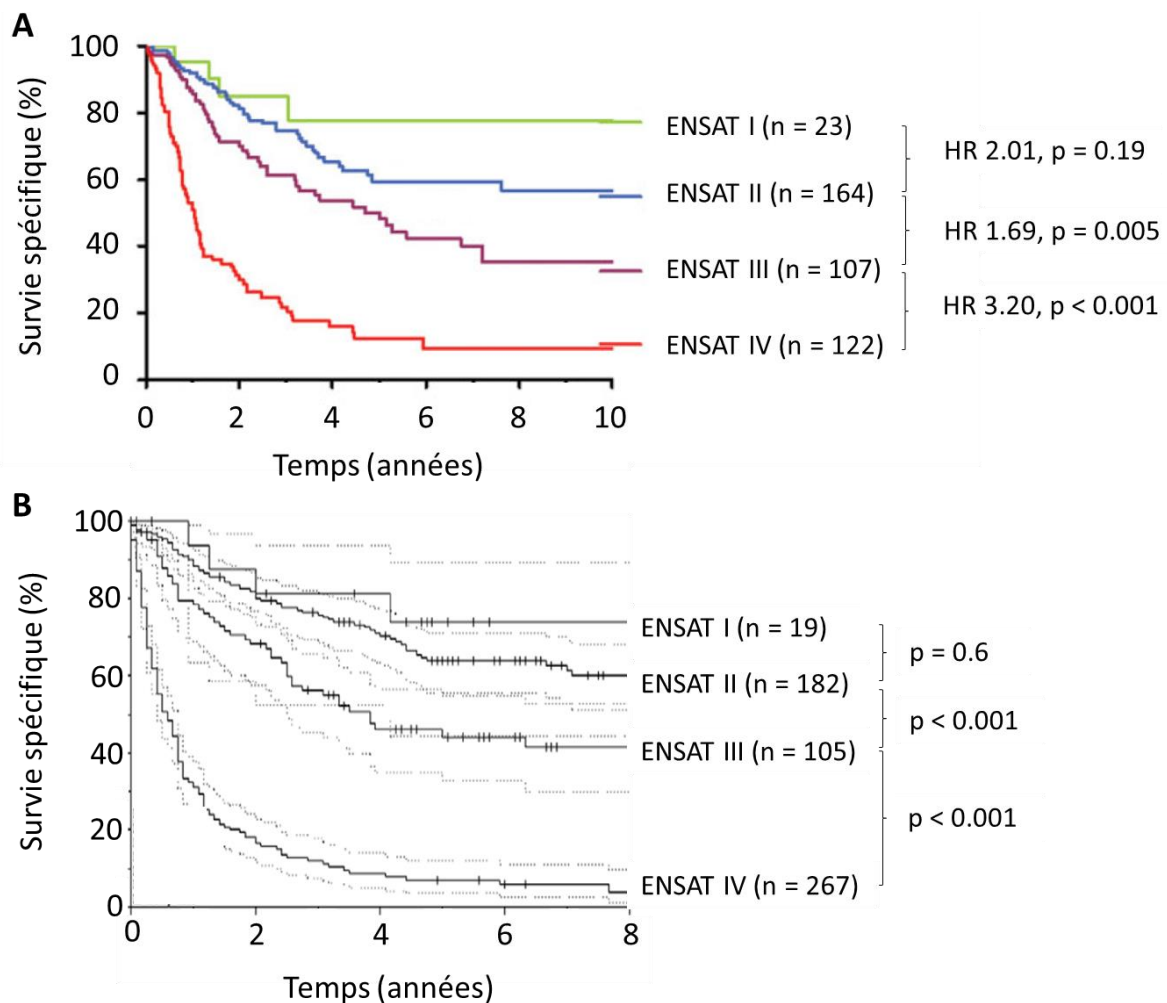
Toutefois, ces chiffres sur l'ensemble de la population sont en fait très différents si l'on analyse les patients en sous-groupes en fonction notamment du stade de la tumeur, de la qualité de l'exérèse, du Ki67... Certains sous-groupes ont en effet une survie prolongée pouvant aller jusqu'à plus de 80% à 5 ans. La prédiction de la survie à l'échelle individuelle reste donc difficile.

#### *3.5.1 Lié au stade de la tumeur*

Il s'agit du facteur pronostique le plus important. La stratification des patients selon les stades ENSAT 2008 / AJCC 8<sup>ème</sup> édition a montré une survie à 5 ans très différente selon les stades : 65-82% pour le stade I, 58-64% pour le stade II, 34-55% pour le stade III et 7-18% pour le stade IV<sup>120,147,154,174,175</sup>. La médiane de survie est également fortement impactée par le stade avec une



médiane de survie pouvant aller jusqu'à 24 ans pour le stade I contre moins de 1 an pour le stade IV<sup>157</sup>. Très récemment, il a été proposé la subdivision du stade IV en stade IVa pour les patients n'ayant qu'un seul site métastatique et en stade IVb pour les patients ayant au moins 2 sites métastatiques, les patients avec un seul site métastatique ayant une meilleure survie<sup>156,176</sup>.



**Figure 8 : Survie spécifique selon la classification du stade tumoral ENSAT 2008 / AJCC 8<sup>ème</sup> édition**

(A) Survie spécifique selon le stade dans la cohorte allemande issue du German ACC Registry. Les hazard ratios (HR), calculés selon le modèle de Cox, et la p-valeur, calculée selon le test du Log-Rank, montrent bien la valeur pronostique de ces stades. Adapté de Fassnacht et al, *Cancer*, 2009

(B) Survie spécifique selon le stade dans la cohorte des Etats-Unis (issue des données des registres « Surveillance, Epidemiology and End Results » de 16 états). Les hazard ratios ne sont pas donnés mais les p-valeurs associées aux courbes de survie ont été calculées par le test du Log-Rank et confirment la valeur pronostique du stade tumoral. Adapté de Lughezzani et al, *Eur J Cancer*, 2010

### 3.5.2 Lié à la qualité de l'exérèse

Il est aujourd'hui clair que la qualité de l'exérèse a un impact important sur le pronostic<sup>177,178</sup>. Elle est évaluée par le chirurgien et le pathologiste en per et post-opératoire. Quatre situations sont décrites : R0, R1, R2, Rx<sup>179</sup>.

- R0 : pas de tumeur résiduelle
- R1 : résidu tumoral microscopique
- R2 : résidu tumoral macroscopique
- Rx : la présence de résidu tumoral ne peut pas être évaluée

Les patients R1 et R2 ont une moins bonne survie à 5 ans que les patients R0 (Hazard Ratio ajusté entre 1.81 et 2.06 selon les séries et selon le statut R1 ou R2)<sup>155</sup>.

### 3.5.3 Lié au statut hormonal

Depuis une dizaine d'années, certaines études ont mis en évidence que l'hypersécrétion de cortisol pouvait être un facteur pronostique péjoratif sur la survie globale et la survie sans récurrence<sup>125,180-182</sup>. Cependant, certaines études ne retrouvaient pas ce facteur comme étant un facteur pronostique<sup>176,183</sup>. Une méta-analyse publiée en 2018 conclut qu'il existe bien un impact modéré de l'hypersécrétion de cortisol sur la survie sans récurrence (Hazard Ratio (HR) = 1.43, IC95 (Intervalle de confiance à 95%) = 1.18-1.73) et sur la survie globale (HR = 1.71, IC95 = 1.18-2.47)<sup>158</sup>. Ceci peut en partie s'expliquer par une morbi-mortalité intrinsèque à la sécrétion de cortisol, comme détaillé en 2.3.3.

### 3.5.4 Lié au Ki67

Si la valeur diagnostique du Ki67 n'est pas consensuelle (cf. point 1-II.3.4.3), sa valeur pronostique a été démontrée par plusieurs études<sup>173,177,178,184,185</sup>. L'étude la plus importante comporte deux cohortes : une cohorte allemande de 319 patients et une cohorte européenne de validation de 250 patients<sup>183</sup>. A noter que les patients stade IV n'étaient pas inclus dans cette étude. Dans les 2 cohortes, le Ki67 était le marqueur le plus significativement associé à la survie globale avec un HR de 1.026-1.061 pour chaque augmentation de 1% du Ki67 ( $p < 0.001$ ). Le Ki67 était également le marqueur le plus significativement associé à la survie sans récurrence avec

un HR de 1.020-1.042 pour chaque augmentation de 1% du Ki67 ( $p < 0.001$ ). Une stratification des patients selon 3 groupes de Ki67 ( $< 10\%$ ,  $10$  à  $19\%$  et  $\geq 20\%$ ) permettait de mettre en lumière la forte différence de survie globale et survie sans progression pour ces 3 groupes ( $p < 0.0001$ ).

### 3.5.5 Autres marqueurs

- Le **grade tumoral** a également été établi comme facteur pronostic, les tumeurs peu différenciées ayant une moins bonne survie à 5 ans que les tumeurs bien ou moyennement différenciées (23.6 vs 58.9%, HR 2.26 (1.82-2.82),  $p < 0.0001$ )<sup>155</sup>.

- Un **nombre de mitose**  $> 20$  pour 50 champs a été décrit comme étant un paramètre de mauvais pronostic pour la survie globale<sup>153,176</sup>. Il est aujourd'hui plutôt remplacé par l'usage du Ki67.

- De **nombreux marqueurs immunohistochimiques** ont été proposés mais le plus souvent étudiés sur des petites cohortes, sans validation sur des cohortes plus larges et indépendantes, avec des résultats contradictoires selon les études<sup>173,186-192</sup>. Parmi les marqueurs analysés dans de larges cohortes et ayant un intérêt pronostique relativement bien établi, on peut citer SF-1<sup>193</sup> et le marquage nucléaire de la  $\beta$ -Caténine<sup>187,194-196</sup>.

- Le développement de **scores pronostiques composites** à partir d'indicateurs pronostiques relativement bien établis a également été proposé. On peut citer :

- le score d'Helsinki, déjà développé dans le point 1-II.3.4.3
- un score comprenant la taille, le stade T de la classification TNM, l'index mitotique, la présence d'une invasion veineuse et la présence d'une sécrétion androgénique. Un score  $> 77$  points est de mauvais pronostic, un score  $< 57$  points étant prédictif de l'absence de récurrence, en particulier métastatique. La sensibilité et la spécificité du score étaient de 90 et 91% respectivement<sup>197</sup>.

En pratique, ces scores sont difficiles à mettre en œuvre et apportent peu d'information par rapport aux outils simples disponibles dans le cadre du diagnostic (stade tumoral et score de Weiss notamment).

### 3.5.6 Risque de récurrence

Au vu de l'ensemble de ces facteurs pronostiques, les patients sont classés à risque faible, intermédiaire ou haut risque de récurrence<sup>123,198</sup> (Tableau 13). Ce niveau de risque de récurrence conditionne en particulier les traitements adjuvants, qui seront décrits en 3.6.

<b>Risque faible / modéré</b>	<b>Risque intermédiaire</b>	<b>Risque élevé</b>	<b>Risque très élevé</b>
Stade I et II Résection R0 Ki 67 ≤ 10 %	Stade III ET Résection R0 ET Ki67 ≤ 10%	Stade III et/ou Résection R1/R2 et/ou Ki67 > 10%	Stade IV Résection R1 Ki67 > 30% Thrombus de la veine cave

**Tableau 13 : Niveaux de risque de récurrence du CCS**

Adapté de Fassnacht et al, *Eur J Endocrinol*, 2018 et Gaujoux et al, *Br J Surg*, 2017

### 3.6 *Traitement*

Le traitement du CCS a pour objectif de parvenir si possible à la rémission complète, de contrôler ou limiter les hypersécrétions hormonales et d'éviter les récurrences. Pour les patients métastatiques, l'enjeu des différents traitements est de diminuer / contrôler la maladie et prolonger la survie.

#### 3.6.1 Traitement chirurgical<sup>123,198</sup>

Le traitement chirurgical doit être réalisé par un chirurgien expérimenté (> 15-20 surrénalectomies toutes causes confondues / an), dans un centre de référence. Le chirurgien doit posséder une expertise en chirurgie surrénalienne endoscopique et par laparotomie. Il doit également posséder des compétences en chirurgie vasculaire, hépatique ou pancréatique (ou avoir dans le même établissement un autre chirurgien ayant une expertise dans ces domaines). Ceci est particulièrement vrai si l'on considère que les CCS sont des tumeurs pouvant atteindre des tailles importantes, parfois au-delà de 20 cm<sup>125,150,151,153</sup>, et pouvant envahir les organes et vaisseaux adjacents.

La qualité de la résection est particulièrement importante. L'objectif est de garantir les chances d'exérèse complète (dite « R0 ») et éviter les complications inhérentes à cette chirurgie

particulièrement ardue. Ainsi, l'exérèse dite « en bloc » de la surrenale et de la graisse péri-surrénalienne est recommandée, pour éviter la rupture de la capsule tumorale, qui favorise la dissémination métastatique et le risque de récurrence locale. La voie chirurgicale privilégiée est la chirurgie « ouverte » par laparotomie (ouverture de la paroi abdominale). La voie endoscopique peut être envisagée uniquement dans les centres experts, pour de petites tumeurs < 6 cm n'envahissant pas les organes adjacents.

*Pour les tumeurs de stade I et II*, la résection complète R0 doit être la priorité. La chirurgie doit être cantonnée à la tumeur surrenalienne. La néphrectomie systématique n'est pas recommandée. L'exérèse prophylactique des ganglions péri-surrénaux et du hile rénal est recommandée.

*Pour les tumeurs de stade III*, il est recommandé une exérèse en bloc de la tumeur surrenalienne et des organes de voisinage envahis. Là encore, la néphrectomie systématique n'est pas recommandée en l'absence d'invasion prouvée du rein.

*Pour les tumeurs de stade IV*, la chirurgie est rarement curative mais elle peut permettre de prolonger la survie, de limiter l'impact d'une hypersécrétion hormonale et éviter les complications compressives locales. Les études sur le sujet sont peu nombreuses et les recommandations relèvent plutôt du consensus d'expert. Ainsi, la chirurgie systématique de réduction tumorale (« debulking ») n'est pas recommandée mais peut être envisagée dans deux cas<sup>123</sup> :

- Si le traitement néo-adjuvant permet de réduire le volume tumoral (primaire et métastase) au point qu'une résection complète soit envisageable.
- Si le chirurgien estime pouvoir enlever au moins 80% de la masse tumorale.

*Pour les récurrences métastatiques*, la chirurgie peut être envisagée en cas de métastases peu nombreuses, si l'exérèse R0 est possible et si l'intervalle libre entre la première chirurgie et la récurrence est d'au moins 1 an.

*Pour les récurrences locales*, l'exérèse est recommandée lorsqu'elle est possible, par voie ouverte exclusivement.

### 3.6.2 Traitements médicamenteux<sup>123</sup>

Les traitements médicamenteux du cancer peuvent être utilisés soit à titre adjuvant (l'objectif est alors de réduire le risque de récurrence chez les patients considérés en rémission), soit à titre curatif, soit à titre palliatif. Dans le CCS, les traitements médicamenteux comportent le mitotane, les chimiothérapies cytotoxiques et les thérapies ciblées.

- Le **mitotane** (o,p-DDD) est un traitement ayant un effet cytotoxique direct sur les mitochondries des ZF et ZR du cortex surrénalien, provoquant une dégénérescence focale puis complète de ces zones. Il est utilisé depuis les années 60 dans le traitement du carcinome corticosurrénalien<sup>199</sup>. Ce traitement est recommandé :

- En thérapie adjuvante chez les patients sans résidu tumoral macroscopiquement visible mais avec un haut risque de récurrence (Ki67 > 10%, R1).
- Chez les patients avec CCS métastatiques, soit en monothérapie, soit en combinaison avec une chimiothérapie.

Chez les patients à risque faible et modéré de récurrence, le bénéfice du mitotane pour prévenir la récurrence n'est pas clair et son instauration doit être discutée au cas par cas. Les résultats de l'essai ADIUVO (NCT00777244), visant à répondre à cette question, devraient être connus très prochainement.

Le traitement doit être débuté le plus rapidement possible après la chirurgie (dans les 6 semaines à 3 mois idéalement), bien qu'il n'y ait pas de données sur un manque d'efficacité d'un traitement initié après 3 mois. Il est débuté progressivement jusqu'à atteindre 4 à 6g/jour. Le taux plasmatique de mitotane est ensuite monitoré régulièrement pour vérifier que le patient se situe dans la zone thérapeutique de 14 à 20mg/L. Il est instauré pour au minimum 2 ans, puis peut être soit arrêté, soit continué pour un maximum de 5 ans.

Toutefois, il possède de nombreuses toxicités, principalement gastro-intestinales (anorexie, nausées, diarrhées) et neuromusculaires (vertige, troubles de la concentration, pertes de mémoire)<sup>200</sup>, qui amènent souvent à des ajustements posologiques, et rendent parfois l'atteinte de la zone thérapeutique impossible. Par ailleurs, un des effets indésirables liés à son mode

d'action est l'insuffisance surrénalienne : les patients doivent donc être supplémentés par hydrocortisone.

- La **chimiothérapie** est basée sur l'administration combinée d'étoposide, doxorubicine et un sel de platine (carboplatine ou cisplatine) (EDP). Il s'agit de la chimiothérapie la plus utilisée, bien que certaines équipes préfèrent ne pas utiliser de doxorubicine, voire pas d'étoposide.

Son utilisation à titre adjuvant reste débattue mais certaines équipes continuent de l'utiliser notamment chez les patients avec très haut risque de récurrence (Ki67 > 30%, résection R1, stade IV...). De plus une étude rétrospective récente a montré pour la première fois un bénéfice de la chimiothérapie adjuvante sur la survie sans récurrence et la survie globale<sup>201</sup>. L'étude ADIUVO2 (NCT03583710), dont la fin est planifiée pour 2025, vise à apporter une réponse concernant le bénéfice de la chimiothérapie adjuvante chez les patients opérés à très haut risque de récurrence.

Dans l'attente des résultats de cette étude, la chimiothérapie est recommandée :

- en 1<sup>ère</sup> ligne chez les patients métastatiques au diagnostic
- en cas de récurrence < 6 mois
- chez les patients métastatiques progressant sous mitotane en monothérapie.

Toutefois, son bénéfice clinique reste décevant<sup>202</sup>, ce d'autant que le seul essai randomisé concernant la chimiothérapie EDP (l'essai FIRM-ACT) montre une amélioration de la survie sans progression sans amélioration de la survie globale<sup>180</sup>.

La gemcitabine associée à du 5-fluorouracile ou de la capecitabine a été évaluée en 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> ligne et a montré des résultats modérés avec un taux de contrôle de la maladie variant de 30 à 46%<sup>203,204</sup>. Le témozolomide a montré un taux de contrôle modeste de l'ordre de 36%<sup>205</sup>. Dans les 3 études, la médiane de survie globale était inférieure à 1 an.

Plus récemment, la chimiothérapie intra-péritonéale par doxorubicine et cisplatine, à titre adjuvant stade ENSAT III et IV ou curatif chez des patients ayant récidivé, a été évaluée de façon rétrospective, avec des résultats plutôt intéressants en traitement adjuvant<sup>206</sup>.

- Les **thérapies ciblées et les immunothérapies** ont révolutionné la prise en charge de nombreux cancers. La rareté du CCS limite les essais de grande ampleur pour évaluer ces nouvelles thérapies.

Les résultats des inhibiteurs de tyrosine kinase et du VEGF sont très décevants<sup>207-210</sup>. Les CCS ont une surexpression d'IGF2 dans 80-90% des cas : les thérapies ciblées touchant cette voie de signalisation semblaient donc prometteuses. Malheureusement, l'essai randomisé GALACCTIC testant l'efficacité du linsitinib, un inhibiteur de l'Insulin-like Growth Factor 1 Receptor (IGF1R), versus placebo n'a pas montré de différence dans la survie sans progression ni dans la survie globale entre les 2 groupes<sup>211</sup>.

Les immunothérapies, ou « checkpoint inhibitors », comprennent deux principales classes médicamenteuses : les inhibiteurs de Programmed cell Death protein 1 (PD-1) et de son ligand (PD-L1) et les inhibiteurs de Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 (CTLA-4). Les anti-PD-1/PDL-1 sont les plus testés, sur de petits groupes de patients et ont montré des taux de réponse entre 6 et 36%, sans aucune corrélation avec le statut PD-L1 des tumeurs<sup>212</sup>. Le plus grand essai concernait l'Avelumab et incluait 50 patients : la survie sans progression était de 2.6 mois et la survie globale de 10.6 mois. Les inhibiteurs de CTLA-4 ont été testés en combinaison avec un inhibiteur de PD-1, le nivolumab, dans 2 essais. Le premier essai, sur 6 patients affichait un taux de réponse de la maladie de 33%, dont 1 réponse métabolique complète<sup>213</sup>. Le second essai, sur 19 patients, montrait un taux de réponse de 6%<sup>214</sup>.

Si les résultats globaux sont décevants, il n'empêche qu'à l'échelle individuelle, certains patients sont d'excellents répondeurs<sup>215</sup>, et qu'il est donc nécessaire de comprendre le profil de ces patients pour leur proposer ces traitements.

- Les **autres traitements médicamenteux** utilisés et recommandés comprennent :

- les médicaments à visée de contrôle de l'hypersécrétion hormonale (inhibiteurs de la stéroïdogénèse ou antagoniste des récepteurs stéroïdiens, Spironolactone, antiandrogènes), dans l'attente de l'efficacité du mitotane.



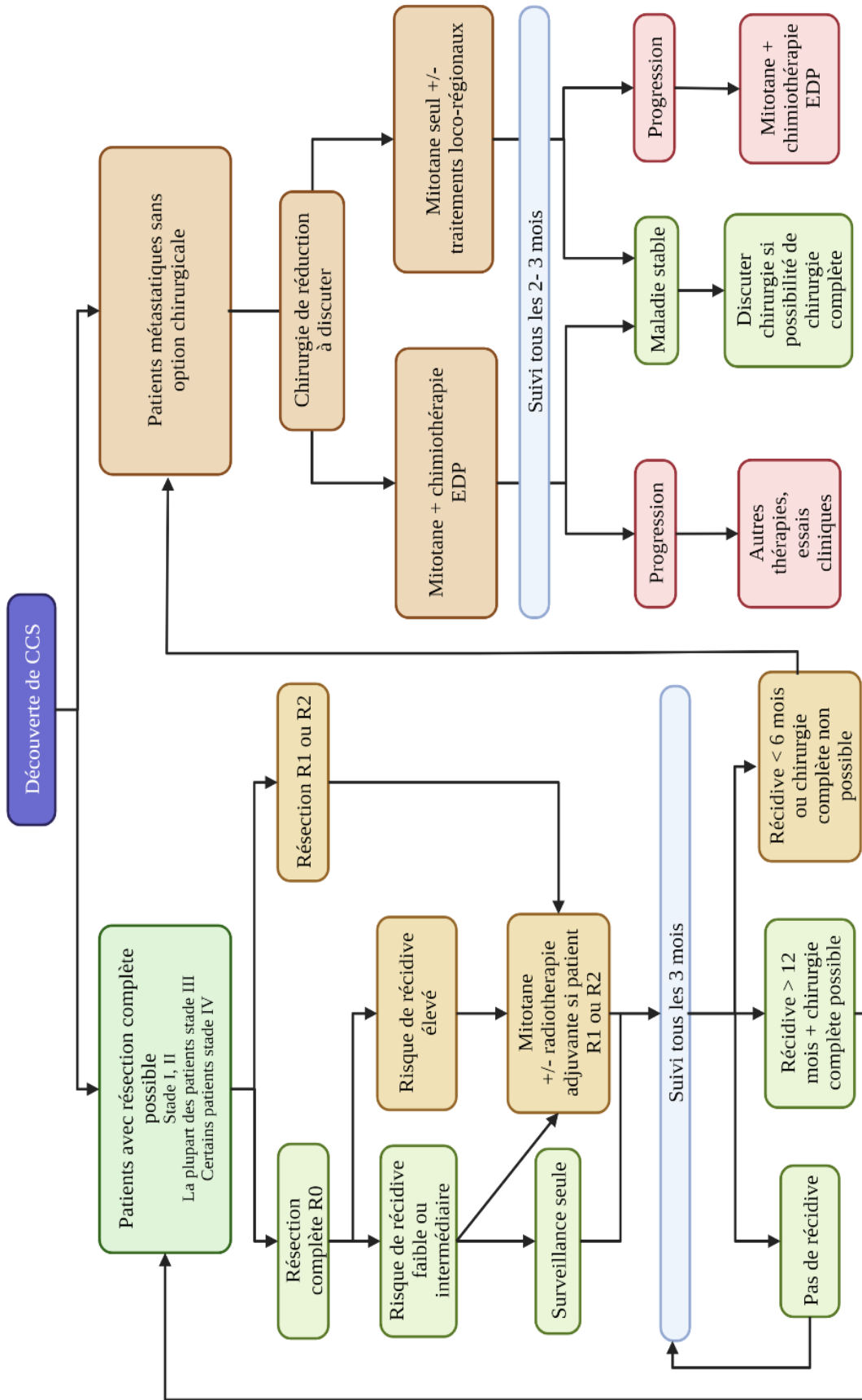
- les médicaments visant à prévenir les complications des hypersécrétions hormonales, par exemple les anticoagulants, la prophylaxie contre *Pneumocystis Jirovecci*, le potassium oral...
- les médicaments anti-ostéoporotiques dans le cas de métastases osseuses.

### 3.6.3 Traitements locorégionaux

- La **radiothérapie** peut être utilisée à titre adjuvant ou à titre palliatif pour traiter des symptômes locaux en lien avec des métastases, notamment osseuses ou cérébrales. Son utilisation à titre palliatif ne fait pas débat et est recommandée, avec une décision individuelle pour chaque patient.

En revanche, à titre adjuvant, les études sont plus nuancées, avec des effets controversés sur les récurrences locales, sur la survie globale ou la survenue de métastases à distance<sup>216-220</sup>. De fait, l'ESE n'a pas adopté de position consensuelle quant à son utilisation à titre adjuvant. Toutefois, il est suggéré de ne pas l'utiliser chez les patients stade I et II, avec résection tumorale complète (R0). La radiothérapie peut toutefois être envisagée chez les patients stade III ou chez les patients R1 ou Rx.

- Les **autres traitements locorégionaux** comprennent la **thermoablation** (radiofréquence, micro-ondes, ultrasons ou cryoablation) et les **traitements par embolisation** (chimioembolisation ou radioembolisation). Ces traitements n'ont jamais été évalués dans une étude randomisée et les quelques études publiées sont des études rétrospectives basées sur l'expérience du centre. Toutefois, ces études ont montré l'intérêt de ces traitements chez les patients oligométastatiques<sup>221,222</sup>, avec une survie à 5 ans pouvant atteindre 59%<sup>223</sup>.



**Figure 9 : Algorithme simplifié du traitement du CCS**

Adapté de Fassnacht et al, *Eur J Endocrinol*, 2018

### 3.7 Altérations génomiques et moléculaires dans le CCS

Face aux options thérapeutiques limitées, une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires qui sous-tendent la physiopathologie du CCS est indispensable. Plusieurs études ont caractérisé les altérations génomiques et moléculaires des CCS, mais chaque étude se focalisait sur une altération ou une mutation en particulier. Deux grandes études pan-génomiques intégrées, réalisées par Assié et al.<sup>224</sup> et Zheng et al.<sup>225</sup> ont nettement clarifié la génomique du CCS.

#### 3.7.1 Altérations génomiques : mutations somatiques et pertes d'hétérozygotie

Outre les syndromes de prédisposition génétique évoqués en 3.2, les CCS présentent de nombreuses mutations somatiques. On peut citer les mutations concernant TP53, les mutations de la voie Wnt/ $\beta$ -Caténine et les mutations de gènes impliqués dans le remodelage de la chromatine (Figure 10). On peut également citer la perte d'hétérozygotie du locus 11p15, aboutissant à une surexpression d'IGF2. Les premières études portant sur la génomique des CCS ont montré qu'il existait une perte d'hétérozygotie sur les locus 11p, 13q et 17p<sup>226</sup>. L'analyse de ces différents locus a amené à la découverte de mutations somatiques de certains gènes. De plus les analyses d'exomes entiers ainsi que les analyses intégrées pan-génomiques sur de très larges cohortes de CCS ont permis de mieux définir la prévalence d'anomalies mutationnelles et chromosomiques des gènes déjà identifiés.

- **Perte d'hétérozygotie du locus 17p13 et mutations de TP53** : la perte d'hétérozygotie du locus 17p13 est présente entre 84 et 100% des CCS<sup>227,228</sup>. Cette perte d'hétérozygotie a été démontrée comme étant un facteur indépendant de prédiction de la récurrence tumorale dans une large cohorte, mais qui comportait à la fois des CCS et des tumeurs localisées bénignes<sup>228</sup>. Ce constat a amené à l'identification plus tardive de mutations somatiques du gène suppresseur de tumeur TP53, localisé en 17p13. En effet, des mutations somatiques de ce gène avaient déjà été décrites dans d'autres cancers et des mutations germinales avaient déjà été identifiées dans le syndrome de Li-Fraumeni. Bien que le taux de mutation de TP53 ne soit pas corrélé avec le taux de perte d'hétérozygotie<sup>190</sup>, il a été confirmé que des mutations somatiques de TP53 étaient

présentes chez 17 à 27% des patients<sup>195,229</sup>. Les analyses pan-génomiques ont permis de montrer que les anomalies de TP53 étaient présentes dans 16 à 21% des CCS et qu'il s'agissait majoritairement de mutations somatiques plutôt que d'altération du nombre de copies<sup>224,225,230</sup>. Elles ont également permis de mettre en évidence des anomalies d'autres gènes en amont de TP53 sur la voie de signalisation p53/Rb, notamment de CDKN2A. Enfin, il a été montré que les mutations de TP53 sont associées au mauvais pronostic<sup>195,224,225</sup>.

- **Mutations de la voie Wnt/ $\beta$ -Caténine** : la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -Caténine et son fonctionnement seront détaillés dans le chapitre IV. Nous aborderons ici uniquement les mutations connues, sans expliquer précisément le rôle des composants de cette voie. Les mutations de CTNNB1 (gène codant la  $\beta$ -Caténine) concernent 16 à 30% environ des CCS<sup>187,194,195</sup>. Il existe plusieurs mutations somatiques de CTNNB1 aboutissant à une stabilisation de la protéine  $\beta$ -Caténine. La plupart de ces mutations concernent l'exon 3, avec notamment une substitution d'acide aminé au niveau de la Sérine 45 (S45P, S45Y, S45F, S45A), mais aussi au niveau de la sérine 37 (S37C) et de la thréonine 41 (T41A). Les études de génomiques intégrées et de séquençage d'exome ont montré que 10 à 16% des CCS présentaient une altération de CTNNB1<sup>224,225,230</sup>. Tout comme pour TP53, il s'agit plutôt de mutations somatiques que d'altérations du nombre de copies.

En revanche, une proportion plus élevée de CCS, environ 40-77%<sup>187,194</sup>, présente une accumulation diffuse cytoplasmique et nucléaire de  $\beta$ -Caténine, suggérant que d'autres facteurs de la voie sont impliqués et aboutissent à une stabilisation de la  $\beta$ -Caténine. En effet, il a été montré un peu plus tard qu'il pouvait exister des mutations somatiques d'APC dans le CCS<sup>194,231</sup>. Les études pan-génomiques ont permis de montrer que les mutations d'APC étaient finalement marginales, de l'ordre de 2-3%. Elles ont cependant permis d'identifier des anomalies d'un nouvel acteur clé de la voie Wnt/ $\beta$ -Caténine : Zinc And Ring Finger 3 (ZNRIF3), une E3 ubiquitine ligase agissant comme un co-répresseur de la voie Wnt/ $\beta$ -Caténine. De façon intéressante, les anomalies de ZNRIF3 sont en grande majorité des anomalies du nombre de copies (délétion homozygote), plutôt que des mutations somatiques. Ces anomalies sont

présentes dans 19 à 21% des CCS, c'est-à-dire en plus grand nombre que les mutations de la  $\beta$ -Caténine elle-même. Par ailleurs, les mutations de CTNNB1 et de ZNRF3 semblent mutuellement exclusives.

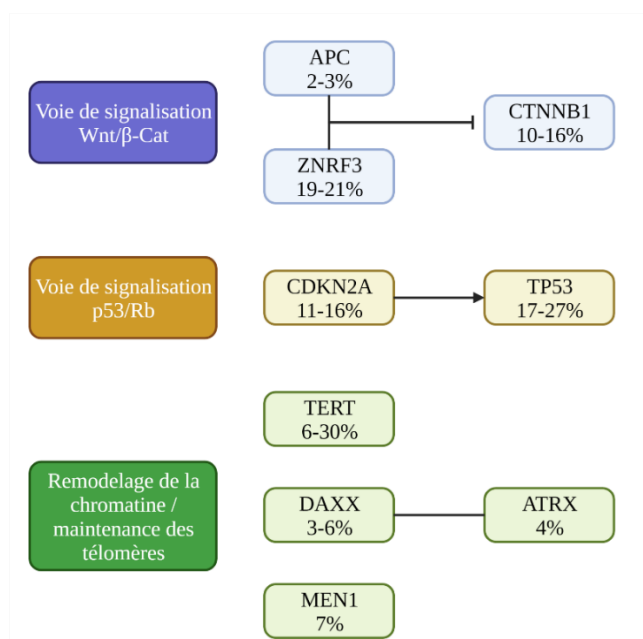
Il est à noter que les mutations de la  $\beta$ -Caténine sont présentes également dans les tumeurs bénignes<sup>187,232,233</sup>. Toutefois, l'immunomarquage  $\beta$ -Caténine est plutôt focal dans les tumeurs bénignes alors qu'il est diffus dans les CCS<sup>187</sup>. Cela suggère un rôle important de la  $\beta$ -Caténine dans la tumorigenèse surrénalienne, mais son implication dans un phénotype malin doit être associée à d'autres événements. Ceci est renforcé par le fait que les souris mutées pour CTNNB1 au niveau surrénalien développent systématiquement des hyperplasies surrénaliennes, mais que peu d'entre elles développent un CCS<sup>16</sup>.

Enfin, il est aujourd'hui clair que les mutations de la  $\beta$ -Caténine elle-même ou d'autres composants de la voie Wnt/ $\beta$ -Caténine, ainsi que le marquage nucléaire  $\beta$ -Caténine sont associés au mauvais pronostic<sup>194,195,224,225,230,234</sup>.

**- Perte d'hétérozygotie du locus 11p15 et surexpression d'IGF2 :** la perte d'hétérozygotie du locus à empreinte parentale 11p15 a été initialement décrite chez 66 à 83% des patients atteints de CCS<sup>228,235,236</sup>, en lien majoritairement avec une disomie paternelle (perte de l'allèle maternel et duplication de l'allèle paternel). Comme pour TP53, un lien a été recherché entre cette perte d'hétérozygotie et IGF2, un gène localisé dans ce locus. En effet, l'implication d'IGF2 était déjà connue dans d'autres cancers pour son rôle dans la prolifération, sa surexpression dans le syndrome de Beckwith Wiedemann avait déjà été décrite et il était connu qu'IGF2 était fortement exprimé dans la surrénale fœtale alors que très peu chez l'adulte. Il a d'abord été montré que les CCS exprimaient 10 fois plus d'ARN messager (ARNm) d'IGF2 que les surrénales adultes normales, alors que les tumeurs bénignes exprimaient des niveaux d'ARNm équivalents à la surrénale normale<sup>237</sup>. Il a ensuite été montré que la perte d'hétérozygotie du locus 11p15 aboutissait à la surexpression d'IGF2 dans 83 à 93% des cas de CCS versus environ 9 à 30% dans les tumeurs bénignes<sup>228,235,236</sup>.

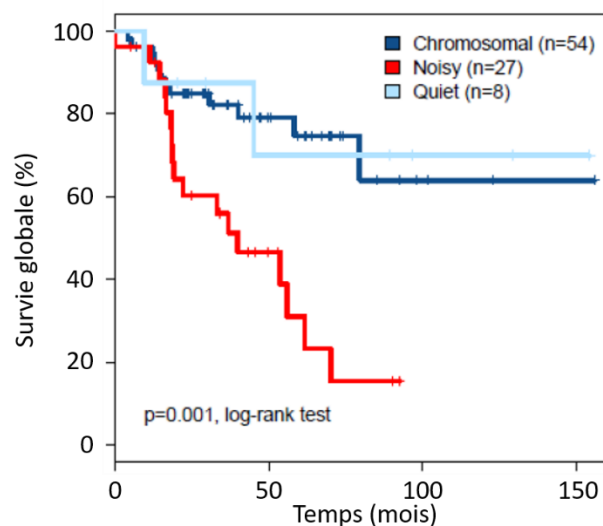
Du fait de sa forte expression dans les CCS, il semblerait que la surexpression d'IGF2 soit une condition nécessaire à la carcinogenèse surrénalienne. Toutefois, la surexpression seule d'IGF2 aboutit à une hyperplasie de la zone fasciculée voire à des adénomes, mais très peu à la formation de CCS<sup>196,238,239</sup>. La surexpression d'IGF2 seule est donc insuffisante pour expliquer le phénotype malin des CCS.

- **Anomalies du remodelage de la chromatine et de la maintenance des télomères**<sup>224,225,230,240</sup> : les études pan-génomiques déjà citées ont également permis d'identifier des anomalies de nouveaux gènes. Des amplifications de TERT, gène responsable d'une activation de la télomérase, impliquée dans le maintien de la longueur des chromosomes, sont décrites dans 6 à 30% des cas. Une activation aberrante de TERT est décrite dans le processus d'immortalisation des cellules cancéreuses. Des mutations de DAXX et ATRX, tous deux impliqués dans le remodelage de la chromatine au niveau télomérique, ont également été décrites dans 3 à 6% des cas. Les mutations de ces gènes sont responsables d'une instabilité génétique. Enfin, des mutations de MEN1 ont été retrouvée dans 7% des cas. MEN1 peut interagir avec l'ADN polymérase II et d'autres complexes multiprotéiques impliqués dans le remodelage de la chromatine.



**Figure 10 : Principales mutations somatiques identifiées dans le CCS**  
 D'après Assié et al, *Nat Genet*, 2014 ; Juhlin et al, *J Clin Endocrinol Metab*, 2015 et Zheng et al, *Cancer Cell*, 2016

**Au total**, il a été établi que 92% des CCS avaient au moins une mutation somatique<sup>240</sup>, avec en moyenne 0.5 à 1 mutation somatique / Mb<sup>224</sup>. Au-delà de ces mutations, des anomalies du nombre de copies sont fréquentes, touchant souvent des bras chromosomiques entiers. Ceci a amené Zheng et al.<sup>225</sup> à proposer un clustering des tumeurs selon leurs altérations chromosomiques à l'échelle des bras chromosomiques entiers. Ainsi, le sous-type « Chromosomal » représente 61% des tumeurs et correspond au groupe avec la plus grande fréquence d'altérations chromosomiques (notamment délétion ou gain de bras entier de chromosome). Le sous-type « Quiet » représente 9% des tumeurs et présente peu d'altérations chromosomiques. Enfin le sous-type « Noisy » est caractérisé par des altérations chromosomiques anarchiques et nombreuses, ainsi qu'une perte du chromosome 1p : il représente 30% des tumeurs et est associé à une moins bonne survie que les deux groupes précédents (Figure 11).



**Figure 11 : Courbe de survie selon le profil d'altération chromosomique**

Adapté de Zheng et al, *Cancer Cell*, 2016

### 3.7.2 Transcriptome

De nombreuses équipes ont étudié le transcriptome des tumeurs surrenaliennes et en particulier des CCS, ce qui a permis l'élaboration de clustering non-supervisé des CCS, corrélé à leur pronostic en terme de survie globale et / ou sans récurrence. Les études les plus connues sont celles de Giordano<sup>241</sup>, de de Reyniès<sup>242</sup>, d'Assié<sup>224</sup> et de Zheng<sup>225</sup> (Figure 12).

L'analyse transcriptomique de Giordano a permis de différencier 2 sous-groupes de CCS : le cluster C1 correspond à des tumeurs de haut grade, de mauvais pronostic, avec un enrichissement en gènes impliqués dans la prolifération cellulaire ; le cluster C2 correspond à des tumeurs de bas grade, de meilleur pronostic.

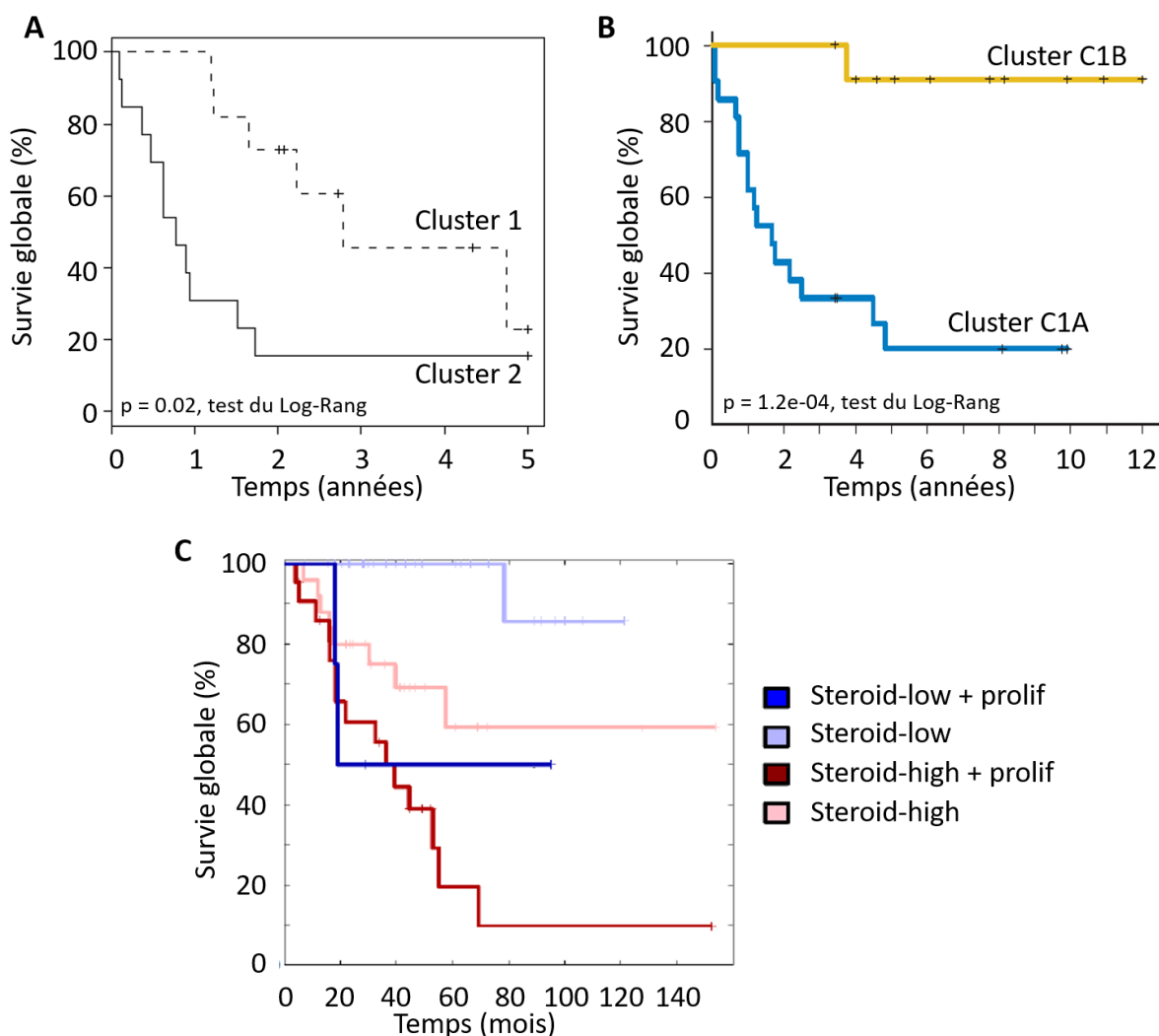
L'analyse transcriptomique de de Reyniès a permis d'identifier 2 sous-groupes, C1 et C2, correspondant aux tumeurs malignes et bénignes respectivement. Le cluster malin C1, représentant les CCS, est lui-même sous-divisé en cluster C1A, de mauvais pronostic, et C1B, de bon pronostic. Le cluster C1A est enrichi en gènes impliqués dans la transcription et le cycle cellulaire tandis que le cluster C1B est enrichi en gènes impliqués dans le métabolisme cellulaire, le transport intracellulaire, l'apoptose et la différenciation cellulaire. Ces analyses ont permis d'identifier BUB1B et PINK1 comme marqueurs pronostiques combinés pour la survie (niveau d'expression en RT-qPCR de  $\Delta C_T(\text{BUB1B}) - \Delta C_T(\text{PINK1})$ ). Ces données transcriptomiques ont été approfondies et enrichies par l'analyse de génomique intégrée de Assié et al. sur la cohorte ENSAT<sup>224</sup>, qui a confirmé l'intérêt du clustering C1A et C1B.

L'analyse transcriptomique de Zheng et al. (cohorte TCGA) a permis d'identifier 2 clusters nommés « steroid-high » et « steroid-low », eux-mêmes sous-divisés en 2 sous-types en fonction de la prolifération, soit 4 clusters au total. Le sous-type « steroid-low » est de meilleur pronostic que le sous-type « steroid-high ». A signature stéroïde équivalente, le sous-type « + prolifération » est de moins bon pronostic. Ces clusters recoupent quasi parfaitement les clusters C1A et C1B : en particulier, le phénotype « steroid-low » correspond au cluster C1B tandis que les phénotypes « steroid-high », « steroid-high + prolif » et « steroid-low + prolif », correspondent au cluster C1A (avec quelques exceptions classées C1B).

La principale limitation de la réalisation de transcriptome à grande échelle est la nécessité d'obtenir des tissus tumoraux congelés de bonne qualité, nécessitant la mise en place d'un circuit clinique dédié. Ce circuit est souvent difficile à mettre en place, d'autant plus dans les CCS, qui sont peu fréquents. Il a été récemment montré que l'étude du transcriptome pouvait être réalisé sur du tissu inclus en paraffine, beaucoup plus facile à conserver et à obtenir :



l'analyse de ces tissus a permis de classer correctement les patients en cluster C1A et C1B, avec une bonne valeur pronostique pour la survie globale et sans progression<sup>243</sup>.



**Figure 12 : Courbe de survie globale en fonction de la classification basée sur le transcriptome**

(A) présente les résultats pour Giordano et al, *Clin Cancer Res*, 2009

(B) présente les résultats pour de Reyniès et al, *J Clin Oncol*, 2009

(C) présente les résultats pour Zheng et al, *Cancer Cell*, 2016

### 3.7.3 MiRnome

La biogenèse des miRs et leur rôle sera présentée dans la partie III de cette introduction.

De nombreuses études ont étudié le miRnome des tumeurs corticosurrénales<sup>244-251</sup>. Certains miRs permettent de différencier tumeurs bénignes et malignes, tandis que d'autres ont une valeur pronostique dans les CCS. Toutefois, les études utilisent des techniques très variables, les cohortes sont parfois petites, les résultats parfois contradictoires et tous les miRs identifiés

n'ont pas été validés par RT-qPCR. Ces différentes études ont été analysées au sein de la revue de N. Cherradi en 2015<sup>252</sup>. Ainsi, miR-483-5p, miR-483-3p, miR-210 et miR-503 sont surexprimés au niveau tumoral dans les tumeurs malignes versus les tumeurs bénignes ou la surrénale normale, tandis que miR-195 et miR-335 sont sous-exprimés. Par ailleurs, le niveau de miR-483-5p a été déterminé comme étant un marqueur de malignité au niveau circulant<sup>246,253–255</sup>.

Les analyses pan-génomiques ont également permis de classer les CCS selon leur miRnome. En particulier, Assié et al. ont identifié 3 clusters de miRs, le cluster Mi1 étant associé au cluster C1B de bon pronostic et le cluster Mi3 étant associé au cluster C1A, de mauvais pronostic (Figure 13). Le cluster M2 était retrouvé à la fois dans les CCS de type C1A et C1B. De façon intéressante, le cluster Mi1 était celui qui présentait le plus de différence avec la surrénale normale : il est notamment caractérisé par une surexpression des miRs du cluster Xq27.3 et une sous-expression du cluster de miRs DLK1-MEG3 (locus 14q32). Zheng et al. ont identifié 6 clusters de miRs (Figure 13) : MiRNA 5 était caractérisé par une abondance des miRs du cluster Xq27.3 et était associé avec le phénotype « steroid-low » ; MiRNA 4 est caractérisé par une surexpression des miRs du locus 14q32 et une sous-expression des miRs du cluster Xq27.3 ; enfin MiRNA 3 était caractérisé par une faible abondance des miRs du cluster Xq27.3 et une expression modérée des miRs du cluster 14q32 et est associé au phénotype « steroid-high + prolif » ainsi qu'au cluster C1A.

#### 3.7.4 Méthylome

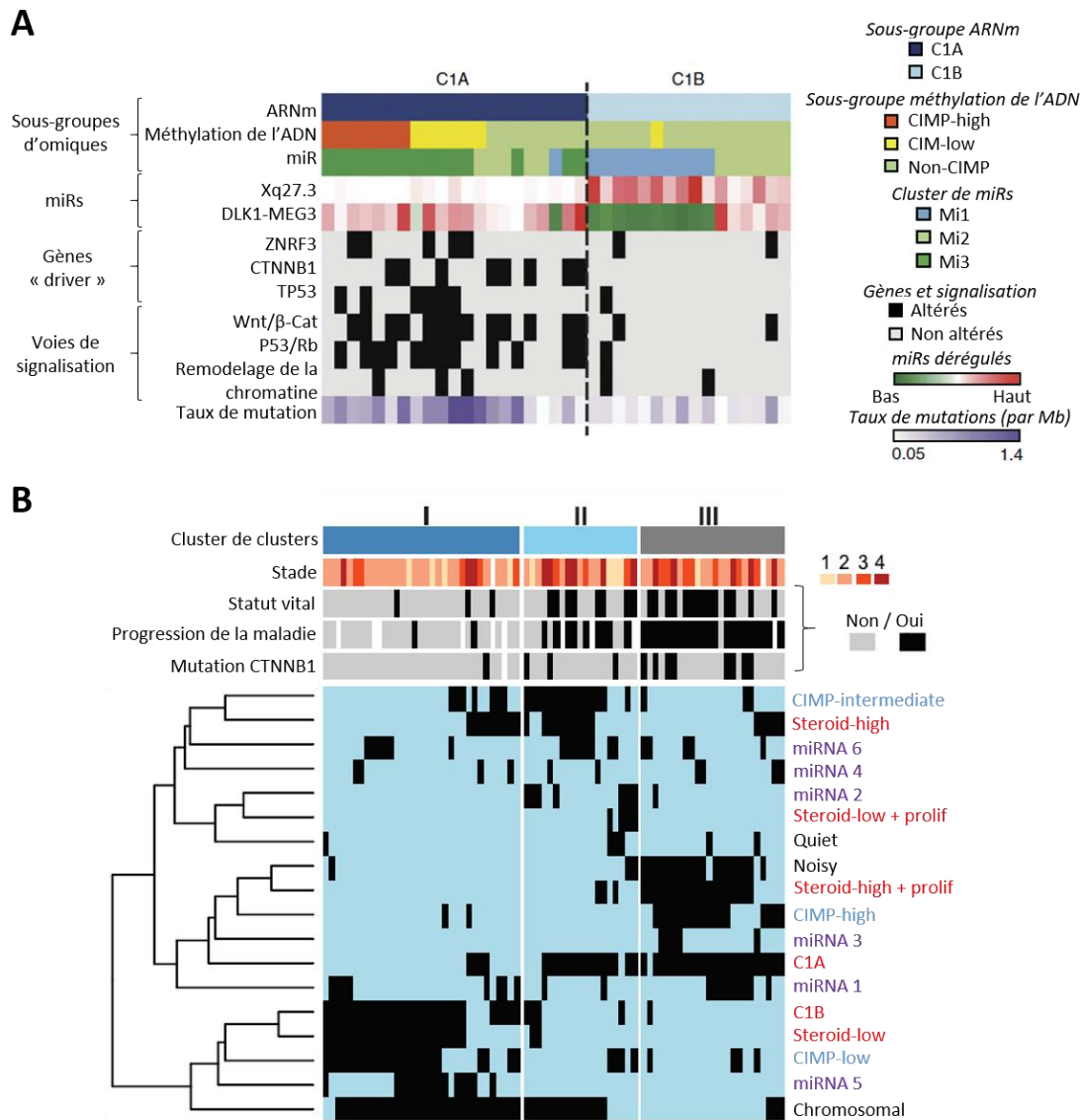
La méthylation est une modification épigénétique permettant de réguler l'expression des gènes sans modifier la séquence ADN. Elle joue un rôle clé dans le développement, le phénomène d'empreinte parentale et la cancérogenèse. Un gène hyperméthylé sera moins transcrit et donc moins exprimé. Cette méthylation s'effectue principalement au niveau de zones promotrices de gènes, riches en cytosine et en guanine, et appelées « îlots CpG ».

Les études du méthylome ont montré que les CCS étaient globalement hyperméthylés par rapport aux tumeurs bénignes<sup>256</sup>. Ces tumeurs hyperméthylées sont désignées sous le nom de

« CpG Island Methylator Phenotype » (CIMP). Toutefois, il existait différents profils de méthylation des CCS. Les CCS non-hyperméthylés, ou non-CIMP, exprimaient un profil de méthylation qui ne différait que très légèrement de la surrénale normale. Les CCS hyperméthylés CIMP était très significativement hyperméthylés par rapport à la surrénale normale et aux CCS non-CIMP. Au sein des CCS-CIMP, deux sous-groupes pouvaient être identifiés selon qu'ils soient très hyperméthylés (CIMP-high) ou moins hyperméthylé (CIMP-low). Le profil de méthylation était un facteur pronostic de survie, les CCS CIMP ayant un moins bon pronostic que les non-CIMP et en particulier les CCS CIMP-high<sup>256</sup>. Dans l'étude pan-génomique de Assié et al., le groupe C1B ne comportait que des tumeurs non-CIMP tandis que le groupe C1A comprenait des tumeurs présentant de manière équivalente les 3 profils de méthylation (Figure 13). Ces constatations ont été confirmées dans l'étude de Zheng et al (Figure 13).

### 3.7.5 Classification moléculaire intégrée : valeur pronostique

Une méta-analyse sur les patients de la cohorte ENSAT et TCGA basé sur le profil transcriptomique C1A/C1B, le profil d'altération chromosomique (Noisy vs Chromosomal/Quiet) et sur le profil de méthylation (CIMP vs non-CIMP) a abouti à la classification des patients en trois groupes moléculaires : A1, A2 et A3-B, avec des pronostics de survie très différents (respectivement 9%, 45% et 82% de survie à 5 ans,  $p < 0.001$ )<sup>257</sup>. Cette classification génomique, dite pangénomique 3-D, était également le seul facteur prédictif indépendant de survie sans progression pour les patients avec un stade ENSAT localisé. Une analyse plus ciblée 3-D a été effectuée où les marqueurs de l'analyse 3D-pangénomique étaient récapitulés par des marqueurs « simplifiés » : ainsi, le transcriptome était récapitulé par la signature BUB1-PINK1, le profil de méthylation par 4 gènes (PAX5, GSTP1, PYCARD et



**Figure 13 : Caractérisation pan-génomique des CCS**

Adapté de Assié et al, *Nat Genet*, 2014 et Zheng et al, *Cancer Cell*, 2016

(A) présente les résultats de l'analyse intégrée des différentes caractéristiques génomiques selon le sous-type de CCS (C1A et C1B).

(B) présente les résultats de l'analyse intégrée à partir du nombre de copies d'ADN (texte noir), du transcriptome (texte rouge), de la méthylation de l'ADN (texte bleu) et de l'expression des miRs (texte violet), aboutissant à la division entre 3 clusters de clusters. Les barres noires représentent la présence de la caractéristique étudiée, les barres bleues son absence. Une barre blanche indique une donnée non disponible. Le sous-groupe « CIMP-intermediate » de Zheng correspond au « CIMP-low » de Assié ; le groupe « CIMP-low » de Zheng correspond au groupe « Non-CIMP » de Assié.

PAX6) et les altérations chromosomiques par le statut mutationnel. Cette classification simplifiée était concordante avec l'analyse pan-génomique et constituait un facteur indépendant de pronostic. Par ailleurs, la classification moléculaire était plus discriminante pour le pronostic que les paramètres pronostiques cliniques ou pathologiques. Le meilleur résultat concernant la

prédiction du pronostic était obtenu en combinant la classification moléculaire, le stade ENSAT et l'index de prolifération.

**En conclusion, le CCS est une tumeur rare de mauvais pronostic, avec des options thérapeutiques limitées. Pour l'heure, les thérapies ciblées et immunothérapies qui ont révolutionné la prise en charge des autres cancers ont démontré peu d'effet sur le CCS. La caractérisation des différentes altérations somatiques, mais surtout l'avènement des études omiques, notamment les études pan-génomiques intégrées ont permis une avancée majeure dans la compréhension de la physiopathologie du CCS. En particulier, ces analyses ont permis d'identifier les altérations de la voie Wnt/ $\beta$ -Caténine comme étant présente dans près de 40% des CCS, devant les mutations de TP53. Elles ont également permis de distinguer des profils d'expression distincts de microARN entre les tumeurs de bon et mauvais pronostic. Enfin, elles ont permis de proposer de nouveaux marqueurs pronostiques pour la survie globale et la survie sans progression.**

### III) Les microARN, acteurs clés de la régulation de l'expression génique

Toutes les cellules d'un même individu ont le même génome. Cependant, afin de garantir le bon développement de l'organisme, la spécialisation des différents types cellulaires, ou encore l'adaptation à des stress environnementaux, les gènes vont s'exprimer différemment selon le type cellulaire et les différents signaux extérieurs reçus par la cellule. La régulation de l'expression des gènes est donc extrêmement importante et soumise à des mécanismes de contrôle fins. Ces mécanismes peuvent être mis en jeu à toutes les étapes de l'expression génique, allant de la transcription, la maturation et la stabilité des ARNm, à leur traduction, et aux modifications post-traductionnelles des protéines produites.

Un des mécanismes de régulation des gènes est l'interférence par l'ARN. Ce chapitre décrit brièvement ce concept, puis se concentre sur un mécanisme particulier d'interférence par l'ARN qui fait intervenir les microARN (miRs).

#### ***1. Interférence par l'ARN***

Les prémices du concept d'interférence par l'ARN (ARNi) ont été décrits pour la première fois dans une étude de 1984 qui montrait qu'une molécule d'ARN non codant (ARNnc) d'environ 100 nucléotides était capable de s'hybrider en une structure tige-boucle sur une séquence complémentaire d'ARNm et d'inhiber sa traduction dans la bactérie *Escherichia Coli*<sup>258</sup>. Puis en 1990, il a été montré que l'injection d'un transgène exogène dans des pétunias pouvait réprimer l'expression d'un gène cible à l'échelle post-transcriptionnelle<sup>259</sup>. Le concept d'ARNi a été formellement décrit en 1998 par Fire et al.<sup>260</sup> dans le nématode *Caenorhabditis elegans* (*C. Elegans*) : l'injection d'un ARN double brin (mais pas d'un ARN simple brin sens ou anti-sens) a permis de diminuer spécifiquement l'expression d'un ARNm mature cible sans affecter les autres ARNm. Ce n'est que plus tard que le mécanisme d'ARNi a été élucidé, impliquant des ARN double brin transformés en ARN intermédiaires plus courts et plusieurs acteurs

protéiques dont la ribonucléase de type III Dicer et le complexe RISC (RNA-induced silencing complex) contenant notamment la protéine Argonaute 2 (Ago 2).<sup>261,262</sup>

Le mécanisme d'ARNi est médié par deux types de petits ARNnc, de 20 à 25 nucléotides<sup>262,263</sup> (Tableau 14 et Figure 14) :

- les microARN (miRs, miRNA), générés à partir de précurseurs double brin repliés en structure tige-boucle, de complémentarité imparfaite.
- les « petits ARN interférents », de l'anglais « small-interfering RNA » ou siRNA, générés à partir de précurseurs double brin, avec ou sans structure tige-boucle, de complémentarité parfaite.

Ces deux types d'ARNnc peuvent être d'origine exogène ou endogène :

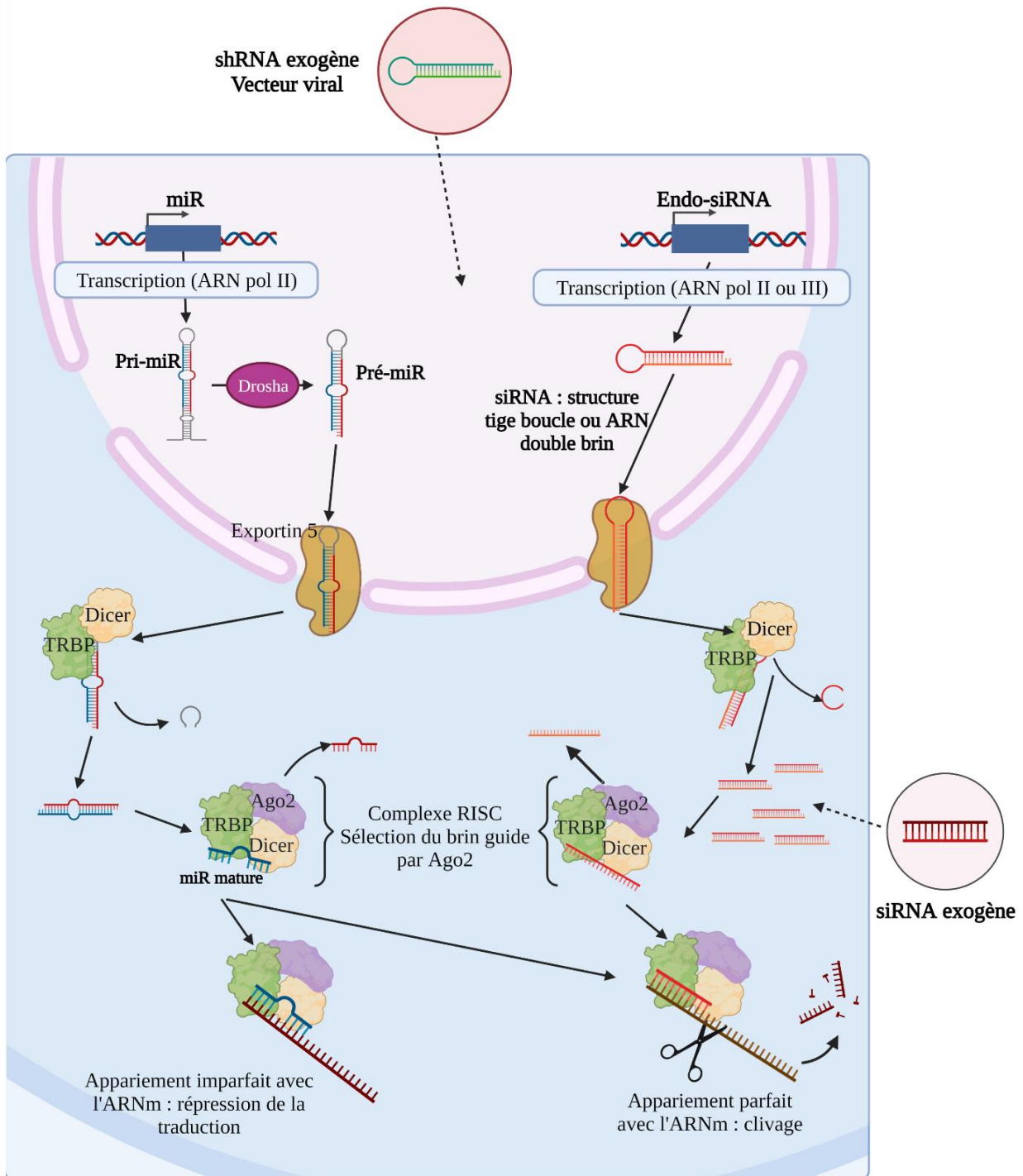
- Dans la littérature, le terme miR ou miRNA réfère au microARN endogène. Le terme de miR « mimic » est utilisé pour désigner un miR d'origine exogène synthétique.
- Le terme siRNA est plutôt appliqué à des siRNA exogènes transfectés dans les cellules mais les siRNA pourraient être générés de façon endogène (endo-siRNA), notamment chez *C. Elegans* ainsi que la *Drosophile*<sup>263-265</sup>. La principale limitation des siRNA exogènes est leur manque de stabilité : la répression de leur gène cible est donc limitée dans le temps.
- Pour pallier cette limitation, des vecteurs viraux exprimant des « short-hairpin RNAs » (shRNAs) ont été mis au point pour réprimer de façon stable l'expression d'un gène cible<sup>266</sup>. Un shRNA est une duplication en tandem avec répétition inverse de 50 à 70 nucléotides dont la transcription conduit à la production d'un ARN double brin sous forme d'épingle à cheveux qui sera clivé par Dicer en siRNA. L'intégration de la cassette d'expression du shRNA dans les cellules transduites par des particules virales permet une expression continue du shRNA. En fonction du vecteur viral, le shRNA est soit intégré au génome (lentivirus), soit présent à l'état épisomal (adénovirus, pas d'intégration au génome)<sup>267</sup>. Les shRNA peuvent également être introduits dans les cellules via des plasmides d'expression avec un gène de résistance permettant la

sélection des cellules ayant intégré le plasmide : dans ce cas, le plasmide est présent à l'état épisomal, non intégré au génome. Plusieurs types structuraux de shRNA ont été générés, selon qu'ils sont transcrits par l'ARN polymérase (ARN pol)-II ou III<sup>268</sup>. De plus, l'expression des shRNA dans la cellule peut être modulée par l'inclusion d'un système inductible dans le vecteur d'expression.

	<b>Endo-siRNA</b>	<b>miR</b>	<b>siRNA</b>	<b>shRNA</b>
<b>Origine</b>	Endogène	Endogène	Exogène	Exogène
<b>Localisation initiale</b>	Noyau	Noyau	Cytoplasme	Noyau (intégré au génome ou épisomal)
<b>Structure des précurseurs</b>	Tige-boucle de complémentarité parfaite (le plus fréquent) ou ARN double brin sens / anti-sens	Tige-boucle de complémentarité imparfaite	Double brin sens / anti-sens	Tige-boucle de complémentarité parfaite
<b>Expression</b>	ARN polymérase II	ARN polymérase II ou III	Transfection cytoplasmique	ARN polymérase II ou III
<b>Prise en charge des miRs primaires</b>	/	Drosha	/	Drosha ou pas selon le type de shRNA
<b>Prise en charge dans le cytoplasme</b>	Dicer	Dicer	Dicer	Dicer
<b>Sélection du brin</b>	Argonaute	Argonaute	Argonaute	Argonaute
<b>Complémentarité avec l'ARNm</b>	Parfaite	Imparfaite la plupart du temps mais peut être parfaite	Parfaite	Parfaite
<b>Mécanisme d'action</b>	Clivage de l'ARNm	Clivage de l'ARNm ou répression de la traduction	Clivage de l'ARNm	Clivage de l'ARNm

**Tableau 14 : Les différents acteurs du système d'interférence par l'ARN**





**Figure 14 : Biogenèse des différents systèmes d'interférence par l'ARN**

Adapté de Sontheimer et Carthew, *Cell*, 2005 ; de Fire et Mello, nobelprize.org, 2006 ; de Fellmann et Lowe, *Nat Cell Biology*, 2014, de Cherradi et al, *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2015

ARN pol : ARN polymérase ; TRBP : trans-activation-responsive RNA-binding protein

La machinerie permettant la biogenèse des endo-siRNA et des miRs possède des éléments communs : transcription par l'ARN pol, export par l'Exportin-5, clivage par le complexe Dicer-TRBP et sélection du brin guide au sein du complexe RISC. Quelques différences subsistent, certaines restant controversées : (1) la biogenèse des endo-siRNA peut se faire à partir d'une structure tige-boucle, d'une structure d'ARN double brin classique sans tige-boucle ; (2) la biogenèse des endo-siRNA ne fait pas intervenir Drossha ; (3) le précurseur du siRNA est beaucoup plus long que celui du miR, de telle sorte que le clivage par Dicer aboutit à la formation de plusieurs siRNA double brin à partir d'un seul précurseur, alors que pour les miRs, un précurseur aboutit à la formation d'un seul miR double brin.

## 2. *Les microARN*

Le premier miR a été identifié en 1993 par deux équipes chez *C. Elegans* : les auteurs avaient montré que lin-4, un petit ARN qui ne codait pas pour une protéine et dérivant d'un précurseur d'environ 65 nucléotides avec une forme de tige-boucle, se liait au gène lin-14, réprimant ainsi sa traduction<sup>269,270</sup>. La fonction de régulation de l'expression génique par les miRs, l'identification de clusters de miRs, la notion de distribution tissu-spécifique et leur conservation inter-espèces n'a toutefois été formellement décrite qu'en 2001, dans 3 articles parus dans la même édition de *Science*<sup>271-273</sup>. Ces 3 articles fondateurs consacrent également le nom de « microARN » et la dénomination de miR-X pour les désigner. Depuis, la recherche sur les miRs a littéralement explosé : la recherche du mot clé « microRNA » dans PubMed aboutit à 15 045 résultats entre 2001 et 2011 versus 130 120 résultats entre 2012 et 2022 ! A ce jour, chez l'Homme, 1967 miRs précurseurs et 2954 miRs matures ont été identifiés. L'ensemble de leur caractéristiques (séquence, localisation chromosomique,...) sont répertoriés sur le site miRbase (<https://mirbase.org>).

### 2.1 Nomenclature<sup>274-276</sup>

L'identification et la nomenclature des miRs ont fait l'objet de plusieurs publications pour donner des critères précis de définition de ce qu'est un miR (notamment pour le différencier d'un endo-siRNA) (Tableau 15) et de nomination<sup>274</sup>. Ainsi, les microARN doivent être nommés en utilisant le préfixe « miR- » suivi d'un numéro d'identification unique. Le gène qui code pour le miR utilise le même préfixe, mais est écrit en italique ou en majuscule selon la nomenclature en vigueur pour l'espèce. Le numéro d'identification du miR est attribué de façon séquentielle, les miRs identiques ayant le même numéro au sein des différentes espèces. Les séquences de miRs identiques de différents loci peuvent recevoir un même numéro, auquel on ajoute un suffixe en chiffre : par exemple, miR-6-1 et miR-6-2, se référant au même miR mature miR-6. Les séquences de miRs dont les transcrits sont légèrement différents peuvent également recevoir le même numéro, leurs gènes étant alors désignés avec un suffixe en lettre : par

exemple miR-13a et miR-13b chez la drosophile. De plus, il est d'usage de noter le brin (5' ou 3') duquel le miR dérive : par exemple, hsa-miR-139-5p est dérivé du brin 5' du miR précurseur. Enfin, le nom complet du miR est préfixé de 3 lettres indiquant l'espèce, « hsa » pour *Homo sapiens*.

Concernant l'identification des miRs, les premiers critères validés en 2003 ont été révisés à la faveur de l'apport des techniques de séquençage<sup>275,276</sup>. Ces critères sont amenés à encore évoluer du fait des découvertes progressives dans le champ des miRs<sup>276</sup>. Notamment, certains "miR-like", issus d'une biogenèse un peu différente de la biogenèse classiquement décrite pour les miRs, peuvent être acceptés et identifiés en tant que miRs : par exemple, les miRtrons (miRs dont la biogenèse est indépendante de Drosha) ou les miRs de la famille miR-451 (dont la biogenèse est indépendante de Dicer). Ainsi, on estime que 15% des miRs chez l'humain dérivent en fait de miRtrons, mais de nombreuses questions restent encore en suspens<sup>277</sup>. Pour plus de clarté, ces nouveaux types de miRs et leur biogenèse ne seront pas abordés dans la thèse.

2003 : Premiers critères d'identification des miRs (Ambros et al, <i>RNA</i> , 2003)	
<i>Critères d'expression</i>	<i>Critères de biogenèse</i>
A. Détection d'un transcrit distinct d'environ 22 nt (méthode d'hybridation, habituellement Northern blot)	C. Prédiction de la forme de tige-boucle du précurseur
B. Identification de la séquence dans une librairie d'ADN complémentaire	D. Conservation phylogénétique
	E. Détection d'une accumulation du précurseur lors de la réduction de la fonction de Dicer
2014 : Critères en lien avec l'apport des techniques de séquençage (Kozomara et Griffiths-Jones, <i>Nucleic Acids Res</i> , 2014)	
A. Au moins 10 lectures correspondant à chacun des 2 miRs matures possibles, sans mésappariement	
B. Appariement des 2 miRs matures en un duplex, avec 0 à 4 nt cohésifs (overhang) en 3'	
C. Au moins 50% des lectures pour chaque bras du pré-miR doivent avoir la même extrémité 5'	
D. L'énergie de repliement pour former la structure tige-boucle doit être inférieure à -0.2 kcal/mol/nt	
E. Au moins 60% des bases du miR mature doivent s'apparier dans la structure tige-boucle prédite	

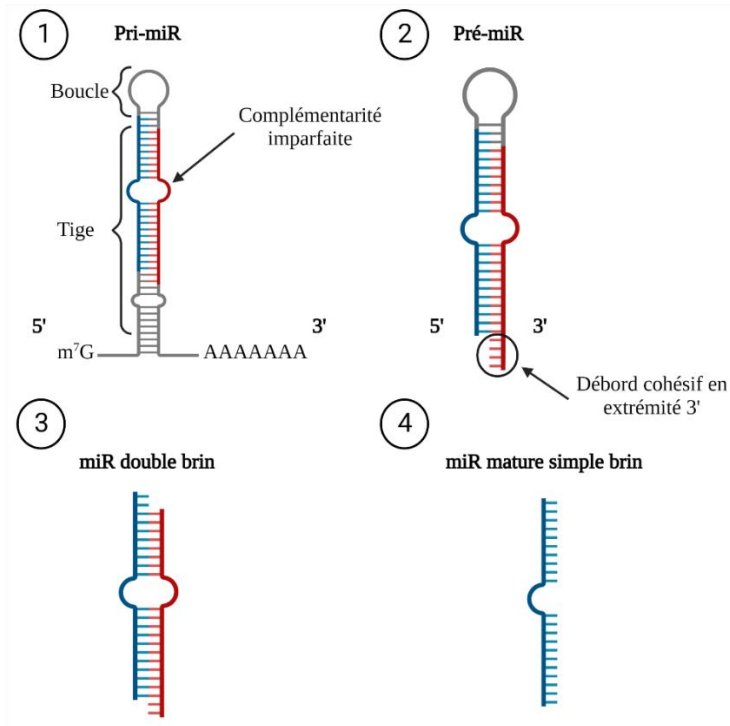
**Tableau 15 : Critères d'identification d'un nouveau miR**

### 2.2 Biogenèse des miRs : voie canonique<sup>278</sup>

La biogenèse canonique des miRs fait intervenir plusieurs étapes de clivage et de transport par différents complexes protéiques (Figure 14). Les miRs matures dérivent d'un microARN primaire (pri-miR) dont la structure est celle d'une tige-boucle, les deux brins de la tige ayant

une complémentarité imparfaite (Figure 15). Comme les ARNm, le pri-miR possède une coiffe 7-méthylguanosine (m<sup>7</sup>G) à son extrémité 5' et une séquence poly(A) à son extrémité 3'. Ces deux caractéristiques sont essentielles pour la protection et la stabilisation de l'ARN et l'export de l'ARN du noyau vers le cytoplasme.

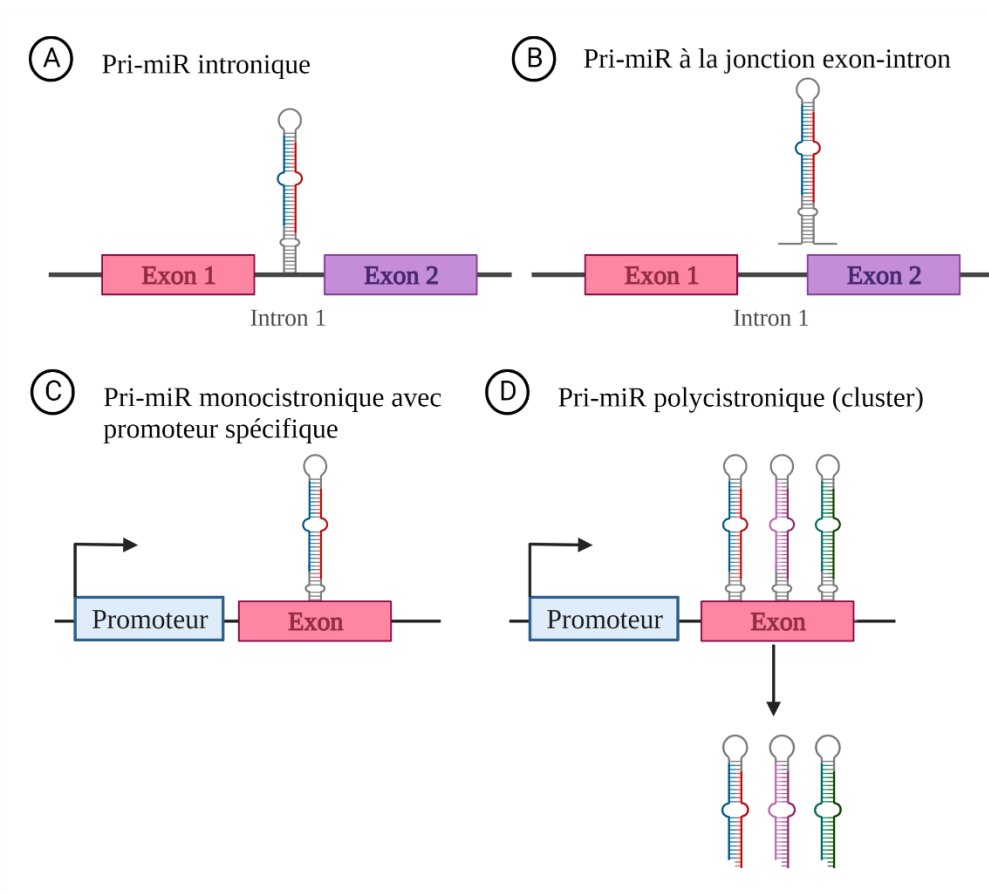
Le pri-miR est essentiellement transcrit grâce à l'ARN pol-II (plus rarement par l'ARN pol-III), initialement sous la forme d'ARN simple brin qui va, par son autocomplémentarité, se replier sur lui-même en sa structure tige-boucle caractéristique. Le pri-miR est ensuite chargé dans un complexe multiprotéique dont les deux acteurs majeurs sont la RNase de type III Drosha et la protéine « DiGeorge critical region 8 » (DGRC8, ou aussi appelée Pasha chez la mouche)<sup>279,280</sup>. Ce complexe, appelé « complexe microprocesseur » va cliver environ 11 paires de bases au niveau de la tige du pri-miR, le transformant ainsi en miR précurseur (pré-miR) d'environ 70 nt. Le pré-miR a la particularité de posséder une extrémité cohésive de 3 à 4 nt (présence de quelques bases non-appariées qui « dépassent » du fragment d'ARN) à son extrémité 3' (Figure 15). Cette extrémité cohésive assure notamment la reconnaissance du pré-miR par l'Exportin-5, qui permet son export dans le cytoplasme<sup>281,282</sup>. Une fois dans le cytoplasme, le pré-miR est clivé en miR double brin (Figure 15), par la RNase de type III Dicer<sup>283</sup>, associée à la protéine « dsRBP trans-activation-responsive RNA-binding » (TRBP)<sup>284,285</sup>. Ce complexe va ensuite être reconnu par la protéine Ago2<sup>286,287</sup>, aboutissant à la formation du complexe RISC<sup>288</sup>, qui va sélectionner un brin « guide », qui deviendra le miR mature. La sélection du brin guide est basée sur la stabilité des extrémités du miR duplexe : le bras avec l'extrémité 5' la plus instable est en général celui sélectionné<sup>289</sup>. La sélection du brin peut aussi être dépendante du tissu. Le brin « passager » est généralement détruit.



**Figure 15 : Du pri-miR au miR mature simple brin**

Il existe différentes organisations des miRs au sein du génome. Dans la grande majorité des cas, la séquence codante du pri-miR est une séquence intronique au sein d'un autre gène ( $\approx 45$  à  $80\%$  selon les études)<sup>290-292</sup>, mais elle peut aussi être un gène individuel, être localisée à une jonction exon-intron ou être intergénique. Le plus souvent, les miRs introniques sont co-transcrits avec leur gène hôte et leur expression est corrélée à celle de leur gène hôte<sup>293,294</sup>. Toutefois, ils peuvent aussi être transcrits de manière indépendante du gène hôte<sup>295</sup> : il est en effet estimé que  $35\%$  des miRs introniques ont un promoteur spécifique.

Par ailleurs, il existe des régions chromosomiques où plusieurs pri-miRs sont transcrits successivement : on parle de cluster de miRs. Dans le cas des clusters, le pri-miR serait alors une séquence unique, plus longue que les pri-miRs classiques, transcrite sous forme polycistronique (un ARN unique codant pour plusieurs miRs matures différents)<sup>296</sup>, puis clivée en plusieurs pré-miRs correspondant chacun au futur miR mature (Figure 16).



**Figure 16 : Localisation génomique des miRs**

### 2.3 Régulation de l'expression des gènes par les miRs<sup>297</sup>

Les miRs régulent l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel en s'hybridant à une séquence complémentaire dans la région 3'-non traduite (3'UTR ou Untranslated Region) de leur ARNm cible. Des études transcriptomiques ont montré une anti-corrélation entre le niveau d'un miR et celui de l'ARNm de son gène cible<sup>298</sup>. De plus, l'ajout de miR « mimics » (miR mimétique de synthèse) *in vitro* diminue le taux de l'ARNm cible, et inversement<sup>299,300</sup>. Enfin, l'induction de dysfonctionnement dans la biogenèse des miRs est associée à une augmentation des ARNm cibles. Toutefois, les mécanismes exacts de la régulation de l'expression génique ne sont que partiellement élucidés.

#### 2.3.1 Appariement du miR et de son ARNm cible au sein du complexe RISC<sup>301</sup>

Le brin guide sélectionné et intégré au sein du complexe RISC comporte 4 régions, de l'extrémité 5' du miR à son extrémité 3' (Figure 17A) :

1. La séquence « graine » (« seed » en anglais) est composée des nucléotides 2 à 7 en 5' du miR. Le 8<sup>ème</sup> nucléotide est parfois intégré dans cette séquence « graine », parfois désignée sous le terme de « séquence graine étendue » ou de « région graine »<sup>302</sup>. C'est cette séquence qui permet la reconnaissance de l'ARNm cible.
2. La région centrale s'étend du 9<sup>ème</sup> au 12<sup>ème</sup> nucléotides et joue un rôle dans le clivage de l'ARNm cible.
3. La région « supplémentaire », des nucléotides 13 à 17, permet la stabilisation du complexe miR-ARNm.
4. La queue, à partir du 18<sup>ème</sup> nucléotide, joue un rôle dans le clivage de l'ARNm et régule le recrutement de co-facteurs.

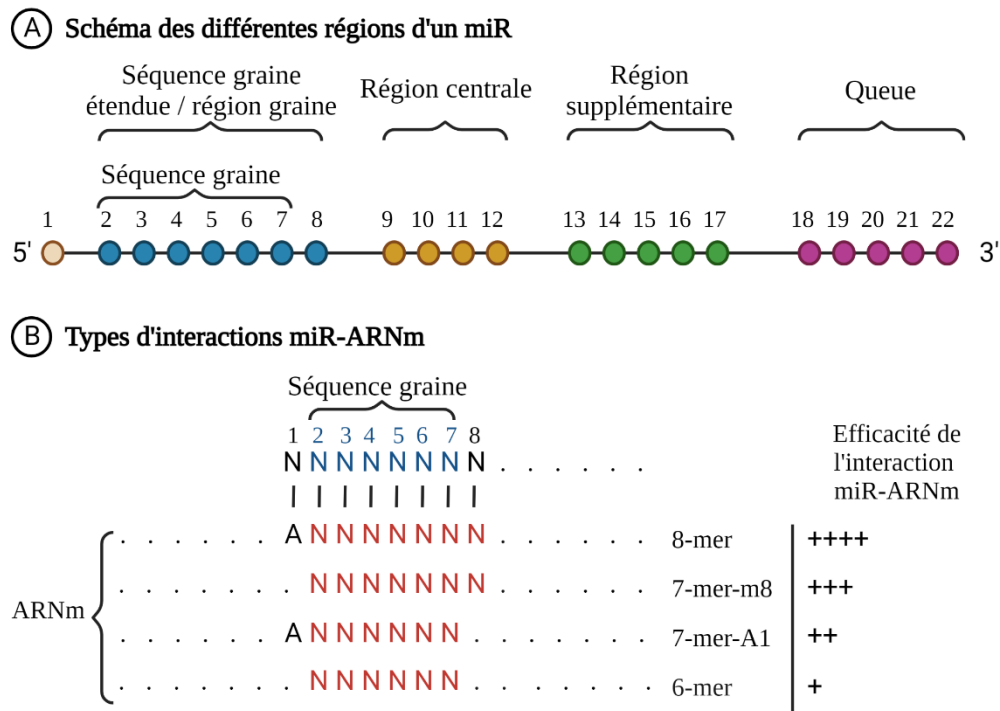
A noter que le premier nucléotide est arrimé dans Ago2 et ne s'apparie donc pas avec l'ARNm cible. Toutefois, ce premier nucléotide peut parfois se coupler à un résidu adénosine de l'ARNm, appelé alors t1A, qui va permettre d'accroître l'affinité du complexe RISC pour l'ARNm cible.

On distingue plusieurs types d'interaction miR-ARNm (Figure 17B)<sup>303</sup> en fonction du niveau de complémentarité. Cette distinction se base sur la composition nucléotidique dite k-mer, c'est-à-dire une séquence de nucléotides de longueur k. Par exemple, une complémentarité de 3 nucléotides entre le miR et son ARNm cible sera dite 3-mer.

On distingue donc :

- L'interaction 8-mer : il s'agit de l'affinité la plus élevée entre un miR et son ARNm, avec une complémentarité parfaite entre la séquence graine + le 8<sup>ème</sup> nucléotide + t1A et l'ARNm.
- L'interaction 7-mer-m8 correspond à l'interaction entre la séquence graine + le 8<sup>ème</sup> nucléotide avec l'ARNm, sans résidu adénosine en position t1. Il s'agit du type d'interaction le plus fréquent entre miR et ARNm cible.
- L'interaction 7-mer-A1 correspond à l'interaction entre la séquence graine + t1A et l'ARNm

- L'interaction 6-mer correspond à l'interaction la séquence graine et l'ARNm, sans résidu adénosine en position t1, ni complémentarité avec le 8<sup>ème</sup> nucléotide.



**Figure 17 : Types d'interaction miR-ARNm**

(A) Schéma des différentes régions du miR avec de l'extrémité 5' à l'extrémité 3', le 1<sup>er</sup> nucléotide permettant l'arrimage à Ago2, la région graine, la région centrale, la région supplémentaire et la queue. Adapté de Iwakawa et Tomari, *Mol Cell*, 2022

(B) Types d'interaction entre un miR et son ARNm. Adapté de Bartel, *Cell*, 2018

D'autres types d'interactions existent, impliquant un appariement imparfait de la séquence graine avec l'ARNm. Elles ne seront pas détaillées ici, leurs conséquences fonctionnelles étant peu claires. D'une manière générale, lorsqu'on parle de complémentarité parfaite entre le miR et son ARNm, la complémentarité de la séquence graine entière avec l'ARNm est sous-entendue. La complémentarité entre la région centrale du miR et l'ARNm n'est par contre pas systématique et la complémentarité parfaite implique une complémentarité au niveau de l'ensemble des nucléotides de cette région avec l'ARNm cible.

Outre le nombre de nucléotides interagissant avec l'ARNm, un autre facteur intervient dans l'action du miR sur son ARNm : son positionnement au niveau de l'ARNm. Dans la grande majorité des cas, le miR va se fixer dans la région 3'UTR de son ARNm cible, l'efficacité de



l'interaction dépendant de plusieurs caractéristiques, telle que la position à au moins 15 nucléotide du codon STOP<sup>304</sup>. Toutefois, il a été montré qu'il pouvait se fixer en 5' UTR ou sur les « open reading frame » (ORF)<sup>305</sup>, même s'il semblerait que dans ce cas, l'action du miR soit moins efficace.

### 2.3.2 Répression traductionnelle et déstabilisation de l'ARNm (déadénylation)

C'est le mécanisme de régulation de l'expression des gènes par les miRs le plus fréquent chez les animaux. Le mécanisme le plus communément accepté au sein de la communauté scientifique est que la répression de la traduction de l'ARNm est suivie de sa dégradation<sup>306-308</sup> (Figure 18). Mais des zones d'ombres subsistent : les deux mécanismes ne sont pas mutuellement exclusifs, peuvent survenir simultanément ou non.

Comme déjà mentionné, les ARNm possèdent une coiffe m<sup>7</sup>g à l'extrémité 5' et une queue poly(A) à leur extrémité 3'. Ces deux régions leur permettent de recruter la Cytoplasmic poly(A)-binding protein (PABPC) au niveau de la queue poly(A) et le complexe Eukaryotic Translation-Initiation Factor (eIF)4F au niveau de la coiffe. Le complexe eIF4F inclut notamment 3 éléments : la protéine eIF4E qui s'attache à la coiffe, la protéine d'échafaudage eIF4G et l'ARN hélicase eIF4A. L'interaction PABPC/eIF4F protège l'ARNm de la dégradation et lui permet d'être traduit plus efficacement, en lui conférant une structure circulaire favorisant l'interaction avec les ribosomes.

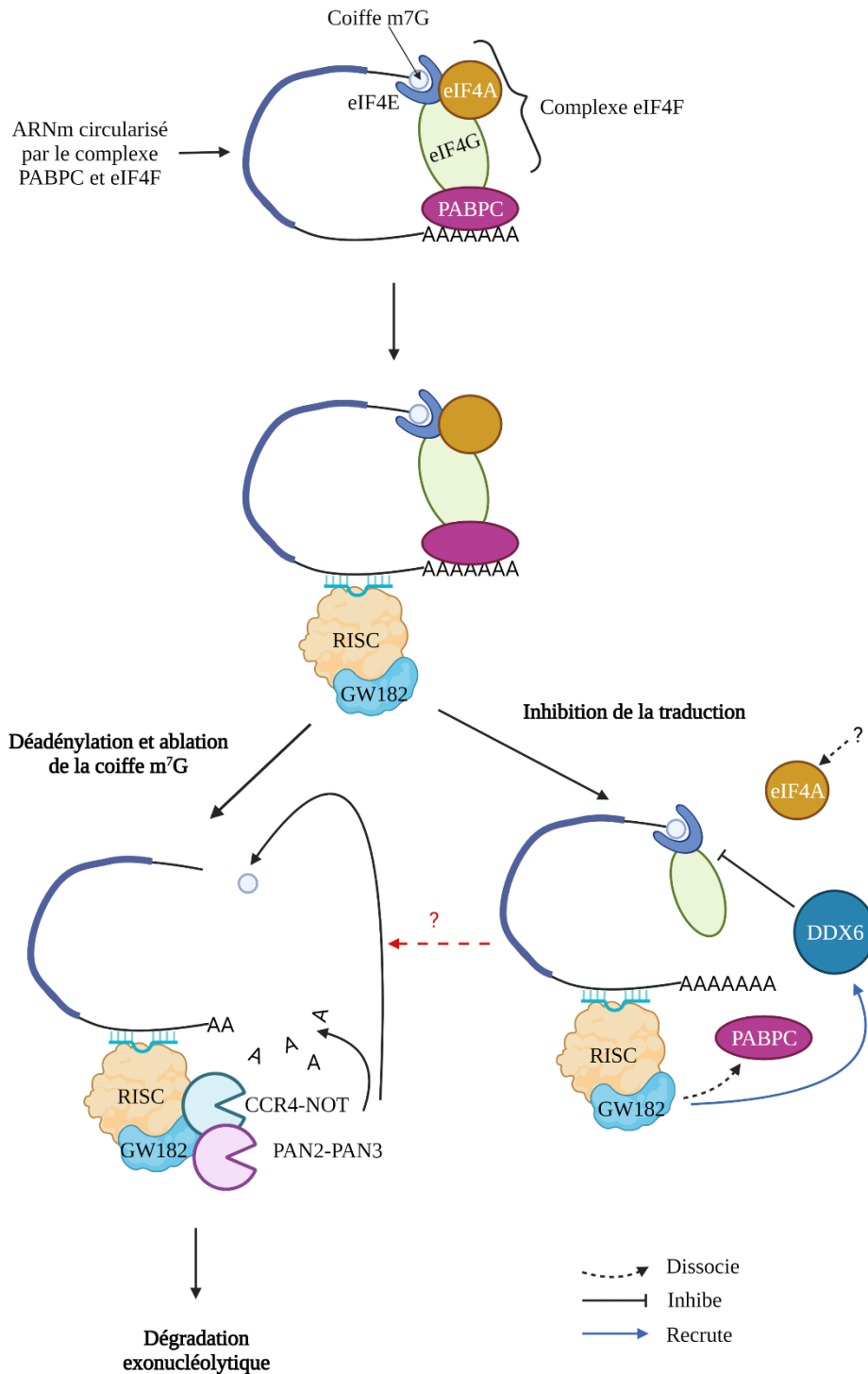
- *Répression de la traduction* : le mécanisme exact reste débattu. Plusieurs hypothèses co-existent, notamment celle d'un déplacement de PABPC, le recrutement d'inhibiteurs de eIF4E ou eIF4G, ou encore la dissociation d'eIF4A du complexe eIF4E<sup>301</sup>. Ces mécanismes peuvent être dépendants de GW182 ou non :

- Comme déjà décrit plus haut, GW182 va dissocier PABPC de la queue poly(A). Ainsi, la formation de la structure circulaire n'est plus possible et la traduction est diminuée.
- Le recrutement d'inhibiteur d'eIF4E ou 4G peut se faire via CCR4-NOT, qui peut interagir avec DDX6, une hélicase à ARN ATP-dépendante. DDX6 a un rôle dans l'ablation de la coiffe m<sup>7</sup>G mais aussi un rôle propre d'inhibition de la traduction.

- La dissociation du complexe eIF4F semble être un point clé de la répression traductionnelle, notamment par la dissociation initiale d'eIF4A.

Toutefois, la répression peut également avoir lieu après l'initiation de la traduction, comme l'ont montré certaines études, où l'ARNm cible du miR était détectable mais pas la protéine<sup>269,309,310</sup>, probablement en favorisant la dissociation entre l'ARNm et les ribosomes<sup>310</sup>.

- *Déstabilisation de l'ARNm* : ce mécanisme implique la déadénylation de l'ARNm, c'est-à-dire la dégradation de sa queue poly(A), suivi d'une dégradation exonucléolytique effectuée par le complexe Exosome à partir de l'extrémité 3' de l'ARNm. Pour ce faire, la protéine GW182 va être recrutée par Ago2. Elle va alors dissocier PABPC de la queue poly(A)<sup>311</sup> et recruter deux complexes permettant la déadénylation : CCR4-NOT et PAN2-PAN3. En outre, CCR4-NOT promeut le recrutement de facteurs intervenant dans l'ablation de la coiffe m<sup>7</sup>G en 5' de l'ARNm.



**Figure 18 : Régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes par le complexe miR-RISC**

Après la fixation du miR sur son ARNm via le complexe RISC, la protéine GW182 est recrutée. La déadénylation et l'ablation de la coiffe m<sup>7</sup>G font appel au recrutement de CCR4-NOT et PAN2-PAN3, deux complexes de déadénylases recrutées par GW182. La répression de la traduction fait appel à plusieurs mécanismes, dont l'ordre de survenue et la simultanéité ou la complémentarité sont encore mal compris. La dissociation de PABPC et le recrutement de DDX6 semblent médiés par GW182 et vont inhiber la traduction. La dissociation d'eIF4F serait un mécanisme indépendant de GW182.

### 2.3.3 Dégradation de l'ARNm cible

Ce mode d'action requiert un appariement de la région centrale du miR avec son ARNm en plus de la complémentarité avec la séquence graine<sup>312-314</sup>. Ce mode d'action est moins fréquent que la répression traductionnelle, puisque chez les animaux, contrairement aux plantes, la complémentarité de la région centrale du miR avec l'ARNm est peu fréquente<sup>302</sup>. Il implique l'action endonucléolytique directe de Ago2, qui va couper l'ARNm en un fragment 5' avec sa coiffe mais sans queue poly(A) et un fragment 3' polyadénylé mais sans coiffe. Le fragment 5' est alors dégradé par le complexe multimérique Exosome et le fragment 3' par des exonucléases de type XRN1<sup>315</sup>.

### 2.3.4 Identification des ARNm cibles

Afin de mieux comprendre le rôle des miRs dans la régulation de l'expression des gènes et dans l'homéostasie cellulaire, il est nécessaire de pouvoir identifier leurs gènes cibles. Cette identification passe aujourd'hui par des prédictions réalisées par des outils bioinformatiques, se basant notamment sur l'appariement entre la séquence graine et l'ARNm. Toutefois, cette méthode est pourvoyeuse de nombreux faux positifs et la validation expérimentale reste fondamentale. Les principales techniques disponibles sont basées sur la co-précipitation des miRs avec leurs ARNm cibles ou sur la démonstration d'une interaction directe entre miR et ARNm via des expériences utilisant des gènes rapporteurs clonés en amont de la région 3'UTR des gènes cibles.

## 2.4 *MicroARN et cancer*

L'altération du miRnome et l'implication, parfois majeure, des miRs dans la cancérogenèse a clairement été démontrée, avec des profils d'expression de miRs différents entre patients porteurs de cancer et sujets sains. L'altération des profils d'expression des miRs découle de plusieurs mécanismes tels que des mutations somatiques des gènes codants pour les miRs ou encore des délétions ou des amplifications partielles ou entières de loci contenant un ou des clusters de miRs<sup>316</sup>. D'autres mécanismes impliquent des modifications épigénétiques

(notamment au niveau des îlots CpG), des modifications post-transcriptionnelles ou encore une dérégulation du processus de biogenèse des miRs (Drosha ou Dicer notamment).

La première démonstration de l'implication des miRs dans la cancérogenèse a été réalisée en 2002, avec l'identification d'une délétion du locus 13q14 dans la leucémie lymphoïde chronique, où sont localisés miR-15a et miR-16-1<sup>317</sup>. On estime que plus de 50% des miRs sont localisés dans des sites sujets à des altérations du nombre de copies, à des pertes d'hétérozygoties ou dans des régions dites « breakpoints », c'est-à-dire sujettes à des réarrangements<sup>318</sup>, et que 25 à 50% d'entre eux sont localisés au sein de clusters<sup>319</sup>. L'analyse du registre The Cancer Genome Atlas (TCGA) à une échelle pan-cancer a récemment déterminé qu'il existait 10 588 mutations affectants les miRs chez les patients du registre, avec 1/3 de ces mutations survenant chez 1% des patients (profils « hypermutés »). Après exclusion des patients hypermutés de l'analyse, environ 1/3 des patients restants présentaient au moins une mutation du miRnome, cette proportion pouvant atteindre 65% dans certains cancers tels que le mélanome. Enfin, les analyses ont montré que 4 clusters de miRs étaient hyper-mutés, incluant le cluster 14q32 et le cluster Xq27<sup>320</sup>. Certaines de ces mutations affectent l'expression des miRs, le stade du cancer, et la survie des patients.

La biologie du cancer a été caractérisée par 6 grandes caractéristiques majeures<sup>321</sup> : prolifération, échappement aux signaux d'inhibition de croissance cellulaire, invasion/métastase, immortalité cellulaire, angiogenèse, résistance à la mort cellulaire. Ce concept a été enrichi de nouvelles caractéristiques telles que « la reprogrammation du métabolisme cellulaire » et « l'évitement de la destruction immunitaire »<sup>322</sup>. Il est intéressant de noter que les miRs sont impliqués dans tous ces processus biologiques<sup>323</sup>. Toutefois, ils peuvent se comporter soit comme des oncogènes (on parle alors d'onco-miRs), soit comme des suppresseurs de tumeurs (miR-TS). Ainsi, les onco-miRs sont surexprimés, ce qui induit la diminution de l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs tels que TP53 ou PTEN, tandis que les miR-TS sont sous-exprimés, ce qui contribue à l'augmentation de l'expression d'oncogènes tels que KRAS ou BCL2. Par exemple, miR-21 ou miR-155 sont des onco-miRs,

tandis que miR-34a et le cluster miR-15a/16-1 sont des miRs-TS. Cependant, certains miRs peuvent se comporter comme des onco-miRs dans certains cancers et comme miRs-TS dans d'autres cancers, pointant ainsi l'importance du contexte physiopathologique.

### *2.5 MicroARN et CCS*

Comme déjà abordé dans le point 1-II.3.7.3, il existe des altérations globales du miRnome dans le CCS avec des profils de miRs comprenant des altérations du cluster DLK1-MEG3 (locus 14q32) ou du cluster Xq27, et permettant d'envisager les miRs comme biomarqueurs pronostiques. Outre ces modifications globales de clusters de miRs, certains miRs ont été identifiés à l'échelle individuelle comme étant des marqueurs tumoraux de malignité dans le CCS (Tableau 16), permettant ainsi d'envisager les miRs comme biomarqueurs diagnostiques. Les principaux miRs identifiés comme surexprimés dans le CCS sont miR-483-5p (8 études/13), miR-503 (6 études), miR-210 (6 études) et miR-483-3p (5 études). MiR-195 et miR-335 ont tous deux été identifiés comme des miRs sous-exprimés dans le CCS dans respectivement 7 et 6 études. Le potentiel diagnostique des miRs a également été analysé au niveau circulant par plusieurs études<sup>246,253-255,324,325</sup>, au sein d'échantillons de sérum<sup>246,253</sup>, de plasma<sup>255,324,325</sup> ou de vésicules extracellulaires plasmiques<sup>254</sup>. MiR-483-5p est le miR le plus fréquemment identifié au niveau circulant, avec une sensibilité variant de 83 à 87.5%, une spécificité évaluée entre 78 et 100% et une AUC entre 0.74 et 0.929 selon le compartiment circulant analysé. Au-delà de la valeur diagnostique et pronostique individuelle de chaque miR, l'utilisation d'une signature de miRs avec combinaison de plusieurs miRs permet également de différencier tumeurs bénignes et malignes en améliorant la sensibilité et la spécificité. Ainsi, l'utilisation combinée de miR-210 + miR-503 + miR-195 ou miR-375 ou miR-483-5p permet d'atteindre des sensibilités, spécificités, valeurs prédictives positives et valeurs prédictives négatives supérieures à 90%<sup>326</sup>.

Notre équipe est depuis plus de dix ans spécialisée dans l'étude des miRs dans le CCS, dans l'analyse de leur valeur diagnostique et pronostique, et dans l'identification de leurs gènes

cibles et de potentiel thérapeutique. En particulier, nous avons identifié miR-483-5p comme marqueur tumoral de malignité<sup>246</sup>, comme marqueur circulant de malignité et d'agressivité<sup>246</sup> et comme marqueur circulant post-opératoire immédiat pronostique de la récurrence<sup>327</sup>. De plus, nous avons également identifié miR-139-5p comme étant un miR tumoral d'agressivité et comme marqueur circulant de malignité<sup>246</sup>. Notre originalité est d'étudier le rôle de miR-483-5p et de miR-139-5p dans la physiopathologie du CCS selon un axe mécanistique par identification de leurs gènes cibles et un axe translationnel par évaluation de leur implication dans l'agressivité du CCS qui dicte le pronostic des patients. Nous avons récemment démontré le potentiel thérapeutique du ciblage de miR-483-5p et de miR-139-5p dans le CCS (manuscrit en préparation) et identifié une nouvelle signature diagnostique de miRs circulants (non publiée, brevetabilité en cours). Il est important de noter qu'à ce jour, l'utilisation des miRs comme biomarqueurs reste du domaine de la recherche et n'est pas une technique de routine en clinique.

Référence	Technique cohorte de découverte	Cohorte de découverte	Technique cohorte de validation	Cohorte de validation	miRs surexprimés dans les CCS	miR sous exprimés dans les CCS
Tömböl et al., 2009 <sup>247</sup>	TLDA	4 CCS, 4 AS, 4 SN	RT-qPCR	7 CCS, 19 AS, 10 SN dont la cohorte de découverte	miR-184 miR-210 miR-503	miR-214 miR-511 miR-375
Soon et al., 2009 <sup>244</sup>	Microarray	22 CCS, 27 AS, 6 SN	RT-qPCR	10 CSS et 9 AS dont 4 CSS et 4 AS de la cohorte de découverte	miR-483-5p miR-503	miR-7 miR-195 miR-335
Ózata et al., 2011 <sup>250</sup>	Microarray	22 CCS, 26 AS et 4 SN	RT-qPCR	25 CCS, 43 AS, 10 SN, dont la cohorte de découverte	miR-483-3p miR-483-5p miR-210 miR-21	miR-195 miR-497
Patterson et al., 2011 <sup>245</sup>	Microarray	10 CCS, 26 AS, 21 SN	RT-qPCR	Validation de l'ensemble des miRs du microarray dans 10 CCS et 24 AS de la cohorte de découverte. Validation indépendante de miR-483-5p dans 31 CCS (2 récidives locales de CCS, 29 métastases), 35 AS, 21 SN, dont les 21 SN de la cohorte de découverte.	miR-483-5p miR-483-3p	miR-195 miR-125b miR-100
Schmitz et al., 2011 <sup>328</sup>	TLDA	7 CCS, 9 AS, 4 SN	RT-qPCR	Cohorte de découverte + validation de miR-139-3p, miR-675 et miR-335 dans 11 AS et 5 CCS		miR-139-3p miR-675 miR-335
Chabre et al., 2013 <sup>246</sup>	Microarray	12 CCS, 6 SN	RT-qPCR	18 CCS, 10 AS, 3 SN	miR-483-5p miR-503 miR-210 miR-542-5p miR-320a miR-93 miR-148b	miR-195 miR-335 miR-497 miR-199a-5p miR-199a-3p
Duregon et al., 2014 <sup>249</sup>	RT-qPCR	51 CCS, 47 AS			miR-483-3p miR-483-5p miR-210	miR-195
Assié et al., 2014 <sup>224</sup>	NGS	45 CCS, 3 SN			miR-34b-5p miR-210 miR-410 miR-483-3p miR-483-5p miR-503 miR-506-3p miR-506-5p miR-508-3p miR-508-5p miR-510	miR-511 miR-214-3p miR-485-3p miR-497 miR-195 miR-335



Feinmesser et al, 2015 <sup>248</sup>	Microarray	8 CCS, 25 AS	RT-qPCR	11 CCS, 4 AS	miR-503 miR-483-3p	miR-34a miR-497 miR-335 miR-195
Gara et al, 2015 <sup>329</sup>	Microarray	10 CCS, 26 AS, 21 SN			miR-9 miR-25 miR-124 miR-139-5p miR-183 miR-185 miR-206 miR-497	
Zheng et al, 2016 <sup>225</sup>	NGS	79 CCS, 120 SN			miR-10-5p miR-21-3p miR-21-5p miR-22-3p miR-146a miR-340 miR-483-5p miR-508-3p miR-509-3p miR-509-5p	
Koperski et al, 2017 <sup>251</sup>	NGS	7 CCS, 8 AS, 8 SN	RT-qPCR	8 CCS, 10 AS, 10 SN	miR-503-5p miR-483-3p miR-450a-5p miR-210 miR-483-5p miR-421	
Decmann et al, 2018 <sup>325</sup>	NGS	10 CCS, 10 AS, 10 ML	RT-qPCR	12 CCS, 14 AS, 15 ML	miR-184 miR-183-5p miR-483-5p	

**Tableau 16 : miRs en tant que biomarqueurs tumoraux diagnostiques**

Ce tableau présente les miRs dérégulés dans le CCS par rapport aux tumeurs surrenaliennes bénignes ou surrenales normales  
 TDLA : TaqMan Low Density Array, RT-qPCR : Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction, NGS : Next Generation Sequencing, AS : adénome surrenalien, SN : surrenale normale, ML : myéolipome surrenalien  
 Les miRs en bleu ont été décrits dans plusieurs études.

### 2.5.1 miR-139-5p

La séquence codante pour miR-139-5p est localisée dans le deuxième intron du gène de la phosphodiesterase 2A (PDE2A), au niveau du chromosome 11q13.4. L'expression de miR-139-5p est corrélée à l'expression de PDE2A dans de nombreux cancers, suggérant une co-transcription avec son gène hôte<sup>294</sup>.

Comme déjà mentionné plus haut, miR-139-5p est surexprimé au niveau tumoral dans les CCS agressifs (récidive dans les 3 ans post-chirurgie) versus non agressifs<sup>224,225,246</sup>. Sa sensibilité a été évaluée à 87.5%, sa spécificité à 93.7%, avec une AUC à 0.941<sup>246</sup>. De façon intéressante, l'expression de miR-139-5p au niveau tumoral est corrélée à la sécrétion de cortisol<sup>225,246</sup>. Au niveau circulant, miR-139-5p permet de discriminer les CCS des adénomes surrenaliens avec une bonne sensibilité (87.5%), mais une spécificité modérée (65%)<sup>246</sup>. Notre équipe a également montré le rôle de miR-139-5p dans l'invasion et la migration cellulaire<sup>330</sup>. Enfin, nous avons identifié N-myc Downstream Regulated Gene 4 (NDRG4), un gène suppresseur de tumeur bien identifié dans le cancer colorectal<sup>331</sup>, comme l'un de ses gènes cibles<sup>330</sup>.

L'expression de miR-139-5p a été évaluée dans de nombreux autres cancers, tels que le glioblastome, le cancer vésical, le cancer prostatique, le cancer colorectal, le cancer ovarien, le cancer du poumon ou encore le cancer du sein, l'ensemble ayant fait l'objet d'une revue en 2020 par Khalili et al<sup>332</sup>. Dans la très grande majorité des autres cancers, miR-139-5p est sous-exprimé et a donc plutôt un rôle de miR-TS. On note toutefois une surexpression dans les tumeurs gastrointestinales stromales (GIST)<sup>333</sup>. Dans le cancer colorectal, une seule étude a trouvé une surexpression de miR-139-5p dans les tissus de métastases hépatiques par rapport à la tumeur primaire<sup>334</sup>, miR-139-5p étant sous-exprimé dans les autres études portant sur ce cancer. Enfin, dans le cancer de la prostate, les études sont divergentes.

Par ailleurs, il a été montré que miR-139-5p contribuait à la cancérogenèse via les voies de signalisation PI3K/AKT, Wnt/ $\beta$ -Caténine et RTK/RAS/MAPK<sup>332</sup>. Plusieurs gènes cibles ont été identifiés tels que Bcl2, TGF $\beta$ 1, Notch1, VEGFR-2... Il a par ailleurs été montré que l'expression de miR-139-5p était modulée par plusieurs ARN non codants, tels que l'ARN long

LINC00152 qui agit comme une « éponge » pour ce miR et diminue ainsi son expression dans le cancer colorectal ou le carcinome épidermoïde buccal<sup>332</sup>. D'autres ARN longs non codants tels que NEAT1, XIST ou AFAP-AS1 diminuent l'expression de miR-139-5p.

La séquence codant pour miR-139-5p peut également subir des modifications épigénétiques : dans le cancer pancréatique, la transcription de miR-139-5p est négativement régulée par Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2), une histone méthyltransférase régulant la triméthylation de l'histone H3K27, et qui est connue dans d'autres cancers pour réprimer des gènes suppresseurs de tumeurs<sup>335</sup>. De manière intéressante, EZH2 a été identifié dans le CCS comme étant un facteur de mauvais pronostic, associé à l'agressivité : en effet, EZH2 est surexprimé dans les CCS de mauvais pronostic<sup>336</sup>, mais son interaction avec miR-139-5p dans ce contexte n'a pas été étudiée.

En terme pronostique, miR-139-5p a été associé au pronostic dans plusieurs cancers : les patients avec un haut niveau de miR-139-5p ont une meilleure survie dans le cancer de la vessie, le carcinome hépatocellulaire, le cancer œsophagien, la leucémie myéloïde aigue, le cancer du sein<sup>332</sup>...A l'inverse, la surexpression de miR-139-5p dans le CCS est associée à un mauvais pronostic<sup>330</sup>.

### 2.5.2 miR-483-5p

La séquence codante pour miR-483-5p est localisé dans le deuxième intron du gène d'IGF2, au niveau du chromosome 11p15.5. Comme pour miR-139-5p, l'expression de miR-483-5p est corrélée à l'expression de son gène hôte dans de nombreux cancers<sup>294</sup>, notamment dans le CCS. Comme décrit dans la partie 3.7.1, IGF2 est surexprimé dans plus de 80% des CCS et il est donc légitime de lier la surexpression de miR-483-5p à une co-transcription avec son gène hôte. Toutefois, il semble qu'il puisse exister certains mécanismes de transcription du pri-miR-483 indépendamment d'IGF2, notamment via USF1, un facteur de transcription de la voie Wnt/ $\beta$ -Caténine<sup>337</sup>.

Dans le CCS, miR-483-5p est l'un des principaux miRs identifiés comme marqueur de malignité permettant de différencier adénome surrénalien et CCS (Tableau 16), sa

surexpression tumorale étant en faveur d'un CCS. Ses performances diagnostiques ont été évaluées dans 2 études : la première indiquait une sensibilité de 80% et une spécificité de 100% avec une AUC de 0.943<sup>245</sup> ; la seconde, issue de notre équipe, indiquait une sensibilité de 73.7% et une spécificité de 100% avec une AUC de 0.904<sup>246</sup>.

Au niveau circulant, miR-483-5p a également été identifié comme marqueur de malignité. Dans le sérum, miR-483-5p a une sensibilité de 85.7% et une spécificité de 100% (AUC 0.929) pour discriminer tumeurs bénignes et malignes<sup>253</sup>. Dans les vésicules extracellulaires, miR-483-5p a une sensibilité de 87.5% et une spécificité de 94.44% (AUC 0.965)<sup>254</sup>. Dans le plasma, ces performances semblent un peu moins intéressantes avec une sensibilité de 87% et une spécificité de 78.3% (AUC 0.88)<sup>325</sup>. De plus, notre équipe a montré que le niveau circulant de miR-483-5p permettait de distinguer les patients ayant un CCS agressif des patients ayant un CCS non agressif avec une sensibilité de 85.7% et une spécificité de 100%<sup>246</sup>.

Nous avons également montré que miR-483-5p était impliqué dans l'invasion et la migration cellulaire et avons identifié N-myc Downstream Regulated Gene 2 (NDRG2) comme un de ses gènes cibles<sup>330</sup>.

Enfin, notre équipe a identifié ce miR comme étant prédictif de la récurrence : nous avons montré que dans les 3 mois post-opératoires, un niveau circulant de miR supérieur à 752 898 copies/mL était pronostic d'une récurrence du CCS dans les 3 ans avec une sensibilité modeste de 61.5% mais une spécificité de 100% (AUC 0.853)<sup>327</sup>. Ce paramètre n'était pas dépendant du stade initial du CCS, ni du Ki67. En analyse multivariée, miR-483-5p était le seul paramètre significativement associé à la progression (HR 5.98, IC95 1.3-27.6).

MiR-483-5p est surexprimé au niveau tumoral et plasmatique dans le cancer de l'ovaire<sup>338</sup> et dans le cancer colorectal<sup>339</sup>. Il est également surexprimé dans le cancer pulmonaire (dans lequel il promeut notamment la migration et l'invasion)<sup>340,341</sup> et dans le cancer du sein triple négatif<sup>342</sup>. Par ailleurs, il a été montré que l'expression de miR-483-5p pouvait être régulée positivement par l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -Caténine dans l'adénocarcinome pulmonaire<sup>340</sup>.

**En conclusion, depuis leur identification il y a bientôt 30 ans, les miRs sont aujourd'hui reconnus comme des acteurs biologiques clés, notamment dans la cancérogenèse. En dépit d'une recherche intensive, leur mécanisme d'action précis n'est pas parfaitement élucidé. Leur rôle dans des boucles de régulation ainsi que les modulations particulièrement fines de leur expression et de celle de leurs gènes cibles restent complexes à explorer, d'autant plus qu'une grande partie des miRs sont pro- ou anti-tumoraux selon le type de cancer. L'essor du séquençage à haut débit a permis l'identification de dérégulations majeures du miRnome dans le cancer et l'établissement de signatures miR caractéristiques. Dans le CCS, miR-139-5p et miR-483-5p sont deux miRs qui contribuent au phénotype agressif du CCS et sont des biomarqueurs prometteurs tant au niveau diagnostique que pronostique.**

## IV) Voie Wnt/ $\beta$ -Caténine

Les voies de signalisation Wnt sont des voies hautement conservées qui contribuent à l'embryogenèse, la régénération des tissus, l'homéostasie, la différenciation cellulaire, le maintien du pool de cellules souches et à la mobilité cellulaire<sup>343</sup>. Ces voies de signalisation sont classiquement catégorisées en voie canonique, dépendante de la  $\beta$ -Caténine ou encore appelée voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -Caténine ; et en voies non-canoniques, indépendantes de la  $\beta$ -Caténine. Les premières découvertes concernant ces voies de signalisation ont été faites chez la drosophile, aussi, certains acteurs sont identiques entre drosophile et humain, mais ne possèdent pas la même dénomination. Dans ce chapitre, je décrirai brièvement les acteurs communs des deux types des voies, puis les voies non-canoniques avant de me focaliser sur la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -Caténine.

### *1. Acteurs communs des voies Wnt canonique et non-canonique*

D'une manière générale, les voies de signalisation Wnt impliquent un ligand Wnt, son récepteur Frizzled (Fz) et la phosphoprotéine Dishveled (Dvl). La liaison du ligand Wnt avec Fz va permettre le recrutement de Dvl. Dvl est considéré comme le 1<sup>er</sup> acteur cytoplasmique de la voie et joue un rôle dans toutes les voies de signalisation Wnt<sup>343</sup>. On distingue classiquement la voie Wnt canonique, ou voie Wnt/ $\beta$ -Caténine, dépendante de la  $\beta$ -Caténine et les voies non-canoniques, indépendantes de la  $\beta$ -Caténine, représentées par la voie Planar cell plolarity (PCP) et la voie du calcium.

#### *1.1 Wnt*

Les protéines Wnt sont une famille de 19 glycoprotéines, d'environ 350 à 400 AA et 40kDa, avec un domaine conservé de 22 à 24 résidus cystéines<sup>343-345</sup>. Elles ont été découvertes dans les années 1980 chez la souris sous le nom de int-1<sup>346,347</sup> et chez la drosophile sous le nom de *wingless* (*wg*)<sup>348-350</sup>. L'appellation Wnt résulte de la contraction de ces deux précédents noms.

Ce sont des protéines très conservées entre les espèces<sup>344</sup>, avec une structure en forme de main, composée d'une « paume » et de deux domaines dont l'aspect a été rattaché à celui de la pince pouce-index, lui permettant de se lier au domaine extracellulaire de leurs récepteurs<sup>345</sup>. La synthèse de la protéine Wnt s'effectue dans le réticulum endoplasmique (RE), où elle va être modifiée par acylation et glycosylation<sup>345,351</sup>. La glycosylation améliore l'efficacité de sécrétion de la protéine, mais n'est pas indispensable. L'acylation est effectuée par la Porcupine, qui ajoute un groupement lipidique palmitoléate à la protéine : cette étape est indispensable à sa fonction et à sa sécrétion, mais a aussi pour effet de rendre la protéine hydrophobe. Cela pose la question de son transport extracellulaire. Le mécanisme le plus souvent décrit est qu'une fois synthétisée et acylée, Wnt s'arrime à la protéine transmembranaire Wntless/Evi, permettant sa sécrétion dans des vésicules extracellulaires, via l'appareil de Golgi<sup>352</sup>.

Plusieurs protéines Wnt peuvent activer un même récepteur Fz<sup>353</sup> et plusieurs récepteurs Fz peuvent être activés par la même protéine Wnt. Toutefois, il est communément admis que Wnt1, Wnt8 et Wnt3a activent préférentiellement la voie canonique tandis que Wnt5a et Wnt11 activent plutôt les voies non-canoniques<sup>354</sup>.

### *1.2 Frizzled*

Frizzled (Fz) est un récepteur couplé aux protéines G<sup>355</sup>. On dénombre 10 isoformes de Fz chez l'homme<sup>356</sup>. Il est composé :

- d'un domaine extracellulaire N-terminal d'environ 120 AA comportant un motif très conservé entre espèce de 10 cystéines (cystein-rich domain, CRD)<sup>353,356</sup> qui permet l'interaction avec Wnt<sup>353,357</sup>
- d'une partie transmembranaire de 7 domaines<sup>355,356</sup>
- d'un domaine C-terminal intracellulaire, comprenant un motif KTXXXW<sup>358</sup>.

Fz interagit avec Wnt via 2 sites : le site 1, hydrophobe, qui permet d'arrimer le groupement lipidique palmitoléate du « pouce » de Wnt et le site 2, à l'opposé du site 1, qui arrime « l'index » de Wnt<sup>359</sup>.

### 1.3 Dishevelled

Dishevelled (Dvl) est une protéine qui est également hautement conservée entre espèces et composée de plusieurs domaines<sup>360</sup> :

- un domaine N-terminal DIX (DIshvelled and aXin), de 82 à 85 AA. Ce domaine permet l'activation de la voie canonique Wnt en permettant l'interaction entre Dvl et l'Axine (protéine du complexe de dégradation de la  $\beta$ -Caténine, cf. point 1-IV.3.1.4)<sup>361</sup>.
- une région dite « basique » comportant des résidus sérine et thréonine, qui joue un rôle dans la liaison protéine-protéine
- un domaine central PDZ (Post synaptic density protein, Drosophila disc large tumor suppressor, and Zonula occludens-1 protein) de 73 AA, qui joue un rôle majeur dans la conformation de Dvl et dans la liaison des ligands. Il interagit notamment avec le motif KTXXXW de la région C-terminale de Fz. Ce domaine central serait notamment impliqué dans la direction du signal Wnt entre voie canonique et voie non-canonique.
- une zone comportant un signal d'import nucléaire, assurant le déplacement de Dvl du cytoplasme au noyau.
- une région riche en proline, qui joue un rôle dans la liaison protéine-protéine
- un domaine C-terminal DEP (Dishevelled, Egl-10, Pleckstrin), de 75 AA et permet notamment l'interaction entre Dvl et DAAM1 dans la voie non canonique PCP, mais semble aussi jouer un rôle dans la voie canonique<sup>362</sup>.
- une zone comportant un signal d'export nucléaire, qui assure le déplacement de Dvl du noyau vers le cytoplasme.

## 2. Voies Wnt non canoniques (Figure 19)

### 2.1 Voie Planar cell plolarity (PCP)

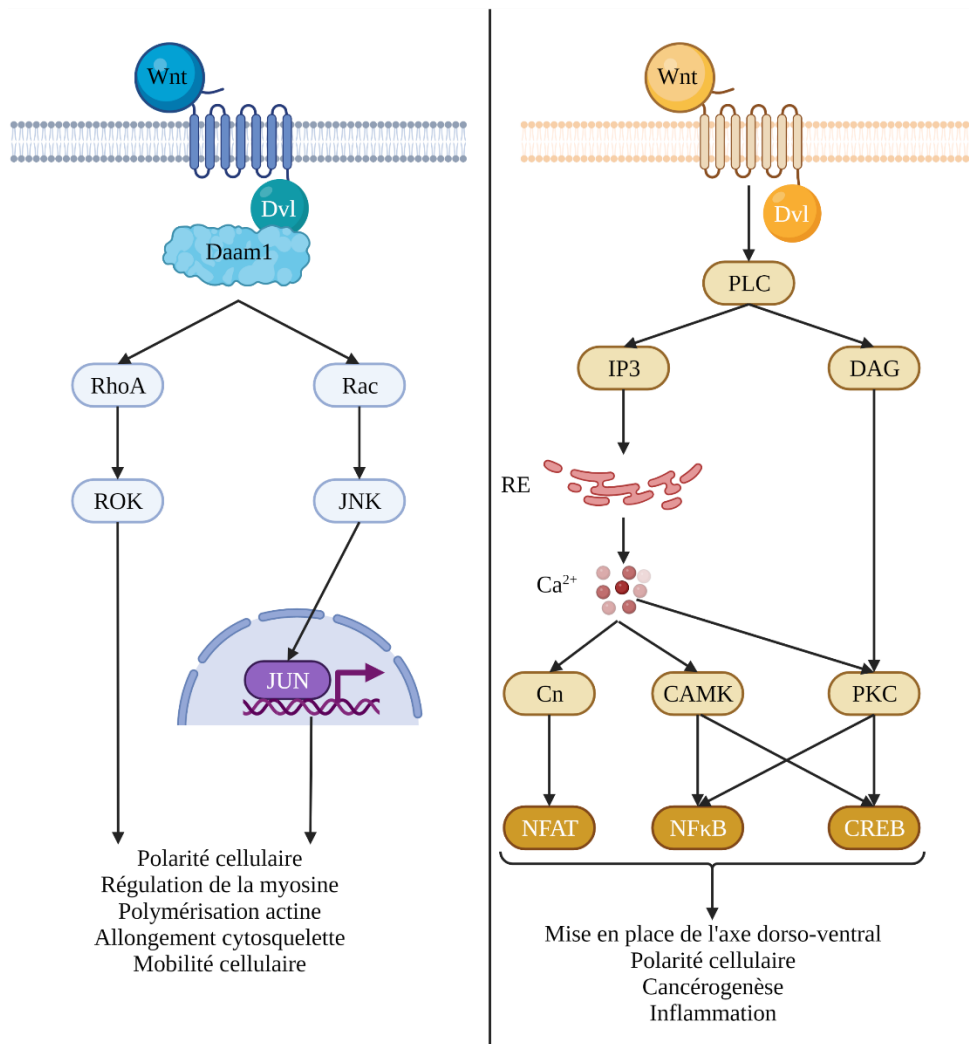
La voie PCP régule la polarité des cellules (par exemple l'orientation des cheveux, les cils de l'oreille interne, la polarisation ciliaire du tractus pulmonaire) et la mobilité cellulaire,



notamment pendant la gastrulation et la neurulation<sup>363</sup>. Elle dépend notamment des ligands Wnt5a, Wnt7 et Wnt 11. La liaison de Wnt à Fz dans cette voie est indépendante de LRP5/6<sup>343</sup> (cf. page 117). Cette liaison va recruter Dvl, qui va ensuite activer de petites GTPases de la famille Rho : RhoA et Rac, via Daam1 (Disheveled-associated activator of morphogenesis 1). RhoA va ensuite activer la Rho-kinase (ROK), tandis que Rac activera la kinase JUN-N-terminal (JNK). JNK va activer le facteur de transcription JUN via la voie des MAP kinases (MAPK). Ces deux acteurs vont jouer un rôle dans la régulation de la myosine, la polymérisation des fragments d'actine, l'allongement du cytosquelette et le mouvement cellulaire directionnel<sup>343,363</sup>.

## 2.2 Voie du calcium<sup>364</sup>

La voie Wnt/Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) aboutit à la production de  $\text{Ca}^{2+}$  par le RE. La liaison Wnt-Fz va entraîner l'activation de la phospholipase C (PLC), qui induit une augmentation de l'inositol triphosphate (IP3) et du diacylglycérol (DAG). L'IP3 va interagir directement avec les canaux calcium du RE et provoquer le relargage d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  par le RE, activant ainsi la CaMK et la calcineurine (Cn). Le DAG va activer la voie PKC. Ces deux voies parallèles vont contribuer à l'activation des protéines NF $\kappa$ B, NFAT et CREB. La voie du calcium est impliquée dans la mise en place de l'axe dorso-ventral chez les vertébrés, dans la cancérogenèse et dans l'inflammation.



**Figure 19 : Voies Wnt non-canoniques**

A gauche, la voie PCP. A droite, la voie du calcium

Dvl : Dishevelled, Daam1 : Disheveled-associated activator of morphogenesis 1, ROK : Rho-Kinase, JNK : kinase JUN-N-terminal, PLC : Phospholipase C, IP3 : inositol triphosphate, DAG : DiAcylGlycerol, RE : Réticulum Endoplasmique, Cn : Calcineurine, CAMK : Calmoduline-dependent protein Kinase, PKC : Protéine Kinase C, NFAT : Nuclear factor of activated T-cells, NFkB : Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, CREB : cAMP response element-binding protein

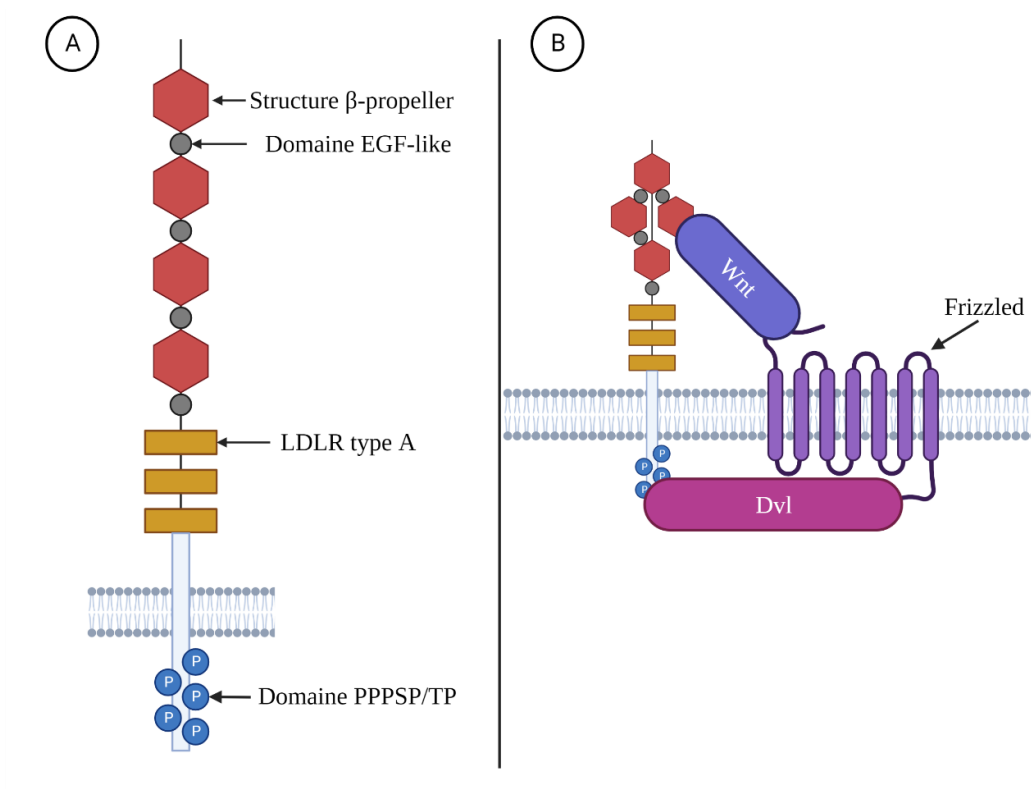
### 3. Voie canonique Wnt/ $\beta$ -Caténine

#### 3.1 Les différents acteurs de la voie

##### 3.1.1 LRP5/6<sup>365</sup>

Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 et 6 (LRP5/6, ou Arrow chez la drosophile) sont des récepteurs à domaine transmembranaire unique, de 1600AA et 180kDa environ et partageant une homologie de l'ordre de 70%<sup>366</sup>. Ces récepteurs possèdent un domaine extracellulaire qui contient 4 répétitions d'une structure  $\beta$ -propeller associée à un domaine

epidermal growth factor (EGF)-like, suivi de 3 répétitions LDL-R (Low-density lipoprotein receptor) type A (Figure 20A)<sup>367</sup>. Les motifs  $\beta$ -propeller sont indispensables au fonctionnement de LRP5/6 et la délétion d'un seul de ces motifs interfère avec son fonctionnement<sup>366</sup>. Le domaine intracellulaire de LRP5/6 contient 5 motifs PPP(S/T)P, qui peuvent être phosphorylés par la Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) et la Casein Kinase 1 (CK1)  $\gamma$ <sup>368-370</sup>. LRP5/6 a été identifié comme un co-récepteur dans la voie canonique Wnt : la stimulation de Fz par Wnt induit la formation d'un complexe ternaire Wnt-Fz-LRP6 au niveau extracellulaire<sup>371,372</sup>, et l'association de Fz-LRP5/6-Dvl au niveau intracellulaire, notamment via les domaines DIX et PDZ de Dvl<sup>373</sup> (Figure 20B).



**Figure 20 : Schéma du co-récepteur LRP5/6 et de son interaction avec Frizzled et Dishevelled**

Adapté de MacDonald & He, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012

(A) Schéma du récepteur LRP5/6

(B) Schéma de l'interaction de LRP5/6 et Frizzled au niveau intra et extracellulaire. L'interaction de Dvl avec LRP5/6 et Frizzled est mal caractérisée, avec plusieurs modèles, impliquant le domaine DIX de Dvl, le domaine DAX de l'Axine, et la phosphorylation de l'extrémité C terminale de LRP5/6 par CK1 $\gamma$  et GSK3 $\beta$ , sans que le mécanisme précis ne soit connu. Pour plus de simplicité, l'Axine, CK1 $\gamma$  et GSK3 $\beta$  ne sont donc pas représentées.

A noter que la nature exacte de l'interaction au niveau intracellulaire est mal caractérisée<sup>366</sup>. Toutefois, la présence du domaine cytoplasmique et du motif PPP(S/T)P<sup>371</sup> ainsi que sa phosphorylation<sup>368</sup> est indispensable pour la fonction du récepteur.

LRP5/6 est notamment régulé négativement par Dickkopf-related protein 1 (DKK), qui se fixe sur LRP5/6, empêchant d'une part son interaction avec Fz<sup>374</sup> et d'autre part provoquant son internalisation<sup>375</sup>.

### 3.1.2 ZNRF3/RNF43

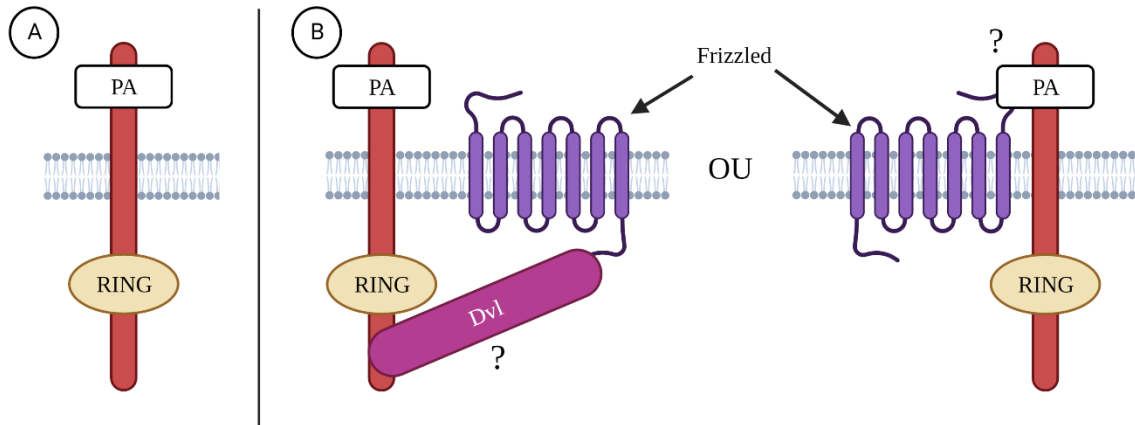
ZiNc and Ring Finger protein 3 (ZNRF3) et RiNg Finger protein 43 (RNF43) sont des E3-ubiquitines ligases du récepteur Fz, identifiées pour la 1<sup>ère</sup> fois en 2012<sup>376,377</sup>. Ces deux protéines paralogues sont localisées à la membrane et possèdent un peptide signal, un domaine extracellulaire associé aux protéases, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire en doigt de zinc (RING) (Figure 21A). Elles agissent comme co-répresseurs des différentes voies de signalisation Wnt (canonique et non-canoniques) en promouvant l'ubiquitination de Fz et LRP5/6, son internalisation et donc sa dégradation<sup>376,377</sup>. Dans la mesure où la fonction de ces deux protéines est redondante, il est intéressant de noter que l'altération de la portion RING d'une seule des deux suffit à altérer la dégradation de Fz, suggérant un effet dominant négatif<sup>376,378</sup>.

En présence de R-spondine (Rspo), une protéine agissant comme facteur de croissance pour les cellules souches, ZNRF3/RNF43 (Z/R) change de partenaire et se lie à « Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled Receptor 4/5 » (LGR4/5), détournant ainsi Z/R de Fz. Ce mécanisme de switch entre protéines induit la clairance membranaire de Z/R<sup>376</sup>, provoque l'accumulation de Fz à la membrane et donc une augmentation de la signalisation de la voie Wnt/ $\beta$ -Caténine, via une sensibilisation des cellules à Wnt<sup>377</sup>.

Le mécanisme d'action précis de Z/R et ses interactions avec d'autres protéines clés de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -Caténine reste indéterminé<sup>379</sup> : l'interaction de ZNRF3/RNF43 avec Fz pourrait être intracellulaire par l'intermédiaire de Dvl<sup>378</sup>, ou bien extracellulaire via les domaines extracellulaires des deux protéines<sup>380</sup> (Figure 21B). Ces deux mécanismes ne sont

pas forcément contradictoires, mais pourraient être en lien avec le type de signalisation Wnt impliqué (canonique vs non-canonique)<sup>380</sup>.

Par ailleurs, il a été récemment mis en évidence que l'activation de la fonction d'ubiquitine ligase de ZNRF3/RNF43 était liée à sa phosphorylation par CK1<sup>381</sup>.



**Figure 21 : Schéma du co-récepteur ZNRF3/RNF43 et de son interaction avec Frizzled**

Adapté de Tsukiyama et al., *Bioessays*, 2021

(A) Schéma du récepteur ZNRF3/RNF43. PA : domaine extracellulaire associé aux protéases ; RING : domaine en doigt de zinc

(B) Schéma de l'interaction de ZNRF3/RNF43 et Frizzled. L'interaction de ZNRF3/RNF43 avec Frizzled est mal caractérisée, avec plusieurs modèles proposés : une interaction au niveau intracellulaire via Dvl ou une interaction extracellulaire entre le domaine extracellulaire de Frizzled et le domaine PA de ZNRF3/RNF43.

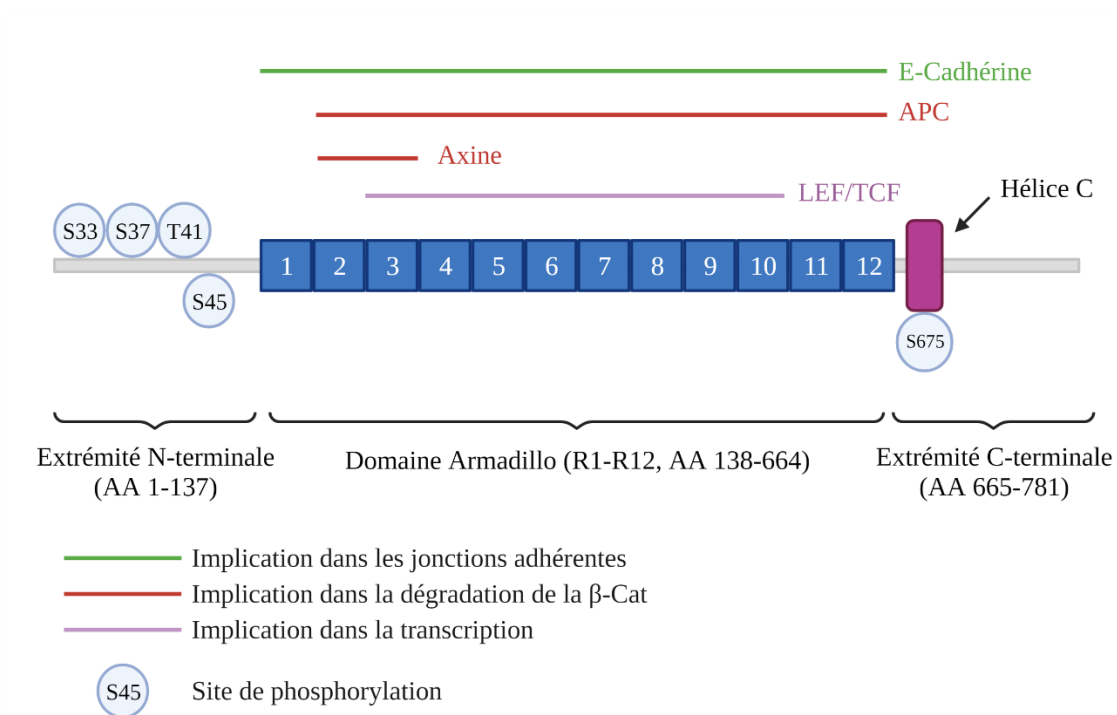
### 3.1.3 $\beta$ -Caténine<sup>382,383</sup>

Le gène CTNNB1 codant pour la  $\beta$ -Caténine est localisé sur le chromosome 3p21<sup>384</sup>. La  $\beta$ -Caténine est une protéine de 92kDa et de 781AA. Son rôle a d'abord été identifié dans l'adhésion cellulaire médiée par les cadhérines : son nom de « Caténine » vient du latin catena (« chaîne »), puisque son rôle a été découvert dans la liaison entre le cytosquelette et les Cell Adhesion Molecules (CAMs)-calcium dépendantes<sup>385,386</sup>. Son rôle dans la signalisation a été découvert peu de temps après<sup>387,388</sup>.

Au niveau structurel, elle est composée (Figure 22) :

- d'un domaine N terminal (résidus 1-137), comportant les sites de phosphorylation S33, S37, S45 et T41, qui vont être phosphorylés par le complexe de dégradation de la  $\beta$ -Caténine (cf. points 1-IV.3.1.4 et 1-IV.3.2.1).

- d'une structure centrale très conservée, composée des 12 répétitions Armadillo (R1 à R12, résidus 138-664)<sup>389,390</sup>. Chaque répétition d'Armadillo est composée de 42 résidus<sup>389,390</sup> et de 3 hélices, à l'exception de la répétition R7, qui n'en comporte que 2<sup>382</sup>. L'ensemble forme une super hélice chargée positivement. Le domaine central permet l'interaction de la  $\beta$ -Caténine avec ses différents partenaires et sa structure est donc relativement rigide comparé aux domaines N et C terminaux, qui sont d'une part moins conservés et d'autre part plus flexible structurellement<sup>383</sup>.
- et d'un domaine C-terminal (résidus 665-781)<sup>382</sup>, comprenant une hélice  $\alpha$  entre les résidus 667 et 683, appelée « hélice C ». L'hélice C est suivie d'une structure de type hélice  $3_{10}$  (résidus 684-691, ce type d'hélice étant classiquement retrouvé en aval des hélices  $\alpha$ )<sup>382</sup>.



**Figure 22 : Structure de la  $\beta$ -Cat et relation avec quelques partenaires principaux**

Adapté de Valenta et al, *EMBO J*, 2012

Les différents partenaires de la  $\beta$ -Caténine partagent des sites de liaison se chevauchant, notamment au niveau de R3 à R9 : ainsi, les différents partenaires ne peuvent pas se fixer en même temps sur la  $\beta$ -Caténine.

Les fonctions d'adhésion et de signalisation cellulaire de la  $\beta$ -Caténine semblent indépendantes l'une de l'autre : la partie C-terminale, et notamment l'hélice C est indispensable pour l'activité de signalisation mais pas pour l'adhésion cellulaire<sup>382,391,392</sup>.

D'ailleurs, la fonction d'adhésion de la  $\beta$ -Caténine versus sa fonction de signalisation est en partie régulée par des modifications post-traductionnelles. Ainsi, la phosphorylation de résidus sérine du domaine C-terminal accroît l'interaction entre la  $\beta$ -Caténine et la cadhérine, la phosphorylation de résidus tyrosine dans le domaine central et de la sérine 675 promeut l'activité de signalisation, tandis que la phosphorylation des résidus sérine 33, 37, 45 et de la thréonine 41 du domaine N-terminal promeut la dégradation de la  $\beta$ -Caténine<sup>383</sup>. D'autres modifications post-traductionnelles telles que l'acétylation ou la glycosylation de la  $\beta$ -Caténine peuvent également moduler sa fonction<sup>383</sup>.

#### 3.1.4 Complexe de dégradation de la $\beta$ -Caténine (Axine / APC / GSK3 $\beta$ / CK1 $\alpha$ ) et $\beta$ -TRCP<sup>393,394</sup>

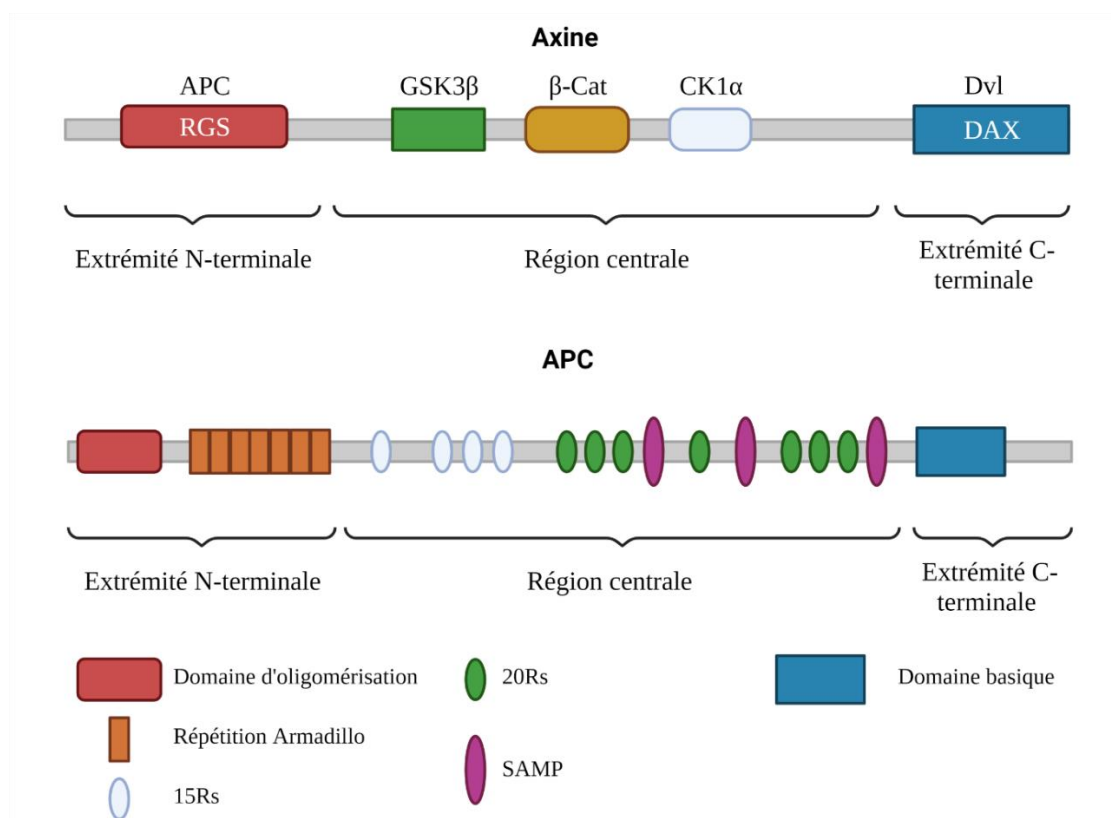
Le complexe de dégradation de la  $\beta$ -Caténine est composé de 4 protéines principales : l'Axine, APC (Figure 23), GSK3 $\beta$  et CK1 $\alpha$ . Son rôle est notamment de phosphoryler la  $\beta$ -Caténine, permettant ainsi sa reconnaissance par  $\beta$ -TRCP ( $\beta$ -Transducin Repeat Containing E3 ubiquitin Protein ligase) qui va ubiquitiner la  $\beta$ -Caténine pour la diriger vers le protéasome, où elle sera dégradée. Le mécanisme de fonctionnement du complexe de dégradation de la  $\beta$ -Caténine sera détaillé en partie 3.2.

- L'*Axine 1* et l'*Axine 2* sont deux protéines paralogues, présentant une homologie d'environ 45%<sup>395</sup>. Elles ont un rôle central dans le complexe de dégradation puisqu'elles lient l'ensemble des autres composants entre eux.

Le gène de l'*Axine 1* est situé sur le chromosome 16p13. Il s'agit d'une protéine de 95kDa et de 862AA. Elle est composée d'un domaine N-terminal portant un motif RGS (Regulators of G-protein signaling), qui permet l'arrimage d'APC. Sa région centrale permet la liaison de GSK3 $\beta$ , de CK1 $\alpha$  et de la  $\beta$ -Caténine. Son extrémité C-terminale présente un domaine DAX (DIX-of-AXin), qui peut se lier au domaine DIX de Dvl<sup>361,395</sup>.

Le gène de l'Axine 2 (aussi appelée Conductine ou Axile) est situé sur le chromosome 17q24. Il s'agit d'une protéine de 93kDa environ, composée de 843AA. Comme l'Axine 1, elle possède un domaine de liaison à APC, à GSK3 $\beta$ , à la  $\beta$ -Caténine et à Dvl<sup>395</sup>. L'Axine 2 est un gène cible de la  $\beta$ -Caténine, contrairement à l'Axine 1. En effet, l'Axine 2 est régulée positivement par la  $\beta$ -Caténine et est impliquée dans le rétrocontrôle négatif de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -Caténine, en limitant la durée et l'intensité du signal Wnt<sup>395,396</sup>.

- APC est la 2<sup>ème</sup> protéine la plus importante du complexe de dégradation. Son gène est situé sur le chromosome 5q21. Il s'agit d'une protéine de 310kDa et 2843 AA. Son extrémité N-terminale comporte un domaine d'oligomérisation et de répétitions Armadillo. L'extrémité C-terminale comporte un domaine « basique ». Entre les deux extrémités, la région centrale d'APC expose des 4 répétitions de 15AA (15Rs) et 7 répétitions de 20AA (20Rs) permettant la liaison à la  $\beta$ -Caténine, et trois répétitions de Sérine-Alanine-Méthionine-Proline (SAMP) permettant la liaison à l'Axine.



**Figure 23 : Schéma des protéines Axine et APC**

Adapté de van Kappel & Madelon, *Br J Pharmacol*, 2017

15Rs : répétitions de 15 AA permettant la liaison à la  $\beta$ -Cat ; 20Rs : répétitions de 20AA permettant la liaison à la  $\beta$ -Cat ; SAMP : répétitions de Sérine-Alanine-Méthionine-Proline permettant la liaison à l'Axine.



- *GSK3β* est une Sérine-Thréonine kinase appartenant à la sous-famille des « glycogène synthase kinases », dont le rôle principal est la régulation du métabolisme glucidique. Son gène est localisé sur le chromosome 3q13. Il s'agit d'une protéine de 47kDa et de 420AA. Son rôle dans la signalisation Wnt a été décrit pour la 1<sup>ère</sup> fois en 1992<sup>397</sup> et son mécanisme d'action, notamment son interaction avec l'Axine, a été progressivement identifié par plusieurs équipes dans la deuxième moitié des années 1990<sup>398-400</sup>. Son rôle dans la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -Caténine est la phosphorylation de la  $\beta$ -Caténine mais aussi d'APC, de l'Axine et de TCF/LEF.

- *CK1 $\alpha$*  est une Sérine-Thréonine kinase de 39kDa et 337AA dont le gène est localisé sur le chromosome 5q32. Elle appartient à la famille des CK1, dont 7 isoformes sont connus chez l'homme. Les CK1 sont présentes dans la plupart des types cellulaires, où elles régulent de nombreux processus. CK1 $\alpha$  a été particulièrement décrite pour son rôle dans la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -Caténine, notamment car elle est responsable de la première phosphorylation de la  $\beta$ -Caténine, indispensable à sa dégradation.

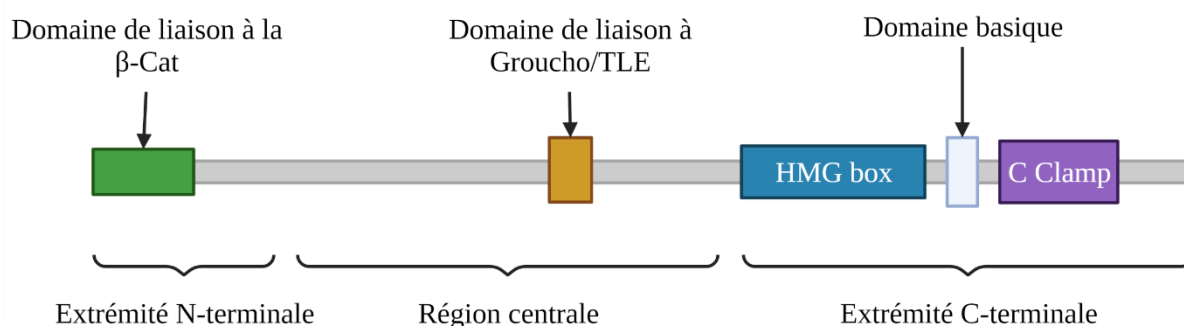
-  *$\beta$ -TRCP* appartient à la famille des protéines F-box, caractérisées par la présence d'un motif d'environ 40AA dénommé « F-box ». Ces protéines rentrent dans la composition d'un complexe E3 ubiquitine-ligase appelé SKP1-Cullin-F-Box (SCF), dont la fonction est dépendante de la phosphorylation de la protéine cible. Son gène est localisé sur le chromosome 10q24. Cette protéine a un poids moléculaire de 69kDa, pour 605AA. Elle est responsable de l'ubiquitination de la  $\beta$ -Caténine, permettant sa reconnaissance et sa dégradation par le protéasome.

### 3.1.5 Effecteurs nucléaires : TCF/LEF<sup>401</sup>

Lymphoid Enhancer Factor (LEF) / T-Cell Factor (TCF) (Figure 24) appartiennent à la famille des facteurs de transcription High-Mobility Group (HMG)-box, c'est-à-dire qu'ils possèdent un domaine spécialisé dans la liaison à l'ADN<sup>402</sup>. Identifiés pour la première fois en 1991 dans les lymphocytes B et T, TCF/LEF ont ensuite été identifiés comme les acteurs finaux de voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -Caténine<sup>388,403-406</sup>. Si la plupart des invertébrés n'ont qu'un seul TCF, la famille TCF/LEF comporte 4 membres chez les vertébrés : TCF1 (ou TCF7, chr 5q31, 384

AA, 42kDa), LEF1 (aussi appelé TCF1 $\alpha$  ou TCF10, chr 4q25, 399 AA, 44kDa), TCF3 (ou TCFL1, chr 2p11, 588 AA, 63kDa) et TCF4 (ou TCFL2, chr 10q25, 619 AA, 68 kDa). Ces 4 membres possèdent tous, à leur partie C-terminale, outre l'HMG-box, un peptide de résidus basiques, appelée « queue basique ». Ensemble, l'HMG-box et la queue basique forment le domaine de liaison à l'ADN, qui reconnaît une séquence consensus 5'-SCTTTGATS-3'<sup>401,406</sup>. Certains TCF possèdent également un domaine « C clamp » enrichi en résidus basiques, aromatiques et en résidus cystéines, qui sert de second domaine de liaison à l'ADN<sup>407</sup>.

En l'absence de  $\beta$ -Caténine, TCF/LEF réprime la transcription notamment grâce à sa liaison avec le co-répresseur Groucho/Transducin-Like Enhancer of split (TLE), au niveau de sa région centrale<sup>408-410</sup>. Enfin à l'extrémité N-terminale, on retrouve un domaine de liaison à la  $\beta$ -Caténine.



**Figure 24 : Schéma général du facteur de transcription TCF/LEF**

Adapté de Cadigan & Waterman, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012

Le domaine C Clamp n'est pas présent sur tous les isoformes de TCF/LEF.

Malgré une origine commune, les 4 membres de TCF/LEF sont situés sur des loci chromosomiques différents et ne possèdent pas les mêmes nombres d'AA ni le même poids moléculaire car ils subissent des modifications épigénétiques. Cette hétérogénéité au sein de la même famille semble être responsable de fonctions différentes pour la régulation des gènes. Ainsi, TCF3 agit plutôt comme un répresseur de la transcription<sup>411,412</sup>, LEF1 comme un activateur<sup>413</sup>, tandis que TCF1 et TCF4 agissent comme répresseurs ou comme activateurs en fonction du contexte<sup>414</sup>. Chez les vertébrés, il est postulé que les TCF peuvent effectuer un switch transcriptionnel lors de la stimulation par la  $\beta$ -Caténine : ainsi, en l'absence de  $\beta$ -

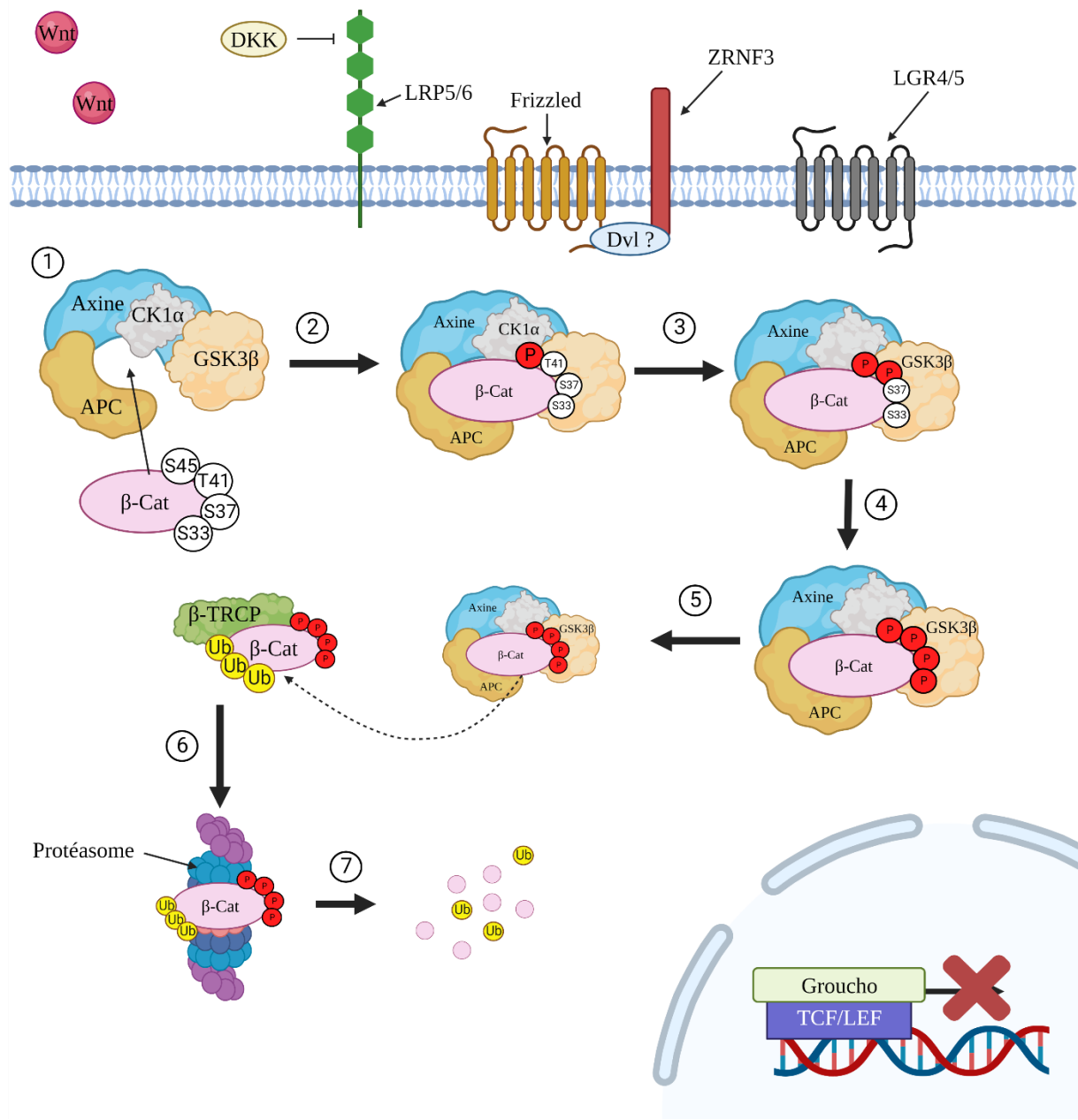
Caténine, la transcription pourrait être réprimée par TCF3/Groucho/TLE tandis qu'en présence de  $\beta$ -Caténine, TCF3 cèderait sa place à un TCF agissant comme activateurs de la transcription<sup>415</sup>. L'activation de la transcription par TCF/LEF passerait notamment par la modification de l'acétylation des histones, via le recrutement d'histone acetyl-transférases (HAT), qui permettent une décondensation de la chromatine.

### 3.2 Voie de signalisation

#### 3.2.1 Etat « Off »

En l'absence de ligand Wnt, la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -Caténine est dite à l'état « Off » (Figure 25). La voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -Caténine étant impliquée dans de nombreux processus fondamentaux tels que le développement ou le maintien de l'homéostasie cellulaire, la concentration de  $\beta$ -Caténine est régulée finement. Ainsi, à l'état Off, la  $\beta$ -Caténine est synthétisée et dégradée en permanence pour maintenir une concentration basse et constante<sup>416</sup>. Comme décrit plus haut, cette dégradation fait appel au complexe de dégradation de la  $\beta$ -Caténine, dont nous avons détaillé les 4 principaux composants : l'Axine, qui sert de protéine chaperonne pour l'ensemble du complexe et va lier les 3 autres composants du complexe de dégradation, APC, GSK3 $\beta$  et CK1 $\alpha$ <sup>398,400,417</sup>.

La  $\beta$ -Caténine va se lier à l'Axine au niveau de la région centrale et à APC via les répétitions 15Rs. Ce complexe va ensuite être reconnu par CK1 $\alpha$  qui va initier la première phosphorylation de la  $\beta$ -Caténine au niveau de la Sérine 45<sup>418</sup>. La  $\beta$ -Caténine ainsi phosphorylée va être reconnue par GSK3 $\beta$ , qui va à son tour phosphoryler la  $\beta$ -Caténine séquentiellement sur la Thréonine 41 puis sur la Sérine 37 et la Sérine 33<sup>419</sup>. La  $\beta$ -Caténine phosphorylée sur ces 4 résidus est reconnue par SCF/ $\beta$ -TRCP, qui catalyse sa polyubiquitination, permettant ainsi sa reconnaissance et sa dégradation par le protéasome<sup>399,420</sup>. Il n'est pas tout à fait clair si la polyubiquitination par  $\beta$ -TRCP se fait au sein du complexe de dégradation ou en dehors. La  $\beta$ -Caténine ainsi dégradée n'est pas transloquée au noyau : le facteur de transcription TCF/LEF reste associé à son co-répresseur Groucho et la transcription des gènes cibles n'est pas active.



**Figure 25 : Voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -Caténine en l'absence de ligand**

En l'absence de ligand, Fz est lié à ZRN3, probablement grâce à Dvl. 1) Le complexe de dégradation va lier la  $\beta$ -Caténine, puis 2) CK1 $\alpha$  va phosphoryler la sérine 45. Ceci va induire une phosphorylation séquentielle par GSK3 $\beta$  de 3) la thréonine 41 puis 4) la sérine 37 et la sérine 33. 5) La  $\beta$ -Caténine phosphorylée va être reconnue par  $\beta$ -TRCP qui va l'ubiquitiner, et 6) permettre sa reconnaissance par le protéasome et donc 7) sa dégradation. La  $\beta$ -Caténine n'est pas transloquée au noyau et la transcription des gènes cibles est donc inhibée.

Même si le mécanisme général de la dégradation de la  $\beta$ -Caténine est connu, il existe de nombreuses questions irrésolues autour du complexe de dégradation et son fonctionnement précis. Par exemple, la façon dont l'Axine lie ces composants reste à ce jour incertaine, et on ne sait pas s'il existe un ordre de liaison prédéterminé ou si les composants se lient au hasard.

En outre, le composant limitant de ce complexe de dégradation et les rôles distincts de l'Axine et d'APC ne sont pas tout à fait clairs : il a d'abord été montré que l'Axine était présente en très petite quantité comparée aux autres composants et que cette quantité, si elle est limitante, est aussi sous-optimale par rapport à la quantité nécessaire pour promouvoir une dégradation importante de la  $\beta$ -Caténine<sup>421</sup>. Chez la drosophile, les niveaux d'ARNm d'Axine et d'APC sont équivalents, mais la protéine d'APC est environ 5 fois plus abondante que celle d'Axine<sup>422</sup>. Pendant deux décennies, l'Axine a donc été considérée comme l'élément majeur du complexe de dégradation. Plus récemment, une étude de quantification de chaque composant du complexe de dégradation par spectrométrie de masse a montré qu'APC était le composant limitant, en contradiction avec les autres études publiées jusqu'à présent<sup>423</sup>. Par ailleurs, APC et l'Axine présentent des sites de fixation redondants, qui peuvent partiellement se compléter en cas de défaillance sur l'une des deux protéines : toutefois, l'efficacité du complexe de dégradation est maximale pour les protéines pleinement fonctionnelles<sup>424</sup>. De plus, le ratio relatif entre l'Axine et APC semble être un élément déterminant de l'efficacité de la dégradation de la  $\beta$ -Caténine<sup>422</sup>. La phosphorylation des différents composants est également sujet à controverse. Il a été bien montré que GSK3 $\beta$  phosphorylait l'Axine<sup>400,425</sup> et APC<sup>417</sup>, et que CK1 $\alpha$  phosphorylait l'Axine<sup>426</sup>, sans que le rôle exact de ces phosphorylations ne soit élucidées. Une étude montre que la phosphorylation de l'Axine par GSK3 $\beta$  ne modifie pas son affinité pour la  $\beta$ -Caténine<sup>400</sup>, alors qu'une autre étude montre que lors de la stimulation par Wnt, l'Axine est déphosphorylée et lie moins efficacement la  $\beta$ -Caténine<sup>425</sup>. Par ailleurs, l'effet de la phosphorylation de l'Axine sur sa stabilité est également controversée, avec soit une stabilité accrue<sup>427</sup>, soit un effet marginal sur la stabilité<sup>422</sup>. Plus récemment, il a été montré que le degré de phosphorylation de l'Axine par GSK3 $\beta$  variait selon la présence ou non de Wnt et que dans les deux cas, la présence d'APC était indispensable pour cette phosphorylation<sup>428</sup>. La relation entre APC, GSK3 $\beta$  et Axine est encore complexifiée par la mise en évidence de la phosphorylation d'APC par GSK3 $\beta$ , cette phosphorylation étant augmentée en présence de l'Axine<sup>400,417</sup>.

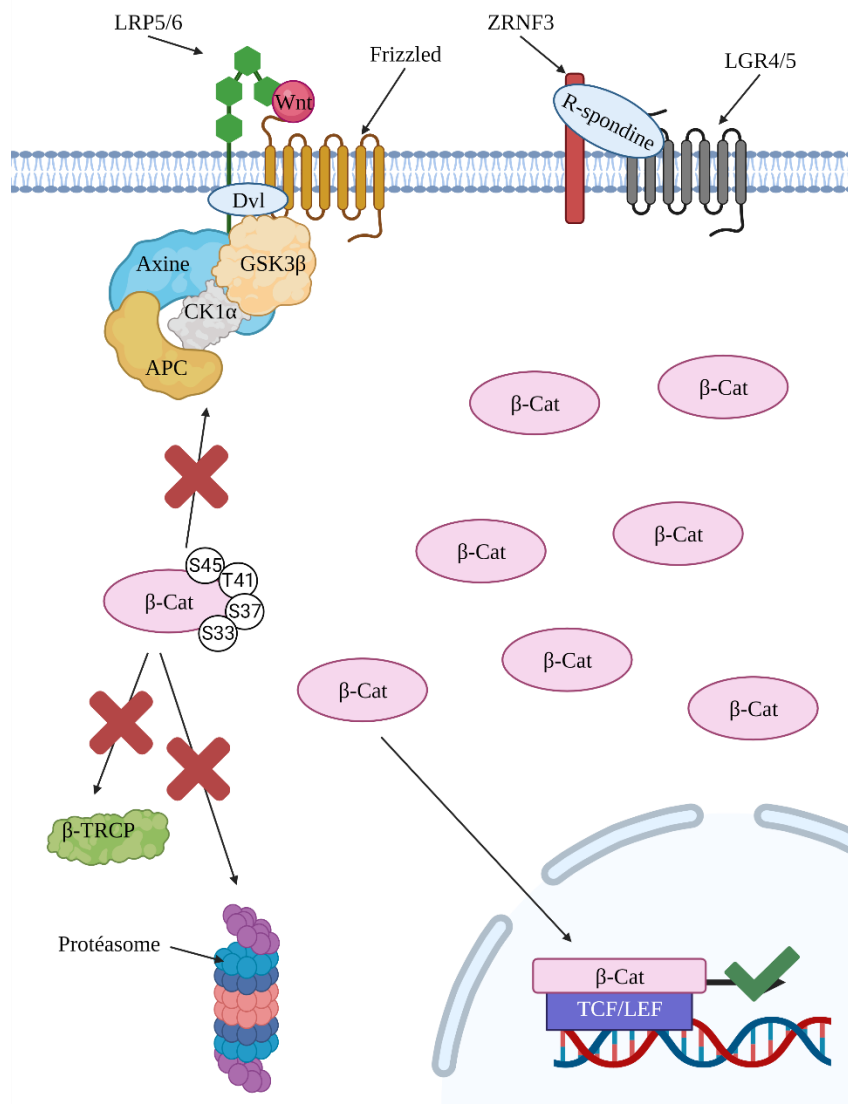
L'affinité de la  $\beta$ -Caténine pour les répétitions 20Rs d'APC est considérablement augmentée après la phosphorylation de ces répétitions par CK1 $\alpha$  et GSK3 $\beta$ <sup>398,429</sup>. L'augmentation de l'affinité de la  $\beta$ -Caténine pour APC met en compétition APC et l'Axine pour la liaison à la  $\beta$ -Caténine : il a donc été proposé qu'un des rôles d'APC soit de permettre la libération de la  $\beta$ -Caténine du complexe de dégradation et de favoriser son transfert vers  $\beta$ -TRCP (dans l'hypothèse où l'ubiquitination se fait en dehors du complexe de dégradation), pour permettre à une autre  $\beta$ -Caténine de prendre sa place<sup>430</sup>. Plutôt qu'une médiation de transfert  $\beta$ -TRCP, il a été aussi proposé qu'APC serve de support pour une ubiquitination de la  $\beta$ -Caténine *in situ*<sup>431</sup>. En accord avec ce postulat, une autre étude montre que l'ubiquitination de la  $\beta$ -Caténine se fait au sein même du complexe de dégradation et que la libération de la  $\beta$ -Caténine du complexe de dégradation se fait par interaction directe avec le protéasome au sein du complexe de dégradation<sup>432</sup>.

### 3.2.2 Etat « On »

La liaison de Wnt à Fz va dissocier ZNRF3/RN43 de Fz et permettre le recrutement de Dvl. Par ses domaines DIX et PDZ, Dvl va permettre la dimérisation de Fz et LRP5/6<sup>373</sup>. La formation du complexe Wnt-Fz-Dvl-LRP5/6 promeut la phosphorylation du motif PPP(S/T)P par GSK3 $\beta$ . Cette première phosphorylation est suivie de la phosphorylation d'un second site 3 AA en aval par CK1 $\alpha$ / $\delta$ / $\epsilon$ <sup>369,370</sup>, ce qui crée un site d'amarrage pour l'Axine<sup>368,370</sup>. A ce jour, la cinétique de phosphorylation de LRP5/6 n'est pas connue : GSK3 $\beta$  est-il recruté d'abord seul puis lié à l'Axine ? L'Axine est-elle recrutée en premier ? Ces questions sont débattues et quelques éléments de réponse seront abordés un peu plus bas.

Le LRP5/6 phosphorylé va ensuite recruter le complexe de dégradation de la  $\beta$ -Caténine, provoquant l'inactivation de ce dernier. L'ensemble est nommé « signalosome »<sup>433</sup>. Le complexe de dégradation n'étant plus disponible pour phosphoryler la  $\beta$ -Caténine, celle-ci n'est plus ubiquitinée ni dégradée. La liaison de Wnt à Fz aboutit donc à une stabilisation cytoplasmique de la  $\beta$ -Caténine. Celle-ci est ensuite transloquée au noyau<sup>434</sup>. La  $\beta$ -Caténine ne possède pas de domaine de liaison à l'ADN<sup>382,390</sup>. Elle se complexe donc avec les facteurs de

transcription déjà cités TCF/LEF, qui possèdent un domaine de fixation à l'ADN. Le complexe  $\beta$ -Caténine/TCF/LEF se lie alors à ses gènes cibles, via le Wnt Response Element (WRE), ce qui initie l'activation de la transcription<sup>434</sup> (Figure 26).



**Figure 26 : Voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -Caténine en présence du ligand Wnt**

En présence de ligand, ZRNK3 va être dissocié de Frizzled. Wnt va permettre de dimériser en extracellulaire LRP5/6 et Frizzled tandis que Dishevelled joue le même rôle en intracellulaire. Le complexe de dégradation de la  $\beta$ -Caténine va être séquestré à la membrane et ne peut donc plus phosphoryler la  $\beta$ -Cat. En l'absence de phosphorylation, la  $\beta$ -Caténine n'est plus reconnue par  $\beta$ -TRCP. De fait, elle n'est plus ubiquitinée et donc dégradée par le protéasome. La diminution de la dégradation de la  $\beta$ -Caténine va aboutir à sa stabilisation cytoplasmique, provoquant sa translocation nucléaire où elle va dissocier son facteur de transcription TCF/LEF de ses co-répresseur en prenant leur place. Ceci va permettre d'initier la transcription de gènes cibles par la fixation de TCF/LEF sur les gènes possédant un WRE.

De nombreux gènes cibles ont été identifiés tels que *c-myc*<sup>435</sup>, *Axin2*<sup>396,436</sup> ou la *cyclinD1*<sup>437</sup>...

Une liste des gènes cibles de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -Caténine est disponible sur le site du laboratoire de R. Nusse : <https://web.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/>.

Tout comme pour l'état « Off », la signalisation générale après activation de Fz par Wnt est connue, mais ses mécanismes précis demeurent inconnus. En particulier, la formation du signalosome et le mécanisme d'inactivation du complexe de dégradation sont loin d'être complètement élucidés. Plusieurs scénarii sont notamment proposés : la fixation de l'ensemble du complexe de dégradation par Fz, la dissociation du complexe, l'inhibition directe de GSK3 $\beta$ , l'inhibition de l'ubiquitination...

De façon intéressante, il a été montré que l'activation de la voie Wnt diminuait la phosphorylation de la  $\beta$ -Caténine par GSK3 $\beta$  et CK1 $\alpha$ , mais qu'il persistait des complexes de dégradation actifs continuant de phosphoryler et dégrader la  $\beta$ -Caténine. La stimulation Wnt réduirait donc la dégradation de la  $\beta$ -Caténine sans l'abolir complètement<sup>438</sup>.

Un des modèles d'inactivation du complexe repose sur le phénomène d'initiation/amplification de la phosphorylation LRP5/6<sup>373,433</sup> : lors de la phase d'initiation, le domaine Dvl recrute l'Axine couplée à GSK3 $\beta$ , ce qui va permettre la phosphorylation initiale de LRP5/6. Cette première phosphorylation crée alors un site d'amarrage permettant le recrutement de complexes Axine-GSK3 $\beta$  supplémentaires, qui vont à leur tour phosphoryler LRP5/6, créant ainsi un cycle d'amplification. En complément, certaines études proposent que la phosphorylation de LRP5/6 va ensuite inhiber directement GSK3 $\beta$  et augmenter l'affinité de LRP5/6 pour l'Axine, permettant un maintien du complexe à la membrane<sup>439,440</sup>. Certains auteurs proposent que l'ensemble aboutisse à une oligomérisation de complexes LRP5/6 et Fz<sup>441</sup>, provoquant ainsi des agrégats LRP5/6-Fz-Dvl avec polymérisation des domaines DIX de Dvl<sup>433,442</sup>. De manière intéressante, il est aussi proposé que le(s) complexe(s) de dégradation séquestré(s) à la membrane puisse(nt) ensuite être internalisé(s) dans des endosomes<sup>443</sup>, notamment grâce à l'action de la cavéoline<sup>441</sup>.

Un autre modèle établit que lors de la liaison de Wnt à Fz, LRP5/6 va être phosphorylé selon un mécanisme Dvl-dépendant. LRP5/6 recrute alors l'ensemble du complexe de dégradation et va inhiber GSK3 $\beta$ , qui ne va plus phosphoryler ni la  $\beta$ -Caténine, ni l'Axine. Par ailleurs, l'Axine va être déphosphorylée par la protéine phosphatase 1. Le domaine DAX de l'Axine se replierait



alors sur le domaine d'interaction à la  $\beta$ -Caténine, provoquant la fermeture du site de fixation de la  $\beta$ -Caténine. Dans ce modèle, l'Axine est inactivée et ne peut plus agir ni avec la  $\beta$ -Caténine, ni avec LRP6 : elle se détache de LRP5/6, permettant à un autre complexe de destruction de prendre sa place et d'être inactivé<sup>444</sup>.

Il est aussi proposé que la liaison de Wnt à Fz inhibe l'ubiquitination de la  $\beta$ -Caténine par  $\beta$ -TRCP, par dissociation de  $\beta$ -TRCP du complexe de dégradation<sup>432</sup>. Ainsi, les complexes de dégradation sont saturés de  $\beta$ -Caténine phosphorylée ne pouvant être ubiquitinée, résultant en une accumulation de la  $\beta$ -Caténine nouvellement produite. Dans cette étude, il a aussi été montré que l'accumulation de la  $\beta$ -Caténine précédait la dégradation de l'Axine et qu'il n'existait pas de diminution de la liaison de l'Axine à GSK3 $\beta$  ou à APC : ces observations étaient donc contradictoires avec le modèle précédemment proposé de dissociation du complexe de dégradation en réponse à la stimulation Wnt. Il est plutôt postulé que l'ensemble du complexe de dégradation est séquestré à la membrane, mais sans lier  $\beta$ -TRCP.

### *3.3 Implication de la voie Wnt/ $\beta$ -Caténine dans le cancer<sup>445,446</sup>*

Le potentiel oncogénique de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -Caténine a été démontré chez la souris : la surexpression de Wnt1 est impliquée dans le développement de tumeurs mammaires<sup>346,447</sup>. Il a depuis été montré que des mutations ou altérations moléculaires affectant les divers composants de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -Caténine étaient impliquées dans la cancérogenèse et l'agressivité des cancers, mais aussi dans l'apparition de tumeurs bénignes. La surexpression de certains composants joue également un rôle oncogénique, sans que des mutations ne soient décrites et il est alors nécessaire de différencier la surexpression en tant que facteur pathogénique propre versus en tant que conséquence de l'activation d'un autre gène (auquel cas, la surexpression est plutôt utilisée comme biomarqueur).

#### 3.3.1 $\beta$ -Caténine

Les mutations de la  $\beta$ -Caténine sont fréquentes, particulièrement au niveau du domaine N-terminal et de l'exon 3, sur les résidus sérines et thréonine phosphorylés pour la dégradation de

la  $\beta$ -Caténine<sup>448</sup>. Elles ont été décrites notamment dans le cancer de l'endomètre, les cancers du foie, le mélanome ou les cancers colorectaux, entre 6 et 16%<sup>448-451</sup>. En particulier, dans le CCS et dans les tumeurs bénignes de la surrenale, les mutations de l'exon 3 sont les plus fréquentes<sup>224,233,234,452</sup>. La mutation S45 est notamment une mutation fréquente dans plusieurs types de cancer<sup>224,446,453</sup>. Certains allèles mutants peuvent être dupliqués, causant alors une forte activation de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -Caténine<sup>454</sup>.

Outre les mutations, des altérations moléculaires de type délétion de l'exon 3 ont été décrites dans les cancers colorectaux<sup>455,456</sup>, du foie<sup>457</sup> et dans un macronodule de MNCSP (ex-PPNAD)<sup>232</sup>.

Des mutations faux sens ont également été retrouvées au niveau de l'exon 8, au niveau du résidu Asparagine 387, dans le CCS et dans les adénomes hépatiques<sup>224,458</sup>.

Encore plus rarement, des modifications post-traductionnelles de type acétylation pourraient favoriser la tumorigenèse.

### 3.3.2 ZNRF3/RNF43

Depuis l'identification de Z/F en 2012 en tant que régulateurs négatifs de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -Caténine, leur rôle dans la cancérogenèse a été étudié. Tout d'abord, les mutations de RNF43 sont beaucoup plus fréquentes que les mutations de ZNRF3. En fait, les mutations de ZNRF3 sont majoritaires uniquement dans les CCS et il s'agit principalement de délétion homozygotes plutôt que de mutations somatiques (cf point 1-II.3.7.1). Plus récemment, il a été montré que ZNRF3 était sous-exprimé dans le cancer papillaire de la thyroïde et que sa surexpression dans la lignée cellulaire de cancer papillaire TPC-1 diminuait la viabilité cellulaire et inhibait la migration et l'invasion<sup>459</sup>. Dans les autres cancers, les premières mutations de RNF43 ont été identifiées des tumeurs pancréatiques bénignes<sup>460</sup>. Elles ont ensuite été identifiées dans le cancer gastrique (notamment avec instabilité des microsatellites,  $\approx 55\%$ )<sup>461</sup>, dans le carcinome colorectal ( $\approx 18\%$ )<sup>462</sup>, dans le cancer de l'endomètre ( $\approx 18\%$ )<sup>462</sup>, dans le cancer du pancréas ( $\approx 6\%$ )<sup>463</sup>. Les principales mutations de RNF43 identifiées sont les mutations G659f et R117fs<sup>464</sup>.

### 3.3.3 APC

Les mutations d'APC sont extrêmement bien décrites dans les cancers colorectaux, puisqu'environ 80% d'entre eux présentent une mutation<sup>450</sup>. Dans le CCS, elles ont été décrites dans 2 à 3% des cas<sup>224,225</sup>. Dans les autres cancers, la mutation est présente entre 5 et 15% dans les cancers de l'estomac, de la peau, des poumons et de la vessie<sup>451</sup>. Plusieurs modèles rongeurs ont été générés pour étudier l'impact d'APC dans la tumorigenèse et ont démontré son impact dans le développement de tumeurs bénignes et malignes, notamment au niveau du tractus digestif<sup>465</sup>.

### 3.3.4 Autres composants

D'autres mutations des composants de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -Caténine ont été décrites, mais restant marginales par rapport aux autres mutations décrites ci-dessus. La recherche de données sur le site du consortium TCGA est particulièrement utile pour ces mutations, qui sont peu ou pas décrites dans la littérature. Toutefois, leur impact réel sur la tumorigenèse est en fait inconnu et les altérations du nombre de copies ne sont pas incluses.

De nombreux cancers surexpriment les ligands Wnt. Ainsi, Wnt-1 est surexprimé dans les tumeurs du sein, du poumon, de la prostate du foie, Wnt-2 et Wnt-5a dans le cancer colorectal, le cancer du sein et du poumon<sup>466</sup>... Toutefois, il n'a pas été montré de mutation du ligand en lui-même dans la littérature. La recherche de mutation des ligands Wnt dans la base de donnée TCGA montre des taux de mutation de l'ordre de 2 à 3% selon le type de cancer et le ligand Wnt concerné<sup>451</sup>.

Comme pour Wnt, une surexpression des récepteurs Fz a été décrite dans les cancers<sup>467</sup>. Fz1 est plutôt impliqué dans la résistance à la chimiothérapie, Fz2 et 5 dans la croissance tumorale, Fz4 dans la transition épithélio-mésenchymateuse. Les mutations de Fz sont toutefois rares.

Des mutations de l'Axine ont été décrites dans environ 8% des carcinomes hépatocellulaires<sup>468</sup>, dans des carcinomes prostatiques<sup>469</sup>, dans le cancer gastrique<sup>470</sup> ou dans le cancer colorectal<sup>471</sup>, mais leur potentiel oncogénique n'est pas toujours avéré. Des délétions ont également été décrites dans le médulloblastome<sup>472</sup>. Aucune mutation de l'Axine n'a été publiée dans le

CCS<sup>224,225</sup>. La recherche de mutations de l'Axine dans la base de données TCGA fait état de mutation de l'ordre de 5 à 7% dans les cancers hépatiques, de l'endomètre, les sarcomes et les tumeurs cutanées<sup>451</sup>.

Des mutations de CK1 $\alpha$  sont présentes dans environ 4% des cancers de l'endomètre<sup>451</sup>. CK1 $\alpha$  est surexprimée dans le cancer colorectal et corrélée à une moins bonne survie<sup>473</sup> mais son implication dans la tumorigenèse n'est que peu étudiée. En revanche, l'implication de CK1 $\delta/\epsilon$  a été démontrée dans la carcinogenèse du cancer colorectal<sup>474,475</sup>.

De la même façon les mutations de GSK3 $\beta$  ne sont pas décrites dans la littérature mais quelques mutations sont décrites dans le cancer de l'endomètre<sup>451</sup>.

La surexpression de LRP6 a été démontrée dans 45% des hépatocarcinomes<sup>476</sup>. Elle a également été montrée dans le cancer du sein et des mutations faux-sens pathogènes ont été identifiées dans le cancer du colon<sup>477</sup>. Là encore, les mutations sont peu décrites dans la littérature et en dehors d'un taux de mutation chez environ 10% des patients avec cancer de l'endomètre dans le registre TCGA, les taux mutationnels de LRP5/6 dans les autres types de cancer sont marginaux<sup>451</sup>. Des polymorphismes de LRP6 ont été associés au cancer de la vessie, du poumon et du cancer colorectal, certains polymorphismes étant associé au bon pronostic du cancer<sup>478</sup>.

Enfin, au niveau des facteurs de transcription TCF/LEF, peu de mutations ont été décrites<sup>479</sup>, à l'exception de mutations de TCF4 dans le cancer colorectal<sup>480,481</sup> mais leur implication réelle dans la tumorigenèse reste inconnue ou faible<sup>480</sup>. L'altération de l'expression de LEF1 a été retrouvée dans le cancer du poumon, du colon, de l'endomètre ou encore de la prostate et est associée au pronostic<sup>482</sup>.

**En conclusion, la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -Caténine est une voie fondamentale dans le développement et la cancérogenèse. Bien que les acteurs clés en soient identifiés, le mécanisme précis d'interaction entre les différents composants reste débattu. L'activation aberrante de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -Caténine a été démontrée dans de nombreux cancers. Les mutations d'APC dans le cancer colorectal sont les mutations les mieux**

caractérisées et pour lesquelles l'implication dans la cancérogenèse est bien établie. Dans le CCS, il existe des altérations moléculaires dans les composants de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -Caténine dans environ 40% des cas : on trouve au premier plan des délétions de ZNRF3, suivi des mutations de CTNNB1. Ces altérations semblent mutuellement exclusives. Les autres composants de la voie peuvent être surexprimés, mais les mutations sont peu fréquentes, suggérant que la surexpression est plutôt la conséquence d'une activation de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -Caténine en amont.





## **2 - Projet de thèse et objectifs**





La caractérisation pan-génomique récente des CCS a permis d'établir que 40% d'entre eux présentaient une altération de la voie Wnt/ $\beta$ -Caténine. Ces altérations étaient principalement des altérations du nombre de copie de ZNRF3 et des mutations somatiques activatrices de CTNNB1. Les patients présentant des altérations au niveau de cette voie de signalisation ont un moins bon pronostic en terme de survie globale. Par ailleurs, l'analyse du miRnome chez les patients montrait un profil d'altération des microARN différent en fonction du pronostic. En particulier, miR-139-5p, un miR que nous avons déjà identifié comme étant un marqueur d'agressivité du CCS, était surexprimé dans les CCS de mauvais pronostic analysés dans ces études pan-génomiques.

Partant de ces différents constats, l'objectif principal de la thèse était de d'explorer le lien potentiel entre l'activation aberrante de la voie Wnt/ $\beta$ -Caténine dans les CCS et le profil d'expression des microARN. Pour cela, la thèse comporte 3 axes complémentaires :

- 1) *In vitro*, une analyse du miRnome dans une lignée de CCS humain H295R exprimant la  $\beta$ -Caténine ( $\beta$ -Cat<sup>+</sup>) ou non ( $\beta$ -Cat<sup>-</sup>), afin d'identifier les miRs candidats sous le contrôle de la  $\beta$ -Caténine. Une attention particulière a été portée à l'expression de miR-139-5p.
- 2) *Chez les patients*, une analyse de l'expression de miR-139-5p en fonction du statut mutationnel de la voie Wnt/ $\beta$ -Caténine.
- 3) *In vivo*, une analyse du rôle de miR-139-5p dans le croissance tumorale et l'invasion, en développant un modèle de cellules H295R porteuses d'une inactivation inductible de miR-139-5p.

Les axes 1 et 2 ont permis la production d'un article résumant les principaux résultats de mes travaux de thèse, qui sera soumis pour publication dans les prochaines semaines. Concernant l'axe 3, il n'est à ce jour pas mené à son terme du fait de difficultés dans l'élaboration du modèle cellulaire.



## 3 - Résultats



## D) Article 1

### 1. *Introduction de l'article 1*

Comme indiqué dans le chapitre précédent, nous souhaitons évaluer l'impact de l'activation aberrante de la voie Wnt/ $\beta$ -Caténine sur l'expression des miRs dans le CCS. Pour cela, nous avons utilisé la lignée cellulaire de CCS H295R, développée à partir d'une tumeur primaire humaine, qui possède la mutation S45P au niveau du gène CTNNB1 : la  $\beta$ -Caténine est donc stabilisée et constitutivement active. A mon arrivée dans le laboratoire, l'équipe disposait de cellules H295R modifiées par un shRNA inductible pour la  $\beta$ -Caténine, fournies par le Dr Bruno Ragazzon (Institut Cochin), permettant ainsi d'induire la diminution d'expression de la  $\beta$ -Caténine et de comparer le profil des cellules  $\beta$ -Cat<sup>+</sup> versus  $\beta$ -Cat<sup>-</sup> <sup>483,484</sup>.

Dans une première partie de l'article, nous avons utilisé les techniques de séquençage ARN (RNA Sequencing) pour comparer le miRnome des cellules  $\beta$ -Cat<sup>+</sup> et des cellules  $\beta$ -Cat<sup>-</sup>. Afin d'identifier les miRs différenciellement exprimés entre les conditions  $\beta$ -Cat<sup>+</sup> et  $\beta$ -Cat<sup>-</sup>, nous avons utilisé le log<sub>2</sub> du nombre de lectures par million (Reads per million, log<sub>2</sub> RPM) et le « Log Fold Change » (LFC). Un miR était potentiellement sous le contrôle de la  $\beta$ -Caténine si son log<sub>2</sub> RPM était > 4 dans au moins une condition ( $\beta$ -Cat<sup>+</sup> ou  $\beta$ -Cat<sup>-</sup>) et son LFC > 1 ou < -1. Nous avons effectué une analyse de la localisation chromosomique de ces miRs, grâce au logiciel miRViz (<http://mirviz.prabi.fr/>) développé par Laurent Guyon, bioinformaticien au sein de notre équipe, afin d'identifier d'éventuels clusters de miRs régulés par la  $\beta$ -Caténine<sup>485</sup>. Afin de sélectionner les miRs candidats pour une validation en RT-qPCR, nous avons appliqué des critères de sélection plus stringents, avec un seuil de log<sub>2</sub> RPM rehaussé à 5.55 et un LFC > 2 ou < -2. Ayant identifié miR-139-5p comme étant sous le contrôle de la  $\beta$ -Caténine, nous avons approfondi l'étude de la relation entre l'expression de la  $\beta$ -Caténine, PDE2A (gène hôte de miR-139-5p) et NDRG4 (un des gènes cibles de miR-139-5p), en comparant l'expression de leur ARNm et de leur protéine dans les cellules  $\beta$ -Cat<sup>+</sup> et  $\beta$ -Cat<sup>-</sup>.

Dans une seconde partie de l'article, nous avons étudié le niveau de miR-139-5p en fonction du statut mutationnel des composants de la voie Wnt/ $\beta$ -Caténine à partir des données publiques de la cohorte COMETE-ENSAT<sup>224</sup>, pour 44 patients. Les patients présentant une mutation somatique ou une altération du nombre de copies de ZNRF3 ou de CTNNB1 ont été définis comme patients mutés. Les patients présentant d'autres mutations ont été classés comme non-mutés. Si les mutations ZNRF3 et CTNNB1 sont mutuellement exclusives dans cette cohorte, certains patients présentent une double mutation pour ZNRF3 ou CTNNB1 et pour TP53. Ces patients, au nombre de 4, ont été classés comme patients mutés, mais représentent un sous-groupe particulier de patients.

L'analyse de la cohorte COMETE-ENSAT nous a permis d'identifier un sous-groupe de patients non-mutés avec un haut niveau de miR-139-5p et nous a amené à considérer la possibilité d'une activation de la voie Wnt/ $\beta$ -Caténine indépendante d'une mutation identifiée sur ZNRF3 ou CTNNB1. Nous avons donc étudié le niveau de miR-139-5p en fonction du niveau de LEF1, un facteur de transcription majeur de la voie Wnt/ $\beta$ -Caténine. Cette étude a été réalisée à la fois pour la cohorte COMETE-ENSAT et la cohorte TCGA (123 patients au total), puisque les données transcriptomiques sont disponibles pour les 2 cohortes.

## **2. Article 1**

## **Aberrant activation of Wnt/ $\beta$ -Catenin signaling pathway drives the expression of poor prognosis-associated microRNAs in adrenocortical cancer**

Justine Cristante<sup>1</sup>, Soha Reda El Sayed<sup>1</sup>, Josiane Denis<sup>1</sup>, Ragazzon Bruno<sup>2</sup>, Constanze Hantel<sup>3,4</sup>, Battail Christophe<sup>1</sup>, Olivier Chabre<sup>1,5</sup>, Laurent Guyon<sup>1#</sup>, Nadia Cherradi<sup>1#</sup>

<sup>1</sup>University Grenoble Alpes, INSERM, CEA, IRIG, Biology and Biotechnologies for Health, UMR\_1292, Grenoble, FRANCE.

<sup>2</sup>University of Paris, Institut Cochin, INSERM UMR\_S1016 CNRS UMR 8104, Paris, France.

<sup>3</sup>Department of Endocrinology, Diabetology and Clinical Nutrition, University Hospital Zurich (USZ) and University of Zurich (UZH), Zürich, SWITZERLAND.

<sup>4</sup>Medizinische Klinik und Poliklinik III, University Hospital Carl Gustav Carus Dresden, Dresden, GERMANY

<sup>5</sup>University Hospital Grenoble Alpes, Endocrinology Department, Grenoble, FRANCE

#Corresponding authors: Drs. Nadia Cherradi and Laurent Guyon  
Biology and Biotechnologies for Health  
Interdisciplinary Research Institute of Grenoble/IRIG/CEA  
17 rue des Martyrs  
38054 Grenoble Cedex 09, France.  
Phone: + 33 438 78 35 01  
Fax: + 33 438 78 50 58  
e-mail: [nadia.cherradi@cea.fr](mailto:nadia.cherradi@cea.fr); [laurent.guyon@cea.fr](mailto:laurent.guyon@cea.fr)

Number of tables and figures: 6 Figures, 13 Supplementary Figures, 3 Supplementary Tables

Keywords: Adrenocortical carcinoma,  $\beta$ -Catenin, MicroRNA, miR-139-5p, PDE2A, NGRD4, 14q32 locus



## Abstract

**Purpose:** Adrenocortical carcinoma (ACC) is a rare malignancy with poor prognosis. Deregulations of microRNA (miRNA) expression is involved in ACC aggressiveness. Nevertheless, the mechanisms underlying such deregulations remain unknown. Aberrant activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin ( $\beta$ -Cat) signaling pathway has been reported in about 40% of ACC and is associated with poor outcome. We aimed to evaluate the role of constitutive activation of Wnt/ $\beta$ -Cat pathway in miRNA expression alterations in ACC.

**Experimental design:** The H295R cell line, expressing constitutively active  $\beta$ -Cat was stably transfected with an inducible shRNA to downregulate  $\beta$ -Cat (H295R-sh $\beta$ ). The miRnome of H295R-sh $\beta$  cells with expressed or repressed  $\beta$ -Cat was investigated using RNA-Seq. Expression of selected miRNAs and mRNAs was assessed by quantitative PCR with an emphasis on miR-139-5p, its host gene phosphodiesterase 2A (PDE2A) and its target gene N-Myc Downstream-Regulated Gene 4 (NDRG4). In ACC patients, prognostic values of Wnt/ $\beta$ -catenin mutational status or LEF1 and their correlations with miR-139-5p, PDE2A and NDRG4 expressions were determined using COMETE-ENSAT and TCGA cohorts.

**Results:** We carried out the first miRnome analysis in  $\beta$ -Catenin-deficient ( $\beta$ -Cat<sup>-</sup>) ACC cells. 42 downregulated miRNAs and 12 upregulated miRNAs were identified in  $\beta$ -Cat<sup>-</sup> cells, among which miR-139-5p and miRNAs of the 14q32 locus. Quantitative PCR analysis of 8 poor-prognosis associated miRNAs confirmed the under-expression of 7 of them after  $\beta$ -Cat silencing. Remarkably, the expression of the intronic miR-139-5p was decreased by 90% in  $\beta$ -Cat<sup>-</sup> cells. MiR-139-5p expression was correlated with the expression of its host gene PDE2A and anti-correlated with that of its target gene NDRG4. In patients, miR-139-5p and PDE2A levels were higher in patients with mutations in components of Wnt/ $\beta$ -Cat signaling pathway or high expression of LEF1. LEF1 expression could better predict prognosis of ACC patients than the mutational status of Wnt/ $\beta$ -Cat signaling pathway.

**Conclusions:** In addition to its transcriptional control on protein coding-genes, aberrant Wnt/ $\beta$ -Cat signaling causes miRNA alterations involved in ACC aggressiveness and clinical outcome.

### Introduction

Adrenocortical carcinoma (ACC) is a rare cancer of the adrenal cortex, with an incidence of 0.7-2 cases/millions of persons/year in adults and an incidence peak between 50 and 60 years<sup>1</sup>. 50 to 70% of patients present hormonal disorders, mainly hypercortisolism (Cushing's syndrome) or androgen excess<sup>2</sup>. However, incidental discovery of ACC on abdominal computed tomography (incidentalomas) is increasing, and is now estimated around 15%<sup>3</sup>. Patients are classified according to clinical stages, with stages I and II representing localized tumour, while stages III and IV represent advanced pathology with lymph node or systemic metastasis<sup>4</sup>. ACC prognosis is very poor, with a 5-year survival between 12 and 40% and a median survival below 3 years<sup>5</sup>. Overall survival is significantly different depending on the stage with a 5-year survival of 65-82% for stage I, 58-64% for stage II, 44-55% for stage III and 7-18% for stage IV<sup>5,6</sup>. 50 to 71% of ACC patients are diagnosed at late stages<sup>7</sup>. To date, treatment is based on complete surgical resection for localized ACC followed by mitotane adjuvant therapy<sup>3</sup>. In advanced or recurrent ACC, the therapeutic arsenal is limited to repeated surgery, local therapeutic measures and chemotherapy, but it remains with poor efficacy. Notably, chemotherapy could improve the progression-free survival but did not improve the overall survival<sup>8</sup>. Targeted therapies and immunotherapy for ACC have been used in recent clinical trials with limited benefits<sup>9</sup>. In search of potential new therapeutic targets, two major studies deciphered the genomic landscape of ACC using the French COMETE/European ENSAT cohorts<sup>10</sup> and the American TCGA cohort<sup>11</sup>, respectively. Transcriptome unsupervised clustering identified two subgroups of tumors C1A and C1B with very poor and much better outcomes, respectively<sup>10</sup>. Among the multiple molecular alterations found in ACC, somatic mutations in the *CTNNB1* gene, encoding  $\beta$ -Catenin, and in the *ZNRF3* gene, encoding an E3 ubiquitin-protein ligase, were the most frequent and mutually exclusive (16% and 21%, respectively)<sup>10,11</sup>. This results in Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway being constitutively active in more than 35% of ACC.

Three Wnt signaling pathways have been characterized so far, including the canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling, the non-canonical planar cell polarity pathway (Wnt/PCP) and the Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  pathway. The canonical Wnt/ $\beta$ -Catenin signaling is a highly conserved pathway, which plays a major role in cell growth, development and oncogenesis<sup>12</sup>. In the absence of a Wnt ligand,  $\beta$ -Catenin is sequentially phosphorylated on four serine (S)/threonine (T) residues (S45, T41, S37 and S33) at the amino-terminal region by a destruction complex (DC) consisting of GSK3 $\beta$  (Glycogen kinase 3 $\beta$ ), CK1 $\alpha$  (Casein Kinase 1 $\alpha$ ), Axin and APC (Adenomatous polyposis coli). Phosphorylated  $\beta$ -catenin is subsequently recognized by the E3 ubiquitin ligase subunit beta-transducin repeat-containing protein (beta-TrCP) and targeted for ubiquitination and subsequent degradation by the proteasome<sup>13</sup>. Upon Wnt ligand binding to the Wnt receptors, Frizzled (FZD) and LRP5/6, DC-mediated phosphorylation of  $\beta$ -catenin is prevented, resulting in  $\beta$ -catenin stabilization and translocation to the nucleus where it activates T-cell factor/lymphoid enhancer-binding factor (TCF/LEF)-dependent transcription of its target genes including *Axin2*, *c-myc*, and *CyclinD1*<sup>14</sup>. ZNRF3/RNF43, a transmembrane RING finger protein of the E3 ubiquitin ligase family acts as an important repressor of the pathway by promoting the ubiquitination and degradation of FZD and LRP6<sup>15,16</sup>. Aberrant activation of Wnt/ $\beta$ -Catenin pathway in ACC is associated with poor prognosis<sup>17-19</sup>. Diffuse abnormal cytoplasmic and nuclear  $\beta$ -Catenin localization was found both in patient tumors and in the human ACC cell line H295R<sup>20</sup>. Genetic analyses revealed that the most commonly detected mutation is the point mutation S45P (exon 3) affecting the consensus GSK3 $\beta$  phosphorylation site, thus leading to  $\beta$ -Catenin stabilization and constitutive activation of TCF/LEF-dependent transcription.  $\beta$ -catenin silencing in H295R cells resulted in a decreased proliferation *in vitro*, abrogated tumor growth *in vivo*<sup>21</sup> and led to the down-regulation of the transcription factor Slug<sup>22</sup>, which is associated with a more aggressive phenotype of ACC<sup>23</sup>.

Besides alterations of the Wnt/ $\beta$ -Cat signaling pathway, massive deregulations of microRNA (miRNA or miR) expression have been identified in ACC<sup>10,11,24,25</sup>. MiRNAs are small non-coding RNA of about 22 nucleotides-long<sup>26</sup>, which repress their target gene expression at the post-transcriptional level, either by inducing mRNA cleavage, destabilization or inhibition of translation<sup>27</sup>. MiRNAs are deregulated in cancer and are involved in carcinogenesis<sup>28,29</sup> and

drug resistance<sup>30</sup>. They also emerged as promising biomarkers for cancer diagnosis, classification and prognosis<sup>31,32</sup> and potential therapeutic tools<sup>33</sup>. Commonly overexpressed miRNAs in ACC include miR-483, miR-139-5p, miR-503, miR-184 and miR-210, while miR-195 and miR-335 were found underexpressed in ACC compared to adrenocortical adenoma (ACA) or normal tissue<sup>34</sup>. In addition, some miRNA clusters have been reported as particularly deregulated between poor and good prognosis ACC, such as the 14q32 or the Xq27 clusters<sup>10,11,35</sup>. We have previously shown that miR-139-5p and miR-483-5p promote ACC aggressiveness, at least by respectively downregulating the N-myc Downstream-Regulated Gene member 4 (NDRG4) and member 2 (NDRG2)<sup>36</sup>.

MiRNAs have been widely described as direct or indirect regulators of Wnt/ $\beta$ -Cat signaling pathway in several cancers such as clear cell renal cell carcinoma<sup>37</sup>, colorectal cancer<sup>38</sup>, hepatoblastoma<sup>39</sup>, hepatocellular carcinoma<sup>40</sup> and breast cancer<sup>41</sup>. By contrast, only very few studies have examined modulations of miRNA expression in response to active Wnt/ $\beta$ -Cat pathway and most of them have focused on a single miRNA or a cluster of miRNAs. Herein, we report on the impact of aberrant activation of Wnt/ $\beta$ -Cat signaling on the whole miRnome in ACC. We show that silencing of  $\beta$ -Catenin leads to significant downregulation of several poor prognosis-associated oncomiRs in ACC including miR-139-5p and miRNAs located in the 14q32 cluster. We identified miR-139-5p and its host gene Phosphodiesterase 2A (PDE2A) as major targets of the Wnt signaling pathway components  $\beta$ -Catenin and Lymphoid enhancer-binding factor 1 (LEF1) transcription factor. The expression of miR-139-5p in ACC cells as well as in ACC patients was strongly correlated with the expression of PDE2A, suggesting a common regulatory transcription unit. Furthermore, we provide evidence that LEF1 is a significant prognostic factor for ACC. Besides, its high expression is better associated with miR-139-5p and PDE2A upregulation than the mutational status of  $\beta$ -Catenin or ZNRF3.

## **Materials and methods**

### **Cell culture and transfection**

The adrenocortical carcinoma cell line NCI H295R was subjected to Cell Line Sterility, IMPACT Mouse FELASA and MKPV testing and was authenticated by CellCheck human 9 Test (9

Marker STR Profile and Inter-species Contamination Test) (IDEXX Analytics, Kornwestheim, Germany). NCI H295R cells stably expressing a doxycycline inducible shRNA targeting CTNNB1 mRNA (pTer- $\beta$ -Catenin shRNA vector) have been described previously<sup>21,42</sup> and were authenticated by CellCheck human 16 Plus Test (9 human STR marker profile + 7 additional Human STR marker, Inter-species contamination Test and STAT-mycoplasma testing) (IDEXX Analytics). Cells transfected with the pTer- $\beta$ -Catenin shRNA (sh $\beta$ ) or pTer control vector (pTer) were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium:F-12 (DMEM/F-12 Glutamax, Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA, #31331093) supplemented with 1% (v/v) Insulin, Transferrin, Selenium Premix (Corning, NY, USA, #354352), 5% (v/v) Nu Serum (Corning, #355100) and antibiotics (100 U/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin and 30  $\mu$ g/mL gentamicin, Life Technologies). Petri dishes were pre-coated with Rat Tail Collagen Type 1 $\alpha$  (Corning, #354236, 1:50 dilution). Stable  $\beta$ -Cat silencing was achieved through shRNA induction in the presence of doxycycline (0.5 $\mu$ g/mL) ( $\beta$ -Cat<sup>-</sup> cells), while  $\beta$ -Catenin expression was maintained in the absence of doxycycline ( $\beta$ -Cat<sup>+</sup> cells).

Kinetics of gene expression were conducted for 10 days with molecular analyses at day 0 (D0), day 3 (D3), day 5 (D5), day 7 (D7) and day 10 (D10). Briefly, sh $\beta$  and pTer cells were seeded in petri dishes of 100mm of diameter, at a density of  $2 \times 10^6$  cells, incubated the following day (D0) in complete medium with or without Doxycycline and lysed at the appropriate day.

For transient silencing of  $\beta$ -Cat, H295R cells were seeded in 6-wells plate at a density of  $0.3 \times 10^6$  cells/well and transfected the day after with a CTNNB1 siRNA (Thermofisher, Carlsbad, USA, #s436) or a control siRNA (Thermofisher, #AM4611), at a final concentration of 10nM, using Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen Thermofisher, Carlsbad, USA, #13778150) according to the manufacturer's recommendations.

MUC1 cells were grown in Advanced DMEM-F12 (Gibco Thermofisher, Carlsbad, USA, #12634-010) with 1% Penicillin-Streptomycin 10UI/mL (Gibco Thermofisher, #15140-122) and 10% Fetal Bovine Serum (Biosera, Nuaille, France, #FB-1001/100), as described previously<sup>43</sup>. For comparison of H295R and MUC1 cell lines, cells were seeded in 6-well plates at a density of  $0.7 \times 10^6$  and  $0.25 \times 10^6$  cells/well, respectively. The following day (D0), medium was changed and cells were grown up for 72h before lysis.

For miR-139-5p rescue experiments, sh $\beta$  cells and H295R cells were seeded in 6-well plates at a density of  $0.35 \times 10^6$  cells/well and  $0.3 \times 10^6$  cells/wells respectively. The following day, sh $\beta$  cells were incubated in complete medium with or without Doxycycline. H295R cells were transfected with a CTNNB1 siRNA or a control siRNA as described above. The same day, both sh $\beta$  cells and H295R cells were transfected with control miRNA mimics or hsa-miR-139-5p mimics (Thermofisher, #MC11749) at a final concentration of 10nM. The transfection of miRNA mimics together with CTNNB1 or control siRNAs was repeated at D6 for both cell lines. Cells were lysed at D10.

### **Small RNA sequencing**

Sh $\beta$ -expressing cells were grown for 10 days in a medium containing or not doxycycline. Total RNA was extracted using the miRVana™ Paris™ kit (Thermofisher, #AM1556) and depleted from ribosomal rRNA using Ribo-zero Removal kit (Illumina). RNA quality and quantity were assessed by SS RNA kit on Fragment Analyzer (Agilent) and QuantiFluor RNA System (Promega) respectively, according to the manufacturers' instructions. Small RNA library preparation was performed using TruSeq Small RNA library preparation kit (Illumina) according to the manufacturer's instructions. The quality and quantity of the obtained library were assessed using HS DNA chip on Bioanalyzer 2100 (Agilent) and QuantiFluor DNA System (Promega), respectively. Small RNA sequencing was performed on the Illumina NextSeq platform of the Centre National de Recherche sur le Genome (Evry, France), using MID-output flow cell to generate 51bp long reads.

### **RNA sequencing data analysis**

FASTQ data were processed as follows using Galaxy v20.01. The data were filtered using FastQC v0.72<sup>44</sup> and Trim Galore! v0.4.3.1<sup>45</sup>, aligned against the miRBase v22 sequence list<sup>46</sup> using Bowtie1 v1.2.0<sup>47</sup>, and then the read counts were normalized using DESeq2 v2.11.40<sup>48</sup>. We then selected miRNAs according to three criteria using R version 4.0.3<sup>49</sup>. MiRNAs were considered as expressed in sufficient quantity in cells when the number of read per millions (RPM) was above 10 ( $\log_2$  RPM > 5.55) in at least one experimental condition ( $\beta$ -Cat<sup>+</sup> or  $\beta$ -

Cat). MiRNAs were considered as differentially expressed between  $\beta$ -Cat<sup>+</sup> and  $\beta$ -Cat<sup>-</sup> cells when the log fold change (LFC) was  $> 2$  or  $< -2$ . For each miRNA, the p-value for prognosis was calculated from the ENSAT Cohort data<sup>10</sup>, with the log-rank test applied on two equal subpopulation separated with the tumour expression of the miRNA, using the R library “survival” version 3.2<sup>50</sup>. We selected miRNAs with p-value below 0.05.

### **Reverse Transcription - Quantitative PCR**

Total RNA was extracted from sh $\beta$  and pTer cells using miRVana™ Paris™ kit according to the manufacturer’s instructions. For miRNA quantification, 10 ng of total RNA were reverse-transcribed as previously described<sup>36</sup> using TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit (#4366596, Applied Biosystems Thermofisher) and miRNA-specific stem-loop primers (Applied Biosystems Thermofisher). Real-time quantitative PCR was performed using 4.5 $\mu$ L of 5-fold diluted RT product and 5.5 $\mu$ L of reaction mix (composed of 5 $\mu$ L of TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, USA, #4440047) with 0.5 $\mu$ L of the appropriate assay for each miRNA (miR-139-5p, miR-483-5p, miR-483-3p, miR-513a-5p, miR-377-5p, miR-377-3p, miR-1185-2-3p, miR-541-3p, miR-320b, miR-2110 and miR-330-3p, (Supplementary Table 1) as previously reported<sup>36</sup> RNU48 was used as an endogenous control for normalization. All experiments were performed in duplicate.

Messenger RNA expression was assessed with 150 to 500 ng of total RNA using iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, USA, #1708891) according to manufacturer’s instructions. Quantitative PCR was performed using 4.5 $\mu$ l of 1:30 diluted RT product and 5.5  $\mu$ l of reaction mix (composed of 5  $\mu$ l of Sso Advanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, #1725275) and 0.5  $\mu$ l of forward and reverse PCR primers mixed together at a final primer concentration of 0.5  $\mu$ M) to generate a PCR volume of 10  $\mu$ l. All primers were purchased from Sigma-Aldrich and are reported in Supplementary Table 2. Real-time PCR was carried out at 95°C for 30s, followed by 40 cycles at 95°C for 5s and 60°C for 15s. Gene expression was normalized to RPL13A and HPRT as housekeeping genes. Normalized expression was calculated using the comparative Ct method and fold changes were derived from the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  values for each gene.

## Western blot

Proteins were extracted from sh $\beta$  and pTer cells using Cell Disruption Buffer (miRVana™ Paris™ kit, ThermoFisher) and were quantified with microBCA protein Assay kit (ThermoFisher, #23235). Protein extracts were dissolved in 5X buffer (60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% glycerol, 2 % SDS, 5 %  $\beta$ -mercapto-ethanol, 0.01% bromophenol blue), heated at 100°C for 5 min and loaded onto 4-20% mini-protean TGX precast protein gels. Electrophoresis was carried out at 80 V for 20-30 min and then at 120 V for 1 hour in a 10X Tris/glycine/SDS running buffer. SDS-PAGE resolved proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane using the Trans-Blot Turbo™ transfer system (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions. The membrane was then incubated for 1 hour at room temperature in a blocking solution of Tris-buffer saline (TBS) containing 0.1% Tween 20 and 5% non-fat dry milk.

The blots were probed overnight at 4°C with monoclonal mouse anti- $\beta$ -Catenin (2  $\mu$ g/mL in Bovine Serum Albumin 3%, R&D Systems, Minneapolis, USA, #MAB1329), monoclonal rabbit anti-NDRG4 (1:1000, Cell Signaling Technology, Danvers, USA, #9039), monoclonal rabbit anti-Axin2 (1:1000, #2151, Cell Signaling), polyclonal rabbit anti-PDE2A (1:1000, Sigma-Aldrich, #ABN1486) in TBS/Tween. The membrane was then washed with the same buffer (3 x 10 min) and incubated for 1 hour either with Horseradish-Peroxydase (HRP) goat anti-rabbit IgG (1:3000, Jackson Immunoresearch, Cambridge, UK, #111-035-144) or with HRP Goat anti-mouse IgG (1:5000, Jackson Immunoresearch, #115-035-062). The membrane was washed as previously mentioned and the antigen-antibody complex was revealed by Clarity Enhanced Chemiluminescence Blotting Substrate (Bio-Rad, #1705060) using the iBright™ FL100 Imaging System (ThermoFisher). Signal intensity was quantified using the iBright Analysis Software (versions 4.0.1 and 5.0.0, ThermoFisher). Protein levels were normalized to tubulin (monoclonal mouse anti-tubulin IgG, 1:2500, Sigma-Aldrich, #T6199). Data are presented as the fold-change in gene expression relative to controls.



### **Measurement of Wnt/ $\beta$ -Cat signaling pathway activity (TOPflash luciferase reporter assay)**

H295R sh $\beta$  cells and pTer cells were seeded in triplicates in a 12-well plate (200 000 cells/well) and were incubated in the presence or in the absence of Doxycycline the day after. 24 hours later, 250 ng of pTOPflash (wt-TCF) or pFOPflash (mutated-TCF binding site, negative control) reporter plasmids (TOPflash luciferase reporter assay, Merck Millipore, Darmstadt, Germany) were transfected with Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Life Technologies) in the presence of 150 ng of pRL-TK-Renilla luciferase plasmid (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). After 48h incubation with Doxycycline, Firefly and Renilla luciferase activities were measured using the Twinlite dual luciferase reporter gene assay system (Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA) on an automated TECAN luminometer (TECAN Group Ltd. Zürich, Switzerland). The ratio of Firefly luciferase activity (Relative light units RLU)/Renilla luciferase activity (RLU) was expressed as a fold change relative to the controls.

H295R cells were seeded in triplicates into 12 well-plates (300 000 cells/well) and transfected for 48h with 10nM anti-miR-139-5p using Lipofectamine RNAiMax. After 2 days, pTOPflash or pFOPflash and pRL-TK-Renilla plasmids were transfected using Lipofectamine 2000 as described above. Firefly and Renilla luciferase activities were measured 24h after plasmid transfection.

### **COMETE-ENSAT and TCGA patient cohort analyses**

Gene expression analysis of the two cohorts were performed with R (version 4.0.3)<sup>49</sup>. For the COMETE-ENSAT cohort, public data from Assie et al<sup>10</sup> were extracted from GSE49276, GSE49277 and the supplementary data. Final analysis was performed on the 44 ACC for which we had both miRNAs and mRNA data. Patients with mutations in CTNNB1 gene, ZNRF3 gene or mutation in either gene in addition to TP53 were classified as mutated for the Wnt/ $\beta$ -Cat signaling pathway. Patients with other mutations were classified as non-mutated for the Wnt/ $\beta$ -Cat signaling pathway.

For the TCGA cohort, data were retrieved from the TCGA website (<https://portal.gdc.cancer.gov/projects/TCGA-ACC>). Expression data for miRNAs and mRNAs

were available for 80 and 79 patients, respectively. The analysis was performed for the 79 patients for whom we had both miRNA and mRNA data. The “transcript per million” column (“tmp\_unstranded” column) was used for mRNA analysis. Both miRNA and mRNA data were log<sub>2</sub> transformed.

As the distribution of the expression genes in the tumour samples of patients were bimodal, in particular for LEF1, we used the expectation-maximization (EM) algorithm to fit a Gaussian mixture using the R library “mixtools” version 1.2. To set the threshold between high and low LEF1 expression, the LEF1 expression with the same probability density for both groups was used, leading to a threshold of 5.2 for the COMET-ENSAT cohort.

### **Statistical analyses**

Statistical analyses were performed with R (versions 3.6 and 4.0.3)<sup>49</sup>. Data normality was assessed using Shapiro-Wilk test with Benjamini-Hochberg correction for multiple tests. T-tests were used for mean comparison while Wilcoxon test was used if the data were not normal. Results are expressed as mean ± SEM. Statistical significance is indicated with \* for  $p \leq 0.05$ , \*\* for  $p \leq 0.01$  and \*\*\* for  $p \leq 0.001$ .

For qPCR, paired t-tests were performed on raw data of qPCR expression extracted from the Bio-Rad CFX Software, to compare control samples and doxycycline-treated samples. Since our results indicated a stabilized  $\beta$ -Cat silencing at H48-H72, we assessed the effect of  $\beta$ -Cat repression for long-term global kinetics, regardless of the precise day. Thus, we performed the statistics on pooled data from D5, D7 and D10. For each day, the  $\beta$ -Cat<sup>-</sup> sample was paired to the  $\beta$ -Cat<sup>+</sup> control of the same day. Bar plots represent the mean fold change in  $\beta$ -Cat<sup>-</sup> samples for each day.

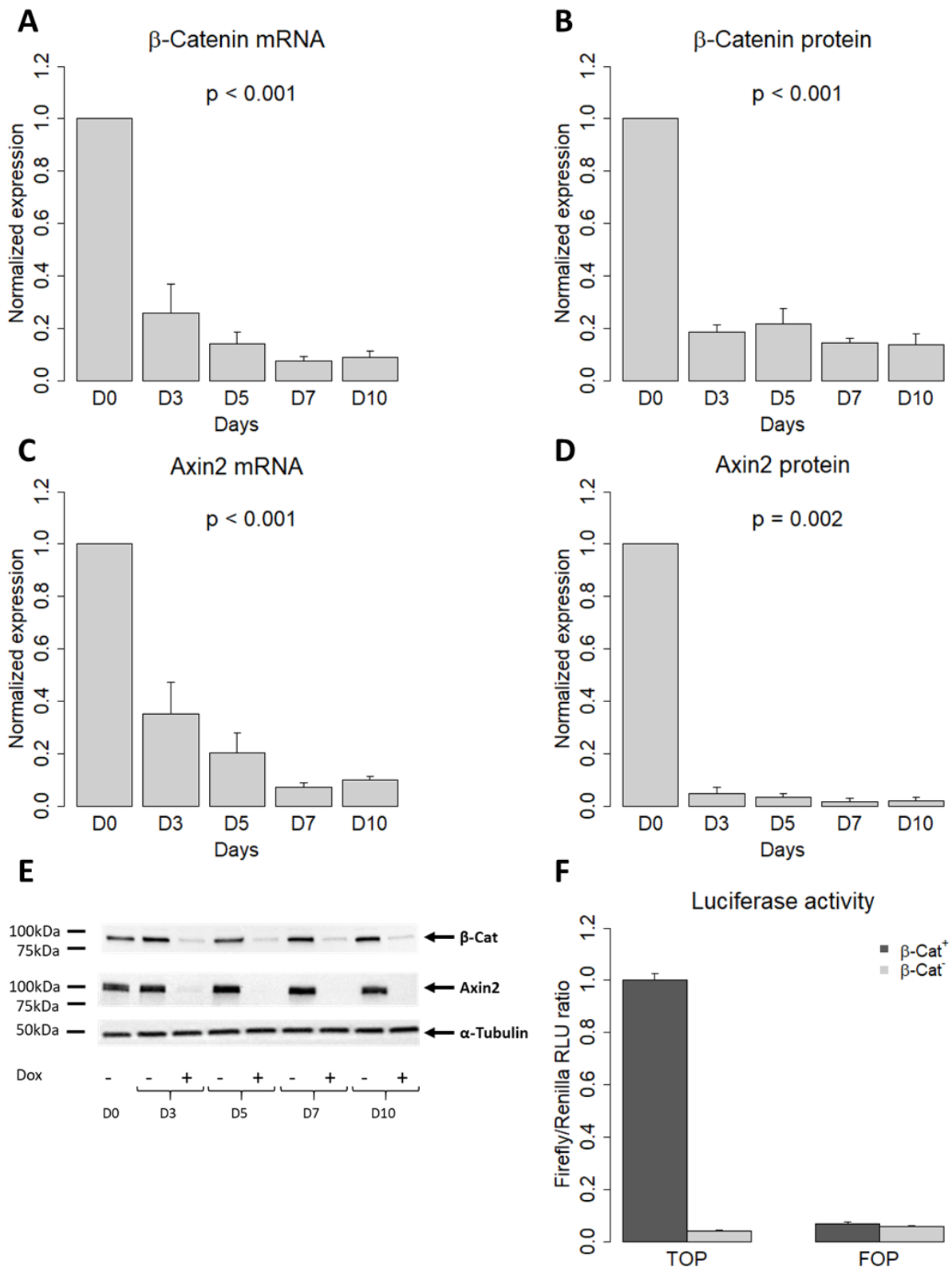
For western blot analyses, paired t-tests were used to compare the mean of doxycycline-treated samples with control samples, for each day. Gene expression fold-change in doxycycline-treated samples was normalized to that in control sample at each day.

## Results

### **$\beta$ -Catenin shRNA-mediated inactivation of Wnt signaling**

We first assessed  $\beta$ -Catenin silencing in NCI H295R sh $\beta$  cells upon shRNA induction by doxycycline. A marked reduction in  $\beta$ -Cat mRNA ( $74 \pm 11$  %) was observed at day 3 (D3), reaching  $91 \pm 2$  % at day 10 (D10) while a decrease of  $\beta$ -Cat protein was detected at D3 ( $81 \pm 3$  %) and persisted until D10 (Figure 1A and 1B). No changes in  $\beta$ -Cat expression occurred in the pTer control cells treated or not with doxycycline (Supplementary Figure 1A, 1B and 1E). As shown in Figure 1F, the activity of  $\beta$ -Cat signaling pathway, assessed by the TOP-FOP Flash luciferase reporter assay, was also markedly decreased 48h after  $\beta$ -Cat silencing ( $96 \pm 0.1$  %), while no change was observed in pTer cells (Supplementary Figure 2).

The levels of Axin2, a canonical target gene of  $\beta$ -Catenin, were also determined to validate the sh $\beta$  cell model. As shown in Figure 1C, Axin2 mRNA level was decreased by  $65 \pm 12$  % at D3 and  $90 \pm 2$  % at D10. Axin2 protein expression was decreased by  $95 \pm 2$  % at D3 and this decrease was maintained up to D10 (Figure 1D). No change in Axin2 occurred in the pTer control cells (Supplementary Figure 1C, 1D and 1E). Altogether, these results demonstrate that shRNA-mediated silencing of  $\beta$ -Catenin efficiently impairs Wnt signaling pathway activity.

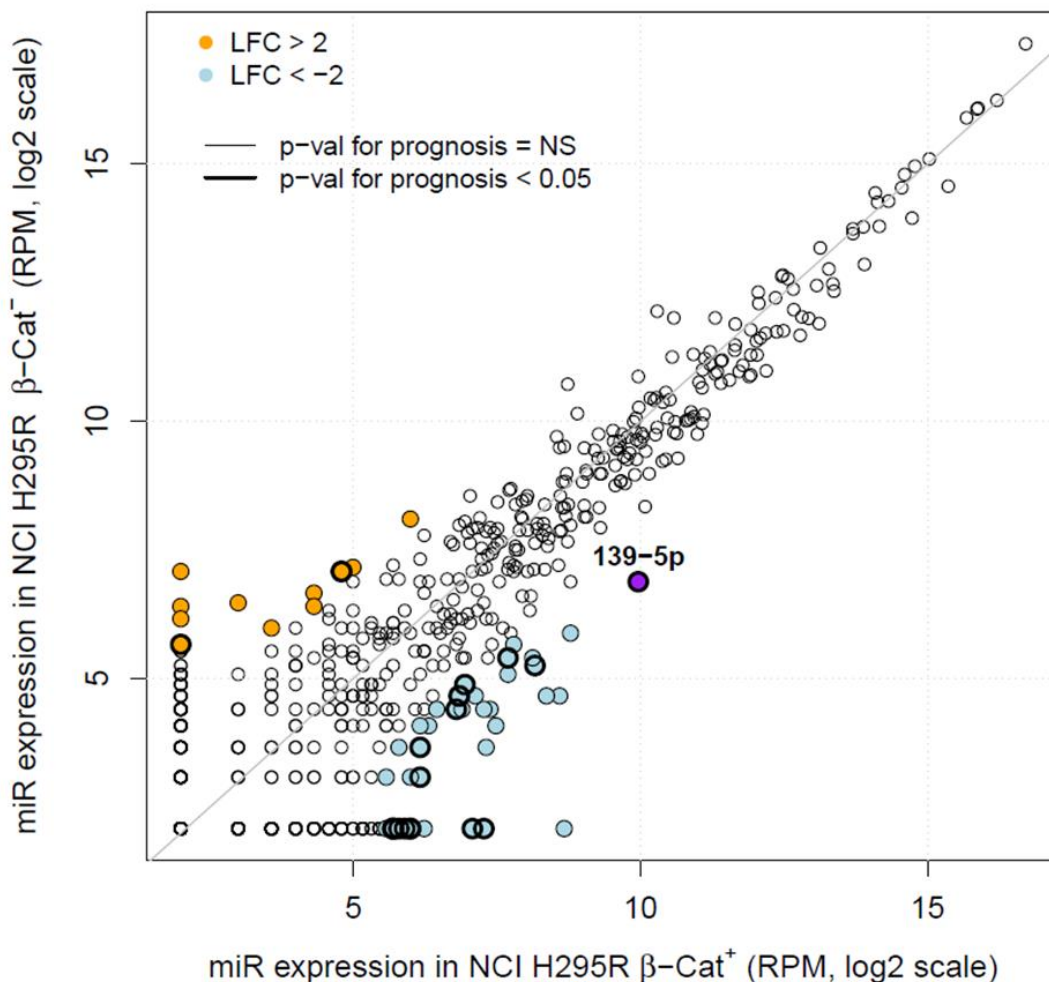
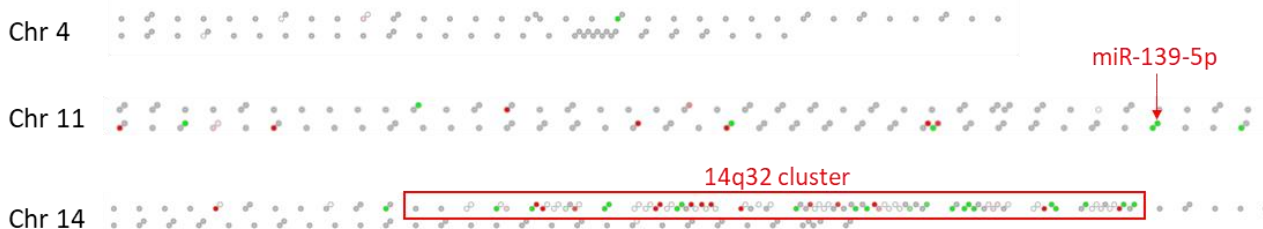


**Figure 1:** Doxycycline efficiently silences Wnt/ $\beta$ -Catenin signalling in H295R sh $\beta$  cells. Cells were cultured without ( $\beta$ -Cat<sup>-</sup> cells) or with Doxycycline ( $\beta$ -Cat<sup>+</sup>) during 10 days. (A) and (B) Expression levels of  $\beta$ -Catenin mRNA and protein, assessed by RT-qPCR and western blot, respectively, in  $\beta$ -Cat<sup>-</sup> cells. (C) and (D) Expression levels of Axin2 mRNA and Axin2 protein, assessed by RT-qPCR and western blot, respectively, in  $\beta$ -Cat<sup>-</sup> cells. (E) A representative western blot for  $\beta$ -Catenin and Axin2 protein levels in non-treated or doxycycline-treated cells.  $\alpha$ -tubulin was used as a loading control. (F) Wnt/ $\beta$ -catenin signaling reporter Top-flash activity in  $\beta$ -Cat<sup>+</sup> and  $\beta$ -Cat<sup>-</sup> cells treated or not with Doxycycline for 48 h. The TOPflash reporter contains wild-type TCF/LEF binding sites while the FOPflash reporter contains the mutated TCF/LEF binding sites (negative control). Shown are the means  $\pm$  S.E.M of 5 independent experiments performed in duplicate for qPCR analyses, 5 independent experiments for western blot analyses of  $\beta$ -Catenin and 4 independent experiments for Axin2.

## **Inactivation of Wnt/ $\beta$ -Catenin signaling changes microRNA expression levels in adrenocortical carcinoma cells**

To determine the impact of  $\beta$ -Cat silencing on miRNA expression in NCI H295R cells, we performed a miRNA profiling analysis using small RNA sequencing. The expression of 54 mature miRNAs was changed following  $\beta$ -Cat repression (Figure 2, Supplementary Table 3): 42 miRNAs were downregulated (77.8%) and 12 were upregulated in  $\beta$ -Cat<sup>-</sup> cells compared to  $\beta$ -Cat<sup>+</sup> cells. MiR-139-5p, that we have previously described as a marker of tumor aggressiveness<sup>35,36</sup>, was markedly repressed following silencing of  $\beta$ -Catenin, while miR-483-5p, a marker of malignancy, was not affected. Analysis of the genomic position of  $\beta$ -Catenin-regulated miRNAs using miRViz software<sup>51</sup> revealed that many of them were localized in the same genomic region, namely the 14q32 locus, that we and others have previously identified as particularly deregulated in ACC<sup>10,35</sup> (Figure 2B).

Among the miRNAs that we found affected by  $\beta$ -Cat silencing, we selected 8 of them for RT-qPCR validation, based on their p-value for prognosis (Supplementary Figure 3), including 4 miRNAs of the 14q32 locus (miR-377-5p, miR-377-3p, miR-1185-2-3p and miR-541-3p), miR-139-5p (chr 11), miR-320b (chr 1), miR-2110 (chr 10), and miR-513a-5p (chr X). In addition, we also measured the expression of miR-483-5p and miR-483-3p, two well-recognized miRNA markers of malignancy<sup>24</sup>. As the expression of miR-1185-2-3p was below the detection limit (Ct > 35), this miRNA was not further analysed. Reducing  $\beta$ -Catenin protein level over time led to a progressive and significant decrease of miR-139-5p expression (Figure 3A), with a  $94 \pm 0.1$  %-decrease at D10. This decrease was not observed in control pTer cells (Supplementary Figure 4). In agreements with the RNA sequencing data, no changes were observed in the expression of miR-483-5p (Figure 3B) and miR-483-3p (Supplementary Figure 5). For all other selected miRNAs, we confirmed a significant decrease in their expression ranging from 35 % to 75 % at D10 of  $\beta$ -Catenin silencing (Supplementary Figure 6).

**A****B****Figure 2:**

(A) Differential expression of miRNAs in  $\beta$ -Cat<sup>+</sup> versus  $\beta$ -Cat<sup>-</sup> cells. Light blue dots represent miRNAs that are underexpressed (RPM > 10 in one condition and LFC < -2), orange dots represent miRNAs that are overexpressed (RPM > 10 in one condition and LFC > 2) after  $\beta$ -Cat silencing. Coloured dots with a thick border correspond to prognostic miRNAs ( $p < 0.05$ , calculated for the COMETE-ENSAT cohort). NS: non-significant for prognosis. (B) Visualization of the genomic position of miRNAs whose expression is changed following  $\beta$ -Cat silencing in H295R cells. To better visualize the global landscape of miRNAs, the selection criteria were the following : log<sub>2</sub> RPM > 4 and LFC either > 1 or < -1. Green dots represent miRNAs that are downregulated (LFC < -1) while red dots represent miRNAs that are upregulated (LFC > 1) in  $\beta$ -Cat<sup>-</sup> cells. In chromosome 4, only one miRNA was decreased after  $\beta$ -Cat silencing. In chromosome 11, few miRNAs were changed, notably miR-139-5p. By contrast, in chromosome 14, numerous miRNAs clustered within in the 14q32 locus were affected.

## **Wnt/ $\beta$ -Catenin signaling exerts a tight control over miR-139-5p, PDE2A and NDRG4 expression**

We subsequently focused on miR-139-5p modulation by  $\beta$ -Catenin. MiR-139-5p is an intronic miRNA, which is located in the second intron of Phosphodiesterase 2A (PDE2A). We therefore investigated whether the decrease in miR-139-5p expression following  $\beta$ -Cat silencing was correlated with a decrease in the expression of its host gene. As shown in Figure 3C, repression of  $\beta$ -Catenin led to a sharp and significant decrease of more than  $90 \pm 2$  % in the expression of PDE2A mRNA, which persisted over time. This was accompanied by a progressive decline in PDE2A protein expression from  $48 \pm 7$  % at D3 up to  $79 \pm 8$  % at D10 (Figure 3D). PDE2A mRNA and protein expression levels were not affected in the control pTer cells (Supplementary Figure 7).

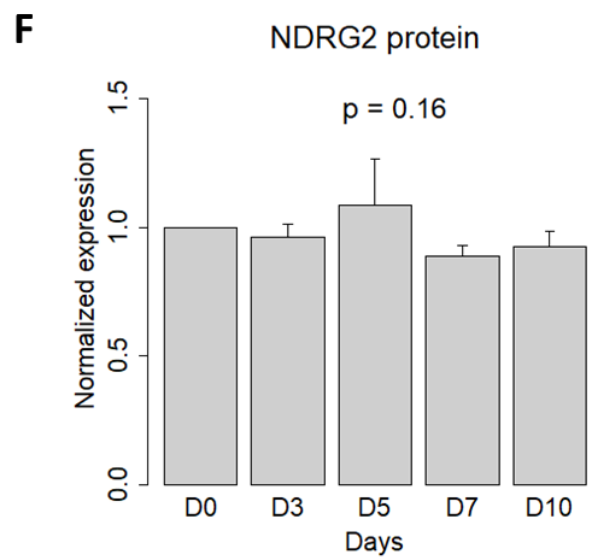
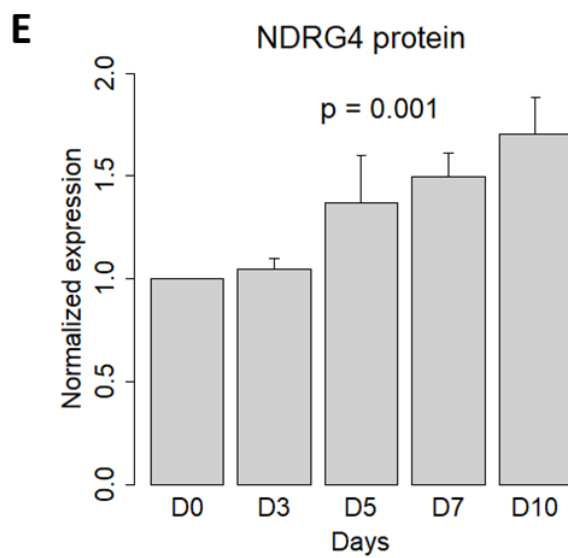
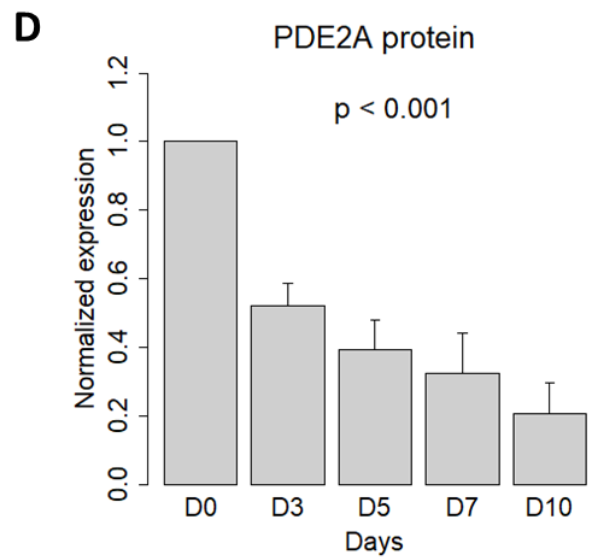
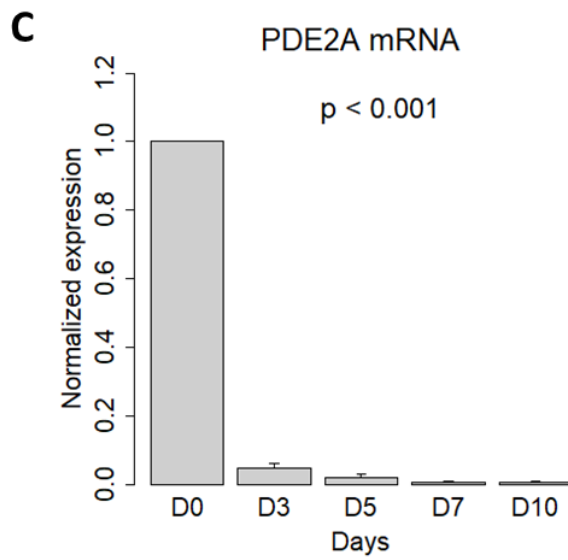
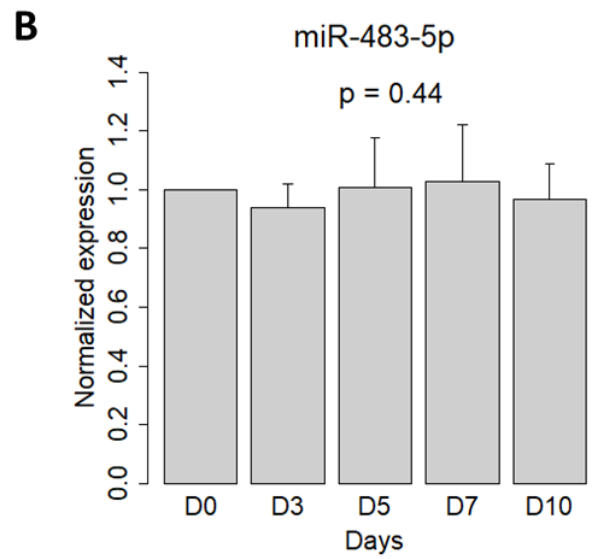
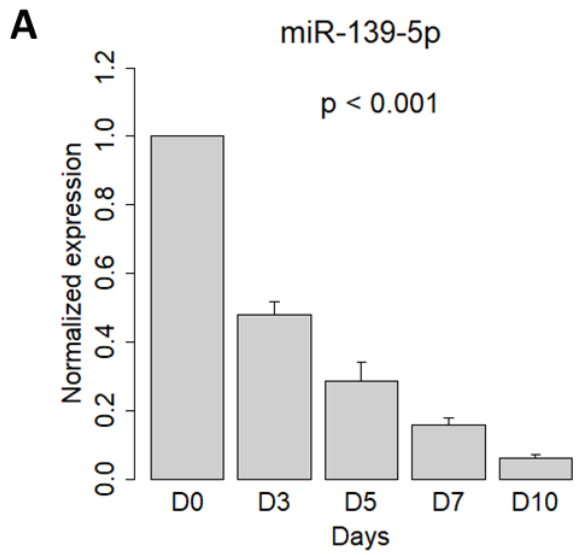
We have previously shown that NDRG4 is a direct target gene of miR-139-5p in H295R cells and that inhibition of miR-139-5p induces a significant increase in NDRG4 mRNA and protein expression. Moreover, the levels of NDRG4 mRNA and protein were inversely correlated to those of miR-139-5p in ACC patients<sup>36</sup>. We then investigated the link between  $\beta$ -Catenin-mediated regulation of miR-139-5p and its target gene NDRG4. Unexpectedly, the levels of NDRG4 mRNA were significantly decreased in  $\beta$ -Cat<sup>-</sup> cells (Supplementary Figure 8). By contrast, NDRG4 protein levels were progressively increased (Figure 3E and 3G) and were inversely correlated to those of miR-139-5p. NDRG4 mRNA and protein levels were unchanged in control pTer cells (Supplementary Figure 9). These results suggest that downregulation of miR-139-5p following  $\beta$ -Cat repression is accompanied by a relief of miR-139-5p-mediated translational repression of NDRG4 mRNA. Interestingly, we found that the levels of NDRG2 were unchanged in  $\beta$ -Cat<sup>-</sup> cells as observed for its regulatory miRNA miR-483-5p (Figure 3B, 3F and 3G). This result points at a specific effect of  $\beta$ -Cat on miR-139-5p/NDRG4 axis.

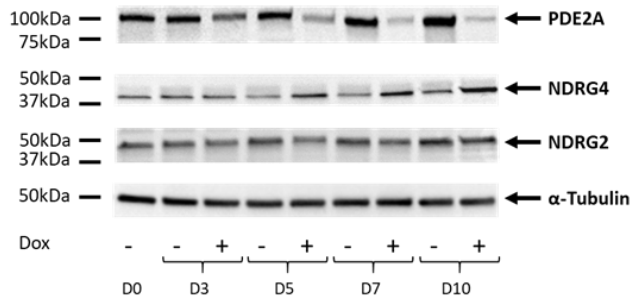
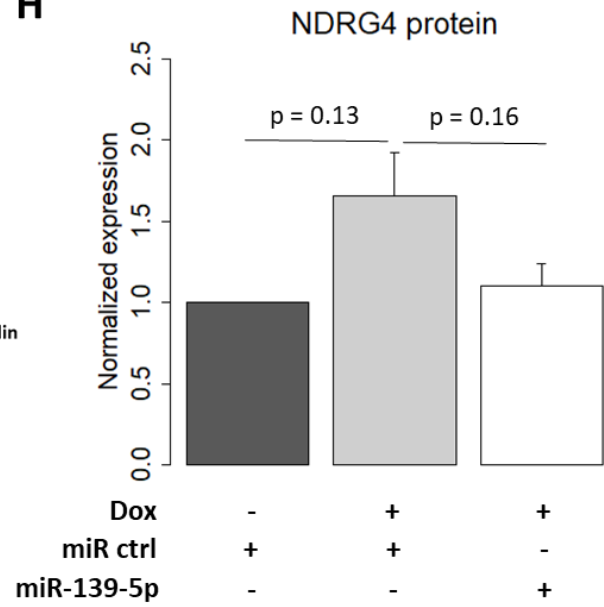
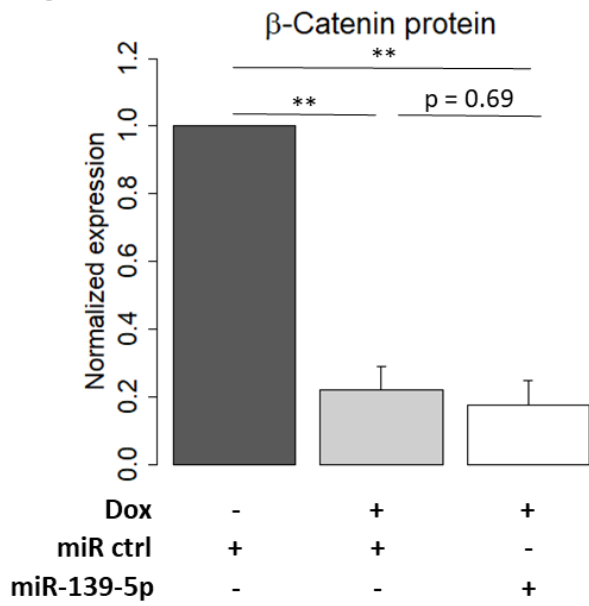
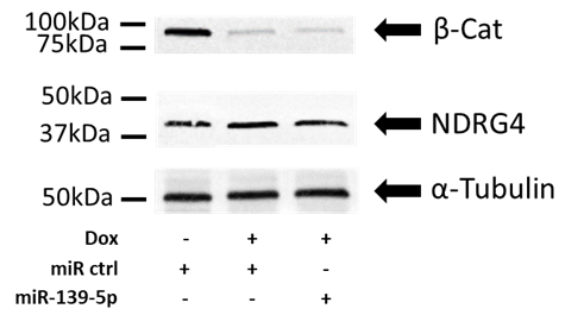
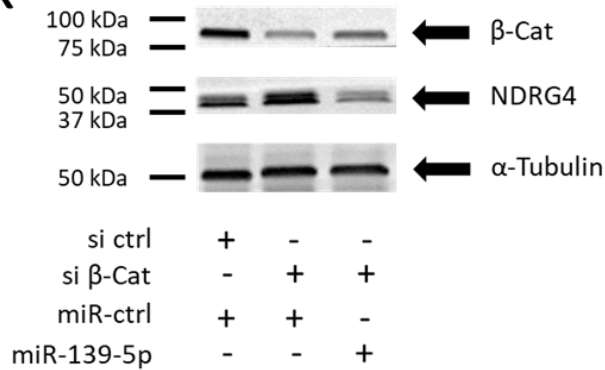
To confirm the results obtained with  $\beta$ -Catenin shRNA, we also used an siRNA-based strategy to silence  $\beta$ -Catenin expression transiently (Supplementary Figure 10). In H295R cells transfected with a  $\beta$ -Catenin siRNA,  $\beta$ -Cat mRNA and protein expressions were significantly decreased by  $57.2 \pm 6\%$  ( $p = 0.024$ ,  $n = 3$ ) and  $60 \pm 5$  % ( $p = 0.001$ ,  $n = 3$ ), respectively, at

D10 (Supplementary Figure 10A and 10E). Axin2 mRNA was decreased by  $49.3 \pm 8\%$  ( $p = 0.025$ ,  $n = 3$ ) while protein expression was reduced by  $61.3 \pm 2\%$  ( $p < 0.001$ ,  $n = 3$ ) at D10 (Supplementary Figure 10B and 10F). We also confirmed a decrease of PDE2A mRNA by  $66.1 \pm 1\%$  ( $p = 0.008$ ,  $n = 3$ ) and PDE2A protein by  $52.0 \pm 5\%$  ( $p = 0.002$ ,  $n = 3$ , Supplementary Figure 10C and 10G). MiR-139-5p expression was decreased by  $74 \pm 2\%$  ( $p < 0.001$ ,  $n = 3$ ) at D10 with a concomitant increase in NDRG4 protein level by  $1.56 \pm 0.08$  fold ( $p = 0.006$ ,  $n = 3$ ) (Supplementary Figure 10J and 10H). Consistent with our previous findings, NDRG4 mRNA expression level was decreased (Supplementary Figure 10D) and the levels of miR-483-5p and miR-483-3p were unchanged at D10 upon  $\beta$ -Cat repression (Supplementary Figure 10K and 10L). These data confirm that  $\beta$ -Cat siRNA produces similar effects to those observed with  $\beta$ -Cat shRNA.

To better assess the link between miR-139-5p, NDRG4 and  $\beta$ -Catenin, we conducted rescue experiments by transfecting exogenous miR-139-5p mimics in  $\beta$ -Cat<sup>-</sup> cells. In  $\beta$ -Cat<sup>-</sup> cells transfected with control miRNA mimics, NDRG4 protein level was  $1.65 \pm 0.27$  higher than that of  $\beta$ -Cat<sup>+</sup> cells (Figure 3H and 3J). Interestingly, adding exogenous miR-139-5p in  $\beta$ -Cat<sup>-</sup> cells prevented the increase in NDRG4 protein level ( $1.10 \pm 0.13$ -fold relative to control  $\beta$ -Cat<sup>+</sup> cells, (Figure 3H and 3J). Similar results were obtained in H295R cells transfected with  $\beta$ -Cat siRNA and control miRNA mimics or miR-139-5p mimics. Indeed, co-transfection of  $\beta$ -Cat siRNA and miR-139-5p mimic prevented NDRG4 protein upregulation and even decreased the levels of NDRG4 detected in control  $\beta$ -Cat<sup>+</sup> cells by  $47.5 \pm 0.02\%$  (Figure 3K and Supplementary Figure 11A). Interestingly, miR-139-5p mimics did not impact the levels of  $\beta$ -Cat protein itself in both  $\beta$ -Cat<sup>-</sup> and H295R cells transfected with  $\beta$ -Cat siRNA (Figure 3I, 3J, 3K and Supplementary Figure 11B). Moreover, transfection of H295R cells with anti-miR-139-5p showed no variations in either TCF-driven luciferase activity or  $\beta$ -Cat protein level (Supplementary Figure 11C, 11D and 11E), thus ruling out a potential feedback loop between miR-139-5p and mutated  $\beta$ -Cat in ACC cells. Altogether, these results suggest a  $\beta$ -Cat-mediated control of miR-139-5p and NDRG4 expression in H295R cells.





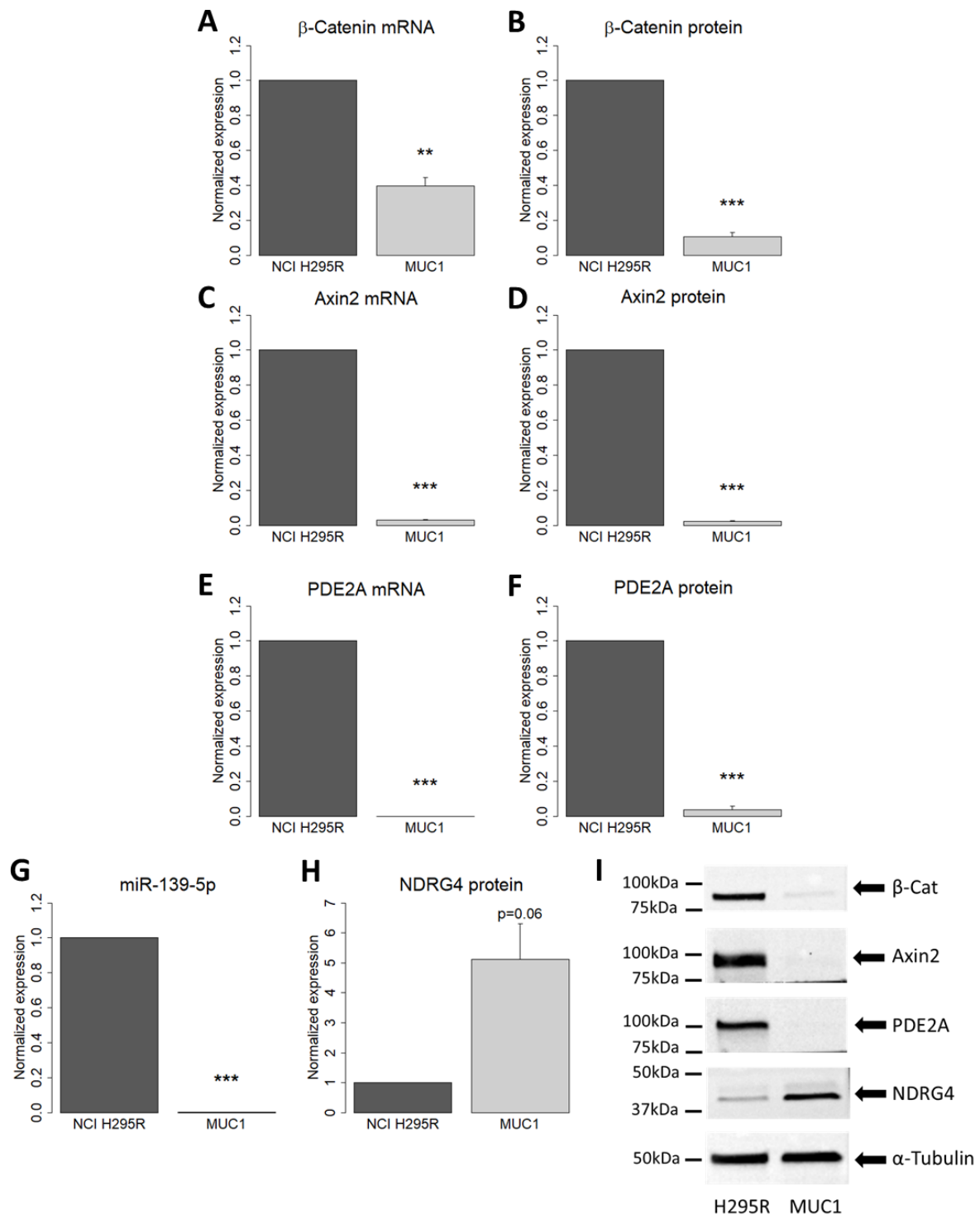
**G****H****I****J****K**

**Figure 3: Effects of  $\beta$ -Cat silencing on miR-139-5p/PDE2A/NDRG4 axis.** (A, C, D)  $\beta$ -Cat repression progressively and markedly decreases the expression of miR-139-5p and its host gene PDE2A while it upregulates miR-139-5p target gene NDRG4 (E). The levels of miR-139-5p, miR-483-5p and PDE2A mRNA were assessed using RT-qPCR in  $\beta$ -Cat cells. (B, F) Neither miR-483-5p nor its target gene NDRG2 were affected after  $\beta$ -Cat silencing. (G) A representative western blot for PDE2A, NDRG4, and NDRG2 with  $\alpha$ -tubulin as a loading control. Graphs for qPCR represent the mean  $\pm$  S.E.M of 5 independent experiments performed in duplicate. Graphs for western blots represent the mean  $\pm$  S.E.M of 4 independent experiments for PDE2A and 5 independent experiments for NDRG4 and NDRG2. (H) Rescuing miR-139-5p in  $\beta$ -Cat cells prevents the increase in NDRG4 protein observed at D10 after  $\beta$ -Cat repression but does not change the expression of  $\beta$ -Cat protein itself (I). Graphs for rescue experiments represent the mean  $\pm$  S.E.M of 3 independent experiments. (J, K) A representative western blot of  $\beta$ -Cat and NDRG4 in miR-139-5p rescue experiments using sh $\beta$  cells treated or not with doxycycline or H295R cells transfected with control or  $\beta$ -Cat siRNA, respectively.  $\alpha$ -tubulin was used as a loading control.

ACC models have been lacking for many years until the recent development of MUC-1 cell line, which has been generated from an ACC neck metastasis of a male patient<sup>43</sup>. To explore more deeply the relationship between miR-139-5p and  $\beta$ -Cat, we also used MUC1 cells, which express the wild type  $\beta$ -Cat gene. We found that the mRNA and protein expression levels in MUC1 cells represent respectively  $40 \pm 5\%$  ( $p = 0.006$ ,  $n = 3$ , Figure 4A) and  $11 \pm 2.6\%$  of those of H295R cells ( $p < 0.001$ ,  $n = 3$ , Figure 4B and 4I). Axin2 mRNA and protein levels were also lower in MUC1 cells, with an mRNA expression level of  $3 \pm 0.1\%$  ( $p < 0.001$ ,  $n = 3$ , Figure 4C) and protein level of  $2 \pm 0.3\%$  of the H295R cell expression levels ( $p < 0.001$ ,  $n = 3$ , Figure 4D and 4I). PDE2A mRNA and protein expression levels were barely detectable in MUC1 compared to H295R cells with an mRNA level representing  $0.01 \pm 0.04\%$  ( $p < 0.001$ ,  $n = 3$ , Figure 4E) and a protein level representing  $3.6 \pm 0.2\%$  ( $p < 0.001$ ,  $n = 3$ , Figure 4F and 4I) of H295R cell expression levels. MiR-139-5p expression was also sharply lower in MUC1 cells and represents  $0.01 \pm 0.1\%$  of miR-139-5p levels in H295R cells ( $p < 0.001$ ,  $n = 3$ , Figure 4G). Conversely, NDRG4 protein expression level was  $5.12 \pm 1.17$ -fold higher in MUC1 cells compared to H295R cells ( $p = 0.06$ ,  $n = 3$ , Figure 4H and 4I).

### **$\beta$ -Catenin gain of function and LEF1 upregulation are associated with increased miR-139-5p and PDE2A expression and reduced NDRG4 expression in ACC patients**

These above results led us to examine the level of miR-139-5p and PDE2A in patients depending on the presence of genetic alterations in the Wnt/ $\beta$ -Cat signaling pathway, as defined in Materials and Methods. In the COMETE-ENSAT cohort, patients with mutations in the Wnt/ $\beta$ -Cat signaling pathway had significantly higher levels of miR-139-5p and PDE2A compared with patients without mutations (median expression of miR-139-5p: 12.8 vs 9.7,



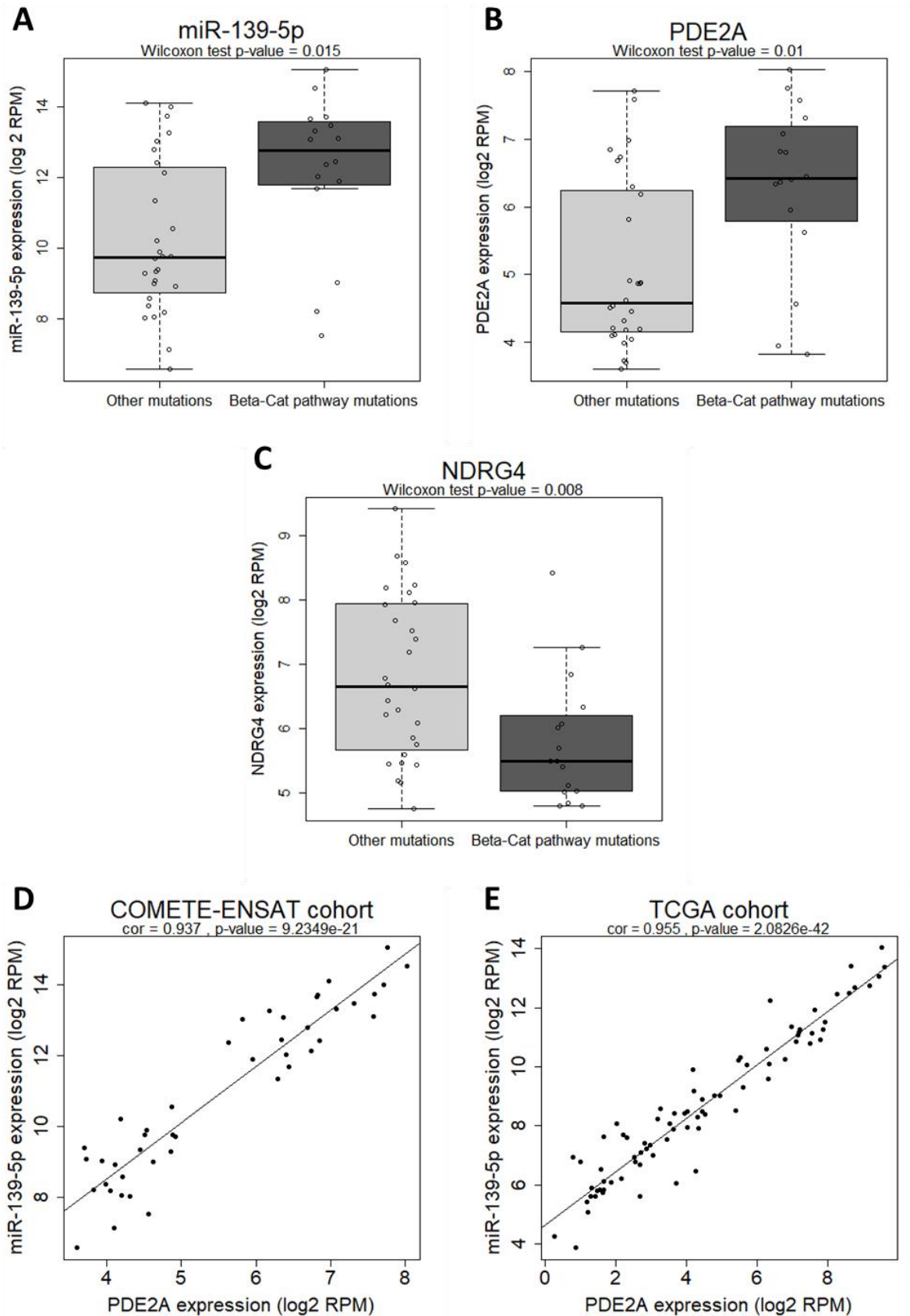
**Figure 4:** Comparison of selected mRNA and protein abundances in MUC1 and H295R cells. Shown are (A) β-Cat mRNA, (B) β-Cat protein, (C) Axin2 mRNA, (D) Axin2 protein, (E) PDE2A mRNA, (F) PDE2A protein, (G) miR-139-5p and (H) NDRG4 protein expression levels. Graphs show the mean of 3 independent experiments. (I) A representative western blot analysis of the different proteins.

p = 0.015; median expression of PDE2A: 6.42 vs 4.57, p = 0.010, Figure 5A and 5B), and significantly lower levels of NDRG4 (median expression of 5.49 vs 6.65, p = 0.008, Figure 5C). Interestingly, the levels of PDE2A and miR-139-5p were strongly correlated in both COMETE-ENSAT (corr coeff: 0.94, p-value:  $9.2 \times 10^{-21}$ ) and TCGA (corr coeff: 0.96, p-value:  $2 \times 10^{-42}$ )

cohorts (Figure 5D and 5E), suggesting a co-transcriptional regulation of miR-139-5p and its host gene PDE2A in the tumor as observed in H295R cells in vitro.

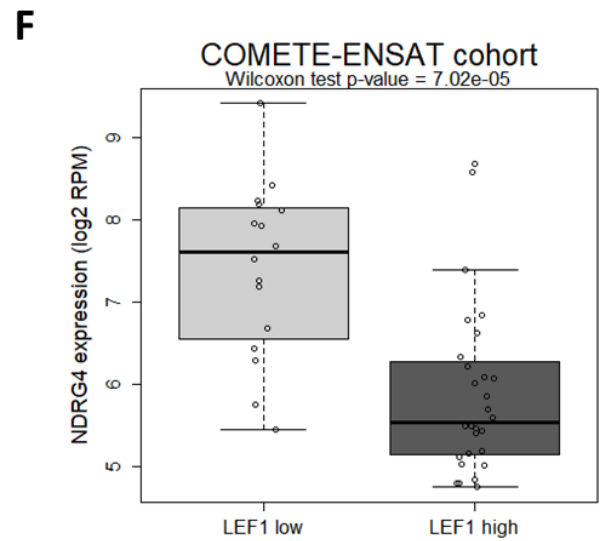
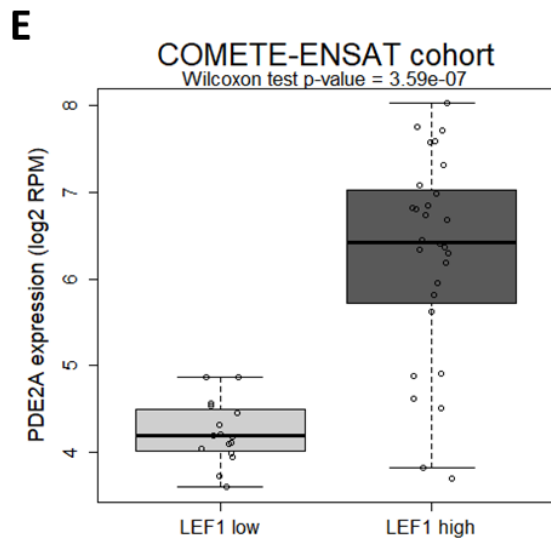
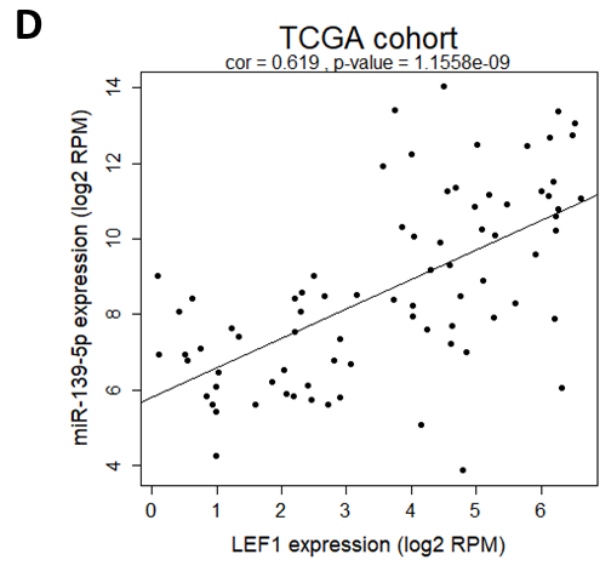
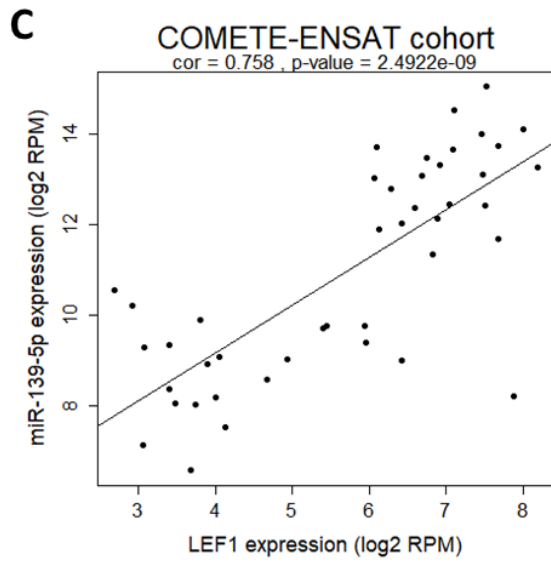
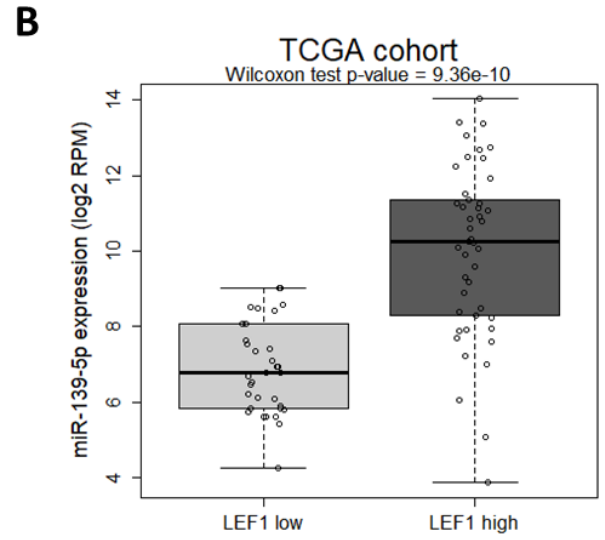
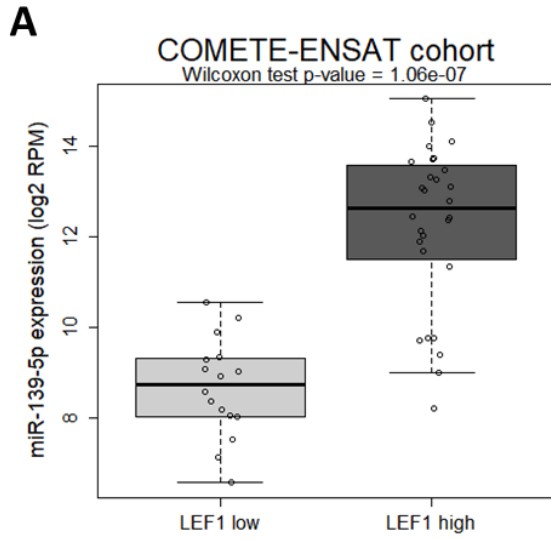
However, it is worth mentioning that a sub-group of 7/28 patients (25%) in the COMETE-ENSAT cohort had no identified mutation in the Wnt/ $\beta$ -Cat signaling pathway but displayed a high level of miR-139-5p while, on the contrary, 3/16 patients (19%) carried a mutation in Wnt/ $\beta$ -Cat signaling pathway and had a low level of miR-139-5p. We thus investigated whether the activation of Wnt/ $\beta$ -Cat signaling pathway could be better predicted by the expression level of the  $\beta$ -catenin co-transcription factor TCF/LEF than by the mutational status of  $\beta$ -Cat. In vertebrates, TCF/LEF family includes four members: TCF1 (also called TCF7), LEF1 (or TCF1 $\alpha$ ), TCF3 and TCF4<sup>52</sup>. We therefore analyzed the distribution of the expression of these 4 genes among patients. We found that LEF1 was the only factor whose expression pattern was bi-modal (Supplementary Figure 12) with a local minimum around 5.2. Almost all  $\beta$ -Cat-mutated patients have an expression level of LEF1 above this threshold of 5.2, but interestingly, 12/28 (42.9 %) of the patients with no known mutation in the  $\beta$ -Cat pathway had a high expression of LEF1, while only 2/16 (12.5 %) of the mutated patients had a low expression of LEF1.

To determine whether miR-139-5p expression correlates better with LEF1 expression than with Wnt/  $\beta$ -Cat pathway mutational status, we examined the level of miR-139-5p in function of the level of LEF1. Patients with a LEF1 expression level above 5.2 were classified in the “LEF1 high” group while patients with a LEF1 expression below 5.2 were classified in the “LEF1 low” group. As shown in Figure 6A, the level of miR-139-5p in “LEF1 high” patients was significantly higher than in the “LEF1 low” patients (median 12.63 vs 8.74,  $p < 0.001$ ) in the COMETE-ENSAT cohort, with a much more significant  $p$ -value than that obtained with the mutational status of Wnt/ $\beta$ -Cat signaling pathway. Interestingly, all the patients with a tumor expression of miR-139-5p above 11 are now in the “LEF1 high” group. This observation was confirmed by analyzing the TCGA dataset (Figure 6B): the median

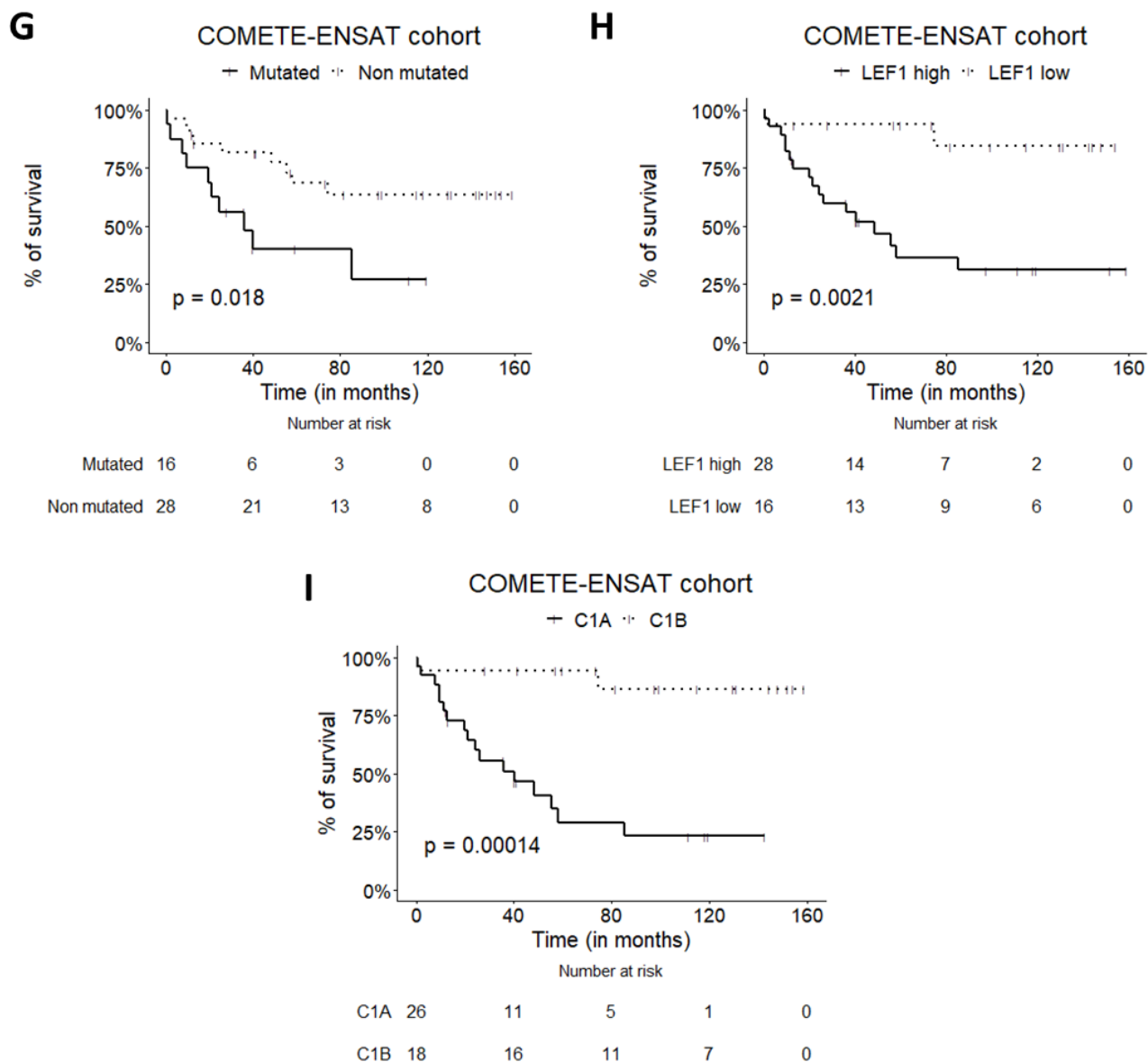


**Figure 5:** (A) Expression of miR-139-5p, (B) its host gene PDE2A and (C) its target gene NDRG4 in the COMETE-ENSAT cohort of ACC patients, depending on the presence or the absence of mutations in Wnt/ $\beta$ -Catenin pathway. Patients with mutations in CTNNB1 ( $\beta$ -Cat), ZNRF3 gene or mutation in either gene in addition to TP53 were listed as mutated for the Wnt/ $\beta$ -Cat signaling pathway. Patients with mutations of TP53, CDKN2A, MEN1, RB1, TERT, DAXX, or MED12 were listed as non-mutated for Wnt/ $\beta$ -Cat signaling pathway (other mutations). (D) and (E) Tumor expression of miR-139-5p with respect to its host gene PDE2A in the COMETE-ENSAT cohort and the TCGA cohort. Each dot corresponds to a given patient.

expression of miR-139-5p in “LEF1 high” patient group was significantly higher than that of the “LEF1 low” patient group (10.25 vs 6.78,  $p < 0.001$ , LEF1 threshold 3.3). Moreover, in both cohorts, miR-139-5p expression shows a clear correlation with LEF1 expression (Figure 6C and 6D). Besides, we observed a higher expression of PDE2A ( $p = 3.59 \times 10^{-7}$ ) and lower expression of NDRG4 ( $p = 7.02 \times 10^{-5}$ ) in the “LEF1 high” group in comparison to the “LEF1 low” group in both COMETE-ENSAT cohort (Figure 6E and 6F) and TCGA cohort (Supplementary Figure 13A and 13B). As observed for miR-139-5p, LEF1 performs better than Wnt/ $\beta$ -Cat signaling pathway mutational status in discriminating patients according to their PDE2A and NDRG4 expression levels, both in the COMETE-ENSAT and the TCGA cohorts. We have previously shown that miR-139-5p expression levels have a significant prognostic value for ACC<sup>36</sup>. We thus evaluated the prognostic significance of miR-139-5p regulators in ACC patients, namely the mutational status of Wnt/ $\beta$ -Cat signaling pathway and LEF1. Comparison of survival curves of patients in function of their mutational status with those in function of their LEF1 expression levels revealed that LEF1 better predicts overall survival than Wnt/ $\beta$ -Cat pathway mutation status (Figure 6G and 6H,  $p = 0.018$  and  $p = 0.0021$  for survival determined with the mutational status and LEF1 expression, respectively). In addition, prediction of survival using LEF1 closely mimics the prediction using the ACC C1A and C1B mRNA clusters determined from the entire transcriptome of the COMETE-ENSAT cohort (Figure 6I). Indeed, 2 death events were observed in both the “LEF low” group and the C1B group compared to 17 death events observed in both the “LEF high” group and the C1A group ( $p = 2.1 \times 10^{-3}$  for LEF1, and  $p = 1.4 \times 10^{-4}$  for C1A/C1B). The powerful predictive value of LEF1 expression was also confirmed in the TCGA cohort ( $p = 5.7 \times 10^{-5}$ , Supplementary Figure 13C).







**Figure 6:** (A) Expression of miR-139-5p as a function of LEF1 expression level in the COMETE-ENSAT cohort and (B) the TCGA cohort. The selected thresholds for the COMETE-ENSAT and the TCGA cohorts were 5.2 and 3.3, respectively, using the Expectation-Maximization algorithm. (C) and (D) Expression of miR-139-5p as a function of LEF1 expression in both cohorts. (E) Expression of miR-139-5p host gene PDE2A and of its target gene NDRG4 (D) in the COMETE-ENSAT cohort in function of LEF1 expression levels. (G) Overall survival in the COMETE-ENSAT cohort (n = 44) depending on the mutational status on Wnt/ $\beta$ -Cat signaling pathway, LEF1 expression (H) and the mRNA clusters C1A and C1B (I).

## Discussion

ACC is a rare malignancy with dismal prognosis and clinical heterogeneity. Understanding ACC tumor biology is essential to develop new efficient therapies. Gain-of-function mutations and deletions in genes involved in the Wnt/ $\beta$ -Cat signaling pathway have been reported in approximately 40% of ACC. Mutations in *CTNNB1* ( $\beta$ -Catenin) gene were found in 15-20% of

the tumors<sup>10,11</sup>, with activating mutations in exon 3 impairing Serine/Threonine residue phosphorylations. Constitutive activation of Wnt/ $\beta$ -Cat pathway in ACC is associated with poor prognosis<sup>17–19,53</sup>. Besides, deregulations of tumor and circulating miRNAs were found in ACC patients and many of them showed tight correlation with prognosis. Nevertheless, the molecular mechanisms underlying aberrant expression of miRNAs in ACC are still unknown. As Wnt/ $\beta$ -Cat signaling pathway is a key driver of both adrenal development and tumorigenesis, we hypothesized that this pathway may promote ACC aggressiveness through modulations of miRNA expression.

We report here for the first time that constitutively active Wnt/ $\beta$ -Cat signaling contribute to miRNA expression deregulations in ACC cells. Indeed, RNA sequencing of the whole miRnome after inducible shRNA-mediated silencing of  $\beta$ -Cat revealed that 54 miRNAs were affected (LFC>2 or <-2), mainly by a decrease in their expression (42 out of 54 miRNAs). Threshold of 2 for LFC was chosen to select miRNAs that  $\beta$ -Cat silencing impacted the most. However, when we used a less stringent threshold of 1, many other miRNAs were impacted (117 miRNAs including 85 with a decreased expression), suggesting a strong control of miRNA expression by  $\beta$ -Cat. We subsequently confirmed by quantitative PCR that  $\beta$ -Cat repression significantly decreases the expression of miR-377-5p, miR-377-3p, miR-541-3p (chr 14), miR-139-5p (chr 11), miR-2110 (chr 10) and miR-513a-5p (chr X), all of which have been found to be overexpressed in aggressive ACC and associated with prognosis<sup>10</sup>.

Most studies of the relationship between miRNAs and Wnt/ $\beta$ -Cat signaling pathway have focused on miRNAs as post-transcriptional regulators of  $\beta$ -Cat expression. Notably, re-expression of specific tumor suppressor miRNAs led to a decrease in  $\beta$ -Cat mRNA expression through a direct binding of miRNAs to the 3'-untranslated region of  $\beta$ -Cat transcript<sup>37,39,40</sup>. To the best of our knowledge, about ten studies showed a direct effect of  $\beta$ -Cat on miRNA expression in cancer<sup>54–62</sup>. Ji *et al.*<sup>54</sup> found that the Wnt/ $\beta$ -Cat signaling pathway activates transcription of the miR-181s family (miR-181a, b, c and d) in hepatocellular carcinoma. Tang *et al.* showed that  $\beta$ -Cat/TCF complex directly binds to the promoter of miR-183-96-182 cluster and activates its transcription in gastric cancer, leading to an increase in cell proliferation<sup>59</sup>.

Guo *et al.* reported a direct effect of  $\beta$ -Cat on miR-150 transcription in colorectal cancer cells with subsequent increases in invasion, migration and epithelial-mesenchymal transition<sup>61</sup>. Among the miRNAs whose expression varies following  $\beta$ -Cat silencing, we identified a subset of both upregulated and downregulated miRNAs located in the 14q32 imprinted locus, which encodes for 54 miRNAs and is the largest miRNA cluster known in the human genome. Depending on the cancer type, miRNAs at this locus act as oncomiRs or tumor suppressor miRNAs, as reviewed by Benetatos *et al.*<sup>63</sup>. We first described the overexpression of 13 miRNAs at the 14q32 locus in aggressive ACC<sup>35</sup>. Consistent with our data, an overall under-expression of this locus was found in the good prognosis subgroup of ACC<sup>10</sup>. More recently, it was reported that deregulations of the 14q32 miRNA cluster in endocrine tumors could have a significant impact on prognosis<sup>64</sup>. Interestingly, miR-410, miR-433 and miR-377-3p within the 14q32 locus have been identified as regulatory miRNAs of Wnt/ $\beta$ -Cat signaling<sup>65,66</sup>. Conversely, we observed a significant decrease in miR-377-3p and miR-410 expression and slight up- or down-regulation of the majority of 14q32 miRNAs upon  $\beta$ -Cat silencing in ACC cells. Altogether, these data suggest a feedback circuit between miRNAs and Wnt/ $\beta$ -catenin pathway.

The pronounced effect of  $\beta$ -Cat silencing on miR-139-5p expression together with the fact that we and others have previously identified miR-139-5p as a marker of aggressiveness and poor prognosis in ACC<sup>10,11,35,36</sup> led us to focus on this miRNA. We demonstrate here *in vitro* that miR-139-5p expression is strongly decreased following  $\beta$ -Cat silencing, in correlation with a complete repression of its host gene PDE2A that has been recently identified as a direct target of  $\beta$ -Cat<sup>67</sup>. PDE2A is a dual-substrate phosphodiesterase that degrades both cGMP and cAMP. It is highly conserved among species and expressed in numerous organs in human, particularly in brain and endocrine organs including the adrenal, the pituitary, the pancreas and the mammary gland<sup>68</sup>. The role of PDE2A in development is crucial since PDE2A-KO mice die between the second and the third week of gestation with major heart defects<sup>69</sup>. PDE2A expression was found to be prominent in the zona glomerulosa (ZG) as compared to the zona fasciculata (ZF) of the adrenal gland. The maintenance of these two physiologically distinct zones would rely on the reciprocal inhibitory effects of the cAMP/Protein Kinase A and the

Wnt/ $\beta$ -catenin pathways in the ZF and the ZG, respectively<sup>70-72</sup>. The importance of PDE2A in the maintenance of adrenal zonation has been suggested recently. Indeed, Pignatti *et al.* identified PDE2A as a direct target of  $\beta$ -Cat. They demonstrated that  $\beta$ -Cat gain-of-function in the ZG induces an upregulation of PDE2A and impairs ZG-to-ZF cell transdifferentiation through inhibition of cAMP/PKA signaling in the ZF<sup>67</sup>. Whether miR-139-5p also contributes to the identity of ZG remains to be determined. In adrenocortical tumors, Durand *et al.* first identified upregulation of PDE2A in adenomas and ACC harboring CTNNB1 mutation<sup>73</sup>. The parallel decrease in PDE2A and miR-139-5p levels that we observed in NCI H295R cells *in vitro* suggests that the  $\beta$ -Cat-dependent expression of miR-139-5p is coupled to that of its host gene PDE2A. Conversely, MUC1 cells, which originate from a neck ACC metastasis with no activating mutation in  $\beta$ -Cat gene, display reduced levels of  $\beta$ -Cat and barely detectable levels of PDE2A and miR-139-5p compared to H295R cells. MiR-139-5p has been shown to regulate Wnt/ $\beta$ -Cat signaling pathway in cervical cancer<sup>74</sup> and bladder cancer<sup>75</sup> by targeting TCF4 and WNT1, respectively. In ACC, we did not observe a regulatory feedback loop between miR-139-5p and Wnt/ $\beta$ -Cat signaling as shown by TOP-Flash reporter assays.

We found that miR-139-5p expression was strongly correlated with PDE2A expression in the two European and American cohorts of ACC patients (COMETE-ENSAT and TCGA). Interestingly, a previous study showed that miR-139-5p was correlated with PDE2A expression in 30/31 cancers of the TCGA consortium<sup>76</sup>. However, no correlation between miR-139-5p/-3p and PDE2A expression was observed *in vitro* in acute myeloid leukemia (AML), in gastric cancer (GC) and colorectal cancer (CRC), suggesting that depending on the cellular context, independent transcription start sites or post-transcriptional mechanisms could be involved<sup>77-79</sup>. It is worth mentioning that, by contrast to ACC, miR-139-5p is underexpressed in AML, GC and CRC and acts as a tumour-suppressor miRNA in many cancers<sup>80,81</sup>.

To strengthen our observations *in vitro*, we analysed the relationship between Wnt/ $\beta$ -Cat pathway mutational status and miR-139-5p levels in ACC patients. Importantly, we found that patients with mutations have significantly higher levels of PDE2A and miR-139-5p and a significantly lower level of NDRG4 when compared to patients with no known mutation in the Wnt/ $\beta$ -Cat pathway. However, we also found that 7 patients out of 28 had high levels of miR-

139-5p in the absence of identified mutations Wnt/ $\beta$ -Cat pathway. A potential mechanism that may explain these findings is a nuclear expression of active  $\beta$ -Cat in some patients with wild type *CTNNB1*, as it has been reported previously<sup>53</sup>. Furthermore, the nuclear localization of  $\beta$ -catenin was shown recently to be promoted by LEF-1 in cancer cells<sup>82</sup>. These findings led us to analyze miR-139-5p expression in function of the expression of LEF1, a well-known downstream target gene of  $\beta$ -Cat in ACC<sup>10,11,53,83,84</sup>. We postulated that the level of LEF1 transcription factor could reflect the global activity of Wnt/ $\beta$ -Cat pathway in ACC whether it holds a known mutation or not. Remarkably, LEF1 was the only transcription factor of the LEF/TCF family members tested, whose expression tightly correlates with that of miR-139-5p. LEF1 better separates patients with high and low expression of miR-139-5p, PDE2A and NDRG4 than does the  $\beta$ -Cat pathway mutational status. We also identified LEF1 as a powerful survival predictor in ACC, with more statistical power than the mutational status of Wnt/ $\beta$ -Cat pathway. In addition, survival prediction with LEF1 is comparable to that obtained with the whole transcriptome defining the C1A and C1B ACC subgroups. Establishing prognosis with a single gene expression might be more practical in a translational perspective. These data confirm that transcript expression better predicts patients' outcome than the mutational status, as recently reported in a genome-wide analysis of prognostic features in human cancers<sup>85</sup>.

In summary, our study provides the first analysis of the impact of aberrant activation of Wnt/ $\beta$ -Cat signaling pathway on the whole miRnome in cancer cells. We demonstrate that  $\beta$ -Cat is involved in the upregulation of several miRNAs which are associated with poor outcome in ACC, including those of the 14q32 cluster and most of all, miR-139-5p, that we have previously found upregulated in aggressive tumors. Expression of miR-139-5p is strongly correlated with the expression of its host gene PDE2A in ACC cells *in vitro* as well as in patients. Moreover, ACC with mutated Wnt/ $\beta$ -Catenin pathway display higher levels of miR-139-5p as compared to non-mutated ACC. Finally, we provide evidence that high LEF1 expression in ACC correlates even better with high miR-139 expression than the mutational status of Wnt/ $\beta$ -Cat pathway and is associated with significantly worse survival for the patients. These findings may trigger further mechanistic studies on the role of aberrant Wnt/ $\beta$ -Cat signaling in promoting ACC aggressiveness through miRNA-mediated circuits. Because  $\beta$ -Cat is a multifunctional

protein whose therapeutic targeting may have serious adverse events, miRNAs could serve as downstream targets of Wnt signaling pathway for the treatment of ACC.

**Funding:** This research was funded by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Société Française d'Endocrinologie, La Ligue contre le Cancer and the Conseil Scientifique du Fonds AGIR pour les Maladies Chroniques.

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest.

## Bibliography

1. Fassnacht, M. *et al.* Update in adrenocortical carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **98**, 4551–4564 (2013).
2. Vanbrabant, T. *et al.* Influence of hormonal functional status on survival in adrenocortical carcinoma: systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Endocrinol.* **179**, 429–436 (2018).
3. Fassnacht, M. *et al.* European Society of Endocrinology Clinical Practice Guidelines on the management of adrenocortical carcinoma in adults, in collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors. *Eur. J. Endocrinol.* **179**, G1–G46 (2018).
4. Fassnacht, M. *et al.* Limited prognostic value of the 2004 International Union Against Cancer staging classification for adrenocortical carcinoma. *Cancer* **115**, 243–250 (2009).
5. Lughezzani, G. *et al.* The European Network for the Study of Adrenal Tumors staging system is prognostically superior to the international union against cancer-staging system: A North American validation. *Eur. J. Cancer* **46**, 713–719 (2010).
6. Daher, M. *et al.* Temporal Trends in Outcomes in Patients With Adrenocortical Carcinoma: A Multidisciplinary Referral-center Experience. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **107**, 1239–1246 (2022).
7. Else, T. *et al.* Adrenocortical carcinoma. *Endocr. Rev.* **35**, 282–326 (2014).
8. Fassnacht, M. *et al.* Combination chemotherapy in advanced adrenocortical carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **366**, 2189–2197 (2012).
9. Cremaschi, V. *et al.* Advances in adrenocortical carcinoma pharmacotherapy: what is the current state of the art? *Expert Opin. Pharmacother.* **0**, 1–12 (2022).
10. Assié, G. *et al.* Integrated genomic characterization of adrenocortical carcinoma. *Nat. Genet.* **46**, 607–612 (2014).
11. Zheng, S. *et al.* Comprehensive Pan-Genomic Characterization of Adrenocortical Carcinoma. *Cancer Cell* **30**, 363 (2016).
12. Klaus, A. & Birchmeier, W. Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 387–398 (2008).
13. MacDonald, B. T. *et al.* Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev. Cell* **17**, 9–26 (2009).
14. Clevers, H. & Nusse, R. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling and Disease. *Cell* **149**, 1192–1205 (2012).
15. Hao, H.-X. *et al.* ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner. *Nature* **485**, 195–200 (2012).
16. 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).
17. de Reyniès, A. *et al.* 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 (2009).
18. Ragazzon, B. *et al.* Transcriptome Analysis Reveals that p53 and  $\beta$ -Catenin Alterations Occur in a Group of Aggressive Adrenocortical Cancers. *Cancer Res.* **70**, 8276–8281 (2010).
19. Gaujoux, S. *et al.*  $\beta$ -Catenin Activation Is Associated with Specific Clinical and Pathologic Characteristics and a Poor Outcome in Adrenocortical Carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **17**, 328–336 (2011).

20. Tissier, F. *et al.* 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 (2005).
21. Gaujoux, S. *et al.* Silencing Mutated  $\beta$ -Catenin Inhibits Cell Proliferation and Stimulates Apoptosis in the Adrenocortical Cancer Cell Line H295R. *PLOS ONE* **8**, e55743 (2013).
22. Salomon, A. *et al.* Loss of  $\beta$ -catenin in adrenocortical cancer cells causes growth inhibition and reversal of epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncotarget* **6**, 11421–11433 (2015).
23. Sbiera, I. *et al.* Epithelial and Mesenchymal Markers in Adrenocortical Tissues: How Mesenchymal Are Adrenocortical Tissues? *Cancers* **13**, 1736 (2021).
24. Cherradi, N. microRNAs as Potential Biomarkers in Adrenocortical Cancer: Progress and Challenges. *Front. Endocrinol.* **6**, 195 (2015).
25. Igaz, P. *et al.* MicroRNAs in adrenal tumors: relevance for pathogenesis, diagnosis, and therapy. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **72**, 417–428 (2015).
26. Ambros, V. The functions of animal microRNAs. *Nature* **431**, 350–355 (2004).
27. Bartel, D. P. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* **116**, 281–297 (2004).
28. Calin, G. A. *et al.* Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 15524–15529 (2002).
29. Lin, S. & Gregory, R. I. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 321–333 (2015).
30. Marima, R. *et al.* MicroRNA and Alternative mRNA Splicing Events in Cancer Drug Response/Resistance: Potent Therapeutic Targets. *Biomedicines* **9**, 1818 (2021).
31. Sempere, L. F. *et al.* microRNA-based diagnostic and therapeutic applications in cancer medicine. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **12**, e1662 (2021).
32. Lu, J. *et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* **435**, 834–838 (2005).
33. Reda El Sayed, S. *et al.* MicroRNA Therapeutics in Cancer: Current Advances and Challenges. *Cancers* **13**, 2680 (2021).
34. Singh, P. *et al.* Dysregulation of microRNAs in adrenocortical tumors. *Mol. Cell. Endocrinol.* **351**, 118–128 (2012).
35. Chabre, O. *et al.* Serum miR-483-5p and miR-195 are predictive of recurrence risk in adrenocortical cancer patients. *Endocr. Relat. Cancer* **20**, 579–594 (2013).
36. Agosta, C. *et al.* MiR-483-5p and miR-139-5p promote aggressiveness by targeting N-myc downstream-regulated gene family members in adrenocortical cancer. *Int. J. Cancer* **143**, 944–957 (2018).
37. Hirata, H. *et al.* MicroRNA-1826 directly targets beta-catenin (CTNNB1) and MEK1 (MAP2K1) in VHL-inactivated renal cancer. *Carcinogenesis* **33**, 501–508 (2012).
38. Liu, P. *et al.* MicroRNA-142-3p Inhibits Tumorigenesis of Colorectal Cancer via Suppressing the Activation of Wnt Signaling by Directly Targeting to  $\beta$ -Catenin. *Front. Oncol.* **10**, 552944 (2020).
39. Indersie, E. *et al.* MicroRNA therapy inhibits hepatoblastoma growth in vivo by targeting  $\beta$ -catenin and Wnt signaling. *Hepatol. Commun.* **1**, 168–183 (2017).
40. Lu, C. *et al.* MicroRNA-320a downregulation mediates human liver cancer cell proliferation through the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *Oncol. Lett.* **13**, 573–578 (2017).

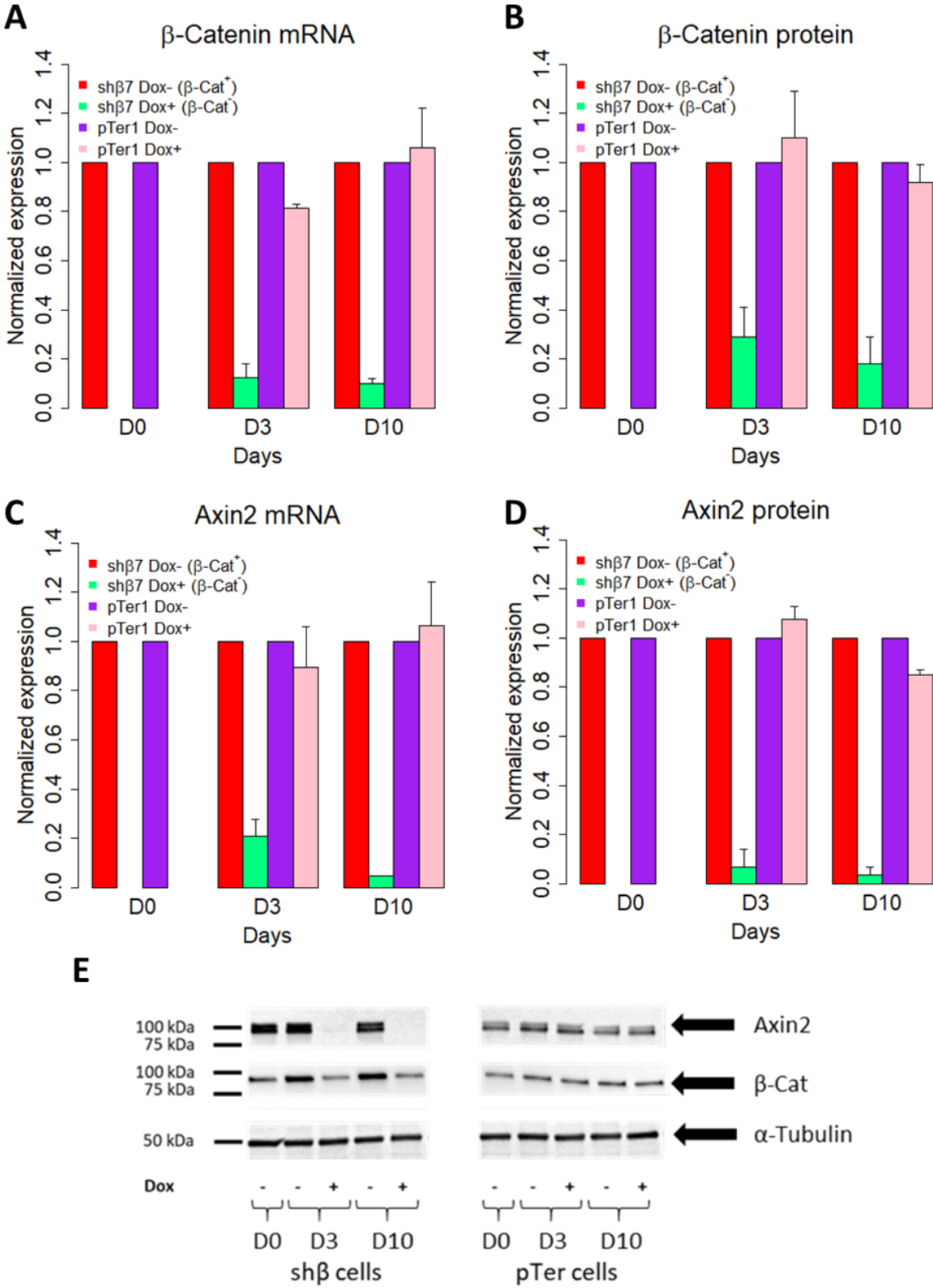


41. Tang, C. *et al.* The Role of miR-640: A Potential Suppressor in Breast Cancer via Wnt7b/ $\beta$ -catenin Signaling Pathway. *Front. Oncol.* **11**, 645682 (2021).
42. van de Wetering, M. *et al.* Specific inhibition of gene expression using a stably integrated, inducible small-interfering-RNA vector. *EMBO Rep.* **4**, 609–615 (2003).
43. Hantel, C. *et al.* Targeting heterogeneity of adrenocortical carcinoma: Evaluation and extension of preclinical tumor models to improve clinical translation. *Oncotarget* **7**, 79292–79304 (2016).
44. Andrews, S. FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (2010).
45. Krueger, F. Trim Galore: a Wrapper Tool Around Cutadapt and FastQC to Consistently Apply Quality and Adapter Trimming to FastQ Files. [http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim\\_galore/](http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/) (2012).
46. Kozomara, A. *et al.* miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res.* **47**, D155–D162 (2019).
47. Langmead, B. *et al.* Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.* **10**, R25 (2009).
48. Love, M. I. *et al.* Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **15**, 550 (2014).
49. R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
50. Therneau, T. A Package for Survival Analysis in R. R package version 3.2-7. <https://CRAN.R-project.org/package=survival> (2020).
51. Giroux, P. *et al.* miRViz: a novel webserver application to visualize and interpret microRNA datasets. *Nucleic Acids Res.* **48**, W252–W261 (2020).
52. Cadigan, K. M. & Waterman, M. L. TCF/LEFs and Wnt signaling in the nucleus. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, a007906 (2012).
53. Maharjan, R. *et al.* Comprehensive analysis of CTNNB1 in adrenocortical carcinomas: Identification of novel mutations and correlation to survival. *Sci. Rep.* **8**, 8610 (2018).
54. Ji, J. *et al.* Wnt/ $\beta$ -catenin signaling activates microRNA-181 expression in hepatocellular carcinoma. *Cell Biosci.* **1**, 4 (2011).
55. Lan, F. *et al.* Genome-wide identification of TCF7L2/TCF4 target miRNAs reveals a role for miR-21 in Wnt-driven epithelial cancer. *Int. J. Oncol.* **40**, 519–526 (2012).
56. Zhou, A.-D. *et al.*  $\beta$ -Catenin/LEF1 transactivates the microRNA-371-373 cluster that modulates the Wnt/ $\beta$ -catenin-signaling pathway. *Oncogene* **31**, 2968–2978 (2012).
57. Chiang, C.-H. *et al.* Up-regulation of miR-182 by  $\beta$ -catenin in breast cancer increases tumorigenicity and invasiveness by targeting the matrix metalloproteinase inhibitor RECK. *Biochim. Biophys. Acta* **1830**, 3067–3076 (2013).
58. Hwang, W.-L. *et al.* MicroRNA-146a directs the symmetric division of Snail-dominant colorectal cancer stem cells. *Nat. Cell Biol.* **16**, 268–280 (2014).
59. Tang, X. *et al.* Glycogen synthase kinase 3 beta inhibits microRNA-183-96-182 cluster via the  $\beta$ -Catenin/TCF/LEF-1 pathway in gastric cancer cells. *Nucleic Acids Res.* **42**, 2988–2998 (2014).
60. Leung, W. K. C. *et al.* Wnt/ $\beta$ -Catenin activates MiR-183/96/182 expression in hepatocellular carcinoma that promotes cell invasion. *Cancer Lett.* **362**, 97–105 (2015).

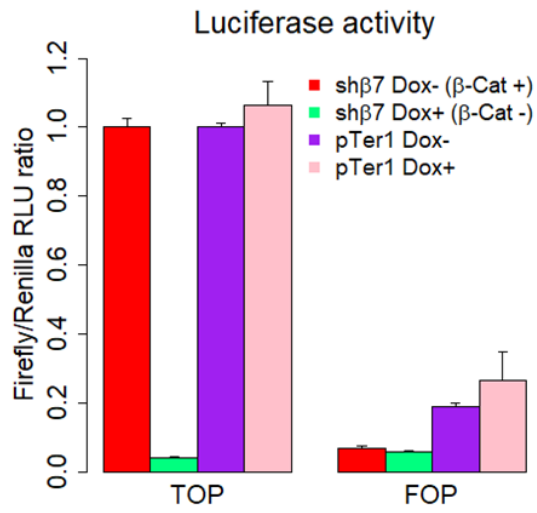
61. Guo, Y.-H. *et al.* Wnt/ $\beta$ -catenin pathway transactivates microRNA-150 that promotes EMT of colorectal cancer cells by suppressing CREB signaling. *Oncotarget* **7**, 42513–42526 (2016).
62. Wu, W.-J. *et al.* Wnt/ $\beta$ -catenin signaling inhibits FBXW7 expression by upregulation of microRNA-770 in hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **37**, 6045–6051 (2016).
63. Benetatos, L. *et al.* The microRNAs within the DLK1-DIO3 genomic region: involvement in disease pathogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 795–814 (2013).
64. Krokker, L. *et al.* Essential Role of the 14q32 Encoded miRNAs in Endocrine Tumors. *Genes* **12**, 698 (2021).
65. Snyder, C. M. *et al.* MEF2A regulates the Gtl2-Dio3 microRNA mega-cluster to modulate WNT signaling in skeletal muscle regeneration. *Dev. Camb. Engl.* **140**, 31–42 (2013).
66. Yu, R. *et al.* miR-377 targets CUL4A and regulates metastatic capability in ovarian cancer. *Int. J. Mol. Med.* **41**, 3147–3156 (2018).
67. Pignatti, E. *et al.* Beta-Catenin Causes Adrenal Hyperplasia by Blocking Zonal Transdifferentiation. *Cell Rep.* **31**, 107524 (2020).
68. Stephenson, D. T. *et al.* Immunohistochemical localization of phosphodiesterase 2A in multiple mammalian species. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* **57**, 933–949 (2009).
69. Assenza, M. R. *et al.* Critical role of phosphodiesterase 2A in mouse congenital heart defects. *Cardiovasc. Res.* **114**, 830–845 (2018).
70. Drelon, C. *et al.* PKA inhibits WNT signalling in adrenal cortex zonation and prevents malignant tumour development. *Nat. Commun.* **7**, 12751 (2016).
71. Walczak, E. M. *et al.* Wnt signaling inhibits adrenal steroidogenesis by cell-autonomous and non-cell-autonomous mechanisms. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **28**, 1471–1486 (2014).
72. Mathieu, M. *et al.* Steroidogenic differentiation and PKA signaling are programmed by histone methyltransferase EZH2 in the adrenal cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, E12265–E12274 (2018).
73. Durand, J. *et al.* Characterization of differential gene expression in adrenocortical tumors harboring beta-catenin (CTNNB1) mutations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96**, E1206-1211 (2011).
74. Ji, X. *et al.* miR-139-5p functions as a tumor suppressor in cervical cancer by targeting TCF4 and inhibiting Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *OncoTargets Ther.* **12**, 7739–7748 (2019).
75. Hu, Y. *et al.* Long non-coding RNA XIST promotes cell growth and metastasis through regulating miR-139-5p mediated Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in bladder cancer. *Oncotarget* **8**, 94554–94568 (2017).
76. Tan, H. *et al.* Pan-cancer analysis on microRNA-associated gene activation. *EBioMedicine* **43**, 82–97 (2019).
77. Stavast, C. J. *et al.* The tumor suppressor MIR139 is silenced by POLR2M to promote AML oncogenesis. *Leukemia* **36**, 687–700 (2022).
78. Bao, W. *et al.* HER2 Interacts With CD44 to Up-regulate CXCR4 via Epigenetic Silencing of microRNA-139 in Gastric Cancer Cells. *Gastroenterology* **141**, 2076-2087.e6 (2011).
79. Shen, K. *et al.* Post-transcriptional regulation of the tumor suppressor miR-139-5p and a network of miR-139-5p-mediated mRNA interactions in colorectal cancer. *FEBS J.* **281**, 3609–3624 (2014).
80. Stavast, C. J. *et al.* MicroRNA-139, an Emerging Gate-Keeper in Various Types of Cancer. *Cells* **11**, 769 (2022).

81. Khalili, N. *et al.* Diagnostic, prognostic, and therapeutic significance of miR-139-5p in cancers. *Life Sci.* **256**, 117865 (2020).
82. Morgan, R. G. *et al.* LEF-1 drives aberrant  $\beta$ -catenin nuclear localization in myeloid leukemia cells. *Haematologica* **104**, 1365–1377 (2019).
83. Zhou, T. *et al.* CTNNB1 Knockdown Inhibits Cell Proliferation and Aldosterone Secretion Through Inhibiting Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in H295R Cells. *Technol. Cancer Res. Treat.* **19**, 1533033820979685 (2020).
84. Lefèvre, L. *et al.* Combined transcriptome studies identify AFF3 as a mediator of the oncogenic effects of  $\beta$ -catenin in adrenocortical carcinoma. *Oncogenesis* **4**, e161 (2015).
85. Smith, J. C. & Sheltzer, J. M. Genome-wide identification and analysis of prognostic features in human cancers. *Cell Rep.* **38**, 110569 (2022).

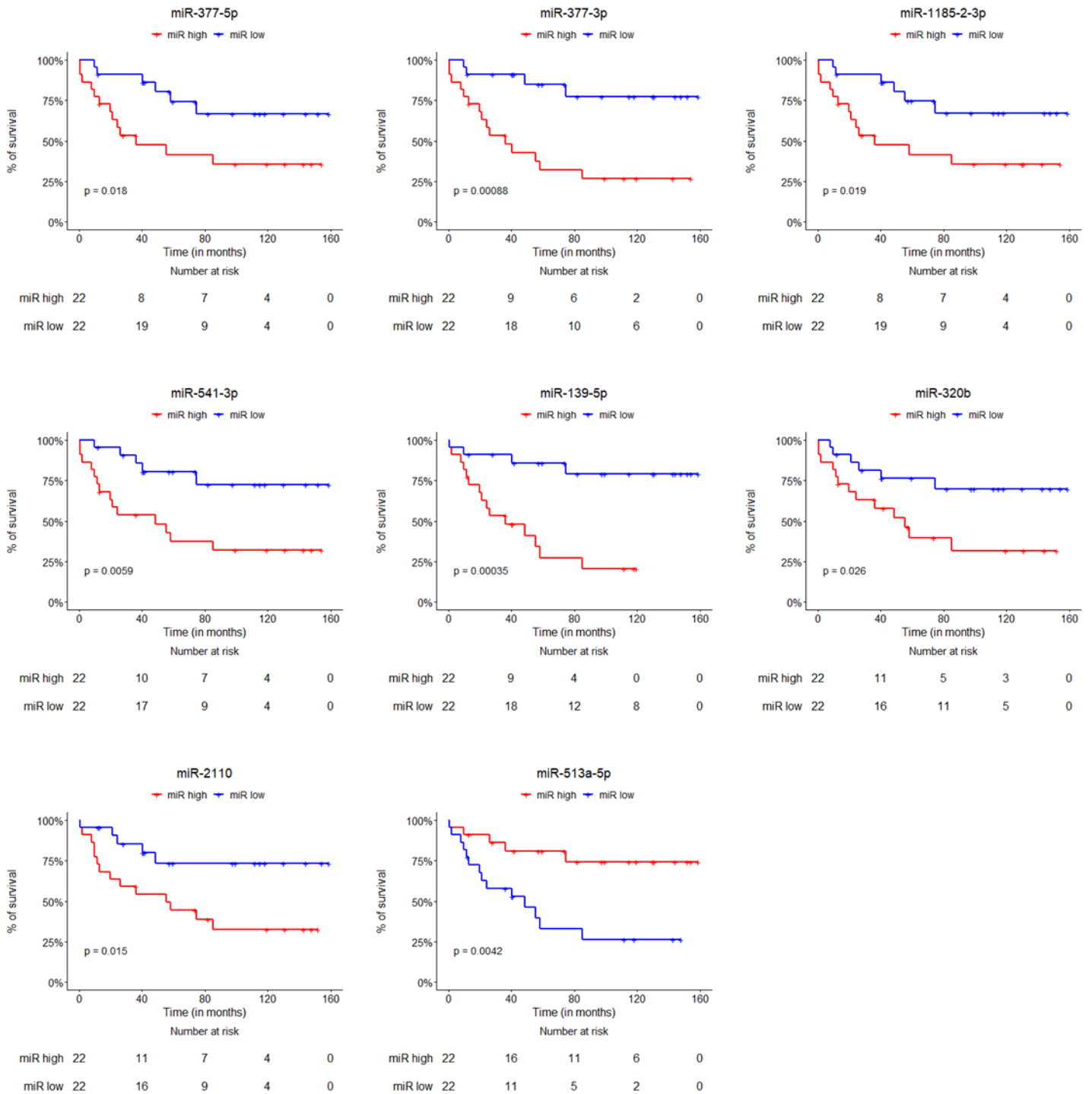
Supplementary materials



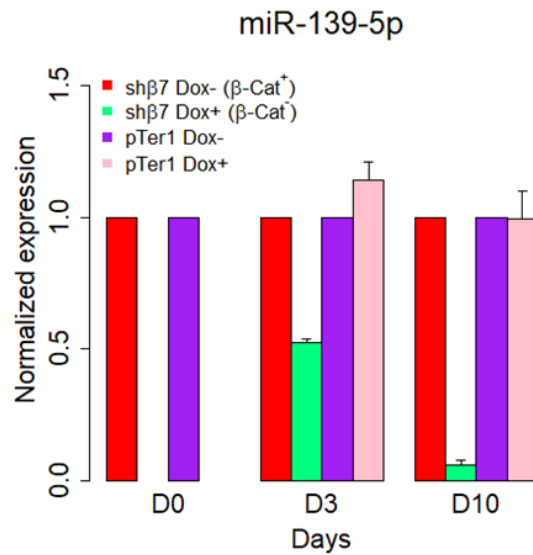
**Supplementary Figure 1:** Doxycycline do not silence β-Catenin and Axin2 expression in H295R pTer cells. H295R shβ and pTer cells were cultured without (β-Cat<sup>+</sup> cells) or with Doxycycline (β-Cat<sup>-</sup>) cells during 10 days. (A) and (B) represent the levels of expression of β-Catenin mRNA and protein assessed by RT-qPCR and western blot, respectively. (C) and (D) represent the levels of expression of Axin2 mRNA and protein assessed by RT-qPCR and western blot, respectively. (E) A representative western blot for β-Catenin and Axin2 protein levels, with α-tubulin as a loading control. Graphs for qPCR and western blot analyses represent the mean ± SD of two independent experiments.



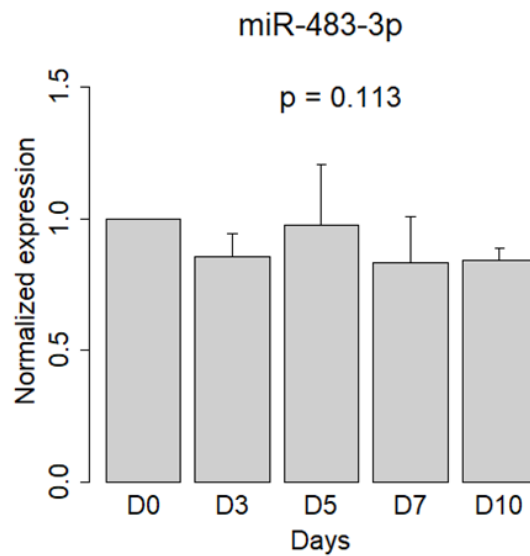
**Supplementary Figure 2:** Doxycycline do not affect the TOP-FOP Flash luciferase activity in pTer control cells. The graph represents the Firefly/Renilla activity ratio after 48h of culture with or without Doxycycline. Shown are the mean  $\pm$  SEM of three experiments.



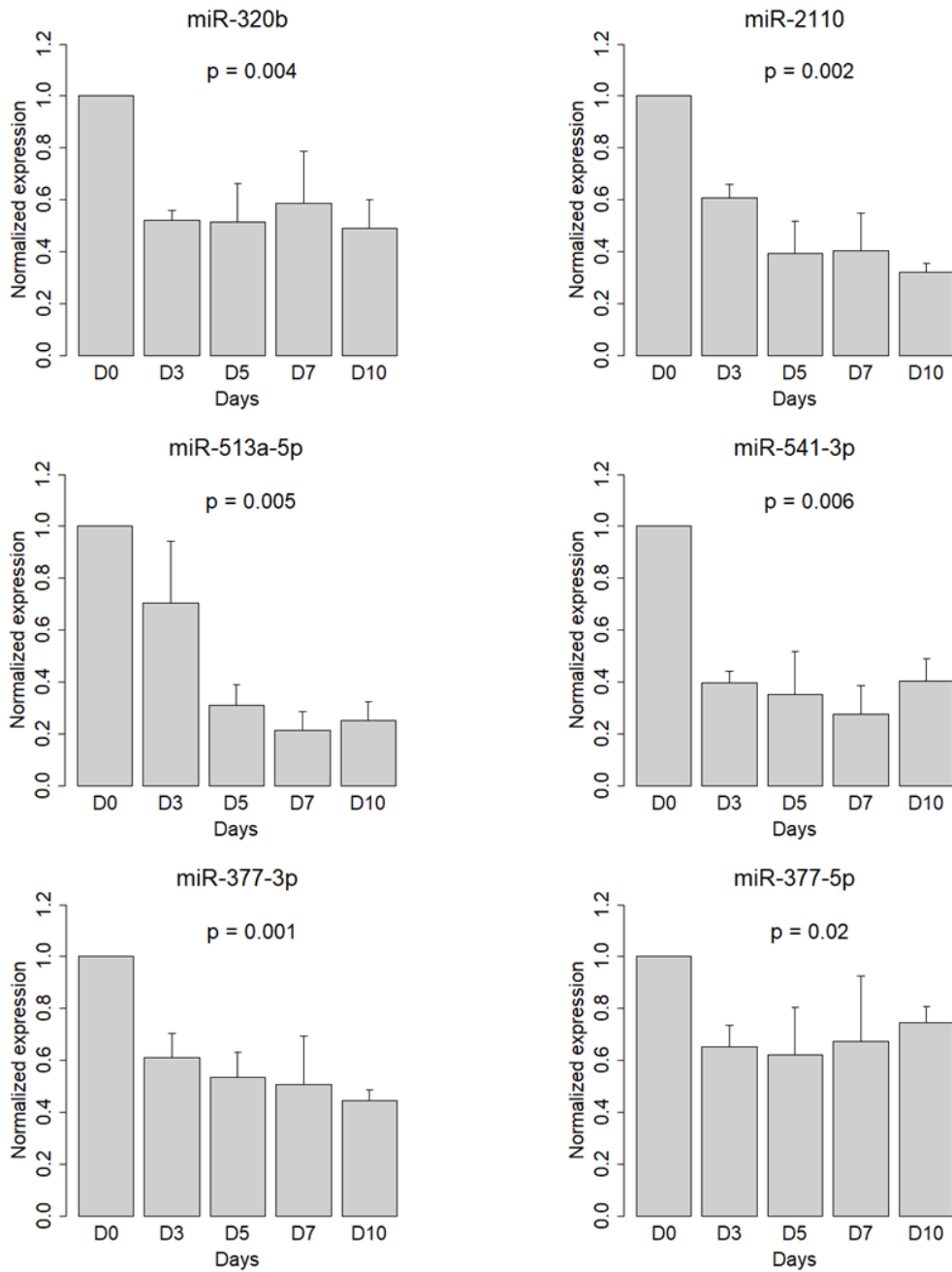
**Supplementary Figure 3:** Overall survival of the patients of the COMETE-ENSAT Cohort depending on miRNA expression in the tumor. For each miRNA, the population was divided in two equal groups of 22 patients, the low and high groups corresponding to patients with a lower and higher expression as compared to the median value of the miRNA level. The p-value was calculated with the Log Rank test.



**Supplementary Figure 4:** Doxycycline silences miR-139-5p in H295R shβ cells but not in pTer cells. H295R shβ and pTer cells were cultured without (β-Cat<sup>+</sup> cells) or with Doxycycline (β-Cat<sup>-</sup>) cells during 10 days. The graph shows the mean ± SD of two independent experiments

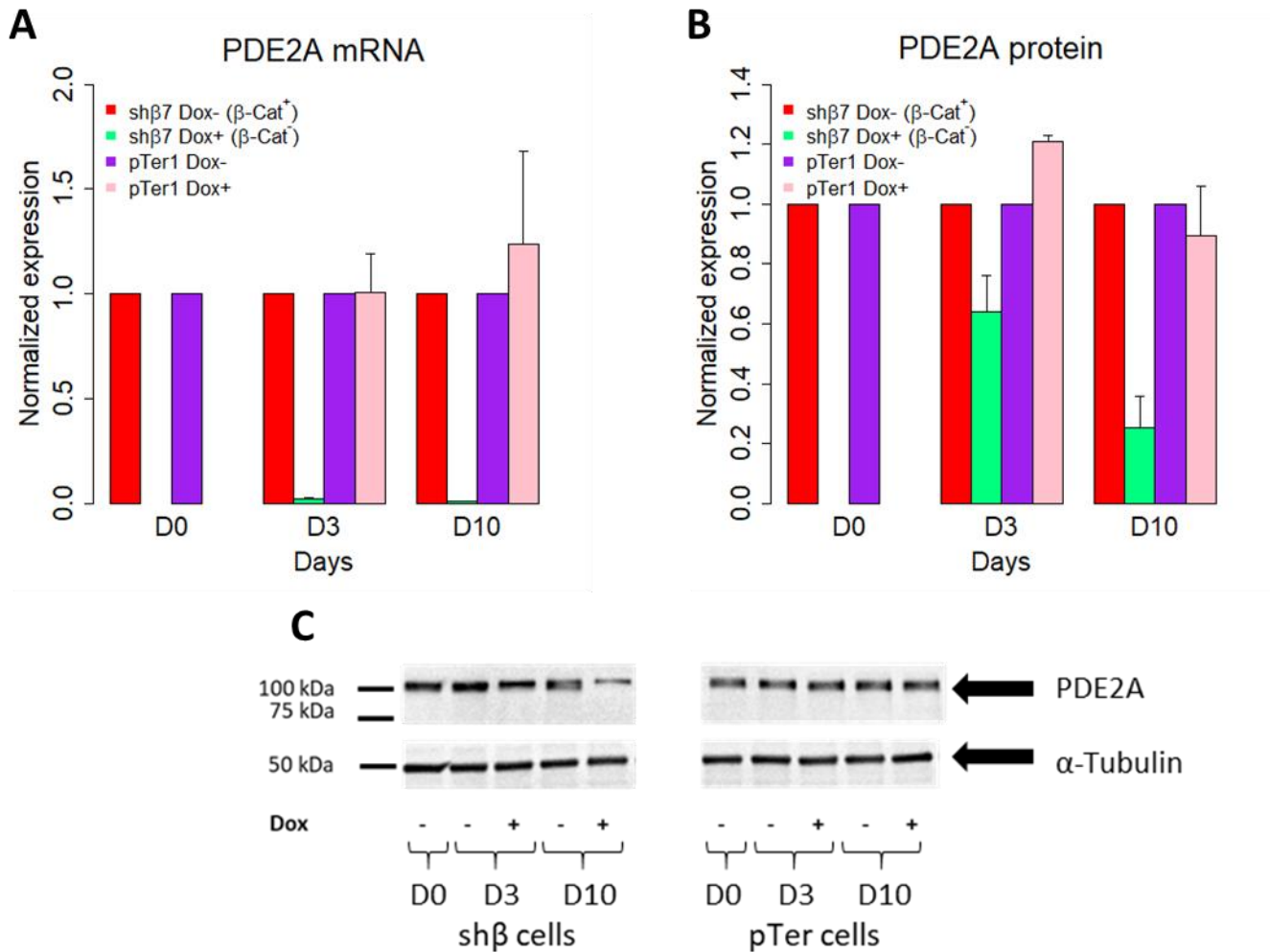


**Supplementary Figure 5:** Expression levels of miR-483-3p after β-Cat silencing in NCI H295R cells, assessed by RT-qPCR.

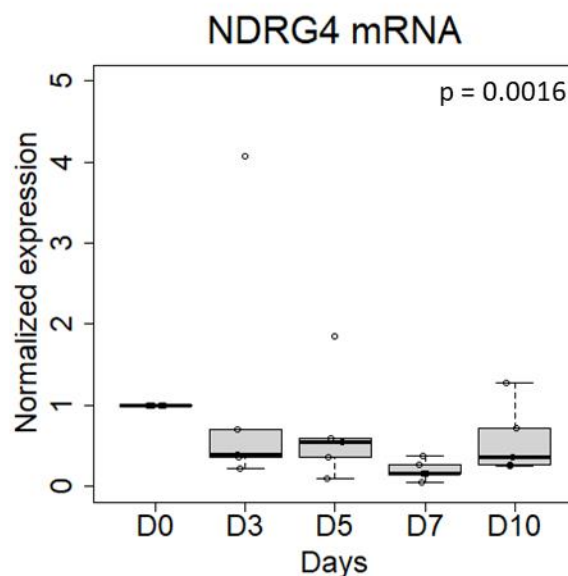


**Supplementary Figure 6:** Expression of miR-320b, miR-2110, miR-513a-5p, miR-541-3p, miR-377-3p and miR-377-5p following  $\beta$ -Cat silencing ( $\beta$ -Cat cells) during 10 days. The graphs show the mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments.

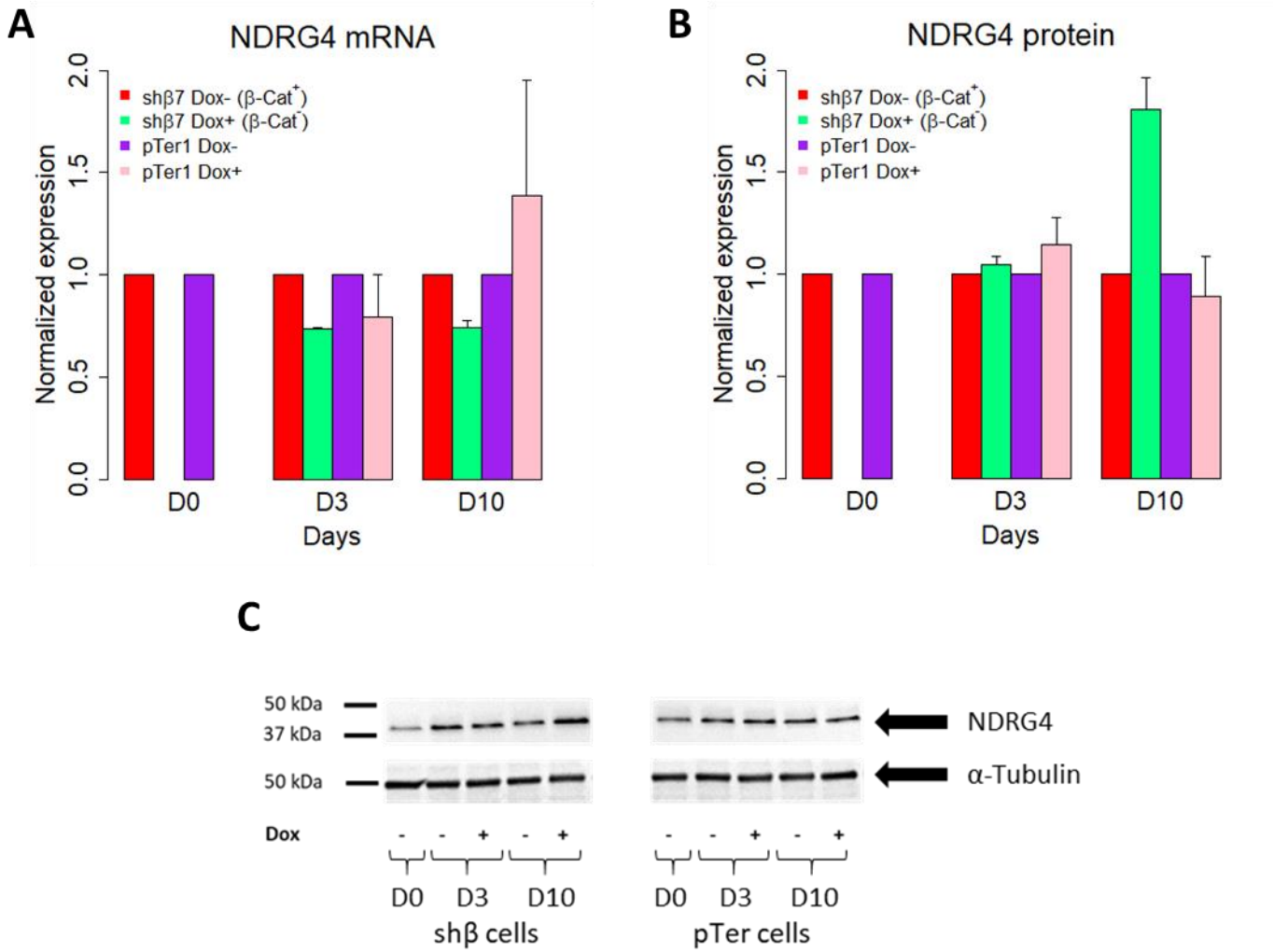




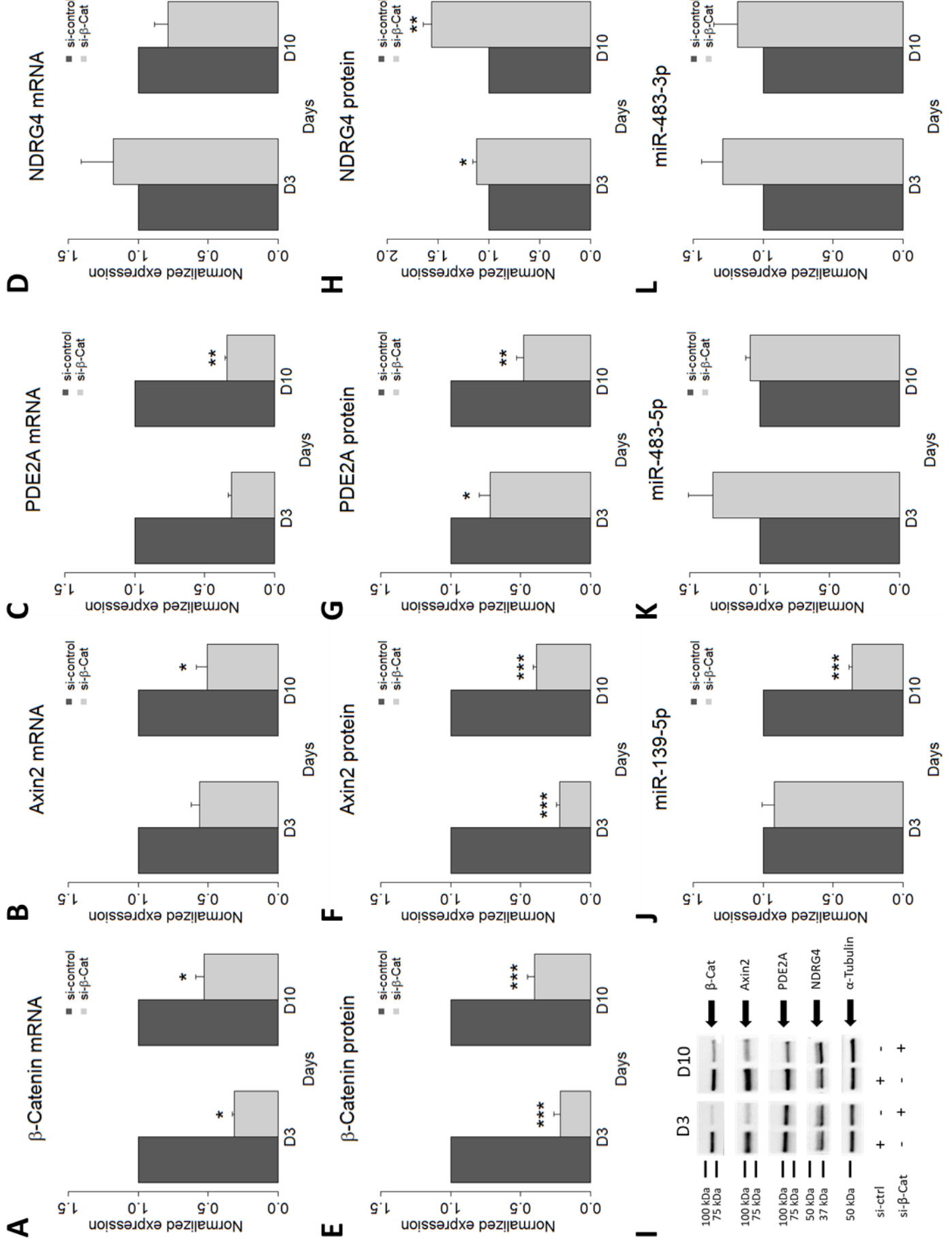
**Supplementary Figure 7:** Effects of β-Cat silencing on PDE2A expression in shβ and pTer cells after 3 and 10 days of culture in the presence of Doxycycline. (A) and (B) represent the levels of expression of PDE2A mRNA assessed by RT-qPCR and PDE2A protein expression assessed by western blot. (C) A representative western blot for PDE2A with α-tubulin used as a loading control. Graphs for qPCR and western blot analyses represent the mean ± SD of 2 independent experiments.



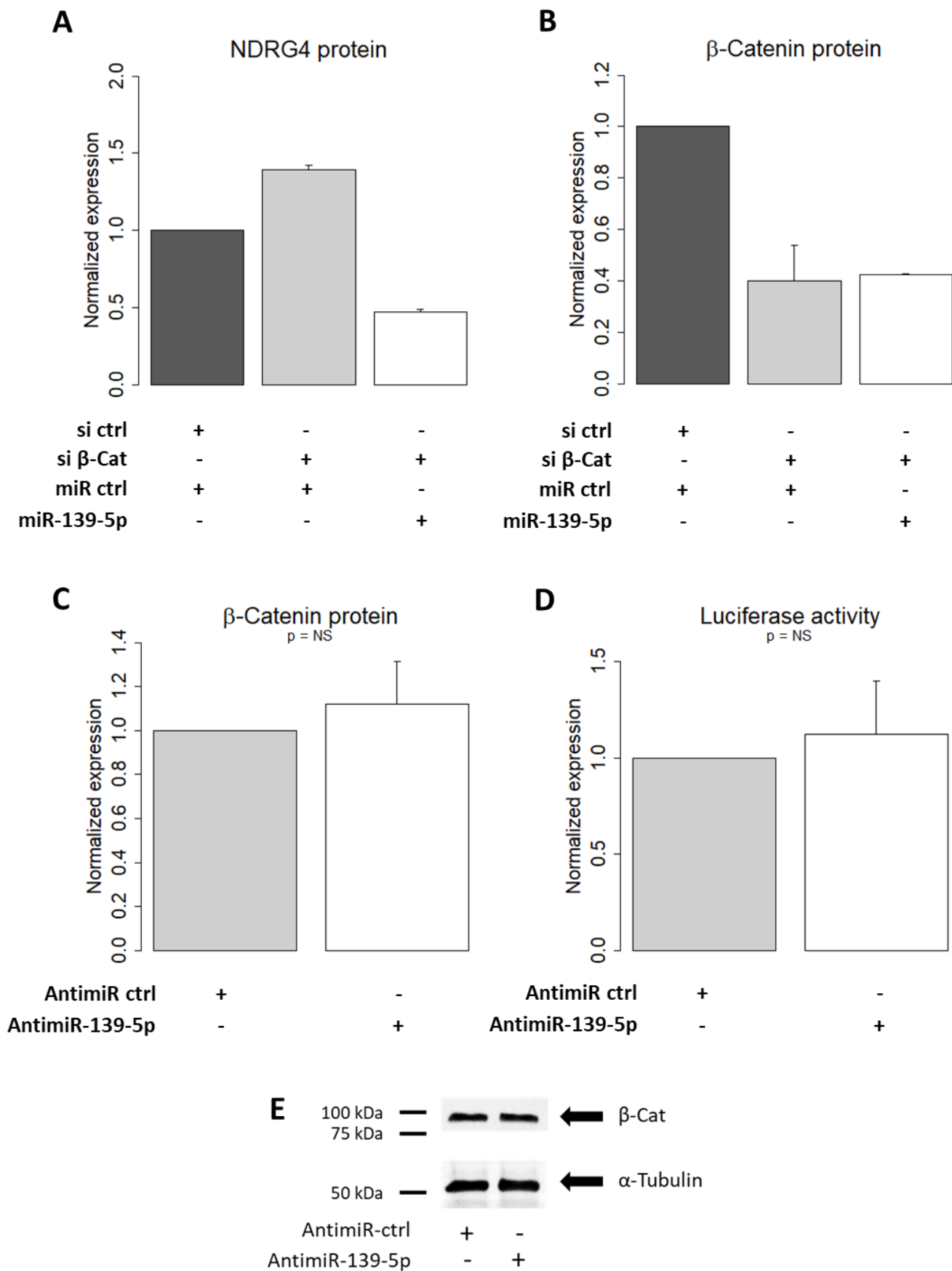
**Supplementary Figure 8:** Effects of β-Cat silencing on NDRG4 mRNA expression at D3, D5, D7 and D10 in shβ cells treated with Doxycycline. Shown are the median values of 5 independent experiments.



**Supplementary Figure 9:** Effects of  $\beta$ -Cat silencing on NDRG4 expression in sh $\beta$  and pTer cells. (A) and (B) Levels of expression of NDRG4 mRNA and protein in sh $\beta$  and pTer cells treated or not with Doxycycline (mean  $\pm$  SD of 2 independent experiments). (C) A representative western blot for NDRG4 in sh $\beta$  and pTer cells.

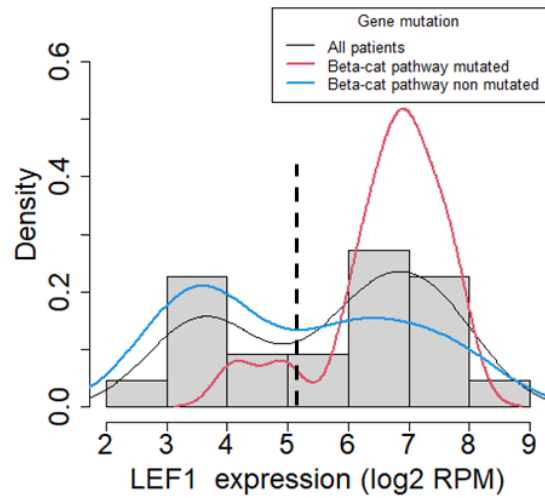


**Supplementary Figure 10:** Silencing  $\beta$ -Cat in H295R cells using a specific siRNA represses Axin 2, PDE2A as well as miR-139-5p expression and upregulates NDRG4 protein levels. Cells were transfected either with control siRNA or  $\beta$ -Cat siRNA at D0. The graphs represent the mean  $\pm$  SEM in 3 independent experiments at D3 and D10 for (A)  $\beta$ -Cat mRNA, (B) Axin2 mRNA, (C) PDE2A mRNA, (D) NDRG4 mRNA, (E)  $\beta$ -Cat protein, (F) Axin2 protein, (G) PDE2A protein, (H) NDRG4 protein, (J) miR-139-5p, (K) miR-483-5p and (L) miR-483-3p. Statistical analyses were described in details in Materials and Methods. (I) shows a representative western blot of the 3 independent experiments.

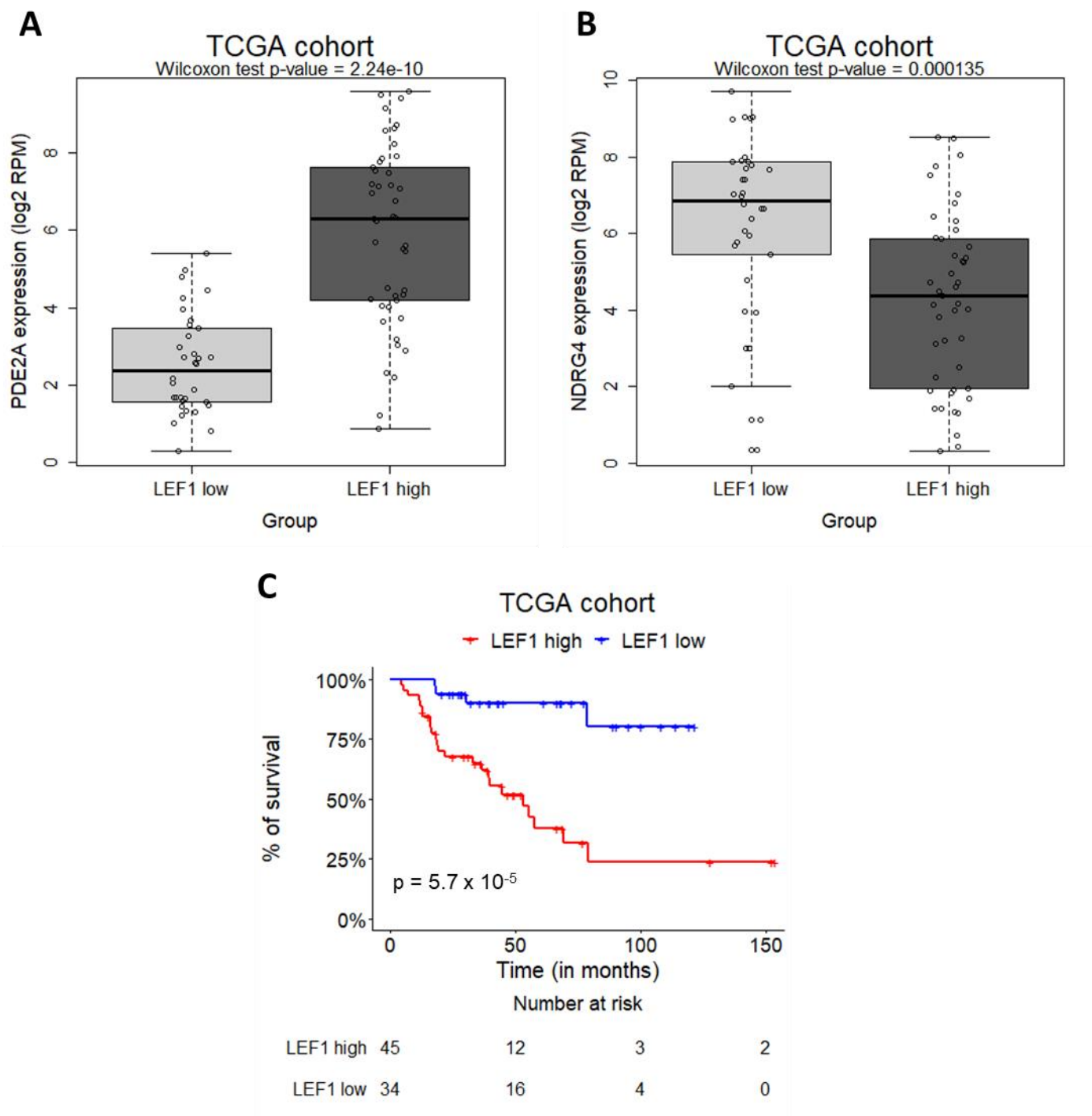


**Supplementary Figure 11:** (A) Rescuing miR-139-5p in H295R cells silenced for β-Cat using siRNA prevents the upregulation of NDRG4 protein. Graphs for rescue experiments represent the mean ± S.E.M of 2 independent experiments. (C and D) Inhibition of miR-139-5p in H295R cells does not change either the levels of β-Cat protein or β-Cat/TCF-driven luciferase activity. Shown are the mean ± SEM of three independent experiments. (E) A representative western blot for β-Cat with α-tubulin used as a loading control.

## LEF1 expression



**Supplementary Figure 12:** Distribution of LEF1 mRNA expression in the tumor of ACC patients from the COMET-ENSAT cohort. The black line shows the bi-modal distribution of LEF1 expression in all the tumors, the blue line shows its distribution in tumors without known mutations in the Wnt/ $\beta$ -Cat pathway and the red line shows the distribution in tumors with known mutations in Wnt/ $\beta$ -Cat pathway. The vertical dotted line shows the local minimum at the threshold of 5.2 obtained from fitting Gaussian mixture with the Expectation-Maximization (EM) algorithm.



**Supplementary Figure 13:** (A) Levels of PDE2A and (B) NDRG4 in function of LEF1 expression level in the TCGA cohort. (C) Patients overall survival in the TCGA cohort based on LEF1 expression level (threshold 3.3).

**Supplementary Table 1 : qPCR TaqMan miRNA assay ID**

<b>miRNA</b>	<b>TaqMan Assay ID</b>
hsa-miR-139-5p	002289
hsa-miR-483-5p	002338
hsa-miR-483-3p	002339
hsa-miR-377-5p	002128
hsa-miR-377-3p	000566
hsa-miR-1185-2-3p	476998_mat
hsa-miR-541-3p	002201
hsa-miR-320b	002844
hsa-miR-2110	121216_mat
hsa-miR-330-3p	000544
hsa-miR-513a-3p	002091
RNU48	001006



**Supplementary Table 2 : qPCR primers**

<b>Gene</b>	<b>Accession number</b>	<b>Forward primer</b>	<b>Reverse primer</b>
HPRT	NM_000194.3	5'- ATGGACAGGACTGAACGTCTTGCT -3'	5'- TTGAGCACACAGAGGGCTACAATG -3'
RPL13A	NM_012423.4	5'-TTAATTCCTCATGCGTTGCCTGCC-3'	5'-TTCCTTGCTCCCAGCTTCCTATGT-3'
CTNNB1 (β-Cat)	NM_001904.4	5'-CTTCACCTGACAGATCCAAGTC-3'	5'-CCTTCATCCCTCCTGTTTAG-3'
Axin2	NM_004655.4	5'-CGAGTAGCCAAAGCGATCTAC-3'	5'-GCTGCTTCTTGATGCCATCTC-3'
PDE2A	NM_002599.5	5'-GAGAGGCACCACTTTGCTCA-3'	5'-ATGCGCTGATAGTCCTTCG-3'
NDRG4	NM_020465.4	5'-ATGTGGGCCTCAACCACAAA-3'	5'-GGAAGTGGTACCCCTGAGGA-3'

**Supplementary Table 3:** List of the 54 mature miRNAs whose expression was changed following  $\beta$ -Cat silencing. Selected miRNAs for RT-qPCR validation are indicated in bold.

miR ID	MIMAT	Type of change
hsa-miR-504-5p	MIMAT0002875	↓
<b>hsa-miR-330-3p</b>	MIMAT0000751	↓
hsa-miR-182-3p	MIMAT0000260	↓
hsa-miR-6772-3p	MIMAT0027445	↓
hsa-miR-653-5p	MIMAT0003328	↓
<b>hsa-miR-377-5p</b>	MIMAT0004689	↓
hsa-miR-135a-3p	MIMAT0004595	↓
hsa-miR-4443	MIMAT0018961	↓
hsa-miR-760	MIMAT0004957	↓
hsa-miR-769-3p	MIMAT0003887	↓
hsa-miR-181c-5p	MIMAT0000258	↓
hsa-miR-628-5p	MIMAT0004809	↓
hsa-miR-653-3p	MIMAT0026625	↓
hsa-miR-425-3p	MIMAT0001343	↓
<b>hsa-miR-541-3p</b>	MIMAT0004920	↓
hsa-miR-7977	MIMAT0031180	↓
hsa-miR-4326	MIMAT0016888	↓
<b>hsa-miR-320b</b>	MIMAT0005792	↓
<b>hsa-miR-377-3p</b>	MIMAT0000730	↓
hsa-miR-4753-3p	MIMAT0019891	↓
hsa-miR-1306-5p	MIMAT0022726	↓
<b>hsa-miR-139-5p</b>	MIMAT0000250	↓
hsa-let-7i-3p	MIMAT0004585	↓
hsa-miR-184	MIMAT0000454	↓
hsa-miR-1908-5p	MIMAT0007881	↓
hsa-miR-92b-5p	MIMAT0004792	↓
hsa-miR-135a-5p	MIMAT0000428	↓
hsa-miR-532-5p	MIMAT0002888	↓
hsa-miR-331-3p	MIMAT0000760	↓
hsa-miR-363-3p	MIMAT0000707	↓
<b>hsa-miR-513a-5p</b>	MIMAT0002877	↓
hsa-miR-370-5p	MIMAT0026483	↓
hsa-miR-589-5p	MIMAT0004799	↓
hsa-miR-324-5p	MIMAT0000761	↓
hsa-miR-125b-1-3p	MIMAT0004592	↓
hsa-miR-489-3p	MIMAT0002805	↓
<b>hsa-miR-1185-2-3p</b>	MIMAT0022713	↓
hsa-miR-99a-3p	MIMAT0004511	↓
hsa-miR-676-3p	MIMAT0018204	↓
hsa-miR-191-3p	MIMAT0001618	↓
<b>hsa-miR-2110</b>	MIMAT0010133	↓
hsa-miR-1468-5p	MIMAT0006789	↓
hsa-miR-26a-2-3p	MIMAT0004681	↑
hsa-miR-450a-1-3p	MIMAT0022700	↑
hsa-miR-1304-5p	MIMAT0005892	↑
hsa-miR-3162-5p	MIMAT0015036	↑
hsa-miR-561-3p	MIMAT0003225	↑
hsa-miR-152-3p	MIMAT0000438	↑
hsa-miR-145-3p	MIMAT0004601	↑
hsa-let-7f-1-3p	MIMAT0004486	↑
hsa-miR-431-3p	MIMAT0004757	↑
hsa-miR-221-5p	MIMAT0004568	↑
hsa-miR-202-5p	MIMAT0002810	↑
hsa-miR-758-5p	MIMAT0022929	↑

### 3. *Discussion de l'article*

Nos travaux de recherche montrent que la  $\beta$ -Caténine contrôle l'expression de certains miRs. Ce résultat est original car la plupart des études sur le lien entre  $\beta$ -Caténine et miRs étudient l'influence d'un miR particulier sur la voie Wnt/ $\beta$ -Caténine. Par ailleurs, notre travail est le premier à évaluer l'impact global de la  $\beta$ -Caténine sur le paysage microARN dans le CCS, mais à notre connaissance ce travail n'a pas non plus été effectué dans d'autres cancers, rendant notre approche particulièrement innovante.

L'analyse de la position génomique des miRs dont l'expression est modulée par la  $\beta$ -Caténine montre qu'une partie de ces miRs est situé au niveau du locus 14q32. Ce locus a été impliqué dans l'agressivité de nombreux cancers et nous avons déjà montré qu'environ 50% des miRs significativement surexprimés dans les CCS agressifs appartenaient à ce locus. L'implication de ce locus dans le pronostic des CCS a également été démontrée dans les études pan-génomiques de Assié et al. et de Zheng et al<sup>224,225</sup>.

Nous avons pu montrer que miR-139-5p, un miR impliqué dans l'agressivité et le pronostic du CCS faisait partie des miRs les plus réprimés dans les cellules  $\beta$ -Cat<sup>-</sup>. Cela n'était pas le cas de miR-483-5p et miR-483-3p, deux miRs également bien identifiés comme marqueurs de malignité au niveau tumoral et d'agressivité au niveau circulant : ces deux miRs présentaient un niveau identique dans les cellules  $\beta$ -Cat<sup>+</sup> et  $\beta$ -Cat<sup>-</sup>, suggérant l'absence d'implication de la  $\beta$ -Caténine dans leur expression dans le CCS, à l'inverse de qui a été observé dans l'hépatocarcinome ou le carcinome gastrique<sup>337,486</sup>. En effet, il a été rapporté que la  $\beta$ -Caténine (sauvage) induit l'expression du locus *miR-483* (miR-483-5p et -3p) indépendamment de son gène hôte *IGF2* par l'intermédiaire d'un promoteur spécifique localisé dans le second intron du gène *IGF2*<sup>337</sup>. Par ailleurs, cette même étude a montré que miR-483-3p cible directement le transcrit  $\beta$ -Caténine et réprime son expression, une régulation qui est perdue en présence de la  $\beta$ -Caténine mutée sur la sérine 45. Dans le carcinome gastrique, la surexpression de miR-483-5p induit l'expression de la  $\beta$ -Cat et de ses gènes cibles, incluant la cycline D1, Bcl2 et MMP2

(matrix metalloproteinase-2). Ces données suggèrent des interactions complexes entre le locus *miR-483* et la voie Wnt/ $\beta$ -Caténine qui seraient contexte-dépendants.

Nous avons ensuite sélectionné 8 miRs candidats, dont miR-139-5p, pour une validation en RT-qPCR et avons confirmé les résultats du RNA-seq pour 7 de ces 8 miRs, le huitième n'étant pas suffisamment exprimé pour conclure ( $Ct > 35$ ). De façon intéressante, nous avons validé une diminution progressive mais très prononcée et très significative de miR-139-5p : en effet, à J10, les cellules  $\beta$ -Cat<sup>-</sup> avaient une extinction quasi complète de miR-139-5p.

Ceci nous a incité à nous intéresser à la régulation de PDE2A, gène hôte de miR-139-5p, récemment identifié comme une cible de la  $\beta$ -Caténine et intervenant dans le maintien de la zonation corticosurrénaliennne. Nous avons confirmé une extinction quasi complète de l'ARNm de PDE2A et de l'ordre de 80% de sa protéine. Ce résultat suggère une co-transcription de miR-139-5p et de PDE2A. Nous avons également examiné l'expression de NDRG4, un gène suppresseur de tumeur identifié par notre équipe comme gène cible de miR-139-5p. Nous avons pu montrer que la diminution de la  $\beta$ -Caténine provoquait une augmentation de la protéine de NDRG4. Nos expériences de reconstitution du niveau d'expression de miR-139-5p (expériences de « rescue ») dans les cellules  $\beta$ -Cat<sup>-</sup> permettent de diminuer l'expression de la protéine de NDRG4. Nous démontrons donc que l'induction de NDRG4 dans les cellules  $\beta$ -Cat<sup>-</sup> est liée à la diminution de miR-139-5p et non à la diminution de la  $\beta$ -Caténine. Par ailleurs, nous avons observé que l'inhibition de l'expression de miR-139-5p dans les H295R à l'aide d'antagomiRs spécifiques ne modifiait pas l'expression de la protéine  $\beta$ -Caténine, ce qui suggère l'absence de rétrocontrôle de miR-139-5p sur celle-ci.

Le modèle cellulaire H295R, qui présente la mutation S45P de CTNNB1 et donc une  $\beta$ -Caténine stabilisée et constitutivement active, récapitule parfaitement les caractéristiques présentes chez les patients avec CCS agressifs (haut niveau de miR-139-5p et bas niveau de NDRG4). Toutefois, une de ses limitations est que l'étude de l'impact de la modulation d'expression de la  $\beta$ -Caténine sur les miRs a été réalisée en diminuant l'expression de celle-ci. Chez les patients, il est évident qu'il n'existe pas de situation similaire et pour mimer au mieux

les situations cliniques existantes, il apparaît plus pertinent d'augmenter l'activité de la voie Wnt/ $\beta$ -Caténine dans une lignée de CCS ne présentant pas de mutation activatrice de CTNNB1. A ce jour, en dehors de la lignée H295R, la seule lignée de CCS disponible commercialement est la lignée SW13, qui présente l'inconvénient d'être mal caractérisée. En effet, son origine oncologique réelle est toujours débattue entre CCS primitif ou métastase surrenalienne d'un autre primitif. Afin de consolider nos observations, nous avons étudié la lignée de CCS humain MUC-1 récemment développée par le Dr Constanze Hantel<sup>487</sup>. A la différence de la lignée H295R issue d'une tumeur primaire, la lignée MUC-1 a été générée à partir d'une métastase surrenalienne cervicale et ne possède pas de mutation activatrice de la  $\beta$ -Caténine mais une mutation pour TP53. Nous avons observé que les cellules MUC-1 ont un niveau d'expression à la limite de la détection de la  $\beta$ -Caténine, de PDE2A et miR-139-5p et un niveau d'expression de NDRG4 environ 5 fois plus élevé par rapport aux cellules H295R (cf Article 1). Ces observations nous ont amenés à surexprimer la  $\beta$ -Caténine sauvage dans les MUC1 et à déterminer l'effet de cette surexpression sur PDE2A, miR-139-5p et NDRG4. Malheureusement, si nous avons réussi à augmenter significativement l'expression de la  $\beta$ -Caténine (environ 15 fois) et à activer la voie de signalisation (système rapporteur TOPFlash), l'expression des gènes cibles de la  $\beta$ -Caténine, Axin2 et PDE2A, n'était pas augmentée (résultats non montrés), rendant ce modèle complexe pour évaluer l'impact de de la  $\beta$ -Caténine sur miR-139-5p et NDRG4. Des altérations moléculaires potentielles pour l'heure inconnues dans cette lignée métastatique pourraient être à l'origine de ces observations. Toutefois, l'étude des effets de la surexpression d'une  $\beta$ -Caténine mutée S45P dans les MUC-1 est en cours afin de clarifier nos observations.

Dans une seconde partie, nous avons analysé le lien entre  $\beta$ -Caténine, PDE2A, miR-139-5p et NDRG4 chez les patients, à partir des données publiques du transcriptome des cohortes COMETE-ENSAT et TCGA. Nous nous sommes tout d'abord intéressés au statut mutationnel pour ZNRF3 et CTNNB1 pour analyser le niveau de miR-139-5p chez les patients en fonction

de la présence ou non d'une mutation ou d'une altération du nombre de copies de ces deux gènes. Nous avons montré que le niveau de PDE2A et de miR-139-5p était significativement augmenté et que le niveau de NDRG4 était significativement diminué chez les patients mutés dans la cohorte COMETE-ENSAT. Nous n'avons pas pu faire cette analyse pour la cohorte TCGA. En effet, le taux de mutation rapporté sur le site web hébergeant les données publiques <https://portal.gdc.cancer.gov/> ne reflète pas le taux global d'altérations moléculaires publié par Zheng et al. Pour CTNNB1, les deux taux sont assez proches avec un taux de mutations de 14.4% sur le site web versus 15.9% dans l'article publié. Pour ZNRF3, la différence est cependant importante avec un taux de mutation de 4.4% sur le site versus 19.3% dans l'article publié. Cette différence correspond en fait à la différence entre « mutations somatiques » (chiffres publiés sur le site web) et « altérations moléculaires » (chiffres publiés dans l'article). Pour ZNRF3 notamment, cette différence importante s'explique par le fait que la plupart des altérations de ce gène sont des altérations du nombre de copies avec des délétions homozygotes, et non des mutations somatiques. Ces données sont issues d'une analyse par puce SNP : du fait de leur caractère fortement identifiant, ces données ne sont pas disponibles publiquement. Seules des données indirectes de log-R Ratio par segment de chromosome et de ploïdie par échantillon sont disponibles en accès libre. De fait, une ré-analyse des données aurait été nécessaire, ce qui n'a pas été possible à notre niveau.

Toutefois, l'analyse sur la cohorte COMETE-ENSAT nous a permis d'identifier un sous-groupe de 8 patients avec un haut niveau de miR-139-5p sans mutation / altération moléculaire rapportée dans la voie Wnt/ $\beta$ -Caténine. Il a été montré que certains patients avaient une accumulation nucléaire de  $\beta$ -Caténine sans altération de ZNRF3 ou CTNNB1<sup>234</sup>. Cette observation nous a incités à analyser le niveau d'expression des 4 facteurs de transcription TCF/LEF de la  $\beta$ -Caténine : TCF1, LEF1, TCF3 et TCF4. Parmi ces facteurs de transcription, comme expliqué dans la partie IV de l'introduction, TCF3 a plutôt une activité de répression de la transcription, LEF1 une forte activité d'activation de la transcription, tandis que TCF1 et TCF4 ont une activité de répression ou d'activation de la transcription variables selon le

contexte. Notre analyse a déterminé que seul LEF1 avait une distribution bimodale, tous les patients mutés ayant un haut niveau d'expression de LEF1. Ce constat nous a poussés à ré-analyser les groupes en fonction du niveau d'expression de LEF1. Nous avons montré 1) que LEF1 discriminait mieux les patients en fonction de leur niveau d'expression de miR-139-5p, PDE2A et NDRG4 que le statut mutationnel pour la voie Wnt/ $\beta$ -Caténine ; 2) que l'expression de LEF1 était un excellent marqueur pronostic de la survie globale des patients ; et 3) que la prédiction de la survie par LEF1 était superposable à celle donnée par le transcriptome entier. Ainsi, nos travaux confirment que le niveau d'expression de l'ARNm est un prédicteur plus puissant du pronostic que le statut mutationnel, comme publié très récemment par Smith et Sheltzer<sup>488</sup> dans une analyse portant sur 33 types de cancer et comme validé dans les CCS par le travail d'Assié et al. et de Jouinot et al.<sup>243,257</sup>.

**En conclusion, l'activation aberrante de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -Caténine dans le CCS module l'expression de certains miRs de mauvais pronostic, dont miR-139-5p et des miRs du locus 14q32. L'expression de miR-139-5p est fortement corrélée à celle de son gène hôte, PDE2A, une cible directe de la  $\beta$ -Caténine. L'étude mécanistique plus approfondie des liens entre voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -Caténine et miRs, en relation avec l'agressivité et le pronostic du CCS permettrait de développer de nouvelles pistes thérapeutiques.**

**Au plan pronostic, nous confirmons que la valeur prédictive du transcriptome peut être récapitulé par certains gènes clés : nous avons ainsi identifié LEF1 comme un gène particulièrement intéressant dans la détermination du pronostic du CCS.**

## II) Résultats complémentaires : génération d'une lignée de cellules H295R exprimant de façon inductible une éponge à miR-139-5p (miR-sponge) pour une utilisation *in vivo*.

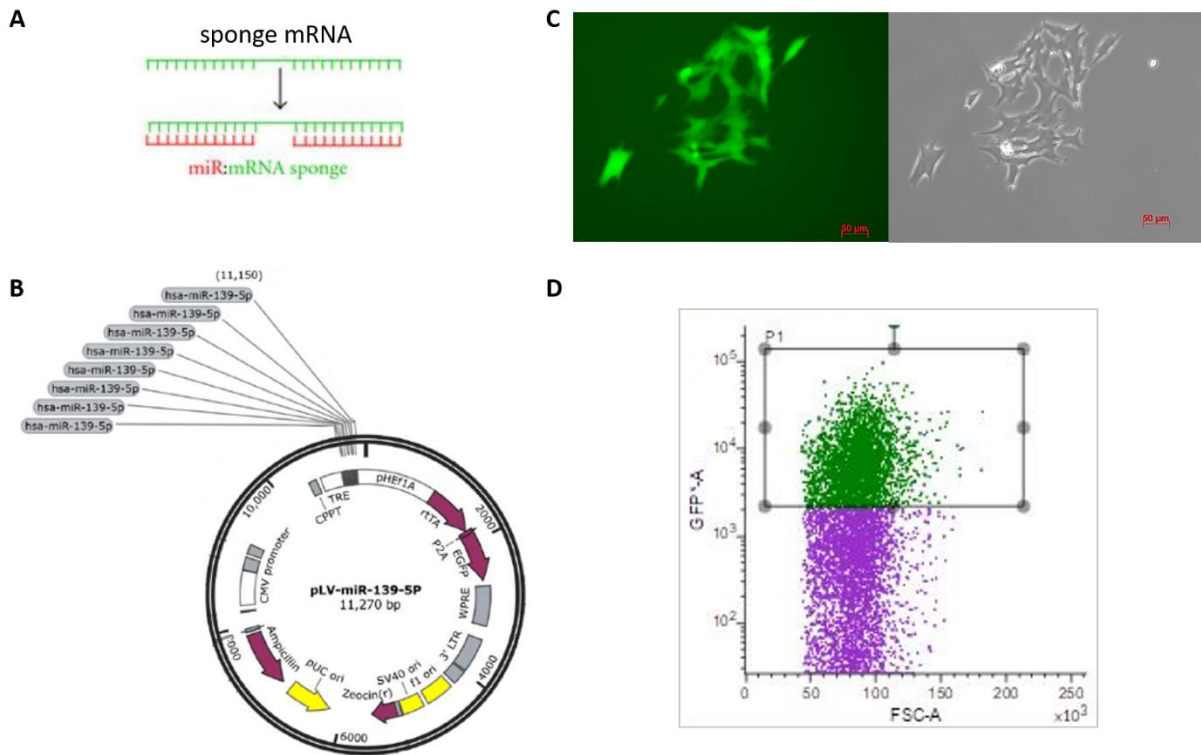
Comme présenté dans la partie II, le troisième objectif de la thèse était d'étudier le rôle de miR-139-5p dans la croissance tumorale *in vivo*, en développant un modèle murin de greffe pseudo-orthotopique à partir de cellules H295R présentant une inactivation/répression de miR-139-5p. La technique initialement retenue était la génération d'une telle lignée par la technique CRISPR-Cas9 par une prestation externe. Toutefois, les différents prestataires contactés ne pouvaient nous garantir une inactivation exclusive de miR-139-5p, la technique pouvant également être responsable d'une inactivation de miR-139-3p.

Nous avons donc opté pour une approche basée sur la répression de miR-139-5p à l'aide d'un lentivirus permettant l'expression concomitante de la GFP et d'une éponge à miR-139-5p inductible (8 répétitions successives de la séquence complémentaire de miR-139-5p) (Figure 27A). L'ajout de doxycycline dans le milieu de culture induit la transcription de l'éponge porteuse des séquences cibles de miR-139-5p qui vont le séquestrer et empêcher son action biologique. Le lentivirus possédait une cassette de résistance à la Zéocine permettant de sélectionner les cellules transduites (Figure 27B).

Nos premiers résultats étaient encourageants : après 48h de transduction par le lentivirus, 50% des cellules environ étaient GFP+ (Figure 27C et D). L'incubation des cellules non-triées en présence de doxycycline pendant 1 semaine induit une expression significative de l'éponge de miR-139-5p dans les cellules transduites (Figure 28A). Le niveau d'expression de cette éponge n'est pas influencé par la dose de Doxycycline (1, 2 ou 5 µg/mL). Toutefois, la baisse obtenue de l'expression de miR-139-5p sur cette population polyclonale était de seulement 20%, ce qui était insuffisant pour initier les expérimentations *in vivo* (Figure 28B).

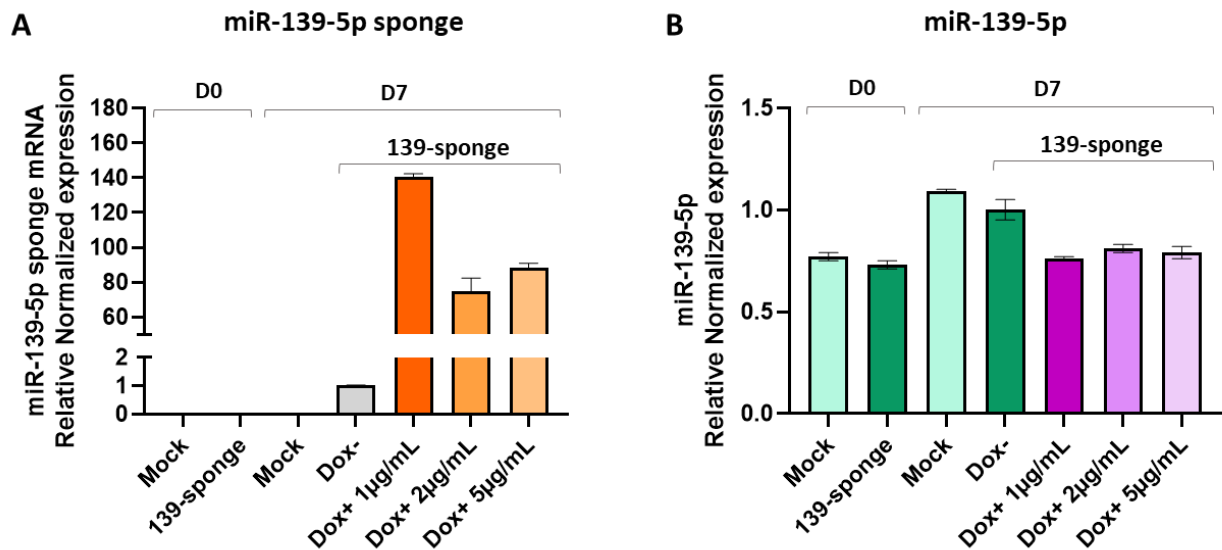
Une première sélection à la Zéocine devait permettre d'obtenir une population transduite à 100%.





**Figure 27 : Transduction de l'éponge à miR-139-5p dans les cellules H295R**

(A) Principe d'une éponge à miR. (B) Schéma du lentivirus transduit, exprimant 8 séquences complémentaires de miR-139-5p. (C) Cellules GFP+ après transduction visualisées en microscopie de fluorescence. (D) Pourcentage de cellules transduites (GFP+ en vert : 44.7%) après analyse par cytométrie de flux (FACS).



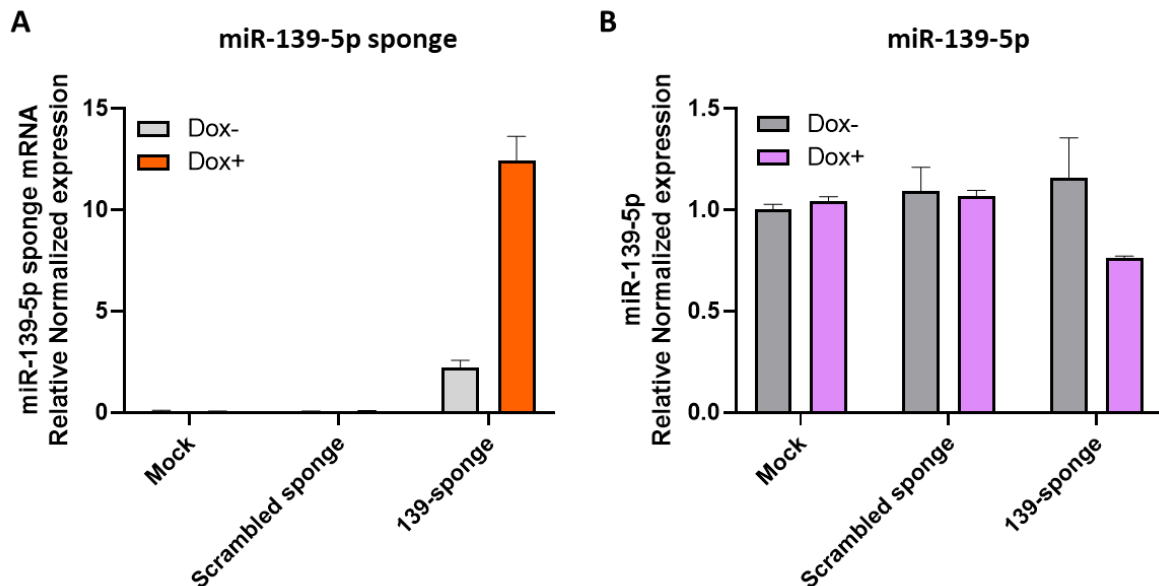
**Figure 28 : Induction de l'éponge à miR-139-5p dans une population de cellules H295R polyclonale après 7 jours de traitement à la Doxycycline**

(A) Expression de l'ARNm de l'éponge à miR-139-5p et (B) Expression de miR-139-5p, mesurées par qPCR. Les H295R non transduites (Mock) ont été analysées au jour 0 (D0) et au jour 7 (D7) de culture et les H295R exprimant l'éponge (139-sponge) ont été analysées à D0 et à D7 de traitement (Dox+) ou non (Dox-) à la Doxycycline. Les résultats présentés sont ceux d'une expérience représentative de 3 expériences indépendantes, réalisées en duplicats.

Toutefois, nous avons rencontré des difficultés de sélection puisque même à très faible dose de Zéocine (5µg/mL), les cellules transduites mourraient au bout de 10 jours de sélection (pour comparaison, la dose de Zéocine utilisée avec les H295R transduites avec le shRNA  $\beta$ -Caténine est de 20µg/mL).

Nous avons donc procédé à une sélection clonale, après un tri initial par FACS. Cette étape s'est avérée particulièrement ardue puisque la sélection clonale des cellules H295R est connue pour être difficile. La technique de sélection clonale par dilution limite en plaque 96 puits n'a pas été menée à son terme : en effet, aucun clone n'a pu être obtenu par cette technique. Nous avons donc effectué une sélection clonale selon la méthode proposée par l'équipe du Dr MC Zennaro (PARCC), à savoir l'ensemencement de quelques milliers de cellules en boîte de pétri. Les clones isolés étaient repérés et suivis plusieurs semaines pour leur développement. Chaque clone a été repiqué en plaque de 24 puits. Nous avons pu générer plusieurs clones viables de cette façon.

Nous avons ensuite examiné l'efficacité de la transcription de l'éponge en RT-qPCR dans quelques clones sélectionnés : dans les cellules H295R non modifiées et les cellules transduites avec l'éponge contrôle, l'ARNm de l'éponge à miR-139-5p n'est pas détecté que ce soit en absence ou en présence de Doxycycline (2µg/mL) (Figure 29A). En revanche, dans les cellules transduites avec l'éponge à miR-139-5p, nous avons détecté une expression substantielle de son ARNm en absence de Doxycycline comparée à celle des cellules induites à la Doxycycline. Le système est donc fonctionnel, mais il y existe une fuite de l'expression basale du transgène associée à une augmentation modérée après induction à la Doxycycline (de l'ordre de 6 fois). L'expression de miR-139-5p n'est pas affectée après induction de l'éponge contrôle mais elle est inhibée de 20 à 30% après induction de l'éponge à miR-139-5p. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus avec la population polyclonale de cellules H295R (Figure 29B).



**Figure 29 : Induction de l'éponge à miR-139-5p dans une population de cellules H295R monoclonale après 7 jours de traitement à la Doxycycline à 2µg/mL**

(A) Expression de l'ARNm de l'éponge à miR-139-5p et (B) Expression de miR-139-5p, mesurées par qPCR dans les H295R non transduites (Mock), les H295R transduites avec une éponge à séquence aléatoire (contrôle) ou avec l'éponge à miR-139-5p (139-sponge). Les résultats présentés sont ceux de deux expériences réalisées en duplicats.

Afin de mieux comprendre ces résultats, nous avons quantifié le nombre de copies de l'ARNm de l'éponge par rapport au nombre de copies de miR-139-5p dans les H295R traitées par 2µg/mL de Doxycycline. Le nombre de copies de miR-139-5p s'est révélé 3000 fois plus élevé que le nombre de sites de fixation disponibles via l'éponge induite (8 sites par ARNm). Ainsi, notre hypothèse est que les séquences éponges produites sont rapidement saturées compte tenu du niveau d'expression très élevé de miR-139-5p dans les H295R. Ceci expliquerait le faible niveau d'extinction de miR-139-5p observé dans nos conditions.

L'analyse de la littérature nous a montré que classiquement, l'induction d'une éponge à miR était de l'ordre de la centaine de fois le contrôle non-induit<sup>489</sup>. Par ailleurs, quelques études ont suggéré que les éponges à miRs seraient plus efficaces lorsque leur séquence est imparfaitement complémentaire à celle du miR cible car moins sensible à la dégradation<sup>490-492</sup>. Notre éponge à miR-139-5p a été dessinée avec une complémentarité parfaite à la séquence de miR-139-5p comme préconisé dans la plupart des études antérieures. L'utilisation d'une séquence éponge à miR-139-5p qui mime l'interaction canonique des miRs avec leur cibles (appariement

imparfait) est à l'étude, dans un contexte de recherche où l'utilisation de ces outils reste encore émergente et non-complètement maîtrisée. Ainsi, à ce jour, le modèle cellulaire envisagé pour les expériences *in vivo* reste à donc mettre en place.



## **4 - Conclusion générale et perspectives**



## D) Impact de l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -Caténine sur l'expression des miRs dans le CCS

Notre premier objectif était d'évaluer la modulation du miRnome dans des cellules H295R  $\beta$ -Cat<sup>+</sup> versus  $\beta$ -Cat<sup>-</sup>, afin d'identifier les miRs candidats pouvant être sous le contrôle de la  $\beta$ -Cat. Nous avons montré que l'extinction de la  $\beta$ -Caténine induit des variations d'expression d'au moins 54 miRs. Sur ces 54 miRs, 42 miRs avaient une expression diminuée dans la condition  $\beta$ -Cat<sup>-</sup> en comparaison à la condition  $\beta$ -Cat<sup>+</sup>. Ainsi, s'il a été largement démontré que plusieurs miRs peuvent moduler l'expression de la  $\beta$ -Caténine, nous démontrons ici pour la première fois que la  $\beta$ -Caténine peut moduler l'expression de plusieurs miRs, en exerçant principalement une régulation positive sur leur expression.

L'analyse de la position génomique des miRs identifiés montre qu'une partie d'entre eux est localisé au niveau du locus 14q32, dont l'implication dans plusieurs cancers a été démontrée<sup>493</sup>. Il est intéressant de voir qu'au niveau de ce locus, l'expression des miRs peut être soit augmentée, soit diminuée, en réponse à une variation d'expression de la  $\beta$ -Caténine. Nous avons déjà identifié ce locus comme abritant des miRs surexprimés dans les CCS agressifs<sup>246</sup> et l'implication de ce locus dans les CCS a été confirmée par les études pan-génomiques<sup>224,225</sup>. Par ailleurs, parmi nos 8 miRs candidats pour une validation d'expression par RT-qPCR, 4 ont été choisis pour leur appartenance à ce locus et 3 ont été validés comme étant diminués après extinction de la  $\beta$ -Caténine. Une première perspective est donc d'étudier les mécanismes de régulation de ce locus par la  $\beta$ -Caténine dans le CCS et d'approfondir l'étude du rôle de ce cluster dans la physiopathologie du CCS par invalidation des miRs régulés par la  $\beta$ -Caténine. Par ailleurs, la recherche de séquences consensus de TCF/LEF au sein des promoteurs de ces miRs et leur validation fonctionnelle par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) et/ou test de gène rapporteur (luciférase) après mutation de leur promoteur permettrait d'évaluer l'action directe ou indirecte de la  $\beta$ -Caténine sur ce locus.



Nous avons par ailleurs identifié miR-139-5p comme faisant partie des miRs les plus sous-exprimés après extinction de la  $\beta$ -Caténine. Cette diminution d'expression est parfaitement corrélée à celle de son gène hôte PDE2A, identifié récemment comme une cible directe de la  $\beta$ -Caténine. Ceci suggère une co-transcription de miR-139-5p et PDE2A par la  $\beta$ -Caténine dans le CCS. Les travaux de Pignatti et al. ont identifié par ChIP deux sites actifs de liaison de TCF/LEF situés aux positions +19762 bp (premier intron) et -8545 bp (promoteur distal) par rapport au site d'initiation de la transcription du gène *PDE2A* dans la surrénale de souris<sup>22</sup>. Des expériences similaires dans des cellules corticosurréaliennes humaines permettraient de mieux caractériser le mécanisme de co-transcription de miR-139-5p et PDE2A. D'autres perspectives intéressantes seraient d'étudier d'une part, le rôle de PDE2A dans la tumorigenèse surréaliennne puisque ce gène est impliqué dans la zonation du cortex surréalien et semble donc avoir une importance particulière pour ce tissu<sup>22</sup>, et d'autre part, d'étudier le rôle de miR-139-5p dans le développement et la transdifférenciation des cellules de la zone glomérulée en cellules de la zone fasciculée. Un modèle de souris transgénique invalidée pour miR-139-5p spécifiquement dans la surrénale seraient particulièrement utile dans ce contexte.

Notre modèle cellulaire se basait sur la modulation de la signalisation Wnt par extinction de la  $\beta$ -Caténine elle-même. Toutefois, il a été montré dans le CCS que l'altération la plus fréquente était la délétion homozygote de ZNRF3, un répresseur de la voie Wnt. Par ailleurs, nous avons montré que certains patients, bien que non « mutés » pour ces deux gènes avaient un niveau élevé du facteur de transcription de la voie Wnt/ $\beta$ -Caténine LEF1, associé à une expression élevée de miR-139-5p. Ceci suggère qu'il peut y avoir une modulation de l'expression des miRs par LEF1 indépendamment de mutations de la  $\beta$ -Caténine.

Ceci soulève plusieurs questions :

- L'effet observé sur les miRs dans nos cellules est-il propre à la  $\beta$ -Caténine ou est-il en lien avec une hyperactivation générale de la voie Wnt/ $\beta$ -Caténine ?

- Quelles sont les conséquences d'une répression de ZNRF3 ou de LEF1 sur le profil d'expression global des miRs dans les cellules H295R?
- Existe-t-il un lien fonctionnel entre ZNRF3 et l'expression de miR-139-5p dans le CCS?

Pour répondre à ces questions, des expériences de modulation de l'expression de ZNRF3 ou de LEF1 par des siRNA ou des vecteurs de surexpression permettraient de déterminer si les effets sur les miRs et sur les caractéristiques de nos cellules sont identiques à ceux observés par la modulation d'expression de la  $\beta$ -Caténine.

Par ailleurs, comme développé dans la partie II) des Résultats, la consolidation de nos résultats par un modèle cellulaire de surexpression de la  $\beta$ -Caténine dans une autre lignée cellulaire surrénalienne serait importante. Nos expériences de surexpression de la  $\beta$ -Caténine sauvage dans les cellules MUC-1 n'ont pas permis d'induire l'expression des gènes cibles de la  $\beta$ -Caténine, Axin2 et PDE2A, suggérant que ce modèle ne serait pas pertinent dans ces conditions. Nous avons acquis récemment un vecteur commercial exprimant la  $\beta$ -Caténine mutée S45P (OriGene) que nous envisageons de tester.

Enfin, nous avons étudié l'impact de l'activation aberrante de la voie de signalisation  $\beta$ -Caténine sur les miRs tumoraux, mais un aspect intéressant serait d'étudier son impact sur les miRs sécrétés dans des petites vésicules extracellulaires de type exosomes. Nous avons réalisé des analyses par RNA-seq des miRs des exosomes produits par les cellules  $\beta$ -Cat<sup>+</sup> et  $\beta$ -Cat<sup>-</sup>, l'analyse des données est actuellement en cours. Des observations préliminaires suggèrent que l'export de certains miRs dans ces nanovésicules est contrôlé par la  $\beta$ -Caténine.

## II) [Aspects pronostiques](#)

Notre deuxième objectif était d'évaluer l'expression de miR-139-5p chez les patients en fonction de leur statut mutationnel pour la  $\beta$ -Caténine. Nous avons déjà montré que les patients

avec un niveau élevé de miR-139-5p avait un moins bon pronostic en terme de survie globale<sup>330</sup>. Notre étude montre que les patients avec une mutation somatique ou une altération du nombre de copie au niveau de ZNRF3 ou de CTNNB1 (groupe des patients dits « mutés ») ont un niveau plus élevé de miR-139-5p que les patients « non-mutés ». Toutefois, certains patients non-mutés ont un haut niveau de miR-139-5p. Nous avons montré que LEF1, un facteur de transcription de la voie Wnt/ $\beta$ -Caténine était plus puissant pour identifier les patients à haut niveau de miR-139-5p que le statut mutationnel. Par ailleurs, LEF1 est un meilleur prédicteur de survie globale que le statut mutationnel et semblait être un bon marqueur représentatif du transcriptome, tout comme BUB1B-PINK1. Dans la cohorte COMETE-ENSAT, 28 patients / 44 (63%) étaient classés dans le groupe « LEF high » tandis que dans la cohorte TCGA 45 patients / 79 (57%) étaient classés « LEF high » versus environ 40% de patients présentant une altération moléculaire sur la voie Wnt/ $\beta$ -Caténine<sup>224,225</sup>. Nos données confirment que les données de transcriptome sont plus intéressantes que les données mutationnelles, en accord avec la littérature<sup>257</sup>.

Ceci soulève plusieurs questions et perspectives :

- Pourquoi certains patients ont un haut niveau de LEF1 sans avoir d'anomalie moléculaire de CTNNB1 ou de ZNRF3 ? S'agit-il d'anomalies non identifiées ou rares au niveau d'autres composants de la voie (APC, Axin, GSK3 $\beta$ , CK1 $\alpha$ , LRP5/6...) ? Ou existe-t-il des modulations de LEF1 indépendantes de la voie Wnt/ $\beta$ -Caténine ?
- Les mesures de l'ARNm de LEF1 sont issues de données transcriptomiques : la mesure de LEF1 en RT-qPCR, à l'instar de ce qui a été proposé pour la signature BUB1-PINK1, confirmerait-elle son intérêt pronostique dans le CCS ?

Ce travail a été effectué sur des miRs et des gènes exprimés au niveau tumoral. L'analyse des pièces tumorales est intéressante pour définir le pronostic global du patient, mais elle ne représente qu'une vision figée de la pathologie du patient. Par ailleurs, il existe une hétérogénéité intra tumorale, notamment au niveau des mutations somatiques, tandis que le

profil de méthylation et le profil d'altération chromosomique semblent plus stables<sup>494</sup>. Ces analyses sont toutefois plus difficiles à réaliser en pratique clinique courante à ce jour. De plus, l'obtention de tumeurs surrenaliennes à des fins de recherche nécessite la mise en place d'un circuit dédié, qui n'est pas forcément simple à mettre en place. On peut donc légitimement se poser la question de l'apport pronostique des miRs dans le sang circulant. Nous avons déjà montré que l'expression sérique de miR-483-5p dans les 3 mois post-opératoire était un marqueur pronostique de la survie sans progression<sup>327</sup>. Il serait intéressant d'analyser les miRs sériques selon le profil mutationnel pour la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -Caténine et le profil LEF1 des patients.

Dans cette optique, il est également nécessaire de permettre le transfert de la technique de dosage des miRs en pratique clinique courante. Le projet de recherche COMETE-CARE auquel nous sommes associés et démarré en fin d'année 2021, poursuit notamment cet objectif.

### III) Aspects thérapeutiques

A ce jour, nous n'avons pas pu mettre au point notre modèle de tumeurs avec inhibition inductible de miR-139-5p *in vivo*. Nous poursuivons actuellement les travaux en ce sens. La démonstration d'un impact de miR-139-5p sur la croissance tumorale *in vivo* ouvrirait la voie à la proposition de thérapies ciblant spécifiquement ce miR. A ce jour, la thérapie par les miRs est balbutiante : seuls une dizaine de thérapies basées sur les miRs ont été testées en clinique, et aucune n'a atteint la phase III de recherche clinique<sup>495</sup>. L'un des principaux problèmes de ces thérapies sont les effets hors cibles, liés à un grand nombre de gènes cibles potentiels des miRs. Pour résoudre ce problème, la vectorisation des miRs au sein de nanoparticules avec adressage organe-spécifique serait une solution. La glande surrénale, du fait de son caractère stéroïdogène, a la particularité de métaboliser les lipides en quantité plus importante que d'autres organes. Le CEA-LETI de Grenoble a développé depuis plusieurs années des nanoparticules lipidiques et l'étude de leur biodistribution a montré une accumulation de ces particules dans les organes métabolisant les lipides, notamment la glande surrénale<sup>496-498</sup>. Notre équipe a mis au point des

nanoparticules lipidiques (Lipidots) chargées en anti-miRs à des fins thérapeutiques pour le CCS<sup>499</sup>. Les premiers résultats obtenus montrent que la biodistribution de ces Lipidots chargés en anti-miRs est cantonnée aux tissus stéroïdogènes (surrénales, ovaires) chez les souris femelles et qu'ils s'accumulent massivement dans des tumeurs de CSS sous-cutanées *in vivo*. Ainsi, l'ensemble des travaux de notre équipe ouvrent la voie au développement de thérapies innovantes par des anti-miRs spécifiquement adressés à la surrénale, évitant ainsi les effets hors cibles, en dehors d'effets sur les gonades, qui nécessiteraient une prise en charge de conservation de la fertilité chez le patient.

**En conclusion, nos travaux ouvrent tout un champ d'investigations fondamentales pour mieux caractériser le lien entre voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -Caténine et l'expression des miRs, notamment ceux du locus 14q32 et miR-139-5p. Le rôle de LEF1 dans cette modulation d'expression des miRs, en lien direct ou non avec les composants en amont de la voie canonique Wnt reste à étudier. A moyen terme, cela permettrait de développer de nouveaux marqueurs pronostiques et d'envisager des stratégies thérapeutiques basées sur l'inhibition de miRs oncogéniques.**





# Annexes








I) [Article 2 : Revue « MicroRNA Therapeutics in Cancer: Current Advances and Challenges »](#)

Soha Reda El Sayed, **Justine Cristante**, Laurent Guyon, Josiane Denis, Olivier Chabre & Nadia Cherradi\*. MicroRNA Therapeutics in Cancer: Current Advances and Challenges. *Cancers (Basel)*. 2021 May 29;13(11):2680. doi: 10.3390/cancers13112680.



Review

# MicroRNA Therapeutics in Cancer: Current Advances and Challenges

Soha Reda El Sayed <sup>1</sup>, Justine Cristante <sup>1,2</sup> , Laurent Guyon <sup>1</sup> , Josiane Denis <sup>1</sup>, Olivier Chabre <sup>1,2</sup> and Nadia Cherradi <sup>1,\*</sup> 

- <sup>1</sup> University Grenoble Alpes, INSERM, CEA, Interdisciplinary Research Institute of Grenoble (IRIG), Biology and Biotechnologies for Health UMR\_1292, F-38000 Grenoble, France; soha.redaelsayed@cea.fr (S.R.E.S.); jcristante@chu-grenoble.fr (J.C.); laurent.guyon@cea.fr (L.G.); josiane.denis@cea.fr (J.D.); OlivierChabre@chu-grenoble.fr (O.C.)
- <sup>2</sup> Centre Hospitalier Universitaire Grenoble Alpes, Service d'Endocrinologie, F-38000 Grenoble, France
- \* Correspondence: nadia.cherradi@cea.fr; Tel.: +33-(0)4-38783501; Fax: +33-(0)4-38785058

**Simple Summary:** Cancer is a complex disease associated with deregulation of numerous genes. In addition, redundant cellular pathways limit efficiency of monotarget drugs in cancer therapy. MicroRNAs are a class of gene expression regulators, which often function by targeting multiple genes. This feature makes them a double-edged sword (a) as attractive targets for anti-tumor therapy and concomitantly (b) as risky targets due to their potential side effects on healthy tissues. As for conventional antitumor drugs, nanocarriers have been developed to circumvent the problems associated with miRNA delivery to tumors. In this review, we highlight studies that have established the pre-clinical proof-of concept of miRNAs as relevant therapeutic targets in oncology. Particular attention was brought to new strategies based on nanovectorization of miRNAs as well as to the perspectives for their applications.



**Citation:** Reda El Sayed, S.; Cristante, J.; Guyon, L.; Denis, J.; Chabre, O.; Cherradi, N. MicroRNA Therapeutics in Cancer: Current Advances and Challenges. *Cancers* **2021**, *13*, 2680. <https://doi.org/10.3390/cancers13112680>

Academic Editor: Sempere Lorenzo

Received: 31 March 2021  
Accepted: 24 May 2021  
Published: 29 May 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** The discovery of microRNAs (miRNAs) in 1993 has challenged the dogma of gene expression regulation. MiRNAs affect most of cellular processes from metabolism, through cell proliferation and differentiation, to cell death. In cancer, deregulated miRNA expression leads to tumor development and progression by promoting acquisition of cancer hallmark traits. The multi-target action of miRNAs, which enable regulation of entire signaling networks, makes them attractive tools for the development of anti-cancer therapies. Hence, supplementing downregulated miRNA by synthetic oligonucleotides or silencing overexpressed miRNAs through artificial antagonists became a common strategy in cancer research. However, the ultimate success of miRNA therapeutics will depend on solving pharmacokinetic and targeted delivery issues. The development of a number of nanocarrier-based platforms holds significant promises to enhance the cell specific controlled delivery and safety profile of miRNA-based therapies. In this review, we provide among the most comprehensive assessments to date of promising nanomedicine platforms that have been tested preclinically, pertaining to the treatment of selected solid tumors including lung, liver, breast, and glioblastoma tumors as well as endocrine malignancies. The future challenges and potential applications in clinical oncology are discussed.

**Keywords:** cancer; preclinical research; multi-target therapy; microRNA delivery; nanotechnology; nanoparticles; nanomedicine platforms

## 1. Introduction

MicroRNAs (miRNAs) are highly conserved small non-coding RNAs, which regulate gene expression through imperfect base pairing to the 3'-untranslated region (3'-UTR) of target mRNA. For the most part, miRNA binding through partial complementarity to the target transcript leads to its degradation or repression of its translation [1]. MiRNAs have a particular biogenesis that makes their expression both spatially and temporarily

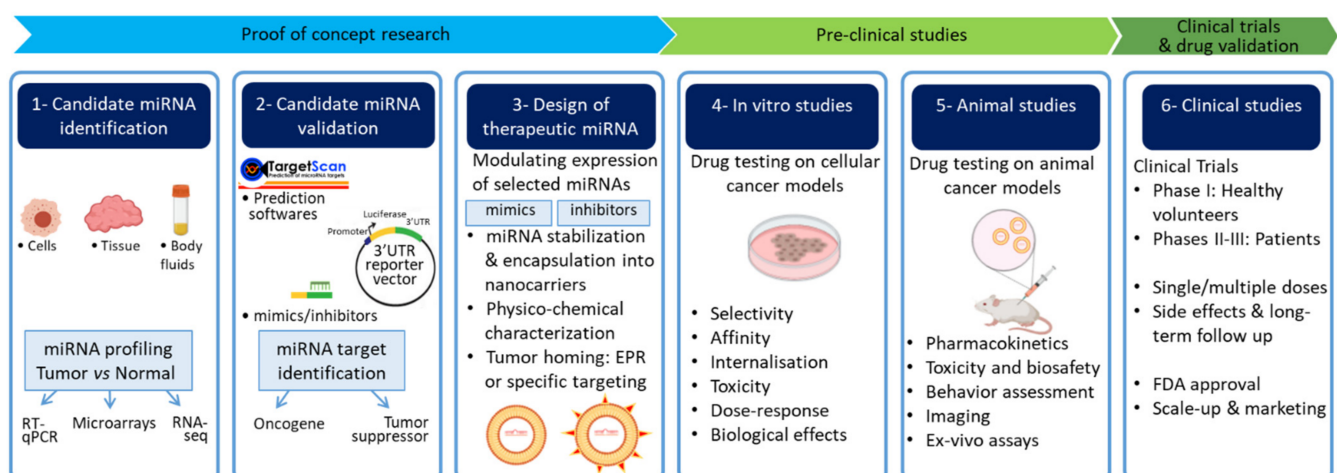
controlled [2]: miRNA genes are transcribed into hairpin-containing primary transcripts (pri-miRNA). Pri-miRNAs are cleaved by the Double-Stranded RNA-Specific Endoribonuclease DROSHA (RNase III) and its cofactor DiGeorge syndrome Critical Region 8 (DGCR8) into short hairpin pre-miRNAs in the nucleus. Pre-miRNAs are then transported into the cytoplasm by an Exportin-5 RanGTP complex to undergo further processing into approximately 22 nucleotides-double-stranded mature miRNAs by the Dicer RNase III/TRBP (HIV-1 transactivating response (TAR) RNA-binding protein) complex. The resulting small RNA duplex is then assembled into AGO (Argonaute) protein within the RNA-Induced Silencing Complex (RISC) where the guide strand is selected to exert its effect on the target transcript [3].

Given their small size of ~22 nucleotides, miRNAs can regulate various genes, in a developmental and tissue-specific manner [4]. To date, about 1917 human precursors and 2654 mature miRNAs have been described in miRBase (<http://www.mirbase.org/>; accessed on 22 October 2018), some of which have been implicated in human pathologies. Their involvement in cancer was first demonstrated in 2002, when miR-15 and miR-16-1 were found to be downregulated in Chronic Lymphocytic Leukemia [5]. Since then, high throughput molecular profiling allowed detection of aberrant miRNA expression in various tumors as compared to healthy tissue [6]. These cancer-associated miRNA signatures result from alterations of several mechanisms including structural genetic alterations (chromosomal deletions/amplifications and mutations), defects in the miRNA biogenesis machinery [7], and epigenetic changes such as altered DNA methylation [8]. Tumor hypoxia is also a key regulator of miRNA expression. Notably, Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) downregulates miR-34a, thus promoting epithelial to mesenchymal transition by targeting the Notch signaling pathway in epithelial cells [9]. Further genetic studies indicated that the specific localization of more than 50% of miRNA genes in fragile genomic regions favors their imbalanced expression, thus their involvement in tumorigenesis. In general, miRNAs embedded in cancer-deleted loci (such as the miR-15a-miR-16-1 cluster at 13q14) act as tumor suppressors, whereas miRNAs located in cancer-amplified genomic regions (such as the miR-17-92 cluster) function as oncogenes [10].

In addition to their major involvement in tumorigenesis and metastasis, miRNAs have been linked to drug resistance, the principal limiting factor to achieving cures in patients with cancer [11,12]. Indeed, alterations in miRNA expression profiles lead to anticancer drug resistance by abnormally regulating the expression of genes involved in multi-drug-resistance (MDR) mechanisms, such as ATP-binding cassette (ABC) transporter genes, apoptosis- and autophagy-related genes, and drug metabolism-related genes [13]. For example, over-expression of miR-223 or miR-298 in doxorubicin (DOX)-resistant hepatocellular carcinoma (HCC) cells or in breast cancer cells, respectively, increased their sensitivity to DOX through ABCB1 (ABC Subfamily B Member 1) downregulation [14,15]. In chronic myeloid leukemia, miR-212 inhibition resulted in ABCG2 (ABC Subfamily G Member 2) upregulation and increased ABCG2-dependent efflux of Imatinib [16]. Knock-down of miRNA-182 and miRNA-205 improve the sensitivity of non-small-cell lung cancer (NSCLC) to cisplatin, and enhanced apoptosis through upregulation of the pro-apoptotic proteins phosphatase and tensin homolog (PTEN) and programmed cell death-4 (PDCD4), respectively [17,18]. Autophagy is activated in cancer cells during chemotherapy and often contributes to drug resistance [19]. Zou et al. found that ectopic expression of miRNA-30a significantly reduced beclin 1 and cisplatin-induced autophagy while significantly increasing HCC and breast cancer cell apoptosis [20]. MiRNAs also regulate drug-metabolizing enzymes such as the cytochrome P450 (CYP) superfamily, which catalyzes the metabolism of most drugs. As observed for ABC transporters, the expression level of drug-metabolizing enzymes is frequently higher in various types of cancers compared with normal tissues. MiR-27b and miR-892a were found to respectively target and downregulate CYP1B1 and CYP1A1 expression in breast cancer [21,22] and to impair the benzo(a)pyrene-mediated decrease in cancer cell viability [22]. All these findings reinforce the idea that subsets of miRNAs may have clinical relevance as therapeutics agents.

Besides their validation as powerful tools for diagnosis, inhibition of miRNA activity and/or enhancement of miRNA function (miRNA replacement) strategies led to promising results in terms of antitumor effects in preclinical models [23–26]. It is worth mentioning that the development of miRNA-based therapies continues to benefit from the major advances made in siRNA/RNA therapeutics. As components of the RNA interference (RNAi) process, both miRNA and siRNA are able to knockdown oncogenic genes by targeting mRNA expression. MiRNA and siRNA have similar physicochemical properties (double-stranded RNA with 21–23 nucleotides) and use the same intracellular machinery to be active (function of the RNA-induced Silencing Complex). Therefore, it is conceivable that similar technologies can be applied to both types of RNA for therapeutic purposes. However, the origin and mechanisms of action of miRNA and siRNA differ: miRNA are encoded by the cell genome and regulate endogenous genes while siRNA function after exogenous delivery; miRNA mostly use 7–8 nucleotides from their 5′-end to identify target mRNA sequence and to induce mRNA degradation or inhibition of translation. Consequently, a single miRNA is able to bind and target more than one mRNA, thus allowing multi-target action on several genes, which often work together as a network within the same pathway [27]. This property is attractive for the treatment of multifactorial diseases such as cancer but can also lead to potential off-target effects. In contrast, siRNA use their full length to recognize their target sequence and mediate cleavage of the target mRNA, thus permitting target specificity and the ability to inhibit the expression of a mutant oncogenic protein without affecting the wild type. Nevertheless, siRNAs can in turn cause unintended gene silencing due to miRNA-like effects when their 5′-end of the guide strand is complementary to the 3′-UTR of the mRNA.

A series of stringent criteria must be met before bringing miRNAs from bench to bedside (Figure 1). These include safe delivery, limitation of off-target effects which are inherent to miRNA mechanisms of action, and reduction of toxicity and immune responses. In this review, we summarize the emergence of miRNA-based therapy as a strategy to treat cancer by specifically targeting signaling pathways leading to the disease. We cover the approaches implemented for the delivery of miRNA mimics or anti-miRNAs (antimiRs) with an emphasis on nanotechnology-based formulations for the treatment of major cancer types and rare endocrine tumors in preclinical models. The challenges that persist for translating laboratory breakthroughs to the clinic are discussed.



**Figure 1.** Translating miRNA biology from bench to bedside in cancer. As for the classical drug discovery workflow, development of miRNA therapeutics consists of 3 main levels: proof of concept research, preclinical studies, and clinical trials. (1) Identification of candidate miRNAs for therapy. MiRNA expression is quantified in tissue, cells, or body fluids of healthy and tumor specimens (RT-qPCR: Reverse Transcription-quantitative PCR; RNA-Seq: RNA sequencing). (2) Potential

targets of differentially expressed miRNAs can be identified using target prediction softwares and validated in reporter gene assays vectors using target transcript 3'-UTR cloned downstream of luciferase reporter and miRNA mimics/inhibitors. (3) Design of therapeutic miRNA requires stabilization and encapsulation of miRNAs in well characterized carriers. (4) Evaluation of the effects of miRNA-loaded nanocarriers on several biological processes in cancer cell models is a pre-requisite for the development of therapeutic protocols in vivo. (5) Therapeutic miRNA candidates are tested in animal cancer models alongside animal behavior and recovery before the evaluation of the antitumor effects. (6) Initiation of clinical trials requires a careful assessment of efficacy and toxicity in pre-clinical studies. Doses and side effects are particularly monitored for FDA approval and treatment scale-up.

## 2. Main Approaches for Therapeutic Targeting of miRNAs

MiRNA expression patterns can be modulated to abolish or restore miRNA biological function. To inhibit oncogenes or restore tumor suppressors, one anti-cancer strategy consists of silencing the overexpressed oncomiRs or replacing the downregulated tumor suppressor miRNAs [28]. There are three approaches to achieve miRNA loss of function: miRNA sponges, antisense oligonucleotides (antagomiRs, antimiRs), and genetic knockouts based on the application of Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated protein 9 (CRISPR/Cas9) genome-editing technologies [29,30]. Synthetic miRNA sponge vectors express transcripts with miRNA binding sites that mimic those found in natural mRNAs and complementary to the targeted miRNA [31]. This system sequesters endogenous intracellular miRNAs, thus preventing their binding availability for the target mRNAs [32]. By transducing a retroviral miRNA sponge to inhibit miR-9, Ma et al. demonstrated that metastasis was significantly reduced in a syngeneic mouse model of breast cancer [33]. High affinity-inhibition is also feasible via chemically modified oligonucleotides such as locked nucleic acids (LNA). As a part of the cell endogenous DNA repair machinery, the CRISPR/Cas9 system has been reported recently as a potent genetic engineering tool for miRNA-based therapeutic intervention. Yoshino and colleagues targeted miR-210-3p and miR-210-5p using the CRISPR/Cas9 system in renal cell carcinoma cell lines and demonstrated that deletion of miR-210-3p increased tumorigenesis, both in vitro and in vivo [34]. Another growing field in miRNA therapeutics is miRNA replacement therapy which aims at restoring miRNAs, which are downregulated or deleted in cancer cells [35]. With the recurrence of downregulated tumor suppressor miRNAs in human malignancies, mainly miR-34 and let-7, administration of miRNA mimics can re-establish miRNA levels to their basal non-pathological states. Indeed, a decrease of let-7 promotes expression of a number of oncogenic factors, including RAS, Myc, cyclins, and cyclin-dependent kinases [36]. In cultured lung cancer cells as well as in pre-clinical models of lung cancer, re-introduction of let-7 mimics impedes cell proliferation and reduces growth of lung tumors [37]. MiR-34a is markedly under-expressed in most human cancer types. Re-expression of miR-34a induces growth arrest and apoptosis, by silencing pro-proliferative and anti-apoptotic genes [38].

## 3. Delivery Platforms for miRNA Therapeutics

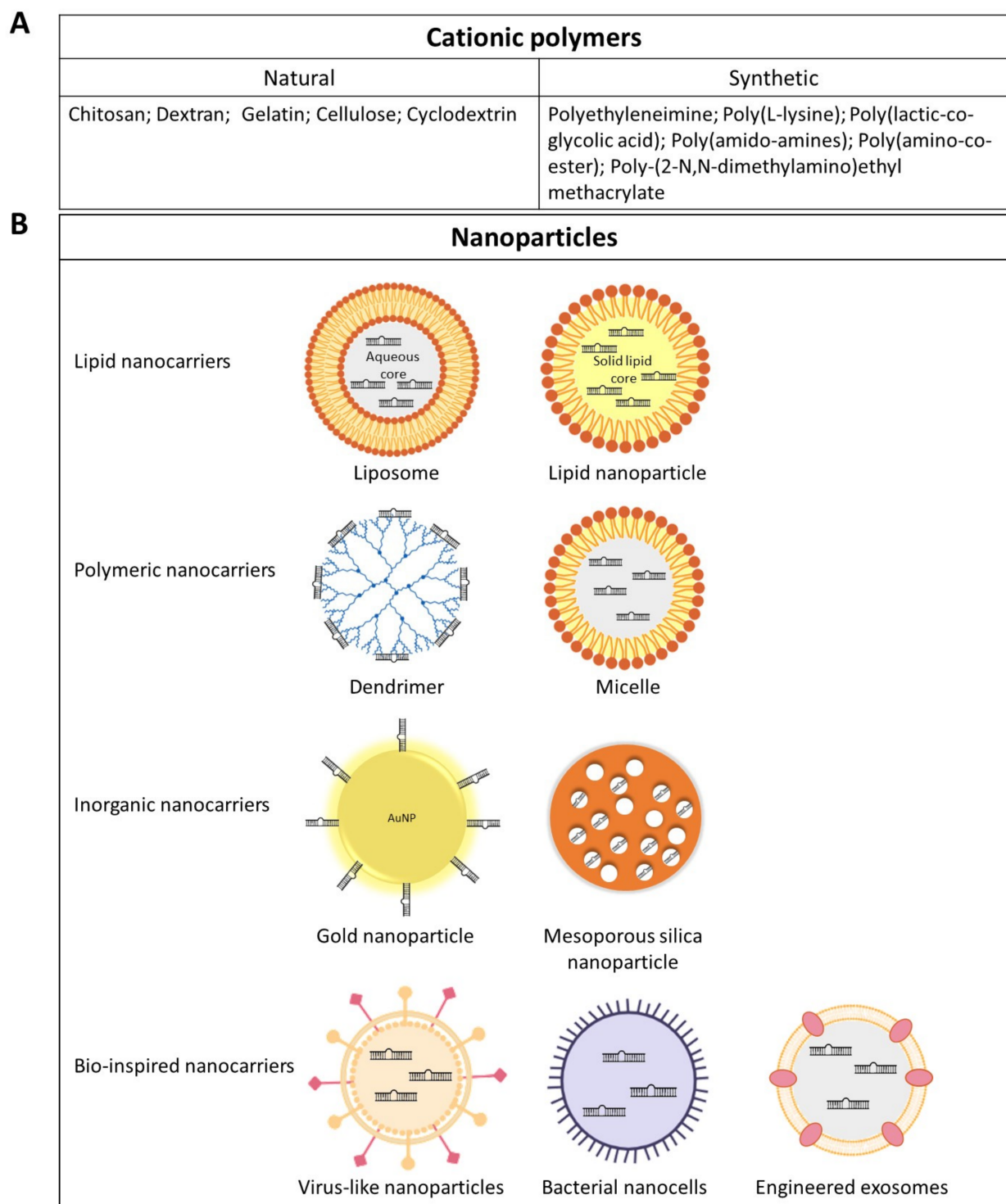
Improvement of miRNA mimics or antimiRs stability and development of safe and efficient delivery systems are critical steps to bring miRNA therapies from bench to bedside. Indeed, synthetic miRNA mimics or antimiR oligonucleotides have short half-life and are immediately degraded in biological fluids by nucleases [39]. To overcome this hurdle, several strategies have been devised, including chemical modifications such as phosphodiester and phosphorothioate internucleotide linkages, addition of a 2'-O-methyl group or synthesis of locked nucleic acids in which the ribose ring is constrained by a methylene linkage between the 2-oxygen and the 4-carbon. In addition to chemical modifications, entrapment of therapeutic miRNAs within functionalized nanoparticles allowed further improvement in their protection from degradation, decreased the immune response and enhanced the circulation time. Finally, conjugation of nanoparticles with targeting ligands such as proteins, peptides, and antibodies improved cellular uptake and specific targeting of the tumor site.

Several viral and non-viral miRNA delivery systems have been used successfully *in vitro* and *in vivo*. Nevertheless, whether based on chemically modified oligonucleotides, miRNA sponges or miRNA mimics, developing therapeutic approaches still present clearance, accessibility, tissue-specific targeting and safety issues [40]. The exponential growth in nanotechnology research is expected to help to overcome these barriers: oligonucleotides can be encapsulated into complex nanoparticles (NPs) capable of efficient and targeted drug delivery. Besides improved endosomal escape, these nanocarriers achieve tumor-selective accumulation through the Enhanced Permeability and Retention (EPR) effect, a central paradigm in cancer nanomedicine [41]. This passive targeting mechanism results from the extravasation of long-circulating nanoparticles (diameter < 100 nm) through the leaky tumor microvasculature into the tumor interstitium. Subsequent nanoparticle cellular uptake and intracellular fate are strongly influenced by their size, shape and surface properties [42].

Genetically modified viral vectors, including retroviruses, lentiviruses, adenoviruses and adeno-associated viruses (AAVs) have long been used for gene therapy and also designed to deliver transgenes encoding miRNA mimics or antagonists [43]. Virus-like nanoparticles (VLNPs) are noninfectious protein shells or capsids, composed of virus-derived structural proteins and devoid of the pathogenic elements of the viral genome. VLNPs can be produced from infections of host cells or by recombinant protein expression and self-assembly. The advantage of viral vectors is to provide high infection efficiency and persistent expression of the transgene. For example, systemic lentiviral delivery of miR-15a/16 in a mouse model of Chronic Lymphocytic Leukemia restored the expression of miR-15a/16, reduced malignancy with decreased proliferation and increased apoptosis of malignant lymphoid cells [44]. However, lentiviruses and retroviruses can integrate their own reverse transcribed DNA into the host genome, which may lead to insertional mutagenesis and activation of oncogenic pathways. Thus, non-integrating adenoviruses and AAVs have been used as alternative miRNA carriers as they keep their own genomes in episomal form. For example, systemic delivery of miR-26a carried by AAVs showed cell cycle arrest and apoptosis induction in hepatocellular carcinoma cells and tumor growth inhibition [45]. Although the viral vectors used are replication-deficient, some problems such as toxicity, immunogenicity, and manufacturing complexity shifted the research in nanomedicine towards non-viral carriers. Thus, polymeric non-viral vectors, which have been favored due to their low immunogenicity, ease of production, controlled composition, and chemical flexibility, have represented an attractive alternative to viral vectors (Figure 2).

Various types of natural and synthetic polymers have been used in miRNA-based therapies. Interest in synthetic cationic polymers resulted from their potential to form polyelectrolyte complexes with nucleic acids. Polyethyleneimine (PEI), an organic macromolecule with a high cationic-charge-density potential, is the most commonly used polymeric gene delivery system. The overall positive charge of PEI makes it convenient for condensing large negatively charged molecules such as nucleic acids, resulting in the formation of polyplexes through electrostatic complexation. Following endocytosis, PEI undergoes protonation of its amine groups within endosomes and thereby exerts a proton-sponge effect. Proton accumulation triggers cytosolic water towards the endosomes, leading therefore to osmotic swelling, endosome bursting, and PEI polyplex release into the cytosol [46]. Systemic or local application of PEI/miR-145 complexes into a mouse model of colon carcinoma significantly reduced tumor proliferation and increased apoptosis, with concomitant repression of c-Myc and ERK5 [47]. Natural cationic polymers including chitosan and dextran (polysaccharides) were also successfully tested for miRNA delivery to treat multiple myeloma and osteosarcoma in preclinical models [48,49]. Chitosan has a strong binding affinity for nucleic acids at low pH as its protonated amine groups rapidly interact with negatively charged molecules such as miRNAs. A major drawback of chitosan nanoparticles is that these interactions are almost irreversible thus preventing efficient drug release. Lipid chains or negatively charged polymers have been combined with chitosan to improve nucleic acid delivery [50].





**Figure 2.** Schematic representation of commonly used and emerging nanoplatforms for miRNA delivery. **(A)** Natural and synthetic polymers can form electrostatic complexes with nucleic acids such as miRNAs. **(B)** Nanoparticle-based platforms are characterized by tunable size, shape, and surface characteristics, which enable them to have compatibility with different administration routes. Specific recognition molecules such as antibodies or peptides can be grafted to target tissues more specifically. Tumor-derived exosomes are being increasingly explored as delivery systems in cancer research since their identification as drivers of organotropic metastatic spread. However, their complex composition and still non-established biological functions led to the development of Exosome-Mimetic Nanosystems that recapitulate natural exosomes structure with a controlled composition.

Other studies investigated the potential of inorganic materials such as gold (Au) or silica NPs in miRNA-based therapy. Inorganic NPs feature several advantages, including tunable size, surface properties, and multifunctional capabilities. Multiple strategies have been used for the functionalization of Au-NPs to increase their bonding with biological molecules and facilitate the intracellular payload release. Gold nanoparticles (Au-NPs) can be functionalized with thiol groups to increase their bonding with miRNA [51]. This approach has been reported by Ekin et al. to successfully convey miR-145 to prostate PC3 and breast MCF-7 cell lines [52]. An additional polyethylene glycol (PEG) layer was shown to stabilize Au-NPs nanoformulations by limiting their aggregation and miRNA degradation [53]. Moreover, Au-NPs binding with the target site can be addressed by decorating their surface with target specific ligands. Even though Au-NPs have received a lot of interest over the past few years, more investigations related to biocompatibility, cytotoxicity, retention, and clearance time are needed to conceive conjugated Au-NPs with minimal side effects [54,55]. Mesoporous silica nanoparticles (MSN) are a special group of inorganic NPs that have porosities at the nanoscale. They provide a high surface area, thermal stability, and easy surface modification, with biocompatible and non-toxic properties. Their large and active surface allows the attachment of different functional groups for targeted drug delivery. Among the many strategies that are used to functionalize MSNs, chemical modifications within the pores to increase the retention time of loaded molecules, coating with PEG for stabilization and attachment of targeting ligands to target specific cell receptors have been extensively investigated. Tivnan et al. exploited the high expression level of the tumor-associated antigen disialoganglioside (GD2) in neuroblastoma to develop GD2-targeting MSN for the delivery of miR-34 into neuroblastoma murine models [56]. However, the synthesis of functionalized MSN requires multiple steps with complex chemical reactions that limited their fabrication at industrial scale.

Lipid-based nanoparticles (LNPs) are widely used due to their efficient cellular uptake through the cell membrane. Different types of nanoformulations, such as liposomes and solid lipid nanoparticles (SLNs) prove to be less toxic than other delivery systems such as polymer nanoparticles, owing to their biocompatibility and biodegradability. MiRNA-loaded LNPs are usually a cocktail of cationic lipids (*N*-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-*N,N,N*-trimethylammonium chloride (DOTMA) or 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP)), neutral lipids and PEG, which shield miRNAs either in their aqueous core or by forming a stable complex via electrostatic interactions with the negatively charged phosphate groups in miRNA molecules [57]. Helper lipids, i.e., neutral lipids like cholesterol and dioleoylphosphatidyl ethanolamine (DOPE), can be incorporated in LNPs in order to reduce the charge-driven toxicity and to enhance delivery efficiency [58,59]. LNPs increased the therapeutic index of many drugs and offered improved drug targeting and controlled release. As for the other drug delivery nanosystems, targeted liposomal formulations have been developed by coating liposomes with specific ligands, which bind to cancer-associated antigens. For example, taking advantage of the selective internalization of GAH antibodies by gastric cancer cells, Hosokawa et al. showed that doxorubicin exerted better anti-tumor activity when vectorized in PEG-GAH liposomes than in non-coated liposomes [60,61]. In the context of miRNA-based therapy, miR-135a-loaded cationic immunoliposomes coated with anti-EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) antibodies (Anti-EGFR-CIL-miR-135a) were shown to inhibit gallbladder carcinoma invasion (GBC) and metastasis, and to promote apoptosis. The GBC tumor growth rate was 60% lower in xenograft-bearing mice treated with Anti-EGFR-CIL-miR-135a as compared to controls [62]. PD-L1 monoclonal antibody-conjugated miR-130a/oxaliplatin-loaded immunoliposomes (PD-miOXNP) showed a high efficacy in HGC27 gastric cancer tumors with reduced Ki67+ cells and increased TUNEL+ cells [63]. SLNs offer additional advantages over polymeric NPs and liposomes. Indeed, incorporation of both hydrophilic and hydrophobic drugs is achievable along with controlled release of the drug for up to several weeks [64]. Moreover, the lipids used in the preparation of SLNs are biodegradable and safe. SLN formulations are also characterized by a high stability and loading capacity as compared to their lipid

counterparts. The main components of SLN formulation are solid lipids, surfactants, and water. Solid lipids include fatty acids, triglycerides, steroids, and waxes. Cationic lipids facilitate interaction with the cell membrane, improving transfection efficiency. Combining miRNA with chemotherapeutic drugs using SLNs was shown to be a powerful anticancer strategy. Shi et al. demonstrated that co-incorporation of miR-34a and paclitaxel (PTX) in SLNs (miSLNs-34a/PTX) increases the uptake of these nanoparticles by B16F10-CD44+ melanoma cells and induces more cell death than single drug-loaded nanoparticles [65]. MiR-34a and PTX exerted a synergistic induction of melanoma cell death. In another study, cationic SLNs were successfully used to deliver anti-miR-21 oligonucleotide and Pemetrexed for glioblastoma therapy in vitro [66]. Micelles are nanoparticles that are formed from the self-assembling of amphiphilic molecules in an aqueous environment. Reported advantages of micelles include simple preparation, low toxicity and good tissue penetration properties [67]. However, similar to liposomes, they are prone to dilution following intravenous administration. Modifications of micelles at their core and their shell can improve encapsulation efficiency and in vivo stability. Mittal et al. designed gemcitabine-conjugated cationic micelles for the co-delivery of gemcitabine and miRNA-205 in pancreatic cancer [68]. Combination formulations efficiently reversed chemoresistance, invasion and migration in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells in vitro, and showed significant growth inhibition in vivo.

A powerful delivery vehicle based on bacterially derived nanocells, called EDV<sup>TM</sup> (EnGeneIC Dream Vectors) has been developed by EnGeneIC Ltd. (Sydney, Australia) [69]. Bacterial nanocells are achromosomal nanoparticles produced by inactivation of the genes that control normal bacterial cell division. They can package a range of anticancer chemotherapeutic drugs [70]. Targeted delivery was achieved by using bispecific antibodies, which are capable of binding the EDVs with one arm and the tumor antigen with the other arm. In addition, the bacterial cell wall of the nanocells stimulates key components of the immune system, which are then activated to kill cancer cells. The EDVs proved to be safe and well tolerated despite high and repeated doses in different animal models [70,71]. This system has been used to deliver miR-16 to mesothelioma in vivo [72] as well as to mesothelioma patients (MesomiR-1 clinical trial NCT02369198). Another elegant strategy for miRNA delivery was inspired by natural exosomes, which shield and convey miRNAs into the tumor niche. Nevertheless, besides the validation of exosomes as biocompatible molecular carriers, their clinical translation is still hampered by their complex composition and poor harvesting yields [73]. To overcome these issues, Vazquez-Rios et al. took advantage of the existing liposome technology to develop Exosome-Mimetic Nanosystems (EMNs) [74]. These nanostructures reproduce cell-derived exosomes structure, physicochemical properties, and loading capacities.

#### 4. Application of miRNA-Based Therapeutics in Selected Cancers

In their recent review, Bonneau et al. reported the clinical advances for miRNA therapeutics in several human diseases, including cancer [75]. In the following sections, we will describe the preclinical advances in anti-cancer strategies using miRNA-based therapy for selected common and rare solid tumors. Table 1 provides several examples of in vitro and in vivo studies using different delivery systems and administration routes to replace or inhibit miRNAs in cancer cells.

##### 4.1. Lung Cancer

Lung cancer is the most frequent cause of cancer-related deaths worldwide with 5-year survival rates ranging from 4–17% depending on stage and populations. Liposomes have been reported to be particularly convenient for drug delivery to the lungs, since they can be prepared from lung endogenous surfactants. This makes them relevant carriers for miRNA-targeting molecules to this organ. To date, miR-34a is the most well documented tumor suppressor miRNA, capable of cell cycle arrest and induction of apoptosis. Its downregulation is reported in various solid tumors including lung cancer, suggesting that replacement

therapy might be effective for retrieving its physiological levels [76]. Wiggins et al. [77] showed that systemic delivery of synthetic miR-34a in liposomal formulation could indeed inhibit tumor growth in NSCLC-bearing mice. No immunogenicity or toxicity were observed. These results were in agreement with prior *in vitro* experiments on genetic variants of NSCLC cell lines, showing that transfection of miR-34a reduced cell growth and colony formation in a p53 dependent manner [77]. In the same line, Kasinski et al. suggested a combinatorial approach to co-deliver the tumor suppressors miR-34 and let-7b using NOV340 liposomes in NSCLC. This strategy reduced tumor burden and induced a 40%-increase in survival rate of  $Kras^{G12D/+}/Trp53^{flx/flx}$  mutant mice [78]. Systemic delivery of miR-200c loaded-NOV340 liposomes has been shown to enhance radiosensitivity in lung cancer by increasing the oxidative stress response and by inhibiting repair of radiation-induced DNA double-strand breaks [79]. Thus, rendering treatment-resistant lung cancer sensitive to radiotherapy through lipid nanoparticle-mediated miRNA replacement appeared as a promising approach. On the clinical side, miR-34 mimics, encapsulated in NOV340 liposomes (MRX34), were the first miRNA-based therapy approach that entered phase I clinical testing in 2013 for several solid and hematological malignancies (NCT01829971, Mirna Therapeutics) [80]. Unfortunately, this study was halted in 2016 following multiple immune-related severe adverse events observed in the patients [81].

Another approach demonstrated that DOTMA-based cationic lipoplexes (LPs) successfully conveyed miR-29b (LP-miR-29b) to both NSCLC A549 cells in culture and NSCLC xenograft mouse model [82]. After several injections of miR-29b-loaded-lipoplexes in the tail vein, the treated mice displayed reduced tumor size as compared to negative controls (LP-miR-NC) and untreated mice. MiR-29b expression in tumor tissue of treated mice was 5-fold higher, confirming the efficient release of miR-29b from DOTMA lipoplexes. As for the biological impact of restoring miR-29b expression, Wu et al. [82] observed a significant decrease in miR-29b oncogenic targets DNMT3B (DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta), CDK6 (Cell division protein kinase 6) and MCL1 (Induced myeloid leukemia cell differentiation protein) with minor toxicity. Nonliving bacterial nanocells (EDVs or TargomiRs) were used as carriers for miR-16 delivery to 26 NSCLC patients in a phase I clinical study (NCT02369198). The targeting moiety of this bacterially derived delivery system was an anti-EGFR bispecific antibody to target EGFR-expressing cancer cells. Tumor growth was impaired after systemic administration of TargomiRs at low dosages. However, dose-dependent toxicities were reported, i.e., anaphylaxis, inflammation as well as cardiac events. Variable response rates were observed with 5% of the patients showing partial response, 68% showing stable disease and 27% showing progressive disease [83]. Based on these observations, the authors recommended to conduct a new trial combining TargomiRs with chemotherapy or immunotherapy in larger groups of patients. More recently, Exosome-Mimetic Nanosystems were engineered with organ specific proteins such as Integrin  $\alpha 6\beta 4$  for the targeted delivery of miR-145 mimics to lung adenocarcinoma cells. *In vivo* experiments were carried out using intraperitoneal or retro-orbital injection of labeled miR-145-EMNs into nude mice bearing lung tumors. Fluorescence was mainly detected at tumor sites and mild off-target effects were found in the liver and spleen [74].

**Table 1.** Examples of in vitro (cell lines) and in vivo studies (preclinical mouse cancer models) that have been conducted to test miRNA-based therapies in the absence or in the presence of accompanying anticancer drugs.

Cancer Type	miRNAs	Delivery System	MiRNA Loading Strategy	Cell Lines	Delivery Route In Vivo	Results	References
Lung cancer	miR-34a	Neutral Lipid Reagent (RNA-LANCER II)	Encapsulation in phospholipid-oil emulsion	A549, BJ, NCI-H460, Calu-3, NCI-H596, NCI-H1650, HCC2935, SW-900, NCI-H226, NCI-H522, NCI-H1299, Wi-38 and TE353.sk	it, iv	Reduced cell proliferation and colony formation; Tumor growth inhibition	[77]
	miR-34 let-7	Neutral Lipid Nanoemulsions	Encapsulation in phospholipid-oil emulsion	KRAS/TP53-mutated NSCLC cell lines: H358, H23, and H441	iv	Decreased MET and MYC expression; 40% better survival rate	[78]
	miR-29	Cationic DOTMA Lipoplexes	Electrostatic interaction	A549	iv	Decreased expression of miR-29b oncogenic targets DNMT3B, CDK6 and MCL1	[82]
	miR-16	Bacterial Minicells (with EGFR antibody coating)	Loading via non-specific Porin channels	-	iv	Inhibition of tumor growth but dose-dependent toxicities	[83]
	miR-145	Liposomal Exosome-Mimetic Nanoplat-forms (Integrin $\alpha 6\beta 4$ coating)	Encapsulation in aqueous phase	A549	ip, ro	Preferential accumulation at tumor sites	[74]
Liver cancer	miR-122	Lentivirus	Viral vector expression system	Mahlavu SK-HEP-1	sc	Reduced ADAM17 expression; Inhibition of tumor growth, angiogenesis, and intrahepatic metastasis	[84]
		Cationic Liposomes	Encapsulation	Sk-Hep-1	it	50% growth suppression of Sk-Hep-1 xenografts; impairment of angiogenesis; Downregulation of SRF, IGF1R and ADAM10	[85]
	Anti-miR-221	PEI-modified PLGA nanoparticles	Electrostatic interaction	HepG2	sc	Inhibition of tumor growth; Increased circulating miR-221	[86]
	miR-199a/b-3p/anti-miR-10b	PEI-Cyclodextrin-PEG polymeric nanoparticles	Electrostatic interaction	Huh-7 PDX	iv	Inhibition of Huh-7 tumor growth by targeting mTOR, PAK4, RHOC and EMT pathways. Tumor suppression on PDX	[87]

Table 1. Cont.

Cancer Type	miRNAs	Delivery System	MiRNA Loading Strategy	Cell Lines	Delivery Route In Vivo	Results	References
	miR-27a Sorafenib	Anti-GPC3 antibody-targeted lipid nanoparticles	Electrostatic interaction	HepG2	-	Suppression of tumor burden; increased apoptosis	[88]
Breast cancer	miR-125a	Liposomes (with hyaluronic acid coating)	Electrostatic interaction	SKBR3, 21MT-1	-	Reduced HER-2 expression	[89]
	miR-34a Doxorubicin	Hyaluronic acid-chitosan nanoparticles	Electrostatic interaction	MDA-MB-231	iv	Enhanced response to chemotherapy	[90,91]
	Anti-miR-21 Adriamycin	PEI graphene oxide nanocarriers	PEI-mediated electrostatic interaction	MCF-7	-	Increased Adriamycin uptake	[92]
	miR-9 miR-21 miR-145	PEI-modified magnetic nanoparticles	Electrostatic interaction	MCF-7	iv	Effective tumor targeting; Reduced tumor burden	[93]
	miR-34	Silica nanoparticles	Electrostatic interaction with added amine groups	Comma D $\beta$ , SUM159pt	it	Inhibition of tumor growth	[94]
Glioblastoma	miR-100 anti-miR-21	Gold-iron oxide nanoparticles (with T7 peptide-cyclodextrin-chitosan coating)	Electrostatic interaction	U87-MG	in	Diagnosis by MRI tracking of gold nanoparticles; Presensitization to temozolomide	[95]
	Anti-miR-21	Cationic polyamine-co-ester	Electrostatic interaction	U87	ced	Apoptosis of GBM cells; Better survival rates	[96]
	miR-34a	Dendritic polyglycerolamine	Electrostatic interaction	Patient-derived GBM cells	iv	Reduced tumor burden	[97]
Thyroid cancer	Anti-miR-146	Invivofectamine	Electrostatic interaction	Cal62	it	Impaired tumor growth; Restored PTEN expression	[98]
	Anti-miR-21	LNA	Chemical modifications	RTL-5	sc	Inhibition of tumor growth	[99]
	miR-204-5p	Lentivirus	Viral vector expression system	TCP-1 BCPAP	sc	Inhibition of tumor growth	[100]
Adrenocortical cancer	miR-7	Bacterial Minicell particles "EnGene/c Delivery Vehicles" (EDVs) (with EGFR antibody coating)	Loading via non-specific porin channels	NCI-H295R SW13	iv	Inhibition of tumor growth by targeting CDK1/Raf1/mTOR signaling	[101]

Table 1. Cont.

Cancer Type	miRNAs	Delivery System	MiRNA Loading Strategy	Cell Lines	Delivery Route In Vivo	Results	References
	miR-431 Doxorubicin Mitotane	Lipofectamine	Electrostatic interaction	NCI-H295R	-	Reversed EMT phenotype	[102]
Ovarian cancer	miR-200c Paclitaxel	Lipofectamine	Electrostatic interaction	SCOV3	-	Impaired migration and invasion, enhanced chemosensitivity	[103]
	miR-200a miR-141	Lentivirus	Viral vector expression system	SCOV3	-	Improved sensitivity to paclitaxel	[104]
	miR-7 Paclitaxel	Polymeric Nanoparticles (monomethoxy (poly(ethylene glycol))-poly(D,L-lactide-co-glycolide)-poly(L-lysine)	Electrostatic interaction with the poly(L-lysine) chains in the core	SCOV3	iv	Improved sensitivity to paclitaxel and apoptosis of cancer cells through inhibition of EGFR/ERK pathway	[105]
	miR-15a miR-16 Cisplatin	Liposomes	Electrostatic interaction	A2780 A2780-CP20 OVCAR4	iv	Reduced tumor burden; decreased expression of BMI1 oncogene and EMT markers	[106]
	Anti-miR-21	Mesoporous Silica Nanoparticles (with CGKRR peptide coating)	Calcium silicate trapping procedure	OAW42	iv	Reduced tumor mass	[107]
	Anti-miR-21	Gold Nanoparticles	Surface functionalization with amine or thiol groups	-	-	Disrupted cell colony formation ability	[108]
	miR-155	PEI	Electrostatic interaction	OvCa-associated dendritic cells	ip	Boosted immunity and better survival	[109]
Prostate Cancer	miR-34a	Chitosan Nanoparticles	Electrostatic interaction via the protonated amino groups at low pH	PC3	iv	Inhibited tumor growth and metastasis	[110]
	Anti-miR-221	Mesoporous Silica Nanoparticles	Electrostatic interaction within the pore	PC3	-	Less cancer expansion	[111]
	miR-205 Docetaxel	Iron oxide nanoplatfoms	Electrostatic interaction	PC3 C4-2	-	Induced apoptosis and Chemosensitization	[112]
	miR-145	SSPEI with R11 peptide coating	Electrostatic interaction	PC3 LNCAP	iv	Impaired tumor growth Enhanced survival	[113]

It = intratumor; iv = intravenous; ip = intraperitoneal; ro = retroorbital; in = intranasal; ced = convection-enhanced delivery; PDX = Patient-Derived Xenografts.

#### 4.2. Liver Cancer

Liver cancer is one of the most common malignancies worldwide and the third leading cause of cancer-associated mortality. It has a poor prognosis due to largely ineffective therapeutic options. Surgical removal or liver transplantation is the only curative treatments

for early-stage HCC, the most frequent type of primary liver cancer [114]. Alterations of miRNAs landscape and their potential as therapeutic targets in liver diseases, including liver metabolism dysregulation, liver fibrosis and liver cancer have been the focus of several reviews [115–117]. Plasma levels of synthetic miRNA antagonists or miRNA mimics distribute broadly after intravenous administration but later accumulate mostly in the liver and kidney and remain high up to 24 h after injection [118]. On the other hand, NPs biodistribution studies have demonstrated that the majority of injected nanomaterials usually accumulate in the liver before undergoing hepatic clearance [119]. This makes liver cancer a good model for testing miRNA-based therapy approaches as this organ can be easily targeted with different delivery systems. Nevertheless, miRNA delivery through NPs to treat HCC has to take into consideration passive and active mechanisms to avoid or delay liver elimination. MiR-122, a highly abundant, liver-specific miRNA that accounts for approximately 70% of the whole hepatic miRNome in humans, was found to be markedly downregulated in HCC. Restoring miR-122 using a lentiviral expression vector in metastatic liver cancer cell lines inhibited migration and invasion in vitro as well as tumorigenesis, angiogenesis, and metastasis in vivo [84]. It was further demonstrated that miR-122 inhibits hepatocellular carcinoma metastasis by modulating ADAM17 (a disintegrin and metalloprotease 17) [84] and cyclin G1 (CCNG1) [120]. Hsu et al. demonstrated that delivery of miR-122 to HCC cells using cationic lipid nanoparticles consisting of 2-dioleoyloxy-*N,N*-dimethyl-3-aminopropane (DODMA), egg phosphatidylcholine, cholesterol, and cholesterol-polyethylene glycol (LNP-DP1) dramatically downregulated miR-122 target genes [85]. In vivo, LNP-DP1-encapsulated miR-122 mimic induced HCC xenografts growth suppression without causing systemic toxicity. MiR-26a is expressed at high levels in normal adult liver but is dramatically downregulated in both human and murine liver tumors. MiR-26a replacement using AAV as delivery vector potently suppressed cancer cell proliferation and activated tumor apoptosis in vivo, leading to marked suppression of tumor growth [45]. It was further shown that miR-26a arrested the cell cycle at G1 phase in human liver cancer cells by downregulating cyclins D2 and E2. MiR-21 is highly overexpressed in HCC [121]. Inhibition of miR-21 in cultured HCC cells increased expression of PTEN tumor suppressor, and decreased tumor cell proliferation, migration, and invasion [122]. Meng et al. investigated poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA)-based nanoparticle for the delivery of anti-miR-221 to HCC cells and tested its therapeutic efficacy in vitro and in vivo [86]. PLGA nanoparticles encapsulating anti-miR-221 suppressed HCC cell growth, colony formation ability, migration, invasion, and impaired tumor growth in mice. Interestingly, Shao et al. developed a combination therapy by encapsulating miR-199a/b-3p mimics and anti-miR-10b into a polymer-based nanopatform PEI- $\beta$ CD@Ad-CDM-PEG (PCACP) to treat HCC. PCACP significantly inhibited HCC cell proliferation and tumor growth by targeting mTOR (mechanistic target of rapamycin), PAK4 (p21-Activated kinase 4), RHOC (Rho-related GTP-binding protein) and epithelial mesenchymal transition (EMT) pathways both in vitro and in vivo [87]. In an elegant study, Sorafenib (SRF), and anti-miR-27a-loaded anti-GPC3 antibody targeted cationic LNPs were developed to treat HepG2 cell xenograft-bearing mice [88]. Combination of SRF and anti-miR-27a (G-S27LN) decreased cell viability and potentiated cell apoptosis compared to SRF alone, suggesting a synergistic anticancer effect. A significant reduction of tumor burden and marked TUNEL positive apoptosis were observed in animals treated with G-S27LN formulation.

#### 4.3. Breast Cancer

As HER-2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) positive breast cancers account for 30% of cases associated with poor prognosis, more attention is being brought to efficiently target this overexpressed receptor. In this context, in vivo studies in mice models of breast cancer have demonstrated that lentiviral delivery of the tumor suppressor miR-125a-5p reduced tumor growth, metastasis, and angiogenesis by directly targeting HDAC4 (Histone deacetylase 4) [123]. Hayward et al. further showed that transfection of miR-125a-5p in hyaluronic acid-coated liposomes indeed knocked down the HER-2



proto-oncogene in 21MT-1 breast cancer cells. This resulted in reduced migratory and proliferative potential due to inactivation of MAPK and PI3K/AKT signaling [89]. Taking into consideration the overexpressed hyaluronic acid (HA) receptors in breast cancer, HA/miRNA nanoparticles hold great promises for targeted clinical approaches. Interestingly, HA-chitosan nanoparticles were used to co-encapsulate doxorubicin and miR-34a. Deng et al. showed that administration of these formulations into nude mice enhanced the response to chemotherapy and decreased cancer cell migration due to inactivation of Notch signaling by miR-34a [90,91]. In a similar approach, Adriamycin uptake by MCF-7 cells was increased when delivered together with anti-miR-21 in PEI graphene oxide carriers [92]. As cancer cells consistently display alterations in multiple microRNAs, combinatorial strategies have been implemented. Indeed, in vivo studies conducted by Yu et al. showed a 58%-reduction in tumor volume when packaging miR-9, miR-21 and miR-145 sponges into PEI-modified magnetic particles [93]. Recently, Panebianco et al. demonstrated that silica nanoparticles (SiO<sub>2</sub>NPs) allowed delivery of miR-34a into mammospheres and mammary tumors [94]. MiR-34a/SiO<sub>2</sub>NPs complexes decreased sphere formation efficiency and reduced tumor growth in mice. The levels of well-known target genes of miR-34a such as NOTCH1 (Notch Receptor 1), Cyclin E2 and c-Myc were significantly reduced, indicating the biological activity of delivered miR-34a.

#### 4.4. Glioblastoma

Despite conventional therapeutic options involving surgery, radiology, and chemotherapy (mainly Temozolomide), glioblastoma (GBM) remains a lethal malignancy with unmet clinical needs. The implementation of the RNA interference technology provided new insights for GBM gene therapy. For example, miR-21 has been recognized as a major oncomiR upregulated in GBM. It contributes to tumorigenesis by directly targeting PTEN, thus blocking expression of key apoptosis-enabling genes such as caspases and p53. MiR-21 overexpression is also associated with drug resistance, hence chemotherapy failure [124,125]. Conversely, the tumor suppressor miR-100 was shown to trigger the p53 network through regulation of the PLK1 (Polo-Like Kinase gene 1) signaling in tumor-initiating cells [126]. Of note, this apoptotic pathway is also activated by the gold-standard GBM treatment, Temozolomide, suggesting a potential chemo-sensitization via miRNA remodeling [127]. In a combined theranostic-chemotherapeutic approach, gold-iron oxide NPs were used to co-deliver miR-100 and anti-miR-21 into GBM xenograft-bearing mice. The carriers were tailored with a GBM cell-targeting T7 peptide and a cyclodextrin-chitosan polymer layer for specific brain targeting [95]. In vivo experiments were carried out by intranasal inhalation of these nanoformulations to bypass the blood-brain barrier. In parallel, a group of mice received systemic doses of temozolomide. Remarkably, mice co-treated with miR-loaded-NPs and temozolomide chemotherapy showed better survival than animals receiving either miR-NPs or chemotherapy alone, or no therapy. Furthermore, given their magnetic resonance property, it was possible to track gold-iron formulations by MRI imaging. Similar results were obtained by intratumor administration of miR-21-inhibiting NPs named PACE (cationic polyamine-co-ester) [96]. As for most solid cancers, miR-34a was also investigated in GBM for its apoptosis-inducing capacities. When complexed in a dendritic polyglycerolamine (dPG-NH<sub>2</sub>) cationic carrier, miR-34a stability was enhanced, thus disabling in vitro proliferation and migration of glioma cell lines via C-MET, CDK6, NOTCH1, and BCL-2 inhibition [97]. In vivo studies revealed reduced tumor burdens upon tail vein injection of dPG-NH<sub>2</sub>-miR-34a polyplexes. Interestingly, the protected miR-34a was able to cross the blood brain barrier with no reported toxicity.

#### 4.5. Endocrine Cancers

With regard to endocrine tissues, miRNAs are indeed relevant players given their hormone-like effects with endocrine, autocrine or paracrine regulatory functions mediating intercellular communication [128]. A reciprocal interplay between hormones and microRNAs has been described: miRNAs can alter hormone metabolism via their binding

to genes coding for hormones, hormone antagonists, enzymes of hormone biosynthesis, or even hormone receptors [129]. Conversely, many hormones were shown to modulate microRNA expression patterns through regulation of miRNA transcription or biogenesis. Understanding these regulatory feedback loops and how they are perturbed in cancer are critical for the development of miR-based therapeutics and biomarkers in endocrine tissues.

#### 4.5.1. Thyroid Cancer

Thyroid carcinoma is the most common form of endocrine cancers. According to the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) registry, thyroid cancers account for 3% of new cancer cases in the US and 0.4% of all cancer deaths with a 2.9-times higher rate in women. Such tumors normally disrupt hormone secretion and are associated with hormone-related complications. Papillary thyroid cancer (PTC) is the most common form of differentiated thyroid neoplasia, which arise from the follicular cells of the thyroid gland. MiRNA profiling in thyroid tumors led to the identification of specific signatures that could be useful for diagnosis and possibly for therapy [130,131]. Among others, miR-146b is highly expressed in PTC and is correlated with pejorative outcome. It was further demonstrated that the tumor suppressor PTEN holds a miR-146 binding site in its 3'-untranslated region. MiR-146b-mediated downregulation of PTEN triggers the PI3K/AKT signaling pathway thus promoting cell proliferation, survival, migration, and invasion. In agreement with these findings, intratumor delivery of miR-146b inhibitors using lipid formulations—namely invivofectamine—suppressed miR-146b-induced aggressiveness in xenograft models [98]. RAS activating mutations have been widely reported in thyroid cancer. Besides their major effects on the global transcription of protein-coding genes, activated RAS proteins have been found to promote the increase of a subset of miRNAs, of which miR-21. Frezzetti et al. showed that LNA-mediated knockdown of miR-21 in RAS-transformed FRTL-5 thyroid cells was able to inhibit markedly the growth of tumor xenografts [99]. The Wnt/ $\beta$  catenin pathway was shown to be activated in PTC as an indirect target of the oncogenic miR-155 [132]. Moreover, miR-155 overexpression in PTC was associated with enhanced survival and colony formation in PTC cell lines. These observations were confirmed in nude mice inoculated with miR-155-transduced TPC-1 cells where larger and highly proliferating tumors were obtained, thus suggesting that silencing miR-155 may be a potential therapeutic strategy for treating PTC. MiRNA replacement therapy has been also conducted in PTC preclinical models. Functional assays by Lianyong et al. showed that miR-204-5p impairs tumor growth through repression of IGF1BP5 (Insulin-like growth factor-binding protein 5). In nude mice, subcutaneous engraftment of human PTC cells stably expressing miR-204-5p induced smaller tumors as compared to controls [100]. In addition to their role in the regulation of cancer hallmarks, miRNAs could also modulate response to adjuvant therapy in thyroid cancer. Approximately 30% of patients with advanced stages of differentiated thyroid cancer are refractory to radioiodine therapy, due to reduced expression of the Sodium Iodide Symporter (NIS) [133]. High levels of miR-146b were shown to disrupt thyroid differentiation and iodide uptake by direct repression of the transcription factor PAX8 and its target gene NIS. Other genes involved in iodide transport mechanisms such as Dehalogenase 1 and Deiodinase 2 are also regulated by miR-146b thus confirming its pivotal role in radioiodine therapy [134]. The authors suggested that miR-146b-3p/PAX8 (Paired box gene 8)/NIS regulatory axis might be a relevant therapeutic target to modulate thyroid cell differentiation and iodide uptake for improved treatment of advanced thyroid cancer. All these important findings are waiting for further exploitation using nanoparticle-based delivery of therapeutic miRNAs in thyroid cancer.

#### 4.5.2. Adrenocortical Cancer

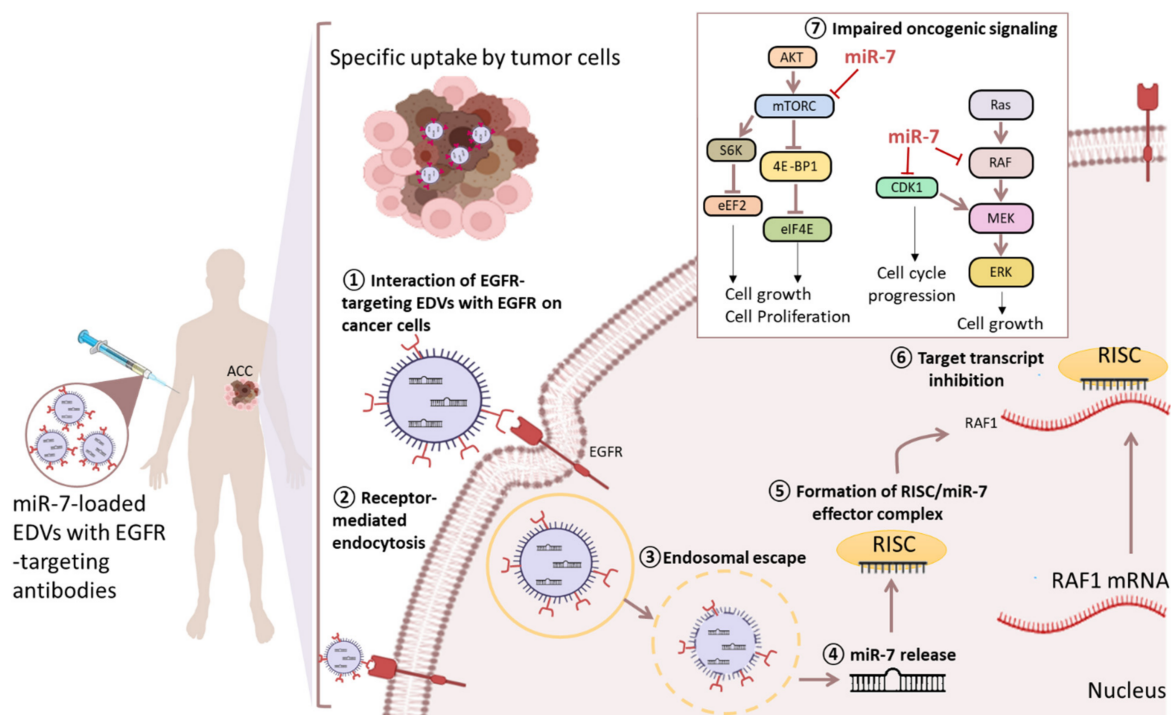
Adrenocortical carcinoma (ACC) is a rare and highly aggressive malignancy (incidence of 4–12 cases per million per year) which develops in the cortex of the adrenal gland. Cortisol hypersecretion, causing rapidly progressive Cushing's syndrome, is the most com-

mon hormone excess in ACC patients. The clinical outcome of ACC is poor, with a 5-year survival ranging from 15 to 35% [135]. About half of the patients presents with advanced disease or develop local recurrence and distant metastasis after surgery. Complete surgical removal of the tumor remains the mainstay treatment option for ACC. Mitotane, the only FDA-approved drug for this cancer, displays some single-agent activity (10–30% tumor response rates) based on its adrenolytic activity, but its broad clinical use is challenged by an unfavorable toxicity profile [136]. Response to combination of mitotane and cisplatin-based chemotherapies do not exceed 20% for patients with advanced ACC, either recurring or metastasizing [137]. Targeted therapies including inhibitors of IGF (Insuline-like Growth Factor)/mTOR pathway, VEGFRs and other tyrosine kinase receptors such as EGFR and FGFR have been largely ineffective as monotherapy. The multiple genomic and molecular alterations reported in ACC (TP53, Wnt/ $\beta$ -catenin, and IGF1R pathways) include extensive deregulations of miRNA expression [138–145]. Among the most frequently deregulated miRNAs in ACC, miR-483, miR-139-5p, miR-503, and miR-210 were found to be upregulated, whereas miR-195 and miR-335 were found to be downregulated [146]. However, miRNA-based therapeutic approaches for ACC are still scarce as most studies focused on the biomarker potential of tumor or circulating miRNAs [146]. A first preclinical approach was performed using the genetically modified bacterial nanocells (EDVs) to deliver systemically the tumor suppressor miR-7 into a human ACC mouse model [101]. Specific tumor homing was ensured by using EGFR-tailored EDVs. MiR-7-loaded nanoparticles could effectively reduce ACC xenograft growth arising from both an ACC cell line and patient-derived xenografts, without any evidence of off-target effects. Mechanistically, this phenotype was mediated by repression of RAF1, mTOR, and CDK1 (Figure 3). As miR-7 replacement therapy acted synergistically with Erlotinib therapy in head and neck cancer [147], it is crucial to assess whether combination of miR-7 and mitotane would have similar effects in ACC. Such was the case of miR-431, which efficiently sensitized ACC cell lines to mitotane and doxorubicin. In fact, miR-431 was 100-fold underexpressed in patients who were resistant to adjuvant therapy, when compared to sensitive ones. Following transfection of the ACC cell line H295R with miR-431 mimics followed by treatment with doxorubicin or mitotane, H295R cells showed reduced proliferation and increased apoptosis. Restoring miR-431 expression could reverse the EMT phenotype as shown by ZEB1 (Zinc finger E-box-binding homeobox 1) transcription factor repression [102]. These findings support a great potential of miRNA therapeutics for ACC alongside clinical trials based on combined chemotherapy [137]. Jung et al. proposed an experimental setup with liposome-encapsulated chemotherapeutics (L-EDP-M etoposide (E), doxorubicin (D), cisplatin (P), and mitotane (M)) in order to minimize unintended targeting [148]. Treatment of the ACC cell line SW-13-derived xenografts in mice induced necrosis and reduction in tumor size. Interestingly, the research group reported an increased expression of circulating miR-210 in the L-EDP-M-responsive animals. Since miR-210 is a frequently described as an oncomiR in ACC, its release from the tumor to the circulation may be valuable for monitoring response to therapy.

#### 4.5.3. Ovarian Cancer

Intensive analysis of the Cancer Genome Atlas (TCGA) data revealed a large panel of miRNA deregulations in the three ovarian cancer (OvCa) subtypes (serous, endometrioid, and clear cell carcinoma). The miR-200 family proved to be of great prognostic value as it gathers five tumor suppressor miRs arising from 2 genomic clusters, namely miR-200b, miR-200a, miR-429, miR-200c, and miR-141 [149]. MiR-200c upregulation is predictive of good prognosis in OvCa. Its overexpression impaired migratory and invasive capacities of SCOV3 cell lines and significantly increased their susceptibility to microtubule-targeting chemotherapeutics, i.e., paclitaxel (PTX) [103]. Animal studies conducted by Mateescu et al. demonstrated that restoring miR-200a and miR-141 favored tumor growth, but simultaneously enhanced chemosensitivity to PTX, which is among the first-line chemotherapy agents used for OvCa [104]. According to the authors, these miRNAs drive a persistent

oxidative stress response through inhibition of p38 $\alpha$ , which is associated with an improved sensitivity to PTX. However, a major drawback of this compound is induction of survival, proliferation, and drug resistance upon activation of the EGFR/ERK pathway. Interestingly, miR-7 was shown to suppress this signaling network, thereby suggesting that combining miR-7 therapy with PTX in nanoparticles could enhance sensitivity to chemotherapy [105]. Indeed, upon intravenous administration, PTX/miR-7 nanoparticles revealed anti-cancer properties in OvCa models through the inhibition of PTX-induced EGFR/ERK pathway. Responsiveness to cisplatin chemotherapy was also improved when liposomal miR-15a and miR-16 were injected in a chemo-resistant orthotopic OvCa mouse model [106]. A reduced tumor burden along with decreased expressions of the BMI1 oncogene, the EMT markers as well as the cisplatin transporter ATP7B were reported in treated mice as compared to negative controls. Peptide modified-porous silicon nanoparticles were used by Bertucci et al. [107] to encapsulate an anti-miR-21 LNA. A tumor specific-peptide CGKRRK was grafted on the surface of the nanocarriers for targeted distribution. Internalization, silencing efficiency, and antitumor activity were firstly determined in cultures of OAW42 OvCa cell lines. In mice bearing subcutaneous xenografts, five doses of anti-miR-21 formulations at 25 mg/kg injected in the tail vein every other day significantly reduced the tumor mass [107]. Another study demonstrated that gold nanoparticles were attractive platforms for anti-miR-21 delivery to OvCa cells as they efficiently silenced endogenous miR-21 and disrupted cell colony formation [108]. Lactic-co-glycolic acid-modified polyethylenimine (LGA-PEI) could successfully transfer miR-520h mimics into ovarian xenograft tumors [150]. Along the same line, miR-155 loaded-PEI nanocomplexes were used for OvCa immunotherapy. While miR-155 was demonstrated to have an immune-stimulatory role [151], it was found underexpressed in OvCa-derived dendritic cells. After intraperitoneal injection, miR-155-PEI were selectively taken up by dendritic cells residing in ovarian tumors, thus boosting anti-cancer immunity and increasing mice survival rates by 65% [109].



**Figure 3.** A proposed model in which miR-7 replacement via EDVs (EnGeneIC Delivery Vehicle) in Adrenocortical Carcinoma could inhibit multiple oncogenic pathways including mTOR, MAPK and CDK1 signaling pathways [70]. mTORC: mammalian target of rapamycin Complex; 4EBP1: eukaryotic translation initiation factor 4E- (eIF4E-) binding protein 1; eIF4E: eukaryotic translation initiation factor 4E; S6K: ribosomal protein S6 kinase; eEF2: eukaryotic elongation factor 2; CDK1: cyclin dependent kinase 1.

#### 4.5.4. Prostate Cancer

The taxanes docetaxel and cabazitaxel remain the standard of care for prostate cancer (PCa). However, drug resistance remains a major issue, which imply the development of new therapeutic strategies. There has been rapidly growing interest in alternative therapeutic molecules such as miRNAs for PCa. For example, systemic injection of miR-34a-enriched-chitosan nanoparticles inhibited prostate tumor growth in subcutaneous xenograft models and prevented bone metastasis [110]. Besides downregulation of its target genes including MET, Axl, and c-Myc, nanoparticle-mediated restoration of miR-34a expression in PC3 cells induced apoptosis and autophagy, and decreased PC3 cell proliferation, invasion, and migration [110]. MiR-221 is one of the most studied oncogenic miRNA in prostate cancer. By inducing p27 cell cycle checkpoint arrest, miR-221 supports uncontrolled proliferation, hence cancer expansion. Moreover, high circulating levels of miR-221 were detected in patients with PCa. This has led Farina et al. to propose a therapeutic approach consisting of miR-221 inhibitor encapsulation into mesoporous silica nanoparticles (MSN) [111]. MSN are biocompatible nanoparticles with a high molecular loading capacity and a possible controlled release of payload. MiR-221 mimic-loaded MSN were successfully delivered to PC3 cell lines where they recapitulated the biological effects of miR-221 [111]. The anti-tumor function of miR-205 was highlighted in prostate cancer using magnetic iron oxide core nanoparticles coated with PEG-PEI layers [112]. MiR-205 nanoplatforms were internalized into PC3 and C4-2 cells as measured by flow cytometry analysis. Western blot analysis revealed an important induction of pro-apoptotic proteins such as cleaved PARP and cleaved Caspase 3 after treatment with miR-205-nanoparticles and Docetaxel. Globally, these formulations reversed cancer hallmarks with a marked anti-migratory and anti-invasive effects as well as chemo-sensitization in vitro [112]. An original approach based on the combination of chemically modified PEI (disulfide linkage in the branched PEI or SSPEI) with the cell permeable peptide R11 (R11-SSPEI nanocarriers) was set up by Zhang et al. [113]. Taking advantage of R11 specific uptake by prostate cancer cells in vivo, they demonstrated that R11-SSPEI nanomaterials were able to deliver miR-145 in intraperitoneal prostate cancer models [113]. Northern blotting of tumor tissue after three weeks of treatment revealed a substantial increase of miR-145 levels in the treated group, thus underscoring the excellent transfection efficiency of PEI formulations. Importantly, MiR-145 overexpression significantly impaired tumor growth and prolonged mice survival.

#### 5. Challenges in the Clinical Translation of miRNA Therapeutics

More than fifty therapeutic siRNA programs have entered clinical trials in the past decade (phase I, II, and III) [152]. Patisiran and givosiran (Alnylam Pharmaceuticals), two siRNA-based drugs, were approved by the Food and Drug Administration in 2018 and 2019 for hereditary transthyretin-mediated amyloidosis and acute hepatic porphyria, respectively [153,154]. About fifteen phase I-, II-, and III-programs based on siRNA drugs are dedicated to the treatment of diverse cancer types [152]. Despite such successes in clinical development, several clinical trials have been discontinued, indicating that there are still several challenges to overcome before the clinical application of RNAi-based therapies becomes widespread. These challenges are even more significant for miRNA-based therapies.

So far, only 10 miRNA-based drugs have reached clinical trials with none of them entering Phase III and half of them were halted. MiRNA-based therapy programs for cancer treatment are mainly driven by four biopharmaceutical companies, including miRagen Therapeutics (Boulder, CO, USA), Regulus therapeutics (San Diego, CA, USA), Mirna Therapeutics Inc. (Carlsbad, CA, USA) and EnGeneIC (Sydney, Australia). MiRagen Therapeutics is performing clinical trials of MRG-106 (Cobomarsen, an inhibitor of miR-155) for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma, chronic lymphocytic leukemia, diffuse large B-cell lymphoma, and adult T-cell leukemia/lymphoma (NCT02580552, NCT03713320). EnGeneIC is currently testing TargomiRs as 2nd or 3rd Line Treatment for patients with

recurrent malignant pleural mesothelioma and non-small cell lung cancer (NCT02369198). The first miRNA-based drug entering clinical trials was Miravirsen, an antagomiR targeting miR-122, as a therapy against Hepatitis C Virus (HCV) infections (Santaris Pharma, Roche Pharmaceuticals). Miravirsen showed a strong efficacy by reducing viremia in patients with HCV [155–157] and underwent multiple phase II clinical trials (NCT01200420, NCT01872936, NCT02031133, NCT02508090). Regulus Therapeutics developed another miR-122 inhibitor, RG-101, an *N*-acetyl-D-galactosamine-conjugated antagomiR which showed considerable efficacy in patients with HCV. However, some serious adverse events of severe hyperbilirubinemia led the FDA to suspend the trial. MRX34, a first-in-class cancer therapy developed by miRNA Therapeutics was delivered as a mimic of miR-34 encapsulated into a liposome-formulated nanoparticle (NOV40). MRX34 displayed a strong activity in melanoma, hepatocellular carcinoma, NSCLC, and renal carcinoma (NCT01829971). Unfortunately, miRNA Therapeutics halted the phase I due to multiple immune-related severe adverse events. These successive failures indicate that miRNA-based therapies are still awaiting their Eureka moment.

Delivery systems and administration routes, dosage concerns and off-target effects remain major challenges to be overcome for the development of miRNA-based therapies for cancer and other diseases. Despite a great number of preclinical studies in mouse models of cancer, only a very small number of miRNA candidates have reached clinical development so far. Performing rigorous pharmacokinetics (absorption, distribution, metabolism, and excretion or ADME) studies in animals will provide a basis for anticipating how miRNA mimics/antimiRs will behave in humans. As detailed earlier, nanotechnologies provided versatile platforms for safe biomolecule delivery (polymers, lipid compounds, inorganic nanomaterial). Nanoparticle-based delivery of miRNA aims to increase therapeutic efficacy, decrease the effective dose, and/or reduce the risk of systemic side effects. However, most of these systems have yet to reach their testing in humans. Hence, the challenge is to establish functional, yet biocompatible carrier systems for miRNA therapy. Indeed, nanoparticles are potent reservoirs in which molecular cargo can be particularly enriched. Due to their synthetic malleability, polymeric biomaterials are tailored for specific applications with surface functionalization, high active payload, and minimized toxicity. MiRNA mimics or inhibitors could be therefore shielded from the injection site to the targeted area. This mechanism mirrors the natural shielding of endogenous miRNAs by extracellular vesicles such as exosomes. However, the applicability of nanocarrier formulations for drug administration depends on several parameters including their average diameter and their polydispersity index. Controlling and validating these parameters are of major importance for nanoparticle circulating time, biodistribution and cellular uptake with a view of their effective clinical applications. Other parameters related to charge, shape, surface chemistry, and clearance are also key determinants for nanoparticle fate. Integration of miRNAs, coatings and targeting agents into a single nanocarrier requires multiple steps in the production process. These structural and physicochemical complexities contribute certainly to the slow rates in clinical translation since they hamper large-scale manufacturing by the pharmaceutical industry. Simplification in the design of nanoparticles should allow efficient and reproducible large-scale manufacturing. The EPR effect of nanoparticles in tumors has long stood as an important driver of cancer nanomedicine. However, the reliability of the EPR effect in human patients have been recently debated as the extent of nanocarriers accumulation varies profoundly between patients and tumor types [158]. The mechanism by which nanoparticles enter solid tumors appears more complex than previously thought and probably involves active trans-endothelial pathways [159]. The EPR-dependent drug delivery is compromised by high tumor interstitial fluid pressure and poor blood flow inside human tumors. Despite nanoparticle stabilization and surface manipulations, perfect tumor targeting is not yet achieved [160]. Liver and spleen remain the first accumulation sites for nanoparticles due in part to their fenestrated endothelium. Thus, these organs are major barriers to clinical translation of nanomaterials adminis-

tered intravenously [161]. Understanding the mechanisms behind this accumulation more extensively will help develop new strategies for tumor targeting and liver or spleen escape.

Dosage concerns must be addressed before introduction of miRNA therapeutics into the clinic because an overdose of miRNA mimics/antimiRs may amplify off-target adverse effects, non-specific immune responses, and toxicities. Dose finding in miRNA therapy studies is complex because exposing patients to either a non-active dose or a potentially toxic dose is not ethical. The initial dose for a phase I/II trial is extrapolated from preclinical animal and cell studies to humans. Several variables should be accounted for, including the differences in size and volume between animal and human organs and the spread of the volume delivered. This further underlines the importance of proper dose-range finding studies in large animal models (such as non-human primates) to fill the gap between preclinical research in mouse cancer models and clinical research in cancer patients. In addition, administration routes of oligonucleotide drugs are still problematic since they are prone to nuclease digestion with a bloodstream half-life of only a few minutes. Currently, miRNA mimics/antimiRs can only be administered through intravenous or subcutaneous routes. The development for oral delivery vehicles will be a key step in advancing this class of drugs to clinical use in patients. Most commercial miRNA mimics/antimiRs undergo different chemical modifications or length changes to increase their stability, which may introduce variations in their activity, pharmacokinetics, and biodistribution. Thus, it is important to characterize each candidate miRNA drug and to evaluate the impact of its specific modifications in early stage of preclinical evaluation. Information on the half-life of the miRNA mimics/antimiRs and the turnover rate of the miRNA targets is mandatory to determine dosing and dosing schedules. For example, measurement of the rate of clearance of antimiRs would allow to replace only the miRNA molecules that are cleared or those required to sequester newly synthesized miRNAs. Defining the doses required to achieve total endogenous miRNA sequestration with antimiRs or endogenous physiological miRNA concentration with miRNA mimics is a key stage of nonclinical toxicity and pharmacokinetic studies. The selected concentration of miRNA mimics/antimiRs should completely silence or upregulate a limited number of target mRNAs in a cell. Any antimiR given in excess of the dose required to fully sequester the available miRNA target will produce non-target-related effects. For example, earlier work showed that LNA-modified anti-miR-122 oligonucleotides could upregulate miR-122 target aldolase A in non-human primates at much lower dose of 1–25 mg/kg [162], compared to the previously reported dose of 120–240 mg/kg of cholesterol-conjugated oligonucleotides in mice [163]. It is reasonable to expect that solving miRNA-dosing issues will be also facilitated by continuous improvement in miRNA target prediction tools and validations of true miRNA targets. Interestingly, Zhang et al. [152] recently analyzed the reasons for the delayed development of miRNA-based therapies compared to siRNA-based therapies. Combining clinical trial information [164], Drugs@FDA database, target prediction softwares and gene ontology enrichment tools allowed them to conclude that the serious immune-related adverse events that led to the discontinuation of MRX34 were due to a “too many targets for miRNA effect” (TMTME) on several genes involved in cytokine and interleukin signaling in the immune system [152]. A combination of tissue specific knockout mouse models and advanced molecular biology techniques will allow us to determine miRNAs target-selectivity and will help us to define the specific contribution of a single miRNA in controlling a biological pathway and gene network in different tissues. This will have major implications for the design of dosage for clinical trials to minimize ineffective and potentially toxic over exposures.

Another challenge is the current regulatory gap for both nanomedicines and RNAi-driven therapies, including miRNA-based therapies [165]. The lack of clear regulatory and safety guidelines for quality control and safety has delayed the development of these products toward effective clinical translation. The increased number of novel polymeric nanomaterials, complex polymeric-based nanoformulations and chemical modifications require appropriate regulatory rules to help in miRNA drug assessment (good manufacturing

practices, production process, and quality controls). Simplification in formulation design could be a key step in the evaluation by regulatory authorities. On the other hand, the cost–benefit ratio is another limitation to the clinical translation of miRNA-based therapies when compared to existing anti-cancer therapies, due to the high cost of both miRNA biology products and emerging nanocarriers, which are more complex in structure and more expensive than conventional drugs [166]. The fact that the healthcare system is different in each country is a threat for pharmaceutical companies who want to invest at the international level. The decrease of financial resources and the lack of socio-economic validation studies may neutralize innovative advances. This means that only developed countries will be able to advance miRNA-based therapy programs in the forthcoming years. Among all the countries, North America is expected to remain at the forefront and hold the highest position in the global miRNA market. In the USA, this is attributable to the increasing miRNA clinical trials launched to develop advanced therapeutic solutions. In Europe, growing government funding for the startups for R&D activities to develop novel miRNA-based therapies might allow the region to hold the second position in the market.

## 6. Conclusions

The pleiotropic action of miRNAs suggests that targeting these molecules could efficiently reverse phenotypes of multifactorial pathologies like cancer. As they are short-sequence molecules naturally produced by the cell, miRNA inhibition or replacement are relatively easy and hold great promises for clinical translation [156,167]. The power of Systems biology will allow a better understanding of the high complexity of miRNA-mediated gene regulatory networks and hence, a better evaluation of the therapeutic value of miRNA drugs. The relevance of miRNAs as anti-cancer agents is supported by 11,439 studies referenced in Pubmed under the search terms “microRNA” AND “cancer therapy”. The field of nanotechnology is now mature enough to envisage reproducible scale-up for potential clinical studies in the next few years. Messenger RNA-based anti-Covid-19 vaccines are a groundbreaking innovation in nanomedicine and a huge scientific achievement in a very short period of time that could help some of the most promising miRNA nanocarriers to reach the market [168]. Moreover, regulatory authorities gained awareness of nanoparticle use for drug delivery given that several liposomal drugs are now on the market, directly paving the way for miRNA therapeutics to the clinics.

**Author Contributions:** Writing—original draft preparation, S.R.E.S. and N.C.; writing—review and editing, N.C., L.G., O.C., J.C. and J.D.; supervision, N.C.; funding acquisition, N.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Ligue Nationale Contre le Cancer to N.C. (Comités Loire et Isère, R16167CC and R19013CC) and S.R.E.S. (LNCC), the Cancéropôle Rhône-Alpes Auvergne CLARA Oncostarter to NC (CVP-PRCAN000183) and the Institut National du Cancer to N.C. (INCA-DGOS-8663, COM-ETE-TACTIC). This work has been performed in a laboratory receiving support from the GRAL LabEX (ANR-10-LABX-49-01) within the frame of the CBH-EUR-GS (ANR-17-EURE-0003).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Ambros, V. The functions of animal microRNAs. *Nature* **2004**, *431*, 350–355. [[CrossRef](#)]
2. Ha, M.; Kim, V.N. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2014**, *15*, 509–524. [[CrossRef](#)]
3. Leichter, A.L.; Sullivan, M.J.; Eccles, M.R.; Chatterjee, A. MicroRNA expression patterns and signalling pathways in the development and progression of childhood solid tumours. *Mol. Cancer* **2017**, *16*, 15. [[CrossRef](#)]
4. Guo, Z.; Maki, M.; Ding, R.; Yang, Y.; Zhang, B.; Xiong, L. Genome-wide survey of tissue-specific microRNA and transcription factor regulatory networks in 12 tissues. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 5150. [[CrossRef](#)]
5. Calin, G.A.; Dumitru, C.D.; Shimizu, M.; Bichi, R.; Zupo, S.; Noch, E.; Aldler, H.; Rattan, S.; Keating, M.; Rai, K.; et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 15524–15529. [[CrossRef](#)]
6. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674. [[CrossRef](#)]



7. Hata, A.; Kashima, R. Dysregulation of microRNA biogenesis machinery in cancer. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2016**, *51*, 121–134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Lin, S.; Gregory, R.I. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2015**, *15*, 321–333. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Du, R.; Sun, W.; Xia, L.; Zhao, A.; Yu, Y.; Zhao, L.; Wang, H.; Huang, C.; Sun, S. Hypoxia-induced down-regulation of microRNA-34a promotes EMT by targeting the Notch signaling pathway in tubular epithelial cells. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e30771. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Calin, G.A.; Croce, C.M. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 857–866. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Rupaimoole, R.; Calin, G.A.; Lopez-Berestein, G.; Sood, A.K. miRNA Deregulation in Cancer Cells and the Tumor Microenvironment. *Cancer Discov.* **2016**, *6*, 235–246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Li, H.; Yang, B.B. Friend or foe: The role of microRNA in chemotherapy resistance. *Acta Pharmacol. Sin.* **2013**, *34*, 870–879. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Si, W.; Shen, J.; Zheng, H.; Fan, W. The role and mechanisms of action of microRNAs in cancer drug resistance. *Clin. Epigenet.* **2019**, *11*, 25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Yang, T.; Zheng, Z.M.; Li, X.N.; Li, Z.F.; Wang, Y.; Geng, Y.F.; Bai, L.; Zhang, X.B. MiR-223 modulates multidrug resistance via downregulation of ABCB1 in hepatocellular carcinoma cells. *Exp. Biol. Med.* **2013**, *238*, 1024–1032. [[CrossRef](#)]
15. Bao, L.; Hazari, S.; Mehra, S.; Kaushal, D.; Moroz, K.; Dash, S. Increased expression of P-glycoprotein and doxorubicin chemoresistance of metastatic breast cancer is regulated by miR-298. *Am. J. Pathol.* **2012**, *180*, 2490–2503. [[CrossRef](#)]
16. Kaehler, M.; Ruemenapp, J.; Gonnermann, D.; Nagel, I.; Bruhn, O.; Haenisch, S.; Ammerpohl, O.; Wesch, D.; Cascorbi, I.; Bruckmueller, H. MicroRNA-212/ABCG2-axis contributes to development of imatinib-resistance in leukemic cells. *Oncotarget* **2017**, *8*, 92018–92031. [[CrossRef](#)]
17. Ning, F.L.; Wang, F.; Li, M.L.; Yu, Z.S.; Hao, Y.Z.; Chen, S.S. MicroRNA-182 modulates chemosensitivity of human non-small cell lung cancer to cisplatin by targeting PDCD4. *Diagn. Pathol.* **2014**, *9*, 143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Lei, L.; Huang, Y.; Gong, W. miR-205 promotes the growth, metastasis and chemoresistance of NSCLC cells by targeting PTEN. *Oncol. Rep.* **2013**, *30*, 2897–2902. [[CrossRef](#)]
19. Levy, J.M.M.; Towers, C.G.; Thorburn, A. Targeting autophagy in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2017**, *17*, 528–542. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Zou, Z.; Wu, L.; Ding, H.; Wang, Y.; Zhang, Y.; Chen, X.; Chen, X.; Zhang, C.Y.; Zhang, Q.; Zen, K. MicroRNA-30a sensitizes tumor cells to cis-platinum via suppressing beclin 1-mediated autophagy. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 4148–4156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Tsuchiya, Y.; Nakajima, M.; Takagi, S.; Taniya, T.; Yokoi, T. MicroRNA Regulates the Expression of Human Cytochrome P450 1B1. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 9090–9098. [[CrossRef](#)]
22. Choi, Y.M.; An, S.; Lee, E.M.; Kim, K.; Choi, S.J.; Kim, J.S.; Jang, H.H.; An, I.S.; Bae, S. CYP1A1 is a target of miR-892a-mediated post-transcriptional repression. *Int. J. Oncol.* **2012**, *41*, 331–336. [[PubMed](#)]
23. Ling, H.; Fabbri, M.; Calin, G.A. MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2013**, *12*, 847–865. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Shah, M.Y.; Ferrajoli, A.; Sood, A.K.; Lopez-Berestein, G.; Calin, G.A. microRNA Therapeutics in Cancer—An Emerging Concept. *EBioMedicine* **2016**, *12*, 34–42. [[CrossRef](#)]
25. Hanna, J.; Hossain, G.S.; Kocerha, J. The Potential for microRNA Therapeutics and Clinical Research. *Front. Genet.* **2019**, *10*, 478. [[CrossRef](#)]
26. Rupaimoole, R.; Slack, F.J. MicroRNA therapeutics: Towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16*, 203–222. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Shu, J.; e Silva, B.V.R.; Gao, T.; Xu, Z.; Cui, J. Dynamic and Modularized MicroRNA Regulation and Its Implication in Human Cancers. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 13356. [[CrossRef](#)]
28. Berindan-Neagoe, I.; Monroig Pdel, C.; Pasculli, B.; Calin, G.A. MicroRNAome genome: A treasure for cancer diagnosis and therapy. *CA Cancer J. Clin.* **2014**, *64*, 311–336. [[CrossRef](#)]
29. Mattes, J.; Collison, A.; Foster, P.S. Emerging role of microRNAs in disease pathogenesis and strategies for therapeutic modulation. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **2008**, *10*, 150–157.
30. Aquino-Jarquín, G. Emerging Role of CRISPR/Cas9 Technology for MicroRNAs Editing in Cancer Research. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 6812–6817. [[CrossRef](#)]
31. Ebert, M.S.; Sharp, P.A. MicroRNA sponges: Progress and possibilities. *RNA* **2010**, *16*, 2043–2050. [[CrossRef](#)]
32. Simonson, B.; Das, S. MicroRNA Therapeutics: The Next Magic Bullet? *Mini Rev. Med. Chem.* **2015**, *15*, 467–474. [[CrossRef](#)]
33. Ma, L.; Young, J.; Prabhala, H.; Pan, E.; Mestdagh, P.; Muth, D.; Teruya-Feldstein, J.; Reinhardt, F.; Onder, T.T.; Valastyan, S.; et al. miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Nat. Cell Biol.* **2010**, *12*, 247–256. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Yoshino, H.; Yonemori, M.; Miyamoto, K.; Tatarano, S.; Kofuji, S.; Nohata, N.; Nakagawa, M.; Enokida, H. microRNA-210-3p depletion by CRISPR/Cas9 promoted tumorigenesis through revival of TWIST1 in renal cell carcinoma. *Oncotarget* **2017**, *8*, 20881–20894. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Bader, A.G.; Brown, D.; Winkler, M. The promise of microRNA replacement therapy. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 7027–7030. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

36. Johnson, C.D.; Esquela-Kerscher, A.; Stefani, G.; Byrom, M.; Kelnar, K.; Ovcharenko, D.; Wilson, M.; Wang, X.; Shelton, J.; Shingara, J.; et al. The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 7713–7722. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Kumar, M.S.; Erkeland, S.J.; Pester, R.E.; Chen, C.Y.; Ebert, M.S.; Sharp, P.A.; Jacks, T. Suppression of non-small cell lung tumor development by the let-7 microRNA family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 3903–3908. [[CrossRef](#)]
38. He, L.; He, X.; Lowe, S.W.; Hannon, G.J. microRNAs join the p53 network—another piece in the tumour-suppression puzzle. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 819–822. [[CrossRef](#)]
39. Chaudhary, V.; Jangra, S.; Yadav, N.R. Nanotechnology based approaches for detection and delivery of microRNA in healthcare and crop protection. *J. Nanobiotechnol.* **2018**, *16*, 40. [[CrossRef](#)]
40. Juliano, R.; Bauman, J.; Kang, H.; Ming, X. Biological barriers to therapy with antisense and siRNA oligonucleotides. *Mol. Pharm.* **2009**, *6*, 686–695. [[CrossRef](#)]
41. Danhier, F.; Feron, O.; Pr at, V. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *J. Control Release* **2010**, *148*, 135–146. [[CrossRef](#)]
42. Shi, J.; Kantoff, P.W.; Wooster, R.; Farokhzad, O.C. Cancer nanomedicine: Progress, challenges and opportunities. *Nat. Rev. Cancer* **2017**, *17*, 20–37. [[CrossRef](#)]
43. Fu, Y.; Chen, J.; Huang, Z. Recent progress in microRNA-based delivery systems for the treatment of human disease. *ExRNA* **2019**, *1*, 24. [[CrossRef](#)]
44. Kasar, S.; Salerno, E.; Yuan, Y.; Underbayev, C.; Vollenweider, D.; Laurindo, M.F.; Fernandes, H.; Bonci, D.; Addario, A.; Mazzella, F.; et al. Systemic in vivo lentiviral delivery of miR-15a/16 reduces malignancy in the NZB de novo mouse model of chronic lymphocytic leukemia. *Genes Immun.* **2012**, *13*, 109–119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Kota, J.; Chivukula, R.R.; O’Donnell, K.A.; Wentzel, E.A.; Montgomery, C.L.; Hwang, H.W.; Chang, T.C.; Vivekanandan, P.; Torbenson, M.; Clark, K.R.; et al. Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. *Cell* **2009**, *137*, 1005–1017. [[CrossRef](#)]
46. Boussif, O.; Lezoualc’h, F.; Zanta, M.A.; Mergny, M.D.; Scherman, D.; Demeneix, B.; Behr, J.P. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: Polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 7297–7301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Ibrahim, A.F.; Weirauch, U.; Thomas, M.; Gr unweller, A.; Hartmann, R.K.; Aigner, A. MicroRNA replacement therapy for miR-145 and miR-33a is efficacious in a model of colon carcinoma. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 5214–5224. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Cosco, D.; Cilirzo, F.; Maiuolo, J.; Federico, C.; Di Martino, M.T.; Cristiano, M.C.; Tassone, P.; Fresta, M.; Paolino, D. Delivery of miR-34a by chitosan/PLGA nanoplexes for the anticancer treatment of multiple myeloma. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 17579. [[CrossRef](#)]
49. Zhang, L.; Lyer, A.K.; Yang, X.; Kobayashi, E.; Guo, Y.; Mankin, H.; Hornicek, F.J.; Amiji, M.M.; Duan, Z. Polymeric nanoparticle-based delivery of microRNA-199a-3p inhibits proliferation and growth of osteosarcoma cells. *Int. J. Nanomed.* **2015**, *10*, 2913–2924.
50. Layek, B.; Singh, J. N-hexanoyl, N-octanoyl and N-decanoyl chitosans: Binding affinity, cell uptake, and transfection. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *89*, 403–410. [[CrossRef](#)]
51. Ding, Y.; Jiang, Z.; Saha, K.; Kim, C.S.; Kim, S.T.; Landis, R.F.; Rotello, V.M. Gold nanoparticles for nucleic acid delivery. *Mol. Ther.* **2014**, *22*, 1075–1083. [[CrossRef](#)]
52. Ekin, A.; Karatas, O.F.; Culha, M.; Ozen, M. Designing a gold nanoparticle-based nanocarrier for microRNA transfection into the prostate and breast cancer cells. *J. Gene Med.* **2014**, *16*, 331–335. [[CrossRef](#)]
53. Ghosh, R.; Singh, L.C.; Shohet, J.M.; Gunaratne, P.H. A gold nanoparticle platform for the delivery of functional microRNAs into cancer cells. *Biomaterials* **2013**, *34*, 807–816. [[CrossRef](#)]
54. Pugazhendhi, A.; Edison, T.; Karuppusamy, I.; Kathirvel, B. Inorganic nanoparticles: A potential cancer therapy for human welfare. *Int. J. Pharm.* **2018**, *539*, 104–111. [[CrossRef](#)]
55. Zhang, Y.; Wang, Z.; Gemeinhart, R.A. Progress in microRNA delivery. *J. Control Release* **2013**, *172*, 962–974. [[CrossRef](#)]
56. Tivnan, A.; Orr, W.S.; Gubala, V.; Nooney, R.; Williams, D.E.; McDonagh, C.; Prenter, S.; Harvey, H.; Domingo-Fern andez, R.; Bray, I.M.; et al. Inhibition of neuroblastoma tumor growth by targeted delivery of microRNA-34a using anti-disialoganglioside GD2 coated nanoparticles. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e38129. [[CrossRef](#)]
57. Scheideler, M.; Vidakovic, I.; Prassl, R. Lipid nanocarriers for microRNA delivery. *Chem. Phys. Lipids* **2020**, *226*, 104837. [[CrossRef](#)]
58. Cheng, X.; Lee, R.J. The role of helper lipids in lipid nanoparticles (LNPs) designed for oligonucleotide delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *99*, 129–137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Hong, C.A.; Nam, Y.S. Functional nanostructures for effective delivery of small interfering RNA therapeutics. *Theranostics* **2014**, *4*, 1211–1232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Hosokawa, S.; Tagawa, T.; Niki, H.; Hirakawa, Y.; Ito, N.; Nohga, K.; Nagaike, K. Establishment and evaluation of cancer-specific human monoclonal antibody GAH for targeting chemotherapy using immunoliposomes. *Hybrid Hybridomics* **2004**, *23*, 109–120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Matsumura, Y.; Gotoh, M.; Muro, K.; Yamada, Y.; Shirao, K.; Shimada, Y.; Okuwa, M.; Matsumoto, S.; Miyata, Y.; Ohkura, H.; et al. Phase I and pharmacokinetic study of MCC-465, a doxorubicin (DXR) encapsulated in PEG immunoliposome, in patients with metastatic stomach cancer. *Ann. Oncol.* **2004**, *15*, 517–525. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Yang, G.; Yin, B. Therapeutic effects of long-circulating miR-135a-containing cationic immunoliposomes against gallbladder carcinoma. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 5982. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

63. Wang, F.; Sun, Y.; Shi, J. Programmed death-ligand 1 monoclonal antibody-linked immunoliposomes for synergistic efficacy of miR-130a and oxaliplatin in gastric cancers. *Nanomedicine* **2019**, *14*, 1729–1744. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Kaur, I.P.; Bhandari, R.; Bhandari, S.; Kakkar, V. Potential of solid lipid nanoparticles in brain targeting. *J. Control Release* **2008**, *127*, 97–109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Shi, S.; Han, L.; Deng, L.; Zhang, Y.; Shen, H.; Gong, T.; Zhang, Z.; Sun, X. Dual drugs (microRNA-34a and paclitaxel)-loaded functional solid lipid nanoparticles for synergistic cancer cell suppression. *J. Control Release* **2014**, *194*, 228–237. [[CrossRef](#)]
66. Küçüktürkmen, B.; Bozkır, A. Development and characterization of cationic solid lipid nanoparticles for co-delivery of pemetrexed and miR-21 antisense oligonucleotide to glioblastoma cells. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2018**, *44*, 306–315. [[CrossRef](#)]
67. Yousefpour Marzbali, M.; Yari Khosroushahi, A. Polymeric micelles as mighty nanocarriers for cancer gene therapy: A review. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2017**, *79*, 637–649. [[CrossRef](#)]
68. Mittal, A.; Chitkara, D.; Behrman, S.W.; Mahato, R.I. Efficacy of gemcitabine conjugated and miRNA-205 complexed micelles for treatment of advanced pancreatic cancer. *Biomaterials* **2014**, *35*, 7077–7087. [[CrossRef](#)]
69. Taylor, K.; Howard, C.B.; Jones, M.L.; Sedliarou, I.; MacDiarmid, J.; Brahmabhatt, H.; Munro, T.P.; Mahler, S.M. Nanocell targeting using engineered bispecific antibodies. *MAbs* **2015**, *7*, 53–65. [[CrossRef](#)]
70. MacDiarmid, J.A.; Mugridge, N.B.; Weiss, J.C.; Phillips, L.; Burn, A.L.; Paulin, R.P.; Haasdyk, J.E.; Dickson, K.A.; Brahmabhatt, V.N.; Pattison, S.T.; et al. Bacterially derived 400 nm particles for encapsulation and cancer cell targeting of chemotherapeutics. *Cancer Cell* **2007**, *11*, 431–445. [[CrossRef](#)]
71. MacDiarmid, J.A.; Madrid-Weiss, J.; Amaro-Mugridge, N.B.; Phillips, L.; Brahmabhatt, H. Bacterially-derived nanocells for tumor-targeted delivery of chemotherapeutics and cell cycle inhibitors. *Cell Cycle* **2007**, *6*, 2099–2105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Reid, G.; Pel, M.E.; Kirschner, M.B.; Cheng, Y.Y.; Mugridge, N.; Weiss, J.; Williams, M.; Wright, C.; Edelman, J.J.; Valley, M.P.; et al. Restoring expression of miR-16: A novel approach to therapy for malignant pleural mesothelioma. *Ann. Oncol.* **2013**, *24*, 3128–3135. [[CrossRef](#)]
73. Luan, X.; Sansanaphongpricha, K.; Myers, I.; Chen, H.; Yuan, H.; Sun, D. Engineering exosomes as refined biological nanoplat-forms for drug delivery. *Acta Pharmacol. Sin.* **2017**, *38*, 754–763. [[CrossRef](#)]
74. Vazquez-Rios, A.J.; Molina-Crespo, A.; Bouzo, B.L.; Lopez-Lopez, R.; Moreno-Bueno, G.; de la Fuente, M. Exosome-mimetic nanoplat-forms for targeted cancer drug delivery. *J. Nanobiotechnol.* **2019**, *17*, 85. [[CrossRef](#)]
75. Bonneau, E.; Neveu, B.; Kostantin, E.; Tsongalis, G.J.; De Guire, V. How close are miRNAs from clinical practice? A perspective on the diagnostic and therapeutic market. *EJIFCC* **2019**, *30*, 114–127. [[PubMed](#)]
76. Li, Y.L.; Liu, X.M.; Zhang, C.Y.; Zhou, J.B.; Shao, Y.; Liang, C.; Wang, H.M.; Hua, Z.Y.; Lu, S.D.; Ma, Z.L. MicroRNA-34a/EGFR axis plays pivotal roles in lung tumorigenesis. *Oncogenesis* **2017**, *6*, e372. [[CrossRef](#)]
77. Wiggins, J.F.; Ruffino, L.; Kelnar, K.; Omotola, M.; Patrawala, L.; Brown, D.; Bader, A.G. Development of a lung cancer therapeutic based on the tumor suppressor microRNA-34. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 5923–5930. [[CrossRef](#)]
78. Kasinski, A.L.; Kelnar, K.; Stahlhut, C.; Orellana, E.; Zhao, J.; Shimer, E.; Dysart, S.; Chen, X.; Bader, A.G.; Slack, F.J. A combinatorial microRNA therapeutics approach to suppressing non-small cell lung cancer. *Oncogene* **2015**, *34*, 3547–3555. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Cortez, M.A.; Valdecana, D.; Zhang, X.; Zhan, Y.; Bhardwaj, V.; Calin, G.A.; Komaki, R.; Giri, D.K.; Quini, C.C.; Wolfe, T.; et al. Therapeutic delivery of miR-200c enhances radiosensitivity in lung cancer. *Mol. Ther.* **2014**, *22*, 1494–1503. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Beg, M.S.; Brenner, A.J.; Sachdev, J.; Borad, M.; Kang, Y.K.; Stoudemire, J.; Smith, S.; Bader, A.G.; Kim, S.; Hong, D.S. Phase I study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, administered twice weekly in patients with advanced solid tumors. *Investig. New Drugs* **2017**, *35*, 180–188. [[CrossRef](#)]
81. Hong, D.S.; Kang, Y.K.; Borad, M.; Sachdev, J.; Ejadi, S.; Lim, H.Y.; Brenner, A.J.; Park, K.; Lee, J.L.; Kim, T.Y.; et al. Phase 1 study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, in patients with advanced solid tumours. *Br. J. Cancer* **2020**, *122*, 1630–1637. [[CrossRef](#)]
82. Wu, Y.; Crawford, M.; Mao, Y.; Lee, R.J.; Davis, I.C.; Elton, T.S.; Lee, L.J.; Nana-Sinkam, S.P. Therapeutic Delivery of MicroRNA-29b by Cationic Lipoplexes for Lung Cancer. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2013**, *2*, e84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. van Zandwijk, N.; Pavlakis, N.; Kao, S.C.; Linton, A.; Boyer, M.J.; Clarke, S.; Huynh, Y.; Chrzanowska, A.; Fullham, M.J.; Bailey, D.L.; et al. Safety and activity of microRNA-loaded minicells in patients with recurrent malignant pleural mesothelioma: A first-in-man, phase 1, open-label, dose-escalation study. *Lancet Oncol.* **2017**, *18*, 1386–1396. [[CrossRef](#)]
84. Tsai, W.C.; Hsu, P.W.; Lai, T.C.; Chau, G.Y.; Lin, C.W.; Chen, C.M.; Lin, C.D.; Liao, Y.L.; Wang, J.L.; Chau, Y.P.; et al. MicroRNA-122, a tumor suppressor microRNA that regulates intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **2009**, *49*, 1571–1582. [[CrossRef](#)]
85. Hsu, S.H.; Yu, B.; Wang, X.; Lu, Y.; Schmidt, C.R.; Lee, R.J.; Lee, L.J.; Jacob, S.T.; Ghoshal, K. Cationic lipid nanoparticles for therapeutic delivery of siRNA and miRNA to murine liver tumor. *Nanomedicine* **2013**, *9*, 1169–1180. [[CrossRef](#)]
86. Li, F.; Wang, F.; Zhu, C.; Wei, Q.; Zhang, T.; Zhou, Y.L. miR-221 suppression through nanoparticle-based miRNA delivery system for hepatocellular carcinoma therapy and its diagnosis as a potential biomarker. *Int. J. Nanomed.* **2018**, *13*, 2295–2307. [[CrossRef](#)]
87. Shao, S.; Hu, Q.; Wu, W.; Wang, M.; Huang, J.; Zhao, X.; Tang, G.; Liang, T. Tumor-triggered personalized microRNA cocktail therapy for hepatocellular carcinoma. *Biomater. Sci.* **2020**, *8*, 6579–6591. [[CrossRef](#)]
88. Wang, Z.; Zhao, K.; Zhang, Y.; Duan, X.; Zhao, Y. Anti-GPC3 Antibody Tagged Cationic Switchable Lipid-Based Nanoparticles for the Co-Delivery of Anti-miRNA27a And Sorafenib in Liver Cancers. *Pharm. Res.* **2019**, *36*, 145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

89. Hayward, S.L.; Francis, D.M.; Kholmatov, P.; Kidambi, S. Targeted Delivery of MicroRNA125a-5p by Engineered Lipid Nanoparticles for the Treatment of HER2 Positive Metastatic Breast Cancer. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2016**, *12*, 554–568. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Deng, X.; Cao, M.; Zhang, J.; Hu, K.; Yin, Z.; Zhou, Z.; Xiao, X.; Yang, Y.; Sheng, W.; Wu, Y.; et al. Hyaluronic acid-chitosan nanoparticles for co-delivery of MiR-34a and doxorubicin in therapy against triple negative breast cancer. *Biomaterials* **2014**, *35*, 4333–4344. [[CrossRef](#)]
91. Imani, S.; Wu, R.C.; Fu, J. MicroRNA-34 family in breast cancer: From research to therapeutic potential. *J. Cancer* **2018**, *9*, 3765–3775. [[CrossRef](#)]
92. Zhi, F.; Dong, H.; Jia, X.; Guo, W.; Lu, H.; Yang, Y.; Ju, H.; Zhang, X.; Hu, Y. Functionalized graphene oxide mediated adriamycin delivery and miR-21 gene silencing to overcome tumor multidrug resistance in vitro. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e60034. [[CrossRef](#)]
93. Yu, Y.; Yao, Y.; Yan, H.; Wang, R.; Zhang, Z.; Sun, X.; Zhao, L.; Ao, X.; Xie, Z.; Wu, Q. A Tumor-specific MicroRNA Recognition System Facilitates the Accurate Targeting to Tumor Cells by Magnetic Nanoparticles. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2016**, *5*, e318. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Panebianco, F.; Climent, M.; Malvindi, M.A.; Pompa, P.P.; Bonetti, P.; Nicassio, F. Delivery of biologically active miR-34a in normal and cancer mammary epithelial cells by synthetic nanoparticles. *Nanomedicine* **2019**, *19*, 95–105. [[CrossRef](#)]
95. Sukumar, U.K.; Bose, R.J.C.; Malhotra, M.; Babikir, H.A.; Afjei, R.; Robinson, E.; Zeng, Y.; Chang, E.; Habte, F.; Sinclair, R.; et al. Intranasal delivery of targeted polyfunctional gold-iron oxide nanoparticles loaded with therapeutic microRNAs for combined theranostic multimodality imaging and presensitization of glioblastoma to temozolomide. *Biomaterials* **2019**, *218*, 119342. [[CrossRef](#)]
96. Seo, Y.E.; Suh, H.W.; Bahal, R.; Josowitz, A.; Zhang, J.; Song, E.; Cui, J.; Noorbakhsh, S.; Jackson, C.; Bu, T.; et al. Nanoparticle-mediated intratumoral inhibition of miR-21 for improved survival in glioblastoma. *Biomaterials* **2019**, *201*, 87–98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Ofek, P.; Calderón, M.; Mehrabadi, F.S.; Krivitsky, A.; Ferber, S.; Tiram, G.; Yerushalmi, N.; Kredon-Russo, S.; Grossman, R.; Ram, Z.; et al. Restoring the oncosuppressor activity of microRNA-34a in glioblastoma using a polyglycerol-based polyplex. *Nanomedicine* **2016**, *12*, 2201–2214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Ramirez-Moya, J.; Wert-Lamas, L.; Santisteban, P. MicroRNA-146b promotes PI3K/AKT pathway hyperactivation and thyroid cancer progression by targeting PTEN. *Oncogene* **2018**, *37*, 3369–3383. [[CrossRef](#)]
99. Frezzetti, D.; Menna, M.D.; Zoppoli, P.; Guerra, C.; Ferraro, A.; Bello, A.M.; Luca, P.D.; Calabrese, C.; Fusco, A.; Ceccarelli, M.; et al. Upregulation of miR-21 by Ras in vivo and its role in tumor growth. *Oncogene* **2011**, *30*, 275–286. [[CrossRef](#)]
100. Liu, L.; Wang, J.; Li, X.; Ma, J.; Shi, C.; Zhu, H.; Xi, Q.; Zhang, J.; Zhao, X.; Gu, M. miR-204-5p suppresses cell proliferation by inhibiting IGFBP5 in papillary thyroid carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *457*, 621–626. [[CrossRef](#)]
101. 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. MicroRNA-7 as a tumor suppressor and novel therapeutic for adrenocortical carcinoma. *Oncotarget* **2015**, *6*, 36675–36688. [[CrossRef](#)]
102. Kwok, G.T.Y.; Zhao, J.T.; Glover, A.R.; Gill, A.J.; Clifton-Bligh, R.; Robinson, B.G.; Ip, J.C.Y.; Sidhu, S.B. microRNA-431 as a Chemosensitizer and Potentiator of Drug Activity in Adrenocortical Carcinoma. *Oncologist* **2019**, *24*, e241–e250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Leskelä, S.; Leandro-García, L.J.; Mendiola, M.; Barriuso, J.; Inglada-Pérez, L.; Muñoz, I.; Martínez-Delgado, B.; Redondo, A.; Santiago, J.d.; Robledo, M.; et al. The miR-200 family controls  $\beta$ -tubulin III expression and is associated with paclitaxel-based treatment response and progression-free survival in ovarian cancer patients. *Endocr. Relat. Cancer* **2011**, *18*, 85–95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Mateescu, B.; Batista, L.; Cardon, M.; Grusso, T.; de Feraudy, Y.; Mariani, O.; Nicolas, A.; Meyniel, J.P.; Cottu, P.; Sastre-Garau, X.; et al. miR-141 and miR-200a act on ovarian tumorigenesis by controlling oxidative stress response. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 1627–1635. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Cui, X.; Sun, Y.; Shen, M.; Song, K.; Yin, X.; Di, W.; Duan, Y. Enhanced Chemotherapeutic Efficacy of Paclitaxel Nanoparticles Co-delivered with MicroRNA-7 by Inhibiting Paclitaxel-Induced EGFR/ERK pathway Activation for Ovarian Cancer Therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 7821–7831. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Dwivedi, S.K.; Mustafi, S.B.; Mangala, L.S.; Jiang, D.; Pradeep, S.; Rodriguez-Aguayo, C.; Ling, H.; Ivan, C.; Mukherjee, P.; Calin, G.A.; et al. Therapeutic evaluation of microRNA-15a and microRNA-16 in ovarian cancer. *Oncotarget* **2016**, *7*, 15093–15104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Bertucci, A.; Kim, K.H.; Kang, J.; Zuidema, J.M.; Lee, S.H.; Kwon, E.J.; Kim, D.; Howell, S.B.; Ricci, F.; Ruoslahti, E.; et al. Tumor-Targeting, MicroRNA-Silencing Porous Silicon Nanoparticles for Ovarian Cancer Therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11*, 23926–23937. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Kafshdooz, L.; Pourfathi, H.; Akbarzadeh, A.; Kafshdooz, T.; Razban, Z.; Sheervalilou, R.; Ebrahimi Sadr, N.; Khalilov, R.; Saghi, S.; Kavetsky, T.; et al. The role of microRNAs and nanoparticles in ovarian cancer: A review. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **2018**, *46*, 241–247. [[CrossRef](#)]
109. Cubillos-Ruiz, J.R.; Baird, J.R.; Tesone, A.J.; Rutkowski, M.R.; Scarlett, U.K.; Camposeco-Jacobs, A.L.; Anadon-Arnillas, J.; Harwood, N.M.; Korc, M.; Fiering, S.N.; et al. Reprogramming tumor-associated dendritic cells in vivo using miRNA mimetics triggers protective immunity against ovarian cancer. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 1683–1693. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

110. Gaur, S.; Wen, Y.; Song, J.H.; Parikh, N.U.; Mangala, L.S.; Blessing, A.M.; Ivan, C.; Wu, S.Y.; Varkaris, A.; Shi, Y.; et al. Chitosan nanoparticle-mediated delivery of miRNA-34a decreases prostate tumor growth in the bone and its expression induces non-canonical autophagy. *Oncotarget* **2015**, *6*, 29161–29177. [[CrossRef](#)]
111. Farina, N.H.; Zingiryan, A.; Vrolijk, M.A.; Perrapato, S.D.; Ades, S.; Stein, G.S.; Lian, J.B.; Landry, C.C. Nanoparticle-based targeted cancer strategies for non-invasive prostate cancer intervention. *J. Cell. Physiol.* **2018**, *233*, 6408–6417. [[CrossRef](#)]
112. Nagesh, P.K.B.; Chowdhury, P.; Hatami, E.; Boya, V.K.N.; Kashyap, V.K.; Khan, S.; Hafeez, B.B.; Chauhan, S.C.; Jaggi, M.; Yallapu, M.M. miRNA-205 Nanoformulation Sensitizes Prostate Cancer Cells to Chemotherapy. *Cancers* **2018**, *10*, 289. [[CrossRef](#)]
113. Zhang, T.; Xue, X.; He, D.; Hsieh, J.-T. A prostate cancer-targeted polyarginine-disulfide linked PEI nanocarrier for delivery of microRNA. *Cancer Lett.* **2015**, *365*, 156–165. [[CrossRef](#)]
114. Villanueva, A. Hepatocellular Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *380*, 1450–1462. [[CrossRef](#)]
115. Wang, X.; He, Y.; Mackowiak, B.; Gao, B. MicroRNAs as regulators, biomarkers and therapeutic targets in liver diseases. *Gut* **2021**, *70*, 784–795. [[CrossRef](#)]
116. Schueller, F.; Roy, S.; Vucur, M.; Trautwein, C.; Luedde, T.; Roderburg, C. The Role of miRNAs in the Pathophysiology of Liver Diseases and Toxicity. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 261. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Zhang, G.; Wang, Q.; Xu, R. Therapeutics Based on microRNA: A New Approach for Liver Cancer. *Curr. Genomics* **2010**, *11*, 311–325. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. Wang, H.; Chiu, M.; Xie, Z.; Chiu, M.; Liu, Z.; Chen, P.; Liu, S.; Byrd, J.C.; Muthusamy, N.; Garzon, R.; et al. Synthetic microRNA cassette dosing: Pharmacokinetics, tissue distribution and bioactivity. *Mol. Pharm.* **2012**, *9*, 1638–1644. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
119. Baboci, L.; Capolla, S.; Di Cintio, F.; Colombo, F.; Mauro, P.; Dal Bo, M.; Argenziano, M.; Cavalli, R.; Toffoli, G.; Macor, P. The Dual Role of the Liver in Nanomedicine as an Actor in the Elimination of Nanostructures or a Therapeutic Target. *J. Oncol.* **2020**, *2020*, 4638192. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
120. Gramantieri, L.; Ferracin, M.; Fornari, F.; Veronese, A.; Sabbioni, S.; Liu, C.G.; Calin, G.A.; Giovannini, C.; Ferrazzi, E.; Grazi, G.L.; et al. Cyclin G1 is a target of miR-122a, a microRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 6092–6099. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
121. Jiang, J.; Gusev, Y.; Aderca, I.; Mettler, T.A.; Nagorney, D.M.; Brackett, D.J.; Roberts, L.R.; Schmittgen, T.D. Association of MicroRNA expression in hepatocellular carcinomas with hepatitis infection, cirrhosis, and patient survival. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 419–427. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Meng, F.; Henson, R.; Wehbe-Janek, H.; Ghoshal, K.; Jacob, S.T.; Patel, T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* **2007**, *133*, 647–658. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Hsieh, T.H.; Hsu, C.Y.; Tsai, C.F.; Long, C.Y.; Chai, C.Y.; Hou, M.F.; Lee, J.N.; Wu, D.C.; Wang, S.C.; Tsai, E.M. miR-125a-5p is a prognostic biomarker that targets HDAC4 to suppress breast tumorigenesis. *Oncotarget* **2015**, *6*, 494–509. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Shi, L.; Chen, J.; Yang, J.; Pan, T.; Zhang, S.; Wang, Z. MiR-21 protected human glioblastoma U87MG cells from chemotherapeutic drug temozolomide induced apoptosis by decreasing Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 activity. *Brain Res.* **2010**, *1352*, 255–264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Wang, G.; Wang, J.J.; Tang, H.M.; To, S.S. Targeting strategies on miRNA-21 and PDCD4 for glioblastoma. *Arch. Biochem. Biophys.* **2015**, *580*, 64–74. [[CrossRef](#)]
126. Alrfaei, B.M.; Clark, P.; Vemuganti, R.; Kuo, J.S. MicroRNA miR-100 Decreases Glioblastoma Growth by Targeting SMARCA5 and Erbb3 in Tumor-Initiating Cells. *Technol. Cancer Res. Treat.* **2020**, *19*, 1533033820960748. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Lee, S.Y. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes Dis.* **2016**, *3*, 198–210. [[CrossRef](#)]
128. Pardini, B.; Calin, G.A. MicroRNAs and Long Non-Coding RNAs and Their Hormone-Like Activities in Cancer. *Cancers* **2019**, *11*, 378. [[CrossRef](#)]
129. Peng, C.; Wang, Y.L. Editorial: MicroRNAs as New Players in Endocrinology. *Front. Endocrinol.* **2018**, *9*, 459. [[CrossRef](#)]
130. Nikiforova, M.N.; Tseng, G.C.; Steward, D.; Diorio, D.; Nikiforov, Y.E. MicroRNA Expression Profiling of Thyroid Tumors: Biological Significance and Diagnostic Utility. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2008**, *93*, 1600–1608. [[CrossRef](#)]
131. Wojcicka, A.; Kolanowska, M.; Jazdzewski, K. Mechanisms in Endocrinology: MicroRNA in diagnostics and therapy of thyroid cancer. *Eur. J. Endocrinol.* **2016**, *174*, R89–R98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
132. Zhang, X.; Li, M.; Zuo, K.; Li, D.; Ye, M.; Ding, L.; Cai, H.; Fu, D.; Fan, Y.; Lv, Z. Upregulated miR-155 in Papillary Thyroid Carcinoma Promotes Tumor Growth by Targeting APC and Activating Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2013**, *98*, E1305–E1313. [[CrossRef](#)]
133. Spitzweg, C.; Bible, K.C.; Hofbauer, L.C.; Morris, J.C. Advanced radioiodine-refractory differentiated thyroid cancer: The sodium iodide symporter and other emerging therapeutic targets. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **2014**, *2*, 830–842. [[CrossRef](#)]
134. Riesco-Eizaguirre, G.; Wert-Lamas, L.; Perales-Patón, J.; Sastre-Perona, A.; Fernández, L.P.; Santisteban, P. The miR-146b-3p/PAX8/NIS Regulatory Circuit Modulates the Differentiation Phenotype and Function of Thyroid Cells during Carcinogenesis. *Cancer Res.* **2015**, *75*, 4119–4130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Fassnacht, M.; Dekkers, O.M.; Else, T.; Baudin, E.; Berruti, A.; de Krijger, R.; Haak, H.R.; Mihai, R.; Assie, G.; Terzolo, M. European Society of Endocrinology Clinical Practice Guidelines on the management of adrenocortical carcinoma in adults, in collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors. *Eur. J. Endocrinol.* **2018**, *179*, G1–G46. [[CrossRef](#)]
136. Veytsman, I.; Nieman, L.; Fojo, T. Management of endocrine manifestations and the use of mitotane as a chemotherapeutic agent for adrenocortical carcinoma. *J. Clin. Oncol.* **2009**, *27*, 4619–4629. [[CrossRef](#)]

137. Fassnacht, M.; Terzolo, M.; Allolio, B.; Baudin, E.; Haak, H.; Berruti, A.; Welin, S.; Schade-Brittinger, C.; Lacroix, A.; Jarzab, B.; et al. Combination chemotherapy in advanced adrenocortical carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **2012**, *366*, 2189–2197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
138. Assie, G.; Letouze, E.; Fassnacht, M.; Jouinot, A.; Luscap, W.; Barreau, O.; Omeiri, H.; Rodriguez, S.; Perlemino, K.; Rene-Corail, F.; et al. Integrated genomic characterization of adrenocortical carcinoma. *Nat. Genet.* **2014**, *46*, 607–612. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
139. 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. Comprehensive Pan-Genomic Characterization of Adrenocortical Carcinoma. *Cancer Cell* **2016**, *30*, 363. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
140. Chabre, O.; Libe, R.; Assie, G.; Barreau, O.; Bertherat, J.; Bertagna, X.; Feige, J.J.; Cherradi, N. Serum miR-483-5p and miR-195 are predictive of recurrence risk in adrenocortical cancer patients. *Endocr. Relat. Cancer* **2013**, *20*, 579–594. [[CrossRef](#)]
141. Igaz, P.; Igaz, I.; Nagy, Z.; Nyírő, G.; Szabó, P.M.; Falus, A.; Patócs, A.; Rácz, K. MicroRNAs in adrenal tumors: Relevance for pathogenesis, diagnosis, and therapy. *Cell. Mol. Life Sci.* **2015**, *72*, 417–428. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
142. Özata, D.M.; Caramuta, S.; Velázquez-Fernández, D.; Akçakaya, P.; Xie, H.; Höög, A.; Zedenius, J.; Bäckdahl, M.; Larsson, C.; Lui, W.O. The role of microRNA deregulation in the pathogenesis of adrenocortical carcinoma. *Endocr. Relat. Cancer* **2011**, *18*, 643–655. [[CrossRef](#)]
143. Patterson, E.E.; Holloway, A.K.; Weng, J.; Fojo, T.; Kebebew, E. MicroRNA profiling of adrenocortical tumors reveals miR-483 as a marker of malignancy. *Cancer* **2011**, *117*, 1630–1639. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Singh, P.; Soon, P.S.; Feige, J.J.; Chabre, O.; Zhao, J.T.; Cherradi, N.; Lalli, E.; Sidhu, S.B. Dysregulation of microRNAs in adrenocortical tumors. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2012**, *351*, 118–128. [[CrossRef](#)]
145. Soon, P.S.; 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. miR-195 and miR-483-5p Identified as Predictors of Poor Prognosis in Adrenocortical Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 7684–7692. [[CrossRef](#)]
146. Cherradi, N. microRNAs as Potential Biomarkers in Adrenocortical Cancer: Progress and Challenges. *Front. Endocrinol.* **2015**, *6*, 195. [[CrossRef](#)]
147. Kalinowski, F.C.; Giles, K.M.; Candy, P.A.; Ali, A.; Ganda, C.; Epis, M.R.; Webster, R.J.; Leedman, P.J. Regulation of epidermal growth factor receptor signaling and erlotinib sensitivity in head and neck cancer cells by miR-7. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e47067. [[CrossRef](#)]
148. Jung, S.; Nagy, Z.; Fassnacht, M.; Zambetti, G.; Weiss, M.; Reincke, M.; Igaz, P.; Beuschlein, F.; Hantel, C. Preclinical progress and first translational steps for a liposomal chemotherapy protocol against adrenocortical carcinoma. *Endocr. Relat. Cancer* **2016**, *23*, 825–837. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
149. Koutsaki, M.; Libra, M.; Spandidos, D.A.; Zaravinos, A. The miR-200 family in ovarian cancer. *Oncotarget* **2017**, *8*, 66629–66640. [[CrossRef](#)]
150. Lü, J.M.; Liang, Z.; Wang, X.; Gu, J.; Yao, Q.; Chen, C. New polymer of lactic-co-glycolic acid-modified polyethylenimine for nucleic acid delivery. *Nanomedicine* **2016**, *11*, 1971–1991. [[CrossRef](#)]
151. Rodriguez, A.; Vigorito, E.; Clare, S.; Warren, M.V.; Couttet, P.; Soond, D.R.; van Dongen, S.; Grocock, R.J.; Das, P.P.; Miska, E.A.; et al. Requirement of microRNA-155 for Normal Immune Function. *Science* **2007**, *316*, 608–611. [[CrossRef](#)]
152. Zhang, S.; Cheng, Z.; Wang, Y.; Han, T. The Risks of miRNA Therapeutics: In a Drug Target Perspective. *Drug Des. Dev. Ther.* **2021**, *15*, 721–733. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
153. Mullard, A. 2018 FDA drug approvals. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2019**, *18*, 85–89. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
154. Mullard, A. 2019 FDA drug approvals. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2020**, *19*, 79–84. [[CrossRef](#)]
155. Janssen, H.L.; Reesink, H.W.; Lawitz, E.J.; Zeuzem, S.; Rodriguez-Torres, M.; Patel, K.; van der Meer, A.J.; Patick, A.K.; Chen, A.; Zhou, Y.; et al. Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N. Engl. J. Med.* **2013**, *368*, 1685–1694. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
156. Lindow, M.; Kauppinen, S. Discovering the first microRNA-targeted drug. *J. Cell Biol.* **2012**, *199*, 407–412. [[CrossRef](#)]
157. van der Ree, M.H.; van der Meer, A.J.; van Nuenen, A.C.; de Bruijne, J.; Ottosen, S.; Janssen, H.L.; Kootstra, N.A.; Reesink, H.W. Miravirsen dosing in chronic hepatitis C patients results in decreased microRNA-122 levels without affecting other microRNAs in plasma. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2016**, *43*, 102–113. [[CrossRef](#)]
158. Shi, Y.; van der Meel, R.; Chen, X.; Lammers, T. The EPR effect and beyond: Strategies to improve tumor targeting and cancer nanomedicine treatment efficacy. *Theranostics* **2020**, *10*, 7921–7924. [[CrossRef](#)]
159. Sindhvani, S.; Syed, A.M.; Ngai, J.; Kingston, B.R.; Maiorino, L.; Rothschild, J.; MacMillan, P.; Zhang, Y.; Rajesh, N.U.; Hoang, T.; et al. The entry of nanoparticles into solid tumours. *Nat. Mater.* **2020**, *19*, 566–575. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
160. Blanco, E.; Shen, H.; Ferrari, M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33*, 941–951. [[CrossRef](#)]
161. Haute, D.V.; Berlin, J.M. Challenges in realizing selectivity for nanoparticle biodistribution and clearance: Lessons from gold nanoparticles. *Ther. Deliv.* **2017**, *8*, 763–774. [[CrossRef](#)]
162. Elmén, J.; Lindow, M.; Schütz, S.; Lawrence, M.; Petri, A.; Obad, S.; Lindholm, M.; Hedtjärn, M.; Hansen, H.F.; Berger, U.; et al. LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature* **2008**, *452*, 896–899. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
163. Krützfeldt, J.; Rajewsky, N.; Braich, R.; Rajeev, K.G.; Tuschl, T.; Manoharan, M.; Stoffel, M. Silencing of microRNAs in vivo with ‘antagomirs’. *Nature* **2005**, *438*, 685–689. [[CrossRef](#)]
164. Zarin, D.A.; Tse, T.; Williams, R.J.; Califf, R.M.; Ide, N.C. The ClinicalTrials.gov results database—Update and key issues. *N. Engl. J. Med.* **2011**, *364*, 852–860. [[CrossRef](#)]

165. Sainz, V.; Connot, J.; Matos, A.I.; Peres, C.; Zupancic, E.; Moura, L.; Silva, L.C.; Florindo, H.F.; Gaspar, R.S. Regulatory aspects on nanomedicines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *468*, 504–510. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
166. Hare, J.I.; Lammers, T.; Ashford, M.B.; Puri, S.; Storm, G.; Barry, S.T. Challenges and strategies in anti-cancer nanomedicine development: An industry perspective. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2017**, *108*, 25–38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
167. Monroig-Bosque Pdel, C.; Rivera, C.A.; Calin, G.A. MicroRNAs in cancer therapeutics: “from the bench to the bedside”. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2015**, *15*, 1381–1385. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
168. Nanomedicine and the COVID-19 vaccines. *Nature Nanotechnol.* **2020**, *15*, 963. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]







II) [Article 3 : « Early postoperative circulating miR-483-5p is a prognosis marker for adrenocortical cancer »](#)

Maurine Oreglia, Silviu Sbiera, Martin Fassnacht, Laurent Guyon, Josiane Denis, **Justine Cristante**, Olivier Chabre & Nadia Cherradi\*. Cancers (Basel). 2020 Mar 19;12(3):724. doi: 10.3390/cancers12030724.



Article

# Early Postoperative Circulating miR-483-5p Is a Prognosis Marker for Adrenocortical Cancer

Maurine Oreglia <sup>1</sup>, Silviu Sbiera <sup>2</sup> , Martin Fassnacht <sup>2</sup> , Laurent Guyon <sup>3</sup> , Josiane Denis <sup>3</sup>, Justine Cristante <sup>1,3</sup>, Olivier Chabre <sup>1,3</sup> and Nadia Cherradi <sup>3,\*</sup> 

<sup>1</sup> Centre Hospitalier Universitaire Grenoble Alpes, Service d'Endocrinologie, F-38000 Grenoble, France; maurine.oreglia@ch-metropole-savoie.fr (M.O.); jcristante@chu-grenoble.fr (J.C.); OlivierChabre@chu-grenoble.fr (O.C.)

<sup>2</sup> Department of Internal Medicine I, Endocrinology and Diabetes Unit, University Hospital Würzburg, 97080 Würzburg, Germany; Sbiera\_S@ukw.de (S.S.); Fassnacht\_M@ukw.de (M.F.)

<sup>3</sup> Univ. Grenoble Alpes, INSERM, CEA, IRIG, Biology of Cancer and Infection UMR\_S 1036, F-38000 Grenoble, France; laurent.guyon@cea.fr (L.G.); josiane.denis@cea.fr (J.D.)

\* Correspondence: nadia.cherradi@cea.fr; Tel.: +33-(0)4-38783501; Fax: +33-(0)4-38785058

Received: 23 January 2020; Accepted: 18 March 2020; Published: 19 March 2020



**Abstract:** We have previously identified serum miR-483-5p as a preoperative diagnosis and prognosis biomarker for adrenocortical cancer (ACC). Here, we aimed to determine whether circulating miR-483-5p levels measured 3 months post-operatively distinguished patients with good prognosis (no recurrence for at least 3 years; NR3yrs) from patients with poor prognosis (recurrence or death within 3 years after surgery; R < 3yrs). We conducted a single-center retrospective analysis using sera from 48 patients with ACC that were initially non-metastatic and treated by surgery. Sera sampled within 3 months after surgery were available in 26 patients. MiR-483-5p absolute circulating levels were measured using quantitative PCR. Thirteen patients showed a recurrence before 3 years (=R < 3yrs). Thirteen patients showed no recurrence within 3 years, including 11 patients with a follow-up longer than 3 years (=NR3yrs). Serum miR-483-5p levels were higher in R < 3yrs than in NR3yrs:  $1,541,990 \pm 428,377$  copies/mL vs.  $388,457 \pm 62,169$  copies/mL ( $p = 0.002$ ). Receiver operating characteristic analysis showed that a value of 752,898 copies/mL distinguished R < 3yrs from NR3yrs with 61.5% sensitivity (CI 31.6–86.1) and 100% specificity (CI 71.5–100) with an area under the curve of 0.853. Patients with a value below this threshold had a significantly longer recurrence-free and overall survival. In multivariate analysis, miR-483-5p provided the single best prognostic value for recurrence-free survival (RFS) (hazard ratio (HR) for recurrence 5.98,  $p < 0.011$ ) but not for overall survival. Our study suggests that serum miR-483-5p is a potent early post-operative biomarker for ACC prognosis that might be a better predictor of RFS than currently used markers.

**Keywords:** adrenocortical carcinoma; biomarker; circulating microRNA; miR-483-5p; early prognosis; recurrence

## 1. Introduction

Adrenocortical carcinoma (ACC) is a rare tumor entity with an incidence of 0.7 to 2 per million per year. The prognosis is generally poor with five-year survival not exceeding 40% in most series [1–3]. Within this overall estimate, the ENSAT (European Network for the Study of Adrenal Tumors) recommends distribution of patients in four stages, with a 5-year survival rate of 73.9%, 63.8%, 44.1%, and 6.9% for stages I, II, III and IV respectively [1,4]. However, except for patients with distant metastasis at diagnosis, this staging system is not based on parameters directly linked to the persistence of neoplastic cells after surgery, which is likely a major factor for recurrence and thus

indirectly for the survival of the patients. In this study, we aimed to define whether circulating microRNA hsa-miR-483-5p, which is likely of tumor origin [5], might provide a better prognosis assessment. MicroRNAs (miRNA) are small 20–22 nucleotides of non-coding RNA which act as post-transcriptional regulators of messenger RNA (mRNA) stability and/or translation [6]. Subsets of miRNAs were shown to be differently expressed between adrenocortical adenomas (ACA) and ACC [7]. MiR-483-5p levels were found to be higher in ACC tumor tissues [5,8–11] as well as in serum or plasma of patients with ACC as compared to patients with ACA [5,12–14]. We first demonstrated the diagnostic and prognostic values of circulating miR-483-5p by showing that serum miR-483-5p measured pre-operatively was significantly higher in patients with aggressive ACC (relapse or death in the first three years post-surgery) than in patients with non-aggressive ACC (at least three years relapse-free survival) [5]. More recently, Salvianti et al. examined post-operative plasma levels of miR-483-5p in a retrospective cohort of 27 ACC patients [14]. In this study, 44 available post-operative samples of 27 patients were pooled together, regardless of the time after surgery. This indicates that some patients were arbitrarily weighted more than others and that the timing of post-operative measurements was not considered. In the present work, we aimed to define more accurately the prognosis value of post-operative serum miR-483-5p in a new cohort of ACC patients by selecting for analysis for each patient the first blood sample collected within three months post-operatively.

## 2. Results

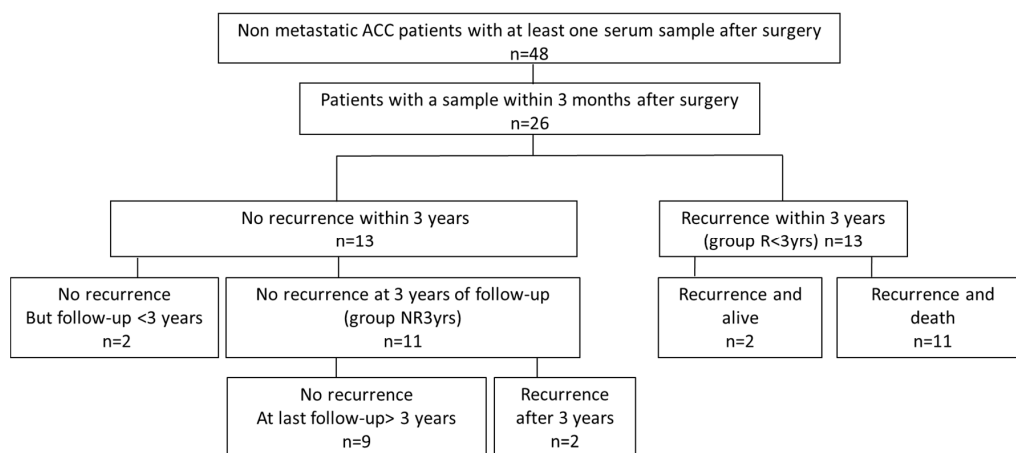
### 2.1. Patients

Patient clinical characteristics are described in Table 1. Their distribution according to follow-up and recurrence is shown in Figure 1. The 26 patients with blood sampled within 3 months post-operatively included 13 patients who showed a recurrence within 3 years (group R < 3yrs) and two patients who showed a late recurrence, which occurred at 4.75 and 4.2 years (57 and 50 months), respectively. By contrast, 13 patients showed no recurrence during the first 3 years of follow-up, of which 11 patients were effectively followed for at least 3 years (group NR3yrs), while two patients showed no recurrence but had a follow-up of less than 3 years. Two of the 11 patients with no recurrence during the first three years of follow-up were the patients (#12 and #13) who showed a recurrence at 4.75 and 4.2 years as already mentioned above. Eleven of the 15 patients with a recurrence died of tumor-related causes during follow-up whereas none of the non-recurring patients did. None of the patients were treated with radio- or chemo-therapy. Among the 26 patients, five patients did not receive mitotane throughout their follow-up (including Patient 2 with a follow-up of less than 3 years), 18 patients received mitotane as adjuvant therapy (including Patient 11 with a follow-up of less than 3 years) and three patients received mitotane after recurrence as palliative therapy (Table 1). All the treated patients received mitotane (adjuvant or palliative treatment) after blood sampling except Patients 5 and 8 (group NR3yrs) who received mitotane 0.9 and 1.8 months before blood sampling, respectively. Patient 5 reached mitotane therapeutic levels only 8 months later, while in Patient 8, mitotane concentration was only 4.3 mg/L at the time of blood collection.

**Table 1.** Clinical characteristics of the 26 patients with adrenocortical cancer (ACC) with serum sampled within 3 months after surgery.

Patient Number	Age	Sex	Ensat Stage	Mitotane Post-op Adjuvant Therapy	Recurrence	Time to Recurrence (Months)	Death	Time to Death (Months)	Last Follow-up Without Recurrence or Death (Months)	Group
1	38	F	I	N	N	-	N	-	69	NR3yrs
2	30	F	II	N	N	-	N	-	5.3	-
3	60	M	II	N	N	-	N	-	58	NR3yrs
4	52	F	II	Y	N	-	N	-	72	NR3yrs
5	70	F	II	Y <sup>a</sup>	N	-	N	-	80	NR3yrs
6	46	F	II	Y	N	-	N	-	87	NR3yrs
7	21	M	II	Y	N	-	N	-	65.5	NR3yrs
8	48	F	III	Y <sup>a</sup>	N	-	N	-	57	NR3yrs
9	64	M	III	N	N	-	N	-	51	NR3yrs
10	70	F	III	Y	N	-	N	-	104	NR3yrs
11	53	M	III	Y	N	-	N	-	34	-
12	44	F	I	N	Y	57	N	-	142	NR3yrs
13	42	F	II	Y	Y	50	N	-	104	NR3yrs
14	59	F	II	Y	Y	5.65	Y	12.7	-	R < 3yrs
15	56	M	II	Y	Y	2.6	Y	13.5	-	R < 3yrs
16	40	F	II	N <sup>b</sup>	Y	9.1	Y	38.7	-	R < 3yrs
17	66	F	II	N <sup>b</sup>	Y	17.6	Y	41.6	-	R < 3yrs
18	46	F	II	N <sup>b</sup>	Y	13	Y	64	-	R < 3yrs
19	42	M	II	Y	Y	16	Y	65	-	R < 3yrs
20	62	M	III	Y	Y	9	Y	57	-	R < 3yrs
21	51	F	III	Y	Y	3	Y	6	-	R < 3yrs
22	78	F	III	Y	Y	2.7	Y	14.9	-	R < 3yrs
23	37	M	III	Y	Y	13	Y	30	-	R < 3yrs
24	47	F	III	Y	Y	2.6	Y	35.5	-	R < 3yrs
25	47	M	III	Y	Y	14	N	-	119	R < 3yrs
26	43	F	III	Y	Y	28.3	N	-	116	R < 3yrs

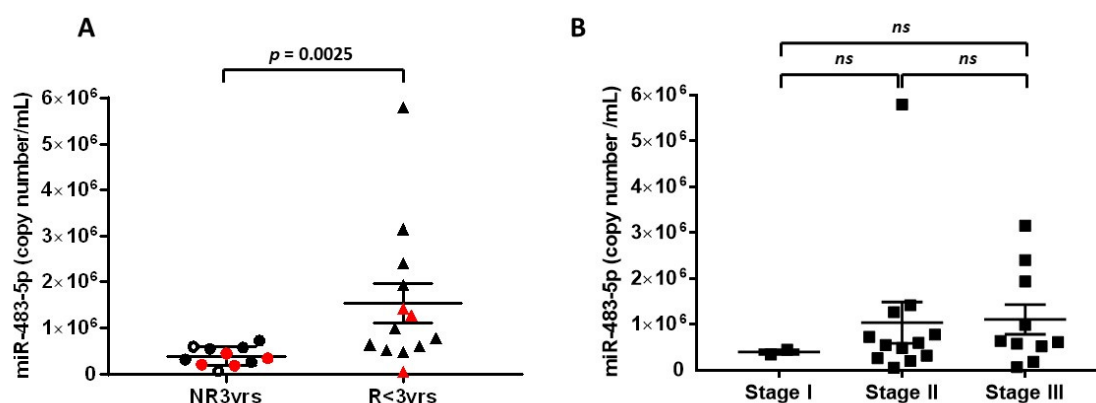
NR3yrs: patient with no recurrence after 3 years of post-surgical follow-up. R < 3yrs: patient with a recurrence before 3 years of follow-up. Time to recurrence and time to death were calculated from the date of surgery. F: female; M: male; N: no; Y: yes. <sup>a</sup>, Among the patients treated post-operatively with mitotane adjuvant therapy, Patients 5 and 8 received mitotane 0.9 and 1.8 months before serum sampling, respectively. All other patients received mitotane after serum sampling including patients 16, 17 and 18 who received palliative mitotane treatment <sup>b</sup>.



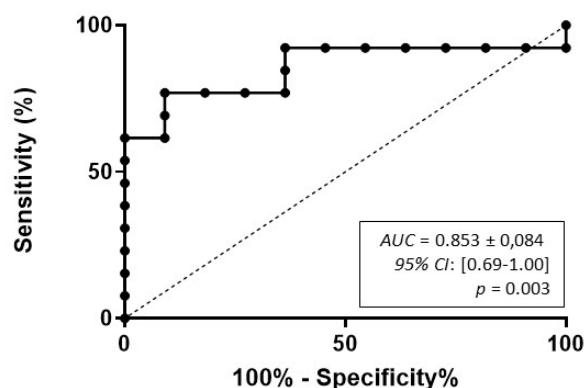
**Figure 1.** Schematic diagram of the study population. Details are described in the text (“Patients” section). R < 3yrs: patients with recurrence occurring before 3 years post-surgery; NR3yrs: patients with no recurrence within 3 years post-surgery.

## 2.2. MiR-483-5p Levels and Recurrence-Risk Within 3 Years: Analysis of the Group R < 3yrs vs. the Group NR3yrs

To analyze the link between serum miR-483-5p levels and recurrence within 3 years, we compared serum miR-483-5p levels in the group R < 3yrs ( $n = 13$ ) vs. the group NR3yrs ( $n = 11$ ). Figure 2a shows that the mean of miR-483-5p copy number was significantly higher in the group R < 3yrs as compared to the group NR3yrs:  $1,541,990 \pm 428,377$  copies/mL vs.  $388,457 \pm 62,169$  copies/mL, respectively ( $p = 0.0025$ ). As described in detail in the “Patients” section, 16 patients received mitotane as adjuvant therapy after serum sampling, so that for these 16 patients, we excluded any potential pharmacological interaction between mitotane and miR-483 5p levels. Patients 5 and 8 in the NR3yrs group received mitotane 0.9 and 1.8 months before serum sampling. Nevertheless, Patient 5 reached mitotane therapeutic levels only 8 months later, while in Patient 8, mitotane concentration was only 4.3 mg/L, so that for these two patients as well, it seemed unlikely that mitotane could have been involved in a pharmacological interaction with miR-483-5p. Moreover, exclusion of both Patients 5 and 8 from the NR3yrs group from the statistical analysis maintained a significant difference between NR3yrs and R < 3yrs patients ( $p = 0.004$ ). Comparison between ENSAT stage I ( $n = 2$ ), stage II ( $n = 12$ ) and stage III ( $n = 10$ ) ACC patients revealed no significant difference in their respective circulating miR-483-5p levels within 3 months post-surgery (stage I:  $395,942 \pm 50,997$  copies/mL; stage II:  $1,036,983 \pm 448,289$  copies/mL; stage III:  $1,108,321 \pm 326,412$  copies/mL;  $p = 0.474$  Kruskal–Wallis multiple comparisons test) (Figure 2b). Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was performed to determine the diagnostic performance of miR-483-5p in discriminating between the R < 3yrs group and the NR3yrs group (Figure 3). High diagnostic accuracy was observed for miR-483-5p with an area under the curve (AUC) of  $0.853 \pm 0.084$  (95% confidence interval (CI): 0.69–1.00,  $p = 0.003$ ). As detailed in the “Statistical analyses” section, we chose a cut-off value for serum miR-483-5p level of 752,898 copies/mL, which predicted recurrence within 3 years with 100% specificity (95% CI: 71.5–100) and 61.5% sensitivity (95% CI: 31.6–86.1). Using this cut-off, no association was found between miR-483-5p levels and ENSAT stage (Fisher’s exact test:  $p = 0.673$ ; low miR-483-5p: <752,898 copies/mL and high miR-483-5p: >752,898 copies/mL).

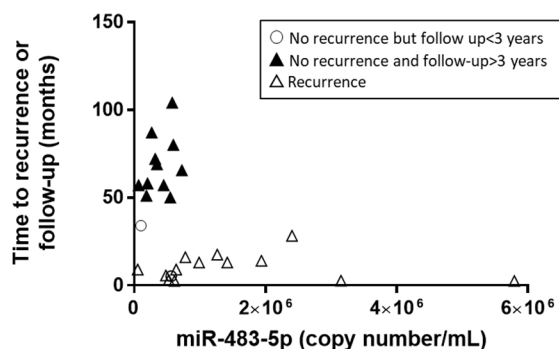


**Figure 2.** Post-operative serum levels of miR-483-5p in ACC patients. (A) Comparison of miR-483-5p levels in NR3yrs ( $n = 11$ ) and R < 3yrs groups ( $n = 13$ ). Cycle threshold (Ct) values were converted to absolute number of copies/mL using a dilution series of a known input quantity of synthetic target miRNA run simultaneously with the experimental samples. Statistically significant difference was assessed using Mann–Whitney test ( $p = 0.0025$ ). Black circles and triangles: patients who received mitotane adjuvant therapy after serum sampling. White circles in the NR3yrs group: Patients 5 and 8 received mitotane adjuvant therapy 0.9 and 1.8 months before serum sampling, respectively. Red symbols: patients with no mitotane therapy throughout their follow-up. (B) Comparison of miR-483-5p levels in NR3yrs and R < 3yrs patients in function of ENSAT stage (stage I:  $n = 2$ ; stage II:  $n = 12$ ; stage III:  $n = 10$ ); ns: non-significant. The lines within the scatter plot represent the mean  $\pm$  S.E.M of miRNA copy number/mL.



**Figure 3.** Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis for miR-483-5p absolute copy number in ACC patients. Three months-post-operative serum samples can discriminate between NR3yrs and R < 3yrs patients with significant accuracy. The area under the curve (AUC), the 95% confidence interval (CI) and the  $p$  value are indicated.

Remarkably, an inverse correlation between miR-483-5p copy numbers within the 3 months post-surgery and time to recurrence or last follow-up with no recurrence was observed, with the identification of two distinct groups of patients (Spearman  $r = -0.42$ ,  $p = 0.03$ , Figure 4).

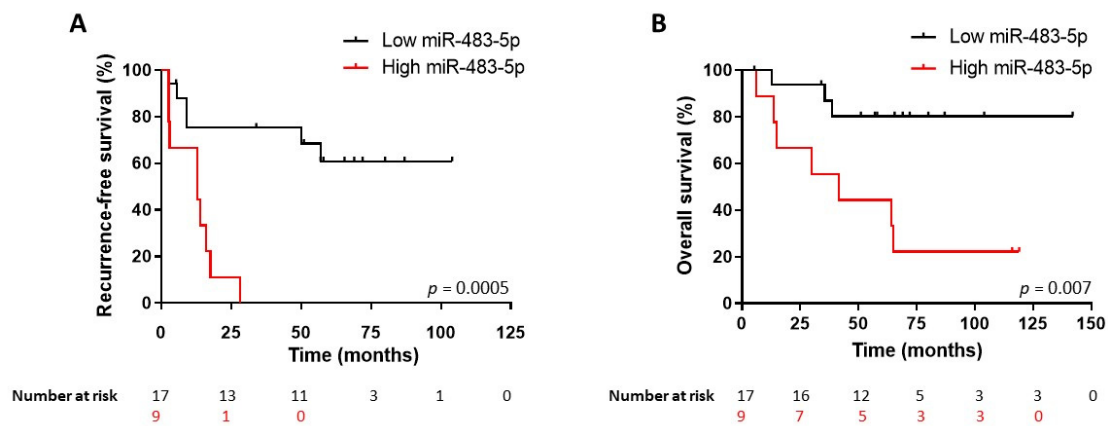


**Figure 4.** Time to recurrence or follow-up with no recurrence in function of miR-483-5p copy number.

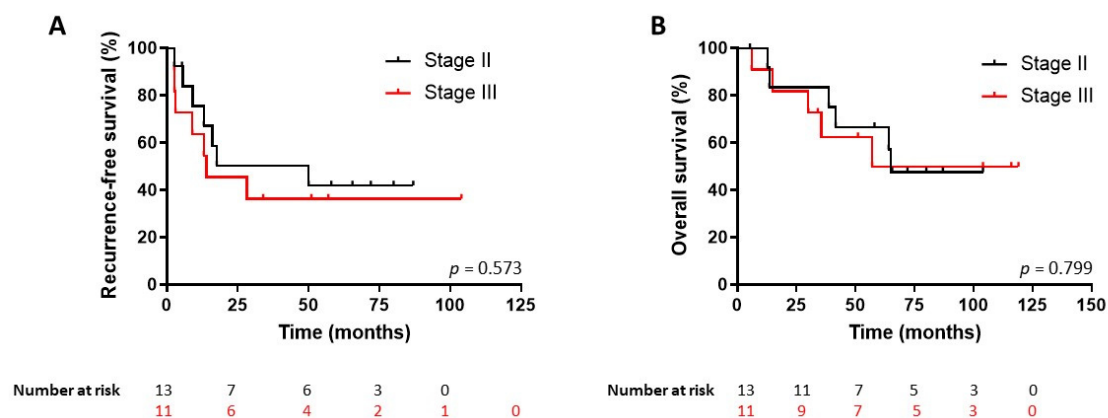
### 2.3. Survival Predictive Value of miR-483-5p Levels in 3 Months Post-Operative Serum Samples

We then used the ROC-derived miR-483-5p cut-off value to perform a Kaplan–Meier analysis of recurrence-free (RFS) and overall survival (OS) in the whole cohort of 26 patients, including not only the 13-patient group R < 3yrs and the 11-patient group NR3yrs but also the two patients with no recurrence but a follow-up < 3yrs. Figure 5 shows that patients with a serum miR-483-5p level higher than 752,898 copies/mL had a significant shorter RFS ( $n = 9$ ; median RFS 1.1 years) than the group with miR-483-5p level lower than 752,898 copies/mL ( $n = 17$ ; median RFS >8.5 years) (hazard ratio (HR) for recurrence: 4.80; 95% CI: 1.46–15.78; log-rank test  $p = 0.0005$ ). Likewise, patients with high levels of miR-483-5p had also a poorer OS ( $n = 9$ ; median OS 3.5 years) as compared to the low miR-483-5p group ( $n = 17$ , median OS >11.8 years) (HR for death: 5.23; 95% CI: 1.36–20; log-rank test  $p = 0.007$ ) (Figure 5). By contrast, ENSAT stage II or III patients showed no significant difference in RFS (Stage II:  $n = 13$ , median RFS 4.2 years. Stage III:  $n = 11$ , median RFS 1.2 years) (HR for recurrence: 1.34; 95% CI: 0.46–3.88, log-rank test  $p = 0.57$ ) or OS (Stage II: median OS 5.4 years; Stage III: median OS 4.7 years) (HR for death: 1.16; 95% CI: 0.35–3.86, log-rank test  $p = 0.79$ ) (Figure 6).





**Figure 5.** Kaplan–Meier survival analysis of all 26 patients (NR3yrs  $n = 11$ ,  $R < 3$ yrs  $n = 13$  and two patients with no recurrence and follow-up  $< 3$  years) according to miR-483-5p circulating levels. (A) Recurrence-free survival (RFS). High levels of miR-483-5p ( $> 752,898$  copies/mL cut-off value) within the 3-month post-surgery period predict a shorter RFS (Log-rank  $p = 0.0005$ ). (B) Overall survival. High levels of miR-483-5p ( $> 752,898$  copies/mL cut-off value) within the 3-month post-surgery period predict a shorter OS (Log-rank  $p = 0.007$ ).



**Figure 6.** Kaplan–Meier survival analysis according to European Network for the Study of Adrenal Tumors (ENSAT) stage II and stage III (24 patients). No significant differences were observed between ENSAT stage II and stage III for Recurrence-free survival (A) or Overall survival (B) predictions in this cohort.

#### 2.4. The Prognostic Value of miR-483-5p is Independent from Ki67 Index and Tumor Stage

Univariate analyses for age, sex and clinical parameters (tumor size, Ki67, ENSAT stage) were performed. None of the clinical parameters reached significance for RFS or OS predictions in this cohort (Table 2). While the circulating miR-483-5p level (cut-off 752,898 copies/mL) did not reach significance for OS (HR = 2.79,  $p = 0.09$ ), it was found to be the single significant predictor of disease recurrence with an HR of 2.79 ( $p = 0.007$ ) (Table 2). Upon multivariate analyses involving tumor size, Ki67, ENSAT stage and miR-483-5p level, miR-483-5p retained a strong prognostic power for RFS with an HR = 5.9 ( $p = 0.011$ ) (Table 3). Of note, Ki67  $> 10\%$  was not significantly associated with OS in univariate and multivariate analyses but a trend for shorter RFS was detectable in both analyses (univariate analysis HR: 0.38,  $p = 0.083$ ; multivariate analysis HR: 0.36;  $p = 0.092$ ).

**Table 2.** Univariate analysis (Cox regression) of circulating miR-483-5p and clinicopathological parameters in relation to overall survival (OS) and recurrence-free survival (RFS).

Variable	OS			RFS		
	HR	95% CI	<i>p</i> Value	HR	95% CI	<i>p</i> Value
Age	1.02	0.97–1.07	0.373	1.01	0.97–1.05	0.601
Sex	0.90	0.26–3.08	0.862	0.87	0.28–2.68	0.817
Tumor size	1.02	0.92–1.13	0.684	1.05	0.96–1.15	0.274
Ki67 > 10%	0.45	0.12–1.69	0.239	0.38	0.11–1.26	0.083
ENSAT stage I–II vs. III	0.70	0.21–2.33	0.566	0.54	0.18–1.61	0.269
miR-483-5p cut-off	2.79	0.85–9.19	0.090	4.84	1.53–15.3	<b>0.007</b>

Univariate analysis includes quantitative variables (age; tumor size), qualitative variables (sex; ENSAT stage I, II vs. III), and dichotomized variables (Ki67 > 10% as the reference category; miR-483-5p < 752,898 copy number/mL as the reference category). HR: hazard ratio; 95% CI: 95% confidence interval. Bold numbers indicate a significant difference.

**Table 3.** Multivariate analysis (Cox regression) of circulating miR-483-5p and clinicopathological parameters in relation to overall survival (OS) and recurrence-free survival (RFS).

Variable	OS			RFS		
	HR	95% CI	<i>p</i> Value	HR	95% CI	<i>p</i> Value
Tumor size	0.92	0.80–1.05	0.212	0.90	0.79–1.03	0.125
Ki67 > 10%	0.44	0.11–1.75	0.245	0.36	0.10–1.33	0.092
ENSAT stage I–II vs. III	0.41	0.09–1.92	0.260	0.28	0.06–1.32	0.109
miR-483-5p cut-off	3.11	0.66–14.6	0.150	5.98	1.30–27.6	<b>0.011</b>

Multivariate analysis includes tumor size (continuous variable), Ki67 (dichotomized variable with Ki67 > 10% as the reference category), ENSAT stage (I, II vs. III) and miR-483-5p (dichotomized variable with miR-483-5p < 752,898 copy number/mL as the reference category). HR: hazard ratio; 95% CI: 95% confidence interval. Bold number indicate a significant difference.

### 3. Discussion

Despite significant advances in the characterization of the ACC molecular landscape and the identification of distinct molecular subtypes with different outcomes, major efforts are still needed to improve diagnosis, surveillance and treatment of patients with ACC. In the last five years, circulating miRNAs have emerged as promising non-invasive biomarkers for adrenocortical cancer. Among candidate miRNAs, miR-483-5p was found to be increased in pre-operative serum or plasma samples from ACC patients [5,12–14]. MiR-483 gene, which is located at 11p15.5 within the second intron of IGF2 gene, is overexpressed in ACC in correlation with the well documented IGF2 overexpression in this type of tumors [9], suggesting the tumor origin of circulating miR-483-5p. We have previously shown that miR-483-5p levels in pre-operative serum are predictive of recurrence risk in ACC [5]. Interestingly, extracellular vesicle-associated miR-483-5p was reported to display a high accuracy in the pre-operative diagnosis of ACC [15]. Significant differences in miR-483-5p levels were found between ENSAT stage I/II and stage III/IV in pre- and post-surgery plasma samples [14]. However, in this work, time interval between surgery and serum sampling was not clearly stated and the potential impact of mitotane therapy on circulating miR-483-5p levels was not evaluated. Indeed, while 40 % of the samples were collected in the 6 months after surgery, no information was given for the remaining [14]. Hence, heterogeneous post-operative sampling may have introduced imprecisions in the analysis due to complex dynamic changes of miRNA in the circulation in the long term. Furthermore, 44 samples were analyzed in 27 patients indicating that some patients were arbitrarily weighted more than others. In the present work, we measured circulating miR-483-5p absolute levels in ACC patients based on three criteria: (1) tumors with or without recurrence within 3 years post-surgery, (2) serum sampling within

3 months post-surgery and (3) one sample per patient (the first one). We show that high circulating miR-483-5p within 3 months post-surgery was associated with more than a four-fold increased risk of recurrence and was predictive of poor overall survival for ACC patients. In multivariate analysis, miR-483-5p appeared as a significant prognostic factor, independent of the well-established prognostic factors, including ENSAT stage and Ki67.

Methodologically, we used the sensitive and validated Taqman PCR assays and the exogenous spiked-in cel-miR-39 with standard curves. We derived a cut-off value of miR-483-5p copy numbers from ROC curve, which distinguishes between recurring and non-recurring ACC patients with a high diagnostic accuracy (AUC of 0.853). These results suggest that miR-483-5p is a good candidate miRNA to monitor disease evolution. In the same line, we have previously reported a correlation between tumor size and circulating miR-483-5p levels, which were decreased after surgery [5]. Importantly, our miR-483-5p measurements were performed in sera sampled before mitotane adjuvant or palliative therapy, thus excluding a potential effect of mitotane on circulating miR-483-5p concentrations. For the only two patients who received mitotane about 1-2 months before serum sampling, it seemed unlikely that mitotane could have an impact on miR-483-5p levels for the reasons outlined previously (Results section). Serum miR-483-5p-based prediction of responsiveness to mitotane in ACC deserves future investigations in prospective longitudinal studies. We also addressed the potential confounding effect of post-surgical mitotane treatment on the risk of recurrence. As this treatment was shown to have a positive impact on recurrence risk, we determined whether the difference that we measured in recurrence rate between patients with high vs. low levels of circulating miR-483-5p is free from any bias linked to different exposure to post-surgical mitotane therapy between the NR3yrs and R < 3yrs groups of patients. In the group of 17 patients who all had mitotane adjuvant therapy, a significant difference in miR-483-5p levels was maintained between patients who recurred before 3 years ( $n = 10$ ) vs. patients who did not recur before 3 years ( $n = 7$ ), ( $p = 0.0136$ ). This indicates that miR-483-5p is still a prognostic factor even in patients who received post-surgical mitotane therapy.

The main limitations of our study are the small size of the cohort and a single-center population. While the prognostic values of the ENSAT stage and Ki67 index have been largely validated for ACC management [16], we found here in this cohort that ENSAT stage II and III or Ki67 > 10% did not predict recurrence risk or death. This is likely due to the limited number of patients analyzed in this study. However, with the same number of patients, the concentration of circulating miR-483-5p is able to distinguish between patients with different prognoses of recurrence and death. We found that miR-483-5p detection in post-operative samples 3 months post-surgery was not significantly different between tumor ENSAT stage II ( $n = 13$ ) and stage III ( $n = 11$ ) patients. This is in contrast to the results reported by Salvianti et al. [14] showing that post-operative miR-483-5p levels were significantly different between stage I/II ( $n = 14$ ) and III/IV ( $n = 9$ ) groups. However, our study design is different as we excluded metastatic patients at diagnosis (stage IV ACC) and narrowed sampling time to 3 months post-surgery. Accordingly, we demonstrate the strong prognostic power of circulating post-operative miR-483-5p for recurrence in univariate and multivariate analyses.

At the cellular level, we have recently shown that miR-483-5p promotes ACC aggressiveness by targeting the N-myc-Downstream Regulated Gene member 2 (NDRG2) in NCI H295R cell line [17]. In another work, inhibition of miR-483-5p in NCI-H295R cells was reported to also reduce their proliferation [8]. Recent studies have shown that tumors can actively release microvesicle-containing miRNAs into the peripheral circulation to exchange information with distant cells and promote metastatic spread [18]. Whether extra-cellular circulating miR-483-5p is involved in ACC progression and dissemination deserves future investigations.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Patients and Clinical Samples

We conducted a retrospective, single-center study, based on a collection of post-operative sera sampled in patients followed for ACC at the Endocrinology and Diabetes Unit of the University Hospital of Würzburg, and who were not metastatic at diagnosis (ENSAT stages I, II, and III) and operated between the years 2002 and 2013. All patients were registered in the ENSAT database. The study was approved by the ethics committee of the University of Würzburg (Germany) (#88/11), and written informed consent was obtained from all subjects. Two hundred and four post-operative sera from 48 patients were available. However, sample collection time points after surgery were highly heterogeneous. To evaluate the prognostic value of miR-483-5p more accurately, we selected 26 patients with at least one serum sampled within 3 months post-operatively. For each patient, a single serum sample was analyzed for the presence of miR-483-5p, which was the first serum sampled within 3 months after surgery (sampling interval ranging from 13 to 90 days).

### 4.2. RNA Extraction

Serum samples were thawed on ice and centrifuged at 3 000 g for 5 min. Total RNA was extracted from 450  $\mu$ L of supernatant using the miRvana PARIS kit (ThermoFisher Scientific, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. Synthetic non-human miRNA (*C. elegans* cel-miR-39, 25 fmol) was added to each denatured sample prior to extraction to adjust for differences in RNA recovery.

### 4.3. Quantification of Serum miRNA by Reverse Transcription-Quantitative PCR (RT-qPCR)

MicroRNAs were quantified by RT-qPCR as described previously in details [5]. Following RNA extraction, reverse transcription was performed using Taqman miRNA Reverse Transcription Kit and miRNA-specific stem-loop primers (ThermoFisher Scientific). Briefly, a fixed volume of 2.5  $\mu$ L from the 45  $\mu$ L RNA eluate was used as input into the RT reaction. In parallel, a 7-point standard curve ranging from  $3 \times 10^8$  to  $3 \times 10^2$  copies was reverse-transcribed for each miRNA using synthetic miRNA mimics (ThermoFisher Scientific). Real-time PCR was performed in duplicate using 4.5  $\mu$ L of the 5-fold diluted RT product combined with 5.5  $\mu$ L of PCR assay reagents (Taqman miRNA assays, ThermoFisher Scientific) to generate a final PCR volume of 10  $\mu$ L (Assay ID: hsa-miR-483-5p: 002338; Cel-miR-39: 000200). Assays were run on C1000 Thermal cycler (CFX96 Real Time system, Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, France) at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. Data were analyzed with CFX Manager Software version 3.1 (Bio-Rad). Copy number of miR-483-5p in each sample was normalized to *C. elegans* exogenous spike-in control (Cel-miR-39) using a previously published median normalization procedure, and expressed as normalized copy number per mL of serum [5].

### 4.4. Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software version 7.04 (San Diego, CA, USA). Mann–Whitney test was performed to compare miRNA expression levels, based on the results of D'Agostino and Pearson normality test. Results are expressed as means  $\pm$  standard error of the mean (S.E.M). Receiver operating characteristic (ROC) curve was generated to determine miR-483-5p diagnostic value. Calculation of the Youden index yielded an optimal cut-off of miR-483-5p  $> 603,601$  copies/mL (sensitivity 76.9 % and specificity 90.9 %). However, we chose to raise the cut-off to 752,898 copies/mL to obtain a maximal specificity (100% specificity and 61.5% sensitivity). High expression corresponds to miR-483-5p levels  $> 752,898$  copies/mL while low expression corresponds to miR-483-5p levels  $< 752,898$  copies/mL. Univariable and multivariable Cox regression models were used to determine the significance of the clinical characteristics for prognosis of RFS and OS. Univariate analyses were performed for quantitative variables (age, tumor size), qualitative variables

(sex, ENSAT stage) and according to cut-off values (Ki67 > 10% and miR-483-5p >752,898 copies/mL). Multivariate hazard ratios (HRs) were determined for tumor size, Ki67, ENSAT stage and miR-483-5p. Survival analyses were performed using the Kaplan–Meier method and curves were compared using the log-rank test. For all the analyses, a  $p < 0.05$  value was considered as statistically significant.

## 5. Conclusions

The role of miRNA in the physiopathology of ACC remains poorly understood. Nonetheless, miR-483-5p was consistently found to be upregulated in the tumor as well as in the serum/plasma of ACC patients, thus positioning this miRNA among the hallmarks of adrenocortical cancer. Our study goes further to demonstrate that early detection of miR-483-5p post-operatively has a powerful prognostic value. Indeed, high miR-483-5p levels in sera sampled within 3 months post-surgery were significantly associated with reduced overall survival and recurrence-free survival. Circulating miR-483-5p thus appears as a potent non-invasive biomarker for therapeutic decision-making during ACC patient surveillance and deserves further validation in prospective clinical studies.

**Author Contributions:** Conceptualization, O.C. and N.C.; investigation and methodology, M.O., J.D., S.S., L.G. and N.C.; validation, J.D., L.G., and N.C.; formal analysis, S.S., L.G., J.C., O.C., and N.C.; resources, M.O., S.S., M.F., L.G., O.C. and N.C.; data curation, M.O., J.D., S.S., L.G., O.C. and N.C.; writing-review and editing, M.O., S.S., M.F., J.C., O.C. and N.C.; supervision, N.C.; project administration and funding acquisition, N.C. All authors have read and have approved the submitted version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Ligue Nationale Contre le Cancer (Comités Loire et Isère), the Association Surrénales, the Institut National du Cancer (INCA-DGOS-8663, Programme Hospitalier de Recherche Clinique COMETE-TACTIC), the Else Kröner-Fresenius-Stiftung Grant 2016\_A96 to S.S. and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) project numbers: 314061271 (CRC/TRR 205) to M.F.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Fassnacht, M.; Johanssen, S.; Quinkler, M.; Bucsky, P.; Willenberg, H.S.; Beuschlein, F.; Terzolo, M.; Mueller, H.H.; Hahner, S.; Allolio, B.; et al. Limited prognostic value of the 2004 International Union Against Cancer staging classification for adrenocortical carcinoma: Proposal for a Revised TNM Classification. *Cancer* **2009**, *115*, 243–250. [[CrossRef](#)]
2. Else, T.; Kim, A.C.; Sabolch, A.; Raymond, V.M.; Kandathil, A.; Caoili, E.M.; Jolly, S.; Miller, B.S.; Giordano, T.J.; Hammer, G.D. Adrenocortical carcinoma. *Endocr. Rev.* **2014**, *35*, 282–326. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Jouinot, A.; Bertherat, J. Management of endocrine disease: Adrenocortical carcinoma: Differentiating the good from the poor prognosis tumors. *Eur. J. Endocrinol.* **2018**, *178*, R215–R230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Lughezzani, G.; Sun, M.; Perrotte, P.; Jeldres, C.; Alasker, A.; Isbarn, H.; Budaus, L.; Shariat, S.F.; Guazzoni, G.; Montorsi, F.; et al. The European Network for the Study of Adrenal Tumors staging system is prognostically superior to the international union against cancer-staging system: A North American validation. *Eur. J. Cancer* **2010**, *46*, 713–719. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Chabre, O.; Libe, R.; Assie, G.; Barreau, O.; Bertherat, J.; Bertagna, X.; Feige, J.J.; Cherradi, N. Serum miR-483-5p and miR-195 are predictive of recurrence risk in adrenocortical cancer patients. *Endocr. Relat. Cancer* **2013**, *20*, 579–594. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Ambros, V. The functions of animal microRNAs. *Nature* **2004**, *431*, 350–355. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Cherradi, N. microRNAs as Potential Biomarkers in Adrenocortical Cancer: Progress and Challenges. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* **2015**, *6*, 195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Ozata, D.M.; Caramuta, S.; Velazquez-Fernandez, D.; Akcakaya, P.; Xie, H.; Hoog, A.; Zedenius, J.; Backdahl, M.; Larsson, C.; Lui, W.O. The role of microRNA deregulation in the pathogenesis of adrenocortical carcinoma. *Endocr. Relat. Cancer* **2011**, *18*, 643–655. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Patterson, E.E.; Holloway, A.K.; Weng, J.; Fojo, T.; Kebebew, E. MicroRNA profiling of adrenocortical tumors reveals miR-483 as a marker of malignancy. *Cancer* **2011**, *117*, 1630–1639. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

10. Soon, P.S.; 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. miR-195 and miR-483-5p Identified as Predictors of Poor Prognosis in Adrenocortical Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 7684–7692. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Assie, G.; Letouze, E.; Fassnacht, M.; Jouinot, A.; Luscap, W.; Barreau, O.; Omeiri, H.; Rodriguez, S.; Perlemoine, K.; Rene-Corail, F.; et al. Integrated genomic characterization of adrenocortical carcinoma. *Nat. Genet.* **2014**, *46*, 607–612. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Patel, D.; Boufraquech, M.; Jain, M.; Zhang, L.; He, M.; Gesuwan, K.; Gulati, N.; Nilubol, N.; Fojo, T.; Kebebew, E. MiR-34a and miR-483-5p are candidate serum biomarkers for adrenocortical tumors. *Surgery* **2013**, *154*, 1224–1228, discussion 1229. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Szabo, D.R.; Luconi, M.; Szabo, P.M.; Toth, M.; Szucs, N.; Horanyi, J.; Nagy, Z.; Mannelli, M.; Patocs, A.; Racz, K.; et al. Analysis of circulating microRNAs in adrenocortical tumors. *Lab. Investig.* **2014**, *94*, 331–339. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Salvianti, F.; Canu, L.; Poli, G.; Armignacco, R.; Scatena, C.; Cantini, G.; Di Franco, A.; Gelmini, S.; Ercolino, T.; Pazzagli, M.; et al. New insights in the clinical and translational relevance of miR483-5p in adrenocortical cancer. *Oncotarget* **2017**, *8*, 65525–65533. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Perge, P.; Butz, H.; Pezzani, R.; Bancos, I.; Nagy, Z.; Paloczi, K.; Nyiro, G.; Decmann, A.; Pap, E.; Luconi, M.; et al. Evaluation and diagnostic potential of circulating extracellular vesicle-associated microRNAs in adrenocortical tumors. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 5474. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Fassnacht, M.; Dekkers, O.M.; Else, T.; Baudin, E.; Berruti, A.; de Krijger, R.; Haak, H.R.; Mihai, R.; Assie, G.; Terzolo, M. European Society of Endocrinology Clinical Practice Guidelines on the management of adrenocortical carcinoma in adults, in collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors. *Eur. J. Endocrinol.* **2018**, *179*, G1–G46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Agosta, C.; Laugier, J.; Guyon, L.; Denis, J.; Bertherat, J.; Libe, R.; Boisson, B.; Sturm, N.; Feige, J.J.; Chabre, O.; et al. MiR-483-5p and miR-139-5p promote aggressiveness by targeting N-myc downstream-regulated gene family members in adrenocortical cancer. *Int. J. Cancer* **2018**, *143*, 944–957. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Tkach, M.; They, C. Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell* **2016**, *164*, 1226–1232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



### III) Production scientifique

#### *Publications :*

1) Reda El Sayed S, **Cristante J**, Guyon L, Denis J, Chabre O, Cherradi N. MicroRNA Therapeutics in Cancer: Current Advances and Challenges. *Cancers (Basel)*. 2021 May 29; 13(11):2680. doi: 10.3390/cancers13112680.

2) Oreglia M, Sbiera S, Fassnacht M, Guyon L, Denis J, **Cristante J**, Chabre O, Cherradi N. Early Postoperative Circulating miR-483-5p Is a Prognosis Marker for Adrenocortical Cancer. *Cancers (Basel)*. 2020 Mar 19;12(3):724. doi: 10.3390/cancers12030724.

3) Article « Aberrant activation of Wnt/ $\beta$ -Catenin signaling pathway drives the expression of poor prognosis-associated microRNAs in adrenocortical cancer », soumission prochaine

4) Revue « Non-coding RNAs in adrenocortical carcinoma », soumission prochaine

#### *Communications :*

1) Communication orale au "8th International Adrenal Cancer Symposium" (Brescia, 30 Septembre-2 Octobre 2021)

**J. Cristante**, L. Guyon, J. Denis, S. Reda El Sayed, B. Ragazzon, O. Chabre, N. Cherradi

« Activated WNT/ $\beta$ -Catenin pathway regulates the expression of a subset of microRNAs in adrenocortical carcinoma ».

Prix de la communication orale.

2) Journée annuelle des doctorants de l'EDCSV (24 Juin 2021) : Graphical abstract. **CRISTANTE Justine**, REDA EL SAYED Soha, DENIS Josiane, GUYON Laurent, CHABRE Olivier, CHERRADI Nadia. "Impact de l'activation de la voie de signalisation Wnt/beta-Caténine sur l'expression des microARN dans le carcinome corticosurrénalien"

3) 36<sup>ème</sup> congrès de la Société Française d'Endocrinologie (Marseille, 7-10 Octobre 2020)

**Justine Cristante**, Josiane Denis, Christophe Battail, Bruno Ragazzon, Olivier Chabre, Laurent Guyon, Nadia Cherradi. "L'expression de microARN du locus soumis à empreinte parentale 14q32 (DLK1-MEG3) est modulée par la bêta-caténine dans le carcinome corticosurrénalien"



*Participation aux congrès :*

- 1) 36<sup>ème</sup> congrès de la Société Française d'Endocrinologie (Marseille, 7-10 Octobre 2020)
- 2) Congrès ENSAT/International ACC symposium (30 Septembre – 2 Octobre 2021)
- 3) 37<sup>ème</sup> congrès de la Société Française d'Endocrinologie (20-23 Octobre 2021)





# Bibliographie



1. Mitty, H. A. Embryology, anatomy, and anomalies of the adrenal gland. *Semin. Roentgenol.* **23**, 271–279 (1988).
2. Kamina, P. *Anatomie clinique T4, Pelvis, Coupes du tronc, 3e éd.* (Maloine, 2014).
3. Sadler, T. & Langman, J. *Embryologie médicale: 9e édition française / 13e édition américaine.* (Pradel - John Libbey Eurotext, 2018).
4. Kempná, P. & Flück, C. E. Adrenal gland development and defects. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **22**, 77–93 (2008).
5. Kater, C. E. *et al.* Classic and current concepts in adrenal steroidogenesis: a reappraisal. *Arch Endocrinol Metab* **66**, 77–87 (2022).
6. Hatano, O. *et al.* Identical origin of adrenal cortex and gonad revealed by expression profiles of Ad4BP/SF-1. *Genes Cells* **1**, 663–671 (1996).
7. Ross, I. L. & Louw, G. J. Embryological and molecular development of the adrenal glands. *Clin. Anat.* **28**, 235–242 (2015).
8. Abou Nader, N. & Boyer, A. Adrenal Cortex Development and Maintenance: Knowledge Acquired From Mouse Models. *Endocrinology* **162**, bqab187 (2021).
9. Val, P. *et al.* Adrenal development is initiated by Cited2 and Wt1 through modulation of Sf-1 dosage. *Development* **134**, 2349–2358 (2007).
10. Zubair, M. *et al.* Two-Step Regulation of Ad4BP/SF-1 Gene Transcription during Fetal Adrenal Development: Initiation by a Hox-Pbx1-Prep1 Complex and Maintenance via Autoregulation by Ad4BP/SF-1. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 4111–4121 (2006).
11. Salmon, T. N. & Zwemer, R. L. A study of the life history of cortico-adrenal gland cells of the rat by means of trypan blue injections. *Anat. Rec.* **80**, 421–429 (1941).
12. Deane, H. W. & Greep, R. O. A morphological and histochemical study of the rat's adrenal cortex after hypophysectomy, with comments on the liver. *Am. J. Anat.* **79**, 117–145 (1946).
13. Freedman, B. D. *et al.* Adrenocortical zonation results from lineage conversion of differentiated zona glomerulosa cells. *Dev. Cell* **26**, 666–673 (2013).
14. King, P. *et al.* Shh signaling regulates adrenocortical development and identifies progenitors of steroidogenic lineages. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 21185–21190 (2009).
15. Beuschlein, F. *et al.* Sf-1, Dax-1, and Acd: Molecular Determinants of Adrenocortical Growth and Steroidogenesis. *Endocr. Res.* **28**, 597–607 (2002).
16. Berthon, A. *et al.* Constitutive  $\beta$ -catenin activation induces adrenal hyperplasia and promotes adrenal cancer development. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 1561–1576 (2010).
17. Walczak, E. M. *et al.* Wnt signaling inhibits adrenal steroidogenesis by cell-autonomous and non-cell-autonomous mechanisms. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **28**, 1471–1486 (2014).
18. Berthon, A. *et al.* WNT/ $\beta$ -catenin signalling is activated in aldosterone-producing adenomas and controls aldosterone production. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 889–905 (2014).
19. Drelon, C. *et al.* PKA inhibits WNT signalling in adrenal cortex zonation and prevents malignant tumour development. *Nat. Commun.* **7**, 12751 (2016).
20. Mathieu, M. *et al.* Steroidogenic differentiation and PKA signaling are programmed by histone methyltransferase EZH2 in the adrenal cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, E12265–E12274 (2018).
21. Basham, K. J. *et al.* A ZNRF3-dependent Wnt/ $\beta$ -catenin signaling gradient is required for adrenal homeostasis. *Genes Dev.* **33**, 209–220 (2019).
22. Pignatti, E. *et al.* Beta-Catenin Causes Adrenal Hyperplasia by Blocking Zonal Transdifferentiation. *Cell Rep.* **31**, 107524 (2020).

23. Leng, S. *et al.*  $\beta$ -Catenin and FGFR2 regulate postnatal rosette-based adrenocortical morphogenesis. *Nat. Commun.* **11**, 1680 (2020).
24. Heikkilä, M. *et al.* Wnt-4 Deficiency Alters Mouse Adrenal Cortex Function, Reducing Aldosterone Production. *Endocrinology* **143**, 4358–4365 (2002).
25. Vidal, V. *et al.* The adrenal capsule is a signaling center controlling cell renewal and zonation through Rspo3. *Genes Dev.* **30**, 1389–1394 (2016).
26. Chida, D. *et al.* Melanocortin 2 receptor is required for adrenal gland development, steroidogenesis, and neonatal gluconeogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 18205–18210 (2007).
27. Dumontet, T. *et al.* PKA signaling drives reticularis differentiation and sexually dimorphic adrenal cortex renewal. *JCI Insight* **3**, (2018).
28. MacFarland, R. T. *et al.* High concentrations of a cGMP-stimulated phosphodiesterase mediate ANP-induced decreases in cAMP and steroidogenesis in adrenal glomerulosa cells. *J. Biol. Chem.* **266**, 136–142 (1991).
29. Stephenson, D. T. *et al.* Immunohistochemical localization of phosphodiesterase 2A in multiple mammalian species. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* **57**, 933–949 (2009).
30. Lakics, V. *et al.* Quantitative comparison of phosphodiesterase mRNA distribution in human brain and peripheral tissues. *Neuropharmacology* **59**, 367–374 (2010).
31. Miller, W. L. & Auchus, R. J. The Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology of Human Steroidogenesis and Its Disorders. *Endocr. Rev.* **32**, 81–151 (2011).
32. Gwynne, J. T. & Strauss, J. F. The role of lipoproteins in steroidogenesis and cholesterol metabolism in steroidogenic glands. *Endocr. Rev.* **3**, 299–329 (1982).
33. Shen, W.-J. *et al.* Scavenger receptor class B type I (SR-BI): a versatile receptor with multiple functions and actions. *Metabolism.* **63**, 875–886 (2014).
34. Higashijima, M. *et al.* 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 (1987).
35. Krieger, M. & Herz, J. Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 601–637 (1994).
36. Acton, S. *et al.* Identification of Scavenger Receptor SR-BI as a High Density Lipoprotein Receptor. *Science* **271**, 518–520 (1996).
37. Lehoux, J.-G. & Lefebvre, A. Short-term effects of ACTH on the low-density lipoprotein receptor mRNA level in rat and hamster adrenals. *J. Mol. Endocrinol.* **6**, 223–230 (1991).
38. Cherradi, N. *et al.* Angiotensin II Promotes Selective Uptake of High Density Lipoprotein Cholesterol Esters in Bovine Adrenal Glomerulosa and Human Adrenocortical Carcinoma Cells Through Induction of Scavenger Receptor Class B Type I. *Endocrinology* **142**, 4540–4549 (2001).
39. Rigotti, A. *et al.* Regulation by Adrenocorticotrophic Hormone of the in Vivo Expression of Scavenger Receptor Class B Type I (SR-BI), a High Density Lipoprotein Receptor, in Steroidogenic Cells of the Murine Adrenal Gland\*. *J. Biol. Chem.* **271**, 33545–33549 (1996).
40. Tóth, I. E. *et al.* 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 (1990).
41. Chanderbhan, R. *et al.* Sterol carrier protein2. Delivery of cholesterol from adrenal lipid droplets to mitochondria for pregnenolone synthesis. *J. Biol. Chem.* **257**, 8928–8934 (1982).
42. Bose, H. S. *et al.* The steroidogenic acute regulatory protein, star, works only at the outer mitochondrial membrane. *Endocr. Res.* **28**, 295–308 (2002).

43. Caron, K. M. *et al.* Targeted disruption of the mouse gene encoding steroidogenic acute regulatory protein provides insights into congenital lipoid adrenal hyperplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 11540–11545 (1997).
44. Hasegawa, T. *et al.* Developmental roles of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) as revealed by StAR knockout mice. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **14**, 1462–1471 (2000).
45. Selvaraj, V. *et al.* Crucial Role Reported for TSPO in Viability and Steroidogenesis is a Misconception. Commentary: Conditional Steroidogenic Cell-Targeted Deletion of TSPO Unveils a Crucial Role in Viability and Hormone-Dependent Steroid Formation. *Front. Endocrinol.* **7**, (2016).
46. Fardella, C. E. & Miller, W. L. Molecular biology of mineralocorticoid metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **16**, 443–470 (1996).
47. Willenberg, H. S. *et al.* New mechanisms to control aldosterone synthesis. *Horm. Metab. Res. Horm. Stoffwechselforschung Horm. Metab.* **40**, 435–441 (2008).
48. Brown, J. J. *et al.* Variation in plasma renin concentration in several physiological and pathological states. *Can. Med. Assoc. J.* **90**, 201–206 (1964).
49. Capponi, A. M. *et al.* Calcium stimulates steroidogenesis in permeabilized bovine adrenal cortical cells. *J. Biol. Chem.* **263**, 16113–16117 (1988).
50. Barrett, P. Q. *et al.* Role of Calcium in Angiotensin II-Mediated Aldosterone Secretion\*. *Endocr. Rev.* **10**, 496–518 (1989).
51. Spät, A. & Hunyady, L. Control of Aldosterone Secretion: A Model for Convergence in Cellular Signaling Pathways. *Physiol. Rev.* **84**, 489–539 (2004).
52. Cherradi, N. *et al.* Regulation of mineralocorticoid biosynthesis by calcium and the StAR protein. *Endocr. Res.* **24**, 355–362 (1998).
53. Bassett, M. H. *et al.* The Orphan Nuclear Receptors NURR1 and NGFIB Regulate Adrenal Aldosterone Production. *Mol. Endocrinol.* **18**, 279–290 (2004).
54. Sutherland, D. J. *et al.* Hypertension, increased aldosterone secretion and low plasma renin activity relieved by dexamethasone. *Can. Med. Assoc. J.* **95**, 1109–1119 (1966).
55. Liddle, G. W. *et al.* Dual mechanism regulating adrenocortical function in man. *Am. J. Med.* **21**, 380–386 (1956).
56. Yoshida, A. *et al.* ACTH-induced inhibition of the action of angiotensin II in bovine zona glomerulosa cells. A modulatory effect of cyclic AMP on the angiotensin II receptor. *J. Biol. Chem.* **266**, 4288–4294 (1991).
57. Gaillard, R. C. *et al.* Aldosterone escape to chronic ACTH administration in man. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* **103**, 116–124 (1983).
58. Herman, J. P. *et al.* Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical stress response. *Compr. Physiol.* **6**, 603–621 (2016).
59. Fehm, H. L. *et al.* Differential and integral corticosteroid feedback effects on ACTH secretion in hypoadrenocorticism. *J. Clin. Invest.* **63**, 247–253 (1979).
60. Keller-Wood, M. E. *et al.* Feedback inhibition of adrenocorticotrophic hormone by physiological increases in plasma corticosteroids in conscious dogs. *J. Clin. Invest.* **71**, 859–866 (1983).
61. Kim, C. *et al.* Crystal Structure of a Complex Between the Catalytic and Regulatory (RI $\alpha$ ) Subunits of PKA. *Science* **307**, 690–696 (2005).
62. Pearson Murphy, B. E. Ontogeny of cortisol-cortisone interconversion in human tissues: A role for cortisone in human fetal development. *J. Steroid Biochem.* **14**, 811–817 (1981).
63. Draper, N. & Stewart, P. M. 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase and the pre-receptor regulation of corticosteroid hormone action. *J. Endocrinol.* **186**, 251–271 (2005).



64. Edwards, C. R. W. *et al.* Localisation of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase—tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor. *The Lancet* **332**, 986–989 (1988).
65. De Kloet, E. R. & Reul, J. M. H. M. Feedback action and tonic influence of corticosteroids on brain function: A concept arising from the heterogeneity of brain receptor systems. *Psychoneuroendocrinology* **12**, 83–105 (1987).
66. Turcu, A. F. *et al.* 11-Oxygenated androgens in health and disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* **16**, 284–296 (2020).
67. Rainey, W. E. & Nakamura, Y. Regulation of the Adrenal Androgen Biosynthesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **108**, 281–286 (2008).
68. Prunty, F. T. Androgen metabolism in man. Some current concepts. *Br. Med. J.* **2**, 605–613 (1966).
69. Rege, J. *et al.* Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of human adrenal vein 19-carbon steroids before and after ACTH stimulation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **98**, 1182–1188 (2013).
70. Chen, F. *et al.* Partial agonist/antagonist properties of androstenedione and 4-androsten-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **91**, 247–257 (2004).
71. Chen, F. *et al.* Direct Agonist/Antagonist Functions of Dehydroepiandrosterone. *Endocrinology* **146**, 4568–4576 (2005).
72. Naamneh Elzenaty, R. *et al.* Basics of androgen synthesis and action. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 101665 (2022) doi:10.1016/j.beem.2022.101665.
73. Labrie, F. Intracrinology. *Mol. Cell. Endocrinol.* **78**, C113–C118 (1991).
74. Bouvattier, C. Les androgènes : de la conception à la puberté féminine. *Médecine Reprod.* **14**, 179–188 (2012).
75. De Peretti, E. & Forest, M. G. Unconjugated Dehydroepiandrosterone Plasma Levels in Normal Subjects from Birth to Adolescence in Human: The Use of a Sensitive Radioimmunoassay1. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **43**, 982–991 (1976).
76. Rosenfield, R. L. Normal and Premature Adrenarche. *Endocr. Rev.* **42**, 783–814 (2021).
77. Biason-Lauber, A. *et al.* Effect of Leptin on CYP17 Enzymatic Activities in Human Adrenal Cells: New Insight in the Onset of Adrenarche\*. *Endocrinology* **141**, 1446–1454 (2000).
78. Topor, L. S. *et al.* Cortisol stimulates secretion of dehydroepiandrosterone in human adrenocortical cells through inhibition of 3 $\beta$ HSD2. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96**, E31–39 (2011).
79. Ruggiero, C. & Lalli, E. Impact of ACTH Signaling on Transcriptional Regulation of Steroidogenic Genes. *Front. Endocrinol.* **7**, (2016).
80. Gallo-Payet, N. 60 years of POMC: Adrenal and extra-adrenal functions of ACTH. *J. Mol. Endocrinol.* **56**, T135–T156 (2016).
81. Xing, Y. *et al.* ACTH is a potent regulator of gene expression in human adrenal cells. *J. Mol. Endocrinol.* **45**, 59–68 (2010).
82. Nogueira, E. F. *et al.* Angiotensin II regulation of adrenocortical gene transcription. *Mol. Cell. Endocrinol.* **302**, 230–236 (2009).
83. Clyne, C. D. *et al.* Angiotensin II and potassium regulate human CYP11B2 transcription through common cis-elements. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **11**, 638–649 (1997).
84. Romero, D. G. *et al.* Adrenal transcription regulatory genes modulated by angiotensin II and their role in steroidogenesis. *Physiol. Genomics* **30**, 26–34 (2007).
85. Malmejac, J. Activity of the adrenal medulla and its regulation. *Physiol. Rev.* **44**, 186–218 (1964).

86. Schulz, C. *et al.* Principles of catecholamine biosynthesis, metabolism and release. *Front. Horm. Res.* **31**, 1–25 (2004).
87. Kebebew, E. *Management of Adrenal Masses in Children and Adults*. (Springer, 2016).
88. Fassnacht, M. *et al.* Management of adrenal incidentalomas: European Society of Endocrinology Clinical Practice Guideline in collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors. *Eur. J. Endocrinol.* **175**, G1–G34 (2016).
89. Hodin, R. *et al.* Diagnosis and management of pheochromocytoma. *Curr. Probl. Surg.* **51**, 151–187 (2014).
90. Tanabe, A. & Naruse, M. Recent advances in the management of pheochromocytoma and paraganglioma. *Hypertens. Res.* **43**, 1141–1151 (2020).
91. Lenders, J. W. M. *et al.* Pheochromocytoma and Paraganglioma: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **99**, 1915–1942 (2014).
92. Newman, E. A. *et al.* Update on neuroblastoma. *J. Pediatr. Surg.* **54**, 383–389 (2019).
93. Mete, O. *et al.* Overview of the 2022 WHO Classification of Adrenal Cortical Tumors. *Endocr. Pathol.* **33**, 155–196 (2022).
94. Bourdeau, I. *et al.* Adrenocortical hyperplasia: A multifaceted disease. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **34**, 101386 (2020).
95. Duan, K. *et al.* Clinicopathological correlates of adrenal Cushing’s syndrome. *J. Clin. Pathol.* **68**, 175–186 (2015).
96. Pitsava, G. & Stratakis, C. A. Genetic Alterations in Benign Adrenal Tumors. *Biomedicines* **10**, 1041 (2022).
97. Assié, G. *et al.* ARMC5 Mutations in Macronodular Adrenal Hyperplasia with Cushing’s Syndrome. *N. Engl. J. Med.* **369**, 2105–2114 (2013).
98. Espiard, S. *et al.* ARMC5 Mutations in a Large Cohort of Primary Macronodular Adrenal Hyperplasia: Clinical and Functional Consequences. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **100**, E926–E935 (2015).
99. Fragoso, M. C. B. V. *et al.* Cushing’s Syndrome Secondary to Adrenocorticotropin-Independent Macronodular Adrenocortical Hyperplasia due to Activating Mutations of GNAS1 Gene. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88**, 2147–2151 (2003).
100. Williams, T. A. *et al.* International Histopathology Consensus for Unilateral Primary Aldosteronism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **106**, 42–54 (2021).
101. Grumbach, M. M. *et al.* Management of the Clinically Inapparent Adrenal Mass (Incidentaloma). *Ann. Intern. Med.* **138**, 424–429 (2003).
102. Zeiger, M. A. *et al.* American Association of Clinical Endocrinologists and American Association of Endocrine Surgeons Medical Guidelines for the Management of Adrenal Incidentalomas: Executive Summary of Recommendations. *Endocr. Pract.* **15**, 450–453 (2009).
103. Conn, J. W. Primary aldosteronism. *J. Lab. Clin. Med.* **45**, 661–664 (1955).
104. Vaidya, A. *et al.* Primary Aldosteronism: State-of-the-Art Review. *Am. J. Hypertens.* hpac079 (2022) doi:10.1093/ajh/hpac079.
105. Funder, J. W. *et al.* Case Detection, Diagnosis, and Treatment of Patients with Primary Aldosteronism: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **93**, 3266–3281 (2008).
106. Amar, L. *et al.* SFE/SFHTA/AFCE primary aldosteronism consensus: Introduction and handbook. *Ann. Endocrinol.* **77**, 179–186 (2016).
107. Monticone, S. *et al.* Prevalence and Clinical Manifestations of Primary Aldosteronism Encountered in Primary Care Practice. *J. Am. Coll. Cardiol.* **69**, 1811–1820 (2017).

108. Shimada, H. *et al.* Molecular Mechanisms of Functional Adrenocortical Adenoma and Carcinoma: Genetic Characterization and Intracellular Signaling Pathway. *Biomedicines* **9**, 892 (2021).
109. Nieman, L. K. *et al.* The diagnosis of Cushing's syndrome: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **93**, 1526–1540 (2008).
110. Pivonello, R. *et al.* Complications of Cushing's syndrome: state of the art. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **4**, 611–629 (2016).
111. Cristante, J. *et al.* Pneumocystis pneumonia can complicate medical treatment of hypercortisolism even in outpatients with Cushing's disease. *Ann. Endocrinol.* **81**, 551–560 (2020).
112. Rubinstein, G. *et al.* Time to Diagnosis in Cushing's Syndrome: A Meta-Analysis Based on 5367 Patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **105**, e12–e22 (2020).
113. Kreitschmann-Andermahr, I. *et al.* From first symptoms to final diagnosis of Cushing's disease: experiences of 176 patients. *Eur. J. Endocrinol.* **172**, X1–X1 (2015).
114. Deutschbein, T. *et al.* Age-dependent and sex-dependent disparity in mortality in patients with adrenal incidentalomas and autonomous cortisol secretion: an international, retrospective, cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **10**, 499–508 (2022).
115. Park, J. *et al.* Cardiovascular Outcomes in Autonomous Cortisol Secretion and Nonfunctioning Adrenal Adenoma: A Systematic Review. *J. Endocr. Soc.* **3**, 996–1008 (2019).
116. Nieman, L. K. *et al.* Treatment of Cushing's Syndrome: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **100**, 2807–2831 (2015).
117. Calebiro, D. *et al.* cAMP signaling in cortisol-producing adrenal adenoma. *Eur. J. Endocrinol.* **173**, M99–M106 (2015).
118. Juhlin, C. C. *et al.* What Did We Learn from the Molecular Biology of Adrenal Cortical Neoplasia? From Histopathology to Translational Genomics. *Endocr. Pathol.* **32**, 102–133 (2021).
119. Faillot, S. *et al.* Genomic classification of benign adrenocortical lesions. *Endocr. Relat. Cancer* **28**, 79–95 (2021).
120. Kerkhofs, T. M. A. *et al.* Adrenocortical carcinoma: A population-based study on incidence and survival in the Netherlands since 1993. *Eur. J. Cancer* **49**, 2579–2586 (2013).
121. Kebebew, E. *et al.* Extent of disease at presentation and outcome for adrenocortical carcinoma: have we made progress? *World J. Surg.* **30**, 872–878 (2006).
122. Sharma, E. *et al.* The Characteristics and Trends in Adrenocortical Carcinoma: A United States Population Based Study. *J. Clin. Med. Res.* **10**, 636–640 (2018).
123. Fassnacht, M. *et al.* European Society of Endocrinology Clinical Practice Guidelines on the management of adrenocortical carcinoma in adults, in collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors. *Eur. J. Endocrinol.* **179**, G1–G46 (2018).
124. Fassnacht, M. *et al.* Adrenocortical carcinoma: a clinician's update. *Nat. Rev. Endocrinol.* **7**, 323–335 (2011).
125. Abiven, G. *et al.* Clinical and Biological Features in the Prognosis of Adrenocortical Cancer: Poor Outcome of Cortisol-Secreting Tumors in a Series of 202 Consecutive Patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **91**, 2650–2655 (2006).
126. Sandru, F. *et al.* Adrenocortical carcinoma: Pediatric aspects (Review). *Exp. Ther. Med.* **23**, 287 (2022).
127. Sandrini, R. *et al.* Childhood Adrenocortical Tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82**, 2027–2031 (1997).
128. Costa, T. E. J. *et al.* Penetrance of the TP53 R337H Mutation and Pediatric Adrenocortical Carcinoma Incidence Associated with Environmental Influences in a 12-Year Observational Cohort in Southern Brazil. *Cancers* **11**, 1804 (2019).

129. Ribeiro, R. C. *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.* **98**, 9330–9335 (2001).
130. Kerkhofs, T. M. A. *et al.* Adrenocortical carcinoma in children: First population-based clinicopathological study with long-term follow-up. *Oncol. Rep.* **32**, 2836–2844 (2014).
131. Ribeiro, R. C. *et al.* Adrenocortical carcinoma in children: a study of 40 cases. *J. Clin. Oncol.* (2016) doi:10.1200/JCO.1990.8.1.67.
132. Else, T. & Rodriguez-Galindo, C. 5th International ACC Symposium: Hereditary Predisposition to Childhood ACC and the Associated Molecular Phenotype. *Horm. Cancer* **7**, 36–39 (2016).
133. Li, F. P. & Fraumeni, J. F. Soft-Tissue Sarcomas, Breast Cancer, and Other Neoplasms. *Ann. Intern. Med.* **71**, 747–752 (1969).
134. Malkin, D. *et al.* Germ Line p53 Mutations in a Familial Syndrome of Breast Cancer, Sarcomas, and Other Neoplasms. *Science* **250**, 1233–1238 (1990).
135. Raymond, V. M. *et al.* Prevalence of germline TP53 mutations in a prospective series of unselected patients with adrenocortical carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **98**, E119–125 (2013).
136. Wasserman, J. D. *et al.* 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 (2015).
137. Li, X. *et al.* Recent advances in Lynch syndrome. *Exp. Hematol. Oncol.* **10**, 37 (2021).
138. Lynch, H. T. *et al.* Hereditary factors in cancer. Study of two large midwestern kindreds. *Arch. Intern. Med.* **117**, 206–212 (1966).
139. Pieterman, C. R. C. & Valk, G. D. Update on the clinical management of multiple endocrine neoplasia type 1. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* **n/a**.
140. Wang, W. *et al.* Adrenocortical carcinoma in patients with MEN1: a kindred report and review of the literature. *Endocr. Connect.* **8**, 230–238 (2019).
141. Gatta-Cherifi, B. *et al.* Adrenal involvement in MEN1. Analysis of 715 cases from the Groupe d’étude des Tumeurs Endocrines database. *Eur. J. Endocrinol.* **166**, 269–279 (2012).
142. Else, T. Association of Adrenocortical Carcinoma with Familial Cancer Susceptibility Syndromes. *Mol. Cell. Endocrinol.* **351**, 66–70 (2012).
143. Shiroky, J. S. *et al.* Characteristics of Adrenal Masses in Familial Adenomatous Polyposis. *Dis. Colon Rectum* **61**, 679–685 (2018).
144. Jouinot, A. & Bertherat, J. Chapter 9 Diseases Predisposing to Adrenocortical Malignancy (Li–Fraumeni Syndrome, Beckwith–Wiedemann Syndrome, and Carney Complex). in *Genetics of Endocrine Diseases and Syndromes* 473 (Springer Nature Switzerland, 2019).
145. Bertherat, J. Adrenocortical Cancer in Carney Complex: A Paradigm of Endocrine Tumor Progression or an Association of Genetic Predisposing Factors? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **97**, 387–390 (2012).
146. Menon, R. K. *et al.* Adrenal cancer in neurofibromatosis type 1: case report and DNA analysis. *Endocrinol. Diabetes Metab. Case Rep.* **2014**, 140074 (2014).
147. Fassnacht, M. *et al.* Limited prognostic value of the 2004 International Union Against Cancer staging classification for adrenocortical carcinoma. *Cancer* **115**, 243–250 (2009).
148. Amini, M. *et al.* *AJCC Cancer Staging Manual. 8th ed.* (Springer International Publishing, 2018).
149. Luton, J.-P. *et al.* Clinical Features of Adrenocortical Carcinoma, Prognostic Factors, and the Effect of Mitotane Therapy. *N. Engl. J. Med.* **322**, 1195–1201 (1990).
150. Volante, M. *et al.* Clinicopathological study of a series of 92 adrenocortical carcinomas: from a proposal of simplified diagnostic algorithm to prognostic stratification. *Histopathology* **55**, 535–543 (2009).

151. Aubert, S. *et al.* Weiss system revisited: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 49 adrenocortical tumors. *Am. J. Surg. Pathol.* **26**, 1612–1619 (2002).
152. Pennanen, M. *et al.* Helsinki score—a novel model for prediction of metastases in adrenocortical carcinomas. *Hum. Pathol.* **46**, 404–410 (2015).
153. Weiss, L. M. *et al.* Pathologic features of prognostic significance in adrenocortical carcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.* **13**, 202–206 (1989).
154. Lughezzani, G. *et al.* The European Network for the Study of Adrenal Tumors staging system is prognostically superior to the international union against cancer-staging system: A North American validation. *Eur. J. Cancer* **46**, 713–719 (2010).
155. Bilimoria, K. Y. *et al.* Adrenocortical carcinoma in the United States. *Cancer* **113**, 3130–3136 (2008).
156. Abdel-Rahman, O. Revisiting the AJCC staging system of adrenocortical carcinoma. *J. Endocrinol. Invest.* **45**, 89–94 (2022).
157. Ayala-Ramirez, M. *et al.* Adrenocortical carcinoma: clinical outcomes and prognosis of 330 patients at a tertiary care center. *Eur. J. Endocrinol.* **169**, 891–899 (2013).
158. Vanbrabant, T. *et al.* Influence of hormonal functional status on survival in adrenocortical carcinoma: systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Endocrinol.* **179**, 429–436 (2018).
159. Sundin, A. Imaging of Adrenal Masses with Emphasis on Adrenocortical Tumors. *Theranostics* **2**, 516–522 (2012).
160. Weissferdt, A. *et al.* Adrenocortical Carcinoma: A Comprehensive Immunohistochemical Study of 40 Cases. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* **22**, 24–30 (2014).
161. Weiss, L. M. Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors. *Am. J. Surg. Pathol.* **8**, 163–169 (1984).
162. Lam, A. K. Update on Adrenal Tumours in 2017 World Health Organization (WHO) of Endocrine Tumours. *Endocr. Pathol.* **28**, 213–227 (2017).
163. Papotti, M. *et al.* The Weiss Score and Beyond—Histopathology for Adrenocortical Carcinoma. *Horm. Cancer* **2**, 333–340 (2011).
164. Bisceglia, M. *et al.* Adrenocortical oncocytic tumors: report of 10 cases and review of the literature. *Int. J. Surg. Pathol.* **12**, 231–243 (2004).
165. Lam, A. K. Adrenocortical Carcinoma: Updates of Clinical and Pathological Features after Renewed World Health Organisation Classification and Pathology Staging. *Biomedicines* **9**, 175 (2021).
166. Tissier, F. *et al.* Adrenocortical tumors: improving the practice of the Weiss system through virtual microscopy: a National Program of the French Network INCa-COMETE. *Am. J. Surg. Pathol.* **36**, 1194–1201 (2012).
167. Duregon, E. *et al.* The reticulin algorithm for adrenocortical tumor diagnosis: a multicentric validation study on 245 unpublished cases. *Am. J. Surg. Pathol.* **37**, 1433–1440 (2013).
168. Terzolo, M. *et al.* Immunohistochemical assessment of Ki-67 in the differential diagnosis of adrenocortical tumors. *Urology* **57**, 176–182 (2001).
169. Stojadinovic, A. *et al.* Adrenocortical Adenoma and Carcinoma: Histopathological and Molecular Comparative Analysis. *Mod. Pathol.* **16**, 742–751 (2003).
170. Soon, P. S. H. *et al.* Microarray gene expression and immunohistochemistry analyses of adrenocortical tumors identify IGF2 and Ki-67 as useful in differentiating carcinomas from adenomas. *Endocr. Relat. Cancer* **16**, 573–583 (2009).
171. Sasano, H. *et al.* Recent advances in histopathology and immunohistochemistry of adrenocortical carcinoma. *Endocr. Pathol.* **17**, 345–354 (2006).

172. Papatomas, T. G. *et al.* An International Ki67 Reproducibility Study in Adrenal Cortical Carcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.* **40**, 569–576 (2016).
173. Babińska, A. *et al.* Diagnostic and prognostic role of SF1, IGF2, Ki67, p53, adiponectin, and leptin receptors in human adrenal cortical tumors. *J. Surg. Oncol.* **116**, 427–433 (2017).
174. Daher, M. *et al.* Temporal Trends in Outcomes in Patients With Adrenocortical Carcinoma: A Multidisciplinary Referral-center Experience. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **107**, 1239–1246 (2022).
175. Fisher, S. B. *et al.* Comparative Performance of the 7th and 8th Editions of the American Joint Committee on Cancer Staging Manual for Adrenocortical Carcinoma. *World J. Surg.* **44**, 544–551 (2020).
176. Assié, G. *et al.* Prognostic Parameters of Metastatic Adrenocortical Carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **92**, 148–154 (2007).
177. Libé, R. *et al.* Prognostic factors in stage III–IV adrenocortical carcinomas (ACC): an European Network for the Study of Adrenal Tumor (ENSAT) study. *Ann. Oncol.* **26**, 2119–2125 (2015).
178. Choi, Y. M. *et al.* Clinicopathological Features Associated With the Prognosis of Patients With Adrenal Cortical Carcinoma: Usefulness of the Ki-67 Index. *Medicine (Baltimore)* **95**, e3736 (2016).
179. Greene, F. L. *et al.* *AJCC Cancer Staging Manual 7th edition.* (Springer Science & Business Media, 2013).
180. Fassnacht, M. *et al.* Combination chemotherapy in advanced adrenocortical carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **366**, 2189–2197 (2012).
181. Else, T. *et al.* Adjuvant Therapies and Patient and Tumor Characteristics Associated With Survival of Adult Patients With Adrenocortical Carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **99**, 455–461 (2014).
182. Berruti, A. *et al.* Prognostic Role of Overt Hypercortisolism in Completely Operated Patients with Adrenocortical Cancer. *Eur. Urol.* **65**, 832–838 (2014).
183. Beuschlein, F. *et al.* Major Prognostic Role of Ki67 in Localized Adrenocortical Carcinoma After Complete Resection. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **100**, 841–849 (2015).
184. Scollo, C. *et al.* Prognostic Factors for Adrenocortical Carcinoma Outcomes. *Front. Endocrinol.* **7**, 99 (2016).
185. Zhang, F. *et al.* Prognostic Role of Ki-67 in Adrenocortical Carcinoma After Primary Resection: A Retrospective Mono-Institutional Study. *Adv. Ther.* **36**, 2756–2768 (2019).
186. Kovach, A. E. *et al.* Genomic and immunohistochemical analysis in human adrenal cortical neoplasia reveal beta-catenin mutations as potential prognostic biomarker. *Discoveries* **3**, e40 (2015).
187. Tissier, F. *et al.* 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 (2005).
188. Pinheiro, C. *et al.* Metabolic reprogramming: a new relevant pathway in adult adrenocortical tumors. *Oncotarget* **6**, 44403–44421 (2015).
189. Fenske, W. *et al.* Glucose transporter GLUT1 expression is an stage-independent predictor of clinical outcome in adrenocortical carcinoma. *Endocr. Relat. Cancer* **16**, 919–928 (2009).
190. Libé, R. *et al.* Somatic TP53 Mutations Are Relatively Rare among Adrenocortical Cancers with the Frequent 17p13 Loss of Heterozygosity. *Clin. Cancer Res.* **13**, 844–850 (2007).
191. Pennanen, M. *et al.* C-myc expression in adrenocortical tumours. *J. Clin. Pathol.* **71**, 129–134 (2018).

192. Waldmann, J. *et al.* Clinical impact of TP53 alterations in adrenocortical carcinomas. *Langenbecks Arch. Surg.* **397**, 209–216 (2012).
193. Sbiera, S. *et al.* High Diagnostic and Prognostic Value of Steroidogenic Factor-1 Expression in Adrenal Tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **95**, E161–E171 (2010).
194. Gaujoux, S. *et al.*  $\beta$ -Catenin Activation Is Associated with Specific Clinical and Pathologic Characteristics and a Poor Outcome in Adrenocortical Carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **17**, 328–336 (2011).
195. Ragazzon, B. *et al.* Transcriptome Analysis Reveals that p53 and  $\beta$ -Catenin Alterations Occur in a Group of Aggressive Adrenocortical Cancers. *Cancer Res.* **70**, 8276–8281 (2010).
196. Heaton, J. H. *et al.* Progression to adrenocortical tumorigenesis in mice and humans through insulin-like growth factor 2 and  $\beta$ -catenin. *Am. J. Pathol.* **181**, 1017–1033 (2012).
197. Freire, D. S. *et al.* Development and internal validation of an adrenal cortical carcinoma prognostic score for predicting the risk of metastasis and local recurrence. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* **79**, 468–475 (2013).
198. Gaujoux, S. *et al.* European Society of Endocrine Surgeons (ESES) and European Network for the Study of Adrenal Tumours (ENSAT) recommendations for the surgical management of adrenocortical carcinoma. *Br. J. Surg.* **104**, 358–376 (2017).
199. Bergenstal, D. M. *et al.* Chemotherapy of adrenocortical cancer with o,p'DDD. *Ann. Intern. Med.* **53**, 672–682 (1960).
200. Gutierrez, M. L. & Crooke, S. T. Mitotane (o, p'-DDD). *Cancer Treat. Rev.* **7**, 49–55 (1980).
201. Kimpel, O. *et al.* Adjuvant platinum-based chemotherapy in radically resected adrenocortical carcinoma: a cohort study. *Br. J. Cancer* **125**, 1233–1238 (2021).
202. Fareau, G. G. *et al.* Systemic chemotherapy for adrenocortical carcinoma: comparative responses to conventional first-line therapies. *Anticancer. Drugs* **19**, 637–644 (2008).
203. Sperone, P. *et al.* Gemcitabine plus metronomic 5-fluorouracil or capecitabine as a second-/third-line chemotherapy in advanced adrenocortical carcinoma: a multicenter phase II study. *Endocr. Relat. Cancer* **17**, 445–453 (2010).
204. Henning, J. E. K. *et al.* Gemcitabine-Based Chemotherapy in Adrenocortical Carcinoma: A Multicenter Study of Efficacy and Predictive Factors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **102**, 4323–4332 (2017).
205. Cosentini, D. *et al.* Activity and safety of temozolomide in advanced adrenocortical carcinoma patients. *Eur. J. Endocrinol.* **181**, 681–689 (2019).
206. Tiberio, G. A. M. *et al.* Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy for Primary or Recurrent Adrenocortical Carcinoma. A Single Center Study. *Cancers* **12**, (2020).
207. Berruti, A. *et al.* Phase II study of weekly paclitaxel and sorafenib as second/third-line therapy in patients with adrenocortical carcinoma. *Eur. J. Endocrinol.* **166**, 451–458 (2012).
208. Kroiss, M. *et al.* Sunitinib in refractory adrenocortical carcinoma: a phase II, single-arm, open-label trial. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **97**, 3495–3503 (2012).
209. O'Sullivan, C. *et al.* The VEGF Inhibitor Axitinib Has Limited Effectiveness as a Therapy for Adrenocortical Cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **99**, 1291–1297 (2014).
210. Wortmann, S. *et al.* Bevacizumab plus capecitabine as a salvage therapy in advanced adrenocortical carcinoma. *Eur. J. Endocrinol.* **162**, 349–356 (2010).
211. Fassnacht, M. *et al.* 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 (2015).

212. Araujo-Castro, M. *et al.* Immunotherapy in Adrenocortical Carcinoma: Predictors of Response, Efficacy, Safety, and Mechanisms of Resistance. *Biomedicines* **9**, 304 (2021).
213. Klein, O. *et al.* Combination immunotherapy with ipilimumab and nivolumab in patients with advanced adrenocortical carcinoma: a subgroup analysis of CA209-538. *Oncoimmunology* **10**, 1908771 (2021).
214. McGregor, B. A. *et al.* Results of a multicenter, phase 2 study of nivolumab and ipilimumab for patients with advanced rare genitourinary malignancies. *Cancer* **127**, 840–849 (2021).
215. Alam, W. *et al.* Complete Radiological Response of Recurrent Metastatic Adrenocortical Carcinoma to Pembrolizumab and Mitotane. *Clin. Med. Insights Oncol.* **15**, 11795549211007682 (2021).
216. Fassnacht, M. *et al.* Efficacy of Adjuvant Radiotherapy of the Tumor Bed on Local Recurrence of Adrenocortical Carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **91**, 4501–4504 (2006).
217. Habra, M. A. *et al.* A retrospective cohort analysis of the efficacy of adjuvant radiotherapy after primary surgical resection in patients with adrenocortical carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **98**, 192–197 (2013).
218. Sabolch, A. *et al.* Adjuvant Radiation Therapy Improves Local Control After Surgical Resection in Patients With Localized Adrenocortical Carcinoma. *Int. J. Radiat. Oncol.* **92**, 252–259 (2015).
219. Gharzai, L. A. *et al.* Adjuvant Radiation Improves Recurrence-Free Survival and Overall Survival in Adrenocortical Carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **104**, 3743–3750 (2019).
220. Wu, K. *et al.* Benefit of Postoperative Radiotherapy for Patients With Nonmetastatic Adrenocortical Carcinoma: A Population-Based Analysis. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* **19**, 1425–1432 (2021).
221. Boilève, A. *et al.* Combination of Mitotane and Locoregional Treatments in Low-volume Metastatic Adrenocortical Carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **106**, e4698–e4707 (2021).
222. Roux, C. *et al.* Loco-Regional Therapies in Oligometastatic Adrenocortical Carcinoma. *Cancers* **14**, 2730 (2022).
223. Mauda-Havakuk, M. *et al.* Long-term outcomes in patients with advanced adrenocortical carcinoma after image-guided locoregional ablation or embolization. *Cancer Med.* **10**, 2259–2267 (2021).
224. Assié, G. *et al.* Integrated genomic characterization of adrenocortical carcinoma. *Nat. Genet.* **46**, 607–612 (2014).
225. Zheng, S. *et al.* Comprehensive Pan-Genomic Characterization of Adrenocortical Carcinoma. *Cancer Cell* **30**, 363 (2016).
226. Yano, T. *et al.* Genetic changes in human adrenocortical carcinomas. *J. Natl. Cancer Inst.* **81**, 518–523 (1989).
227. Gicquel, C. *et al.* Recent advances in the pathogenesis of adrenocortical tumours. *Eur. J. Endocrinol.* **133**, 133–144 (1995).
228. Gicquel, C. *et al.* Molecular Markers and Long-Term Recurrences in a Large Cohort of Patients with Sporadic Adrenocortical Tumors. *Cancer Res.* **61**, 6762–6767 (2001).
229. Reincke, M. *et al.* p53 mutations in human adrenocortical neoplasms: immunohistochemical and molecular studies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **78**, 790–794 (1994).
230. Juhlin, C. C. *et al.* Whole-exome sequencing characterizes the landscape of somatic mutations and copy number alterations in adrenocortical carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **100**, E493-502 (2015).
231. Gaujoux, S. *et al.* Inactivation of the APC Gene Is Constant in Adrenocortical Tumors from Patients with Familial Adenomatous Polyposis but Not Frequent in Sporadic Adrenocortical Cancers. *Clin. Cancer Res.* **16**, 5133–5141 (2010).



232. Gaujoux, S. *et al.* Wnt/ $\beta$ -Catenin and 3',5'-Cyclic Adenosine 5'-Monophosphate/Protein Kinase A Signaling Pathways Alterations and Somatic  $\beta$ -Catenin Gene Mutations in the Progression of Adrenocortical Tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **93**, 4135–4140 (2008).
233. Tadjine, M. *et al.* Frequent mutations of  $\beta$ -catenin gene in sporadic secreting adrenocortical adenomas\*. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* **68**, 264–270 (2008).
234. Maharjan, R. *et al.* Comprehensive analysis of CTNNB1 in adrenocortical carcinomas: Identification of novel mutations and correlation to survival. *Sci. Rep.* **8**, 8610 (2018).
235. Gicquel, C. *et al.* Rearrangements at the 11p15 locus and overexpression of insulin-like growth factor-II gene in sporadic adrenocortical tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **78**, 1444–1453 (1994).
236. Gicquel, C. *et al.* Structural and Functional Abnormalities at 11p15 Are Associated with the Malignant Phenotype in Sporadic Adrenocortical Tumors: Study on a Series of 82 Tumors1. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82**, 2559–2565 (1997).
237. Ilvesmäki, V. *et al.* Insulin-like growth factors (IGFs) and their receptors in adrenal tumors: high IGF-II expression in functional adrenocortical carcinomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **77**, 852–858 (1993).
238. Drelon, C. *et al.* Analysis of the role of Igf2 in adrenal tumour development in transgenic mouse models. *PLoS One* **7**, e44171 (2012).
239. Weber, M. M. *et al.* The role of the insulin-like growth factor system in adrenocortical tumorigenesis. *Eur. J. Clin. Invest.* **30**, 69–75 (2000).
240. Vatrano, S. *et al.* Detailed genomic characterization identifies high heterogeneity and histotype-specific genomic profiles in adrenocortical carcinomas. *Mod. Pathol.* **31**, 1257–1269 (2018).
241. Giordano, T. J. *et al.* Molecular Classification and Prognostication of Adrenocortical Tumors by Transcriptome Profiling. *Clin. Cancer Res.* **15**, 668–676 (2009).
242. de Reyniès, A. *et al.* 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 (2009).
243. Jouinot, A. *et al.* Transcriptome in paraffin samples for the diagnosis and prognosis of adrenocortical carcinoma. *Eur. J. Endocrinol.* **186**, 607–617 (2022).
244. Soon, P. S. H. *et al.* 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 (2009).
245. Patterson, E. E. *et al.* MicroRNA profiling of adrenocortical tumors reveals miR-483 as a marker of malignancy. *Cancer* **117**, 1630–1639 (2011).
246. Chabre, O. *et al.* Serum miR-483-5p and miR-195 are predictive of recurrence risk in adrenocortical cancer patients. *Endocr. Relat. Cancer* **20**, 579–594 (2013).
247. Tömböl, Z. *et al.* Integrative molecular bioinformatics study of human adrenocortical tumors: microRNA, tissue-specific target prediction, and pathway analysis. *Endocr. Relat. Cancer* **16**, 895–906 (2009).
248. Feinmesser, M. *et al.* Specific MicroRNAs Differentiate Adrenocortical Adenomas from Carcinomas and Correlate With Weiss Histopathologic System. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. AIMM* **23**, 522–531 (2015).
249. Duregon, E. *et al.* MicroRNA expression patterns in adrenocortical carcinoma variants and clinical pathologic correlations. *Hum. Pathol.* **45**, 1555–1562 (2014).
250. Özata, D. M. *et al.* The role of microRNA deregulation in the pathogenesis of adrenocortical carcinoma. *Endocr. Relat. Cancer* **18**, 643–655 (2011).
251. Koperski, Ł. *et al.* Next-generation sequencing reveals microRNA markers of adrenocortical tumors malignancy. *Oncotarget* **8**, 49191–49200 (2017).

252. Cherradi, N. microRNAs as Potential Biomarkers in Adrenocortical Cancer: Progress and Challenges. *Front. Endocrinol.* **6**, 195 (2015).
253. Patel, D. *et al.* MiR-34a and miR-483-5p are candidate serum biomarkers for adrenocortical tumors. *Surgery* **154**, 1224–1228; discussion 1229 (2013).
254. Perge, P. *et al.* Evaluation and diagnostic potential of circulating extracellular vesicle-associated microRNAs in adrenocortical tumors. *Sci. Rep.* **7**, 5474 (2017).
255. Decmann, A. *et al.* Comparison of plasma and urinary microRNA-483-5p for the diagnosis of adrenocortical malignancy. *J. Biotechnol.* **297**, 49–53 (2019).
256. Barreau, O. *et al.* Identification of a CpG Island Methylator Phenotype in Adrenocortical Carcinomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **98**, E174–E184 (2013).
257. Assié, G. *et al.* Value of Molecular Classification for Prognostic Assessment of Adrenocortical Carcinoma. *JAMA Oncol.* (2019) doi:10.1001/jamaoncol.2019.1558.
258. Mizuno, T. *et al.* A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 1966–1970 (1984).
259. Napoli, C. *et al.* Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* **2**, 279–289 (1990).
260. Fire, A. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806–811 (1998).
261. Fire, A. & Mello, C. C. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006, Advanced Informations. *NobelPrize.org* <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2006/advanced-information/> (2006).
262. Sioud, M. RNA Interference: Story and Mechanisms. in *Design and Delivery of SiRNA Therapeutics* (eds. Ditzel, H. J. *et al.*) 1–15 (Springer US, 2021). doi:10.1007/978-1-0716-1298-9\_1.
263. Ambros, V. *et al.* MicroRNAs and Other Tiny Endogenous RNAs in *C. elegans*. *Curr. Biol.* **13**, 807–818 (2003).
264. Sontheimer, E. J. & Carthew, R. W. Silence from within: Endogenous siRNAs and miRNAs. *Cell* **122**, 9–12 (2005).
265. Piatek, M. J. & Werner, A. Endogenous siRNAs: regulators of internal affairs. *Biochem. Soc. Trans.* **42**, 1174–1179 (2014).
266. Brummelkamp, T. R. *et al.* A System for Stable Expression of Short Interfering RNAs in Mammalian Cells. *Science* **296**, 550–553 (2002).
267. Paddison, P. J. *et al.* Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev.* **16**, 948–958 (2002).
268. Bofill-De Ros, X. & Gu, S. Guidelines for the optimal design of miRNA-based shRNAs. *Methods* **103**, 157–166 (2016).
269. Wightman, B. *et al.* Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* **75**, 855–862 (1993).
270. Lee, R. C. *et al.* The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**, 843–854 (1993).
271. Lee, R. C. & Ambros, V. An Extensive Class of Small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **294**, 862–864 (2001).
272. Lau, N. C. *et al.* An Abundant Class of Tiny RNAs with Probable Regulatory Roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **294**, 858–862 (2001).
273. Lagos-Quintana, M. *et al.* Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. *Science* **294**, 853–858 (2001).

274. Ambros, V. *et al.* A uniform system for microRNA annotation. *RNA* **9**, 277–279 (2003).
275. Kozomara, A. & Griffiths-Jones, S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* **42**, D68–D73 (2014).
276. Desvignes, T. *et al.* miRNA Nomenclature: A View Incorporating Genetic Origins, Biosynthetic Pathways, and Sequence Variants. *Trends Genet.* **31**, 613–626 (2015).
277. Salim, U. *et al.* Biogenesis, characterization, and functions of mirtrons. *WIREs RNA* **13**, e1680 (2022).
278. Treiber, T. *et al.* Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**, 5–20 (2019).
279. Lee, Y. *et al.* The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**, 415–419 (2003).
280. Han, J. *et al.* The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* **18**, 3016–3027 (2004).
281. Lund, E. *et al.* Nuclear Export of MicroRNA Precursors. *Science* **303**, 95–98 (2004).
282. Yi, R. *et al.* Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* **17**, 3011–3016 (2003).
283. Bernstein, E. *et al.* Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**, 363–366 (2001).
284. Förstemann, K. *et al.* Normal microRNA Maturation and Germ-Line Stem Cell Maintenance Requires Loquacious, a Double-Stranded RNA-Binding Domain Protein. *PLOS Biol.* **3**, e236 (2005).
285. Chendrimada, T. P. *et al.* TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* **436**, 740–744 (2005).
286. Liu, J. *et al.* Argonaute2 Is the Catalytic Engine of Mammalian RNAi. *Science* **305**, 1437–1441 (2004).
287. Meister, G. *et al.* Human Argonaute2 Mediates RNA Cleavage Targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol. Cell* **15**, 185–197 (2004).
288. Hammond, S. M. *et al.* An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**, 293–296 (2000).
289. Ha, M. & Kim, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 509–524 (2014).
290. Kim, Y.-K. & Kim, V. N. Processing of intronic microRNAs. *EMBO J.* **26**, 775–783 (2007).
291. Rodriguez, A. *et al.* Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* **14**, 1902–1910 (2004).
292. Baskerville, S. & Bartel, D. P. Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA N. Y. N* **11**, 241–247 (2005).
293. Morlando, M. *et al.* Primary microRNA transcripts are processed co-transcriptionally. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 902–909 (2008).
294. Tan, H. *et al.* Pan-cancer analysis on microRNA-associated gene activation. *EBioMedicine* **43**, 82–97 (2019).
295. Monteys, A. M. *et al.* Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. *RNA N. Y. N* **16**, 495–505 (2010).
296. Lee, Y. *et al.* MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* **21**, 4663–4670 (2002).

297. Huntzinger, E. & Izaurralde, E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 99–110 (2011).
298. Baek, D. *et al.* The impact of microRNAs on protein output. *Nature* **455**, 64–71 (2008).
299. Selbach, M. *et al.* Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* **455**, 58–63 (2008).
300. Krützfeldt, J. *et al.* Silencing of microRNAs in vivo with ‘antagomirs’. *Nature* **438**, 685–689 (2005).
301. Iwakawa, H. & Tomari, Y. Life of RISC: Formation, action, and degradation of RNA-induced silencing complex. *Mol. Cell* **82**, 30–43 (2022).
302. Bartel, D. P. Metazoan MicroRNAs. *Cell* **173**, 20–51 (2018).
303. Lewis, B. P. *et al.* Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets. *Cell* **120**, 15–20 (2005).
304. Grimson, A. *et al.* MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants beyond Seed Pairing. *Mol. Cell* **27**, 91–105 (2007).
305. Schnall-Levin, M. *et al.* Conserved microRNA targeting in *Drosophila* is as widespread in coding regions as in 3'UTRs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 15751–15756 (2010).
306. Béthune, J. *et al.* Kinetic analysis reveals successive steps leading to miRNA-mediated silencing in mammalian cells. *EMBO Rep.* **13**, 716–723 (2012).
307. Djuranovic, S. *et al.* miRNA-Mediated Gene Silencing by Translational Repression Followed by mRNA Deadenylation and Decay. *Science* **336**, 237–240 (2012).
308. Bazzini, A. A. *et al.* Ribosome Profiling Shows That miR-430 Reduces Translation Before Causing mRNA Decay in Zebrafish. *Science* **336**, 233–237 (2012).
309. Olsen, P. H. & Ambros, V. The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev. Biol.* **216**, 671–680 (1999).
310. Petersen, C. P. *et al.* Short RNAs Repress Translation after Initiation in Mammalian Cells. *Mol. Cell* **21**, 533–542 (2006).
311. Fabian, M. R. *et al.* Mammalian miRNA RISC Recruits CAF1 and PABP to Affect PABP-Dependent Deadenylation. *Mol. Cell* **35**, 868–880 (2009).
312. Martinez, J. & Tuschl, T. RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. *Genes Dev.* **18**, 975–980 (2004).
313. Wee, L. M. *et al.* Argonaute Divides Its RNA Guide into Domains with Distinct Functions and RNA-Binding Properties. *Cell* **151**, 1055–1067 (2012).
314. Jo, M. H. *et al.* Human Argonaute 2 Has Diverse Reaction Pathways on Target RNAs. *Mol. Cell* **59**, 117–124 (2015).
315. Valencia-Sanchez, M. A. *et al.* Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev.* **20**, 515–524 (2006).
316. Dragomir, M. P. *et al.* Classical and noncanonical functions of miRNAs in cancers. *Trends Genet.* **38**, 379–394 (2022).
317. Calin, G. A. *et al.* Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 15524–15529 (2002).
318. Calin, G. A. *et al.* Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 2999–3004 (2004).
319. Kabekkodu, S. P. *et al.* Cluster miRNAs and cancer: Diagnostic, prognostic and therapeutic opportunities. *WIREs RNA* **11**, e1563 (2020).

320. Urbanek-Trzeciak, M. O. *et al.* Pan-cancer analysis of somatic mutations in miRNA genes. *EBioMedicine* **61**, 103051 (2020).
321. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
322. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* **12**, 31–46 (2022).
323. Dragomir, M. P. *et al.* Non-coding RNAs in GI cancers: from cancer hallmarks to clinical utility. *Gut* **69**, 748–763 (2020).
324. Salvianti, F. *et al.* New insights in the clinical and translational relevance of miR483-5p in adrenocortical cancer. *Oncotarget* **8**, 65525–65533 (2017).
325. Decmann, A. *et al.* MicroRNA Expression Profiling in Adrenal Myelolipoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **103**, 3522–3530 (2018).
326. Turai, P. I. *et al.* Tissue miRNA Combinations for the Differential Diagnosis of Adrenocortical Carcinoma and Adenoma Established by Artificial Intelligence. *Cancers* **14**, 895 (2022).
327. Oreglia, M. *et al.* Early Postoperative Circulating miR-483-5p Is a Prognosis Marker for Adrenocortical Cancer. *Cancers* **12**, (2020).
328. Schmitz, K. J. *et al.* Differential expression of microRNA-675, microRNA-139-3p and microRNA-335 in benign and malignant adrenocortical tumours. *J. Clin. Pathol.* **64**, 529–535 (2011).
329. Gara, S. K. *et al.* Integrated genome-wide analysis of genomic changes and gene regulation in human adrenocortical tissue samples. *Nucleic Acids Res.* **43**, 9327–9339 (2015).
330. Agosta, C. *et al.* MiR-483-5p and miR-139-5p promote aggressiveness by targeting N-myc downstream-regulated gene family members in adrenocortical cancer. *Int. J. Cancer* **143**, 944–957 (2018).
331. Anghel, S. A. *et al.* Promising Epigenetic Biomarkers for the Early Detection of Colorectal Cancer: A Systematic Review. *Cancers* **13**, 4965 (2021).
332. Khalili, N. *et al.* Diagnostic, prognostic, and therapeutic significance of miR-139-5p in cancers. *Life Sci.* **256**, 117865 (2020).
333. Pantaleo, M. A. *et al.* Integrating miRNA and gene expression profiling analysis revealed regulatory networks in gastrointestinal stromal tumors. *Epigenomics* **8**, 1347–1366 (2016).
334. Liu, J. *et al.* Epigenetic Alternations of MicroRNAs and DNA Methylation Contribute to Liver Metastasis of Colorectal Cancer. *Dig. Dis. Sci.* **64**, 1523–1534 (2019).
335. Ma, J. *et al.* EZH2-Mediated microRNA-139-5p Regulates Epithelial-Mesenchymal Transition and Lymph Node Metastasis of Pancreatic Cancer. *Molecules Cells* **41**, 868–880 (2018).
336. Drelon, C. *et al.* EZH2 is overexpressed in adrenocortical carcinoma and is associated with disease progression. *Hum. Mol. Genet.* **25**, 2789–2800 (2016).
337. Veronese, A. *et al.* Mutated beta-catenin evades a microRNA-dependent regulatory loop. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 4840–4845 (2011).
338. Zheng, H. *et al.* Plasma miRNAs as diagnostic and prognostic biomarkers for ovarian cancer. *PLoS One* **8**, e77853 (2013).
339. Cui, H. *et al.* IGF2 -derived miR-483 mediated oncofunction by suppressing DLC-1 and associated with colorectal cancer. *Oncotarget* **7**, 48456–48466 (2016).
340. Song, Q. *et al.* miR-483-5p Promotes Invasion and Metastasis of Lung Adenocarcinoma by Targeting RhoGDI1 and ALCAM. *Cancer Res.* **74**, 3031–3042 (2014).
341. Wang, C. *et al.* A Five-miRNA Panel Identified From a Multicentric Case–control Study Serves as a Novel Diagnostic Tool for Ethnically Diverse Non-small-cell Lung Cancer Patients. *EBioMedicine* **2**, 1377–1385 (2015).

342. Ren, J. *et al.* Inhibition of miR-483-5p improves the proliferation, invasion and inflammatory response of triple-negative breast cancer cells by targeting SOCS3. *Exp. Ther. Med.* **22**, 1047 (2021).
343. Hayat, R. *et al.* Wnt signaling pathway: A comprehensive review. *Cell Biol. Int.* **46**, 863–877 (2022).
344. Cadigan, K. M. & Nusse, R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev.* **11**, 3286–3305 (1997).
345. Sonavane, P. R. & Willert, K. Controlling Wnt Signaling Specificity and Implications for Targeting WNTs Pharmacologically. in *Pharmacology of the WNT Signaling System* (Springer Nature, 2021).
346. Nusse, R. & Varmus, H. E. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* **31**, 99–109 (1982).
347. van Ooyen, A. & Nusse, R. Structure and nucleotide sequence of the putative mammary oncogene int-1; proviral insertions leave the protein-encoding domain intact. *Cell* **39**, 233–240 (1984).
348. Sharma, R. P. Wingless - a new mutant in *D. melanogaster*. *Drosoph. Inf. Serv.* **50**, 134 (1973).
349. Rijsewijk, F. *et al.* The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell* **50**, 649–657 (1987).
350. Cabrera, C. V. *et al.* Phenocopies induced with antisense RNA identify the wingless gene. *Cell* **50**, 659–663 (1987).
351. Degirmenci, B. *et al.* Wnt Ligands as a Part of the Stem Cell Niche in the Intestine and the Liver. in *WNT Signaling* (Academic Press, 2018).
352. Nusse, R. & Clevers, H. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell* **169**, 985–999 (2017).
353. Bhanot, P. *et al.* A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature* **382**, 225–230 (1996).
354. Kikuchi, A. *et al.* Chapter 2 - New Insights into the Mechanism of Wnt Signaling Pathway Activation. in *International Review of Cell and Molecular Biology* (ed. Jeon, K. W.) vol. 291 21–71 (Academic Press, 2011).
355. Vinson, C. R. *et al.* A *Drosophila* tissue polarity locus encodes a protein containing seven potential transmembrane domains. *Nature* **338**, 263–264 (1989).
356. Wang, Y. *et al.* A Large Family of Putative Transmembrane Receptors Homologous to the Product of the *Drosophila* Tissue Polarity Gene frizzled(\*). *J. Biol. Chem.* **271**, 4468–4476 (1996).
357. Dann, C. E. *et al.* Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains. *Nature* **412**, 86–90 (2001).
358. Umbhauer, M. *et al.* The C-terminal cytoplasmic Lys-thr-X-X-X-Trp motif in frizzled receptors mediates Wnt/ $\beta$ -catenin signalling. *EMBO J.* **19**, 4944–4954 (2000).
359. Janda, C. Y. *et al.* Structural Basis of Wnt Recognition by Frizzled. *Science* **337**, 59–64 (2012).
360. Sharma, M. *et al.* Dishevelled: A masterful conductor of complex Wnt signals. *Cell. Signal.* **47**, 52–64 (2018).
361. Kishida, S. *et al.* DIX Domains of Dvl and Axin Are Necessary for Protein Interactions and Their Ability To Regulate  $\beta$ -Catenin Stability. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 4414–4422 (1999).
362. Tauriello, D. V. F. *et al.* Wnt/ $\beta$ -catenin signaling requires interaction of the Dishevelled DEP domain and C terminus with a discontinuous motif in Frizzled. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, E812–E820 (2012).
363. Yang, Y. & Mlodzik, M. Wnt-Frizzled/planar cell polarity signaling: cellular orientation by facing the wind (Wnt). *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **31**, 623–646 (2015).

364. De, A. Wnt/Ca<sup>2+</sup> signaling pathway: a brief overview. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **43**, 745–756 (2011).
365. Jeong, W. & Jho, E. Regulation of the Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein LRP6 and Its Association With Disease: Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling and Beyond. *Front. Cell Dev. Biol.* **9**, (2021).
366. MacDonald, B. T. & He, X. Frizzled and LRP5/6 receptors for Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, a007880 (2012).
367. Cheng, Z. *et al.* Crystal structures of the extracellular domain of LRP6 and its complex with DKK1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 1204–1210 (2011).
368. Tamai, K. *et al.* A Mechanism for Wnt Coreceptor Activation. *Mol. Cell* **13**, 149–156 (2004).
369. Davidson, G. *et al.* Casein kinase 1  $\gamma$  couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature* **438**, 867–872 (2005).
370. Zeng, X. *et al.* A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature* **438**, 873–877 (2005).
371. Tamai, K. *et al.* LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* **407**, 530–535 (2000).
372. Pinson, K. I. *et al.* An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature* **407**, 535–538 (2000).
373. Zeng, X. *et al.* Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions. *Development* **135**, 367–375 (2008).
374. Bafico, A. *et al.* Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. *Nat. Cell Biol.* **3**, 683–686 (2001).
375. Mao, B. *et al.* Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/ $\beta$ -catenin signalling. *Nature* **417**, 664–667 (2002).
376. Hao, H.-X. *et al.* ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner. *Nature* **485**, 195–200 (2012).
377. 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).
378. Jiang, X. *et al.* Dishevelled Promotes Wnt Receptor Degradation through Recruitment of ZNRF3/RNF43 E3 Ubiquitin Ligases. *Mol. Cell* **58**, 522–533 (2015).
379. Tsukiyama, T. *et al.* Post-translational Wnt receptor regulation: Is the fog slowly clearing?: The molecular mechanism of RNF43/ZNRF3 ubiquitin ligases is not yet fully elucidated and still controversial. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* **43**, e2000297 (2021).
380. Tsukiyama, T. *et al.* Molecular Role of RNF43 in Canonical and Noncanonical Wnt Signaling. *Mol. Cell. Biol.* **35**, 2007–2023 (2015).
381. Tsukiyama, T. *et al.* A phospho-switch controls RNF43-mediated degradation of Wnt receptors to suppress tumorigenesis. *Nat. Commun.* **11**, 4586 (2020).
382. Xing, Y. *et al.* Crystal structure of a full-length beta-catenin. *Struct. Lond. Engl. 1993* **16**, 478–487 (2008).
383. Valenta, T. *et al.* The many faces and functions of  $\beta$ -catenin. *EMBO J.* **31**, 2714–2736 (2012).
384. Kraus, C. *et al.* Localization of the human beta-catenin gene (CTNNB1) to 3p21: a region implicated in tumor development. *Genomics* **23**, 272–274 (1994).
385. Ozawa, M. *et al.* The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J.* **8**, 1711–1717 (1989).

386. McCrea, P. D. *et al.* A Homolog of the armadillo Protein in *Drosophila* (Plakoglobin) Associated with E-Cadherin. *Science* **254**, 1359–1361 (1991).
387. Riggleman, B. *et al.* Spatial expression of the *Drosophila* segment polarity gene armadillo is posttranscriptionally regulated by wingless. *Cell* **63**, 549–560 (1990).
388. Behrens, J. *et al.* Functional interaction of  $\beta$ -catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* **382**, 638–642 (1996).
389. Riggleman, B. *et al.* Molecular analysis of the armadillo locus: uniformly distributed transcripts and a protein with novel internal repeats are associated with a *Drosophila* segment polarity gene. *Genes Dev.* **3**, 96–113 (1989).
390. Huber, A. H. *et al.* Three-Dimensional Structure of the Armadillo Repeat Region of  $\beta$ -Catenin. *Cell* **90**, 871–882 (1997).
391. Vleminckx, K. *et al.* The C-terminal transactivation domain of  $\beta$ -catenin is necessary and sufficient for signaling by the LEF-1/ $\beta$ -catenin complex in *Xenopus laevis*. *Mech. Dev.* **81**, 65–74 (1999).
392. Valenta, T. *et al.* Probing transcription-specific outputs of  $\beta$ -catenin in vivo. *Genes Dev.* **25**, 2631–2643 (2011).
393. Kimelman, D. & Xu, W.  $\beta$ -Catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene* **25**, 7482–7491 (2006).
394. van Kappel, E. C. & Maurice, M. M. Molecular regulation and pharmacological targeting of the  $\beta$ -catenin destruction complex. *Br. J. Pharmacol.* **174**, 4575–4588 (2017).
395. Salahshor, S. & Woodgett, J. R. The links between axin and carcinogenesis. *J. Clin. Pathol.* **58**, 225–236 (2005).
396. Lustig, B. *et al.* Negative Feedback Loop of Wnt Signaling through Upregulation of Conductin/Axin2 in Colorectal and Liver Tumors. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 1184–1193 (2002).
397. Siegfried, E. *et al.* wingless signaling acts through zeste-white 3, the *drosophila* homolog of glycogen synthase kinase-3, to regulate engrailed and establish cell fate. *Cell* **71**, 1167–1179 (1992).
398. Rubinfeld, B. *et al.* Binding of GSK3 $\beta$  to the APC- $\beta$ -Catenin Complex and Regulation of Complex Assembly. *Science* **272**, 1023–1026 (1996).
399. Aberle, H. *et al.*  $\beta$ -catenin is a target for the ubiquitin–proteasome pathway. *EMBO J.* **16**, 3797–3804 (1997).
400. Ikeda, S. *et al.* Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3 $\beta$  and  $\beta$ -catenin and promotes GSK-3 $\beta$ -dependent phosphorylation of  $\beta$ -catenin. *EMBO J.* **17**, 1371–1384 (1998).
401. Cadigan, K. M. & Waterman, M. L. TCF/LEFs and Wnt signaling in the nucleus. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, a007906 (2012).
402. van de Wetering, M. *et al.* The human T cell transcription factor-1 gene. Structure, localization, and promoter characterization. *J. Biol. Chem.* **267**, 8530–8536 (1992).
403. Molenaar, M. *et al.* XTcf-3 Transcription Factor Mediates  $\beta$ -Catenin-Induced Axis Formation in *Xenopus* Embryos. *Cell* **86**, 391–399 (1996).
404. Huber, O. *et al.* Nuclear localization of  $\beta$ -catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech. Dev.* **59**, 3–10 (1996).
405. Brunner, E. *et al.* pangolin encodes a Lef-1 homologue that acts downstream of Armadillo to transduce the Wingless signal in *Drosophila*. *Nature* **385**, 829–833 (1997).
406. van de Wetering, M. *et al.* Armadillo Coactivates Transcription Driven by the Product of the *Drosophila* Segment Polarity Gene dTCF. *Cell* **88**, 789–799 (1997).



407. Atcha, F. A. *et al.* A Unique DNA Binding Domain Converts T-Cell Factors into Strong Wnt Effectors. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 8352–8363 (2007).
408. Roose, J. *et al.* The Xenopus Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors. *Nature* **395**, 608–612 (1998).
409. Cavallo, R. A. *et al.* Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature* **395**, 604–608 (1998).
410. Brantjes, H. *et al.* All Tcf HMG box transcription factors interact with Groucho-related co-repressors. *Nucleic Acids Res.* **29**, 1410–1419 (2001).
411. Kim, C.-H. *et al.* Repressor activity of Headless/Tcf3 is essential for vertebrate head formation. *Nature* **407**, 913–916 (2000).
412. Merrill, B. J. *et al.* Tcf3: a transcriptional regulator of axis induction in the early embryo. *Development* **131**, 263–274 (2004).
413. Reya, T. *et al.* Wnt Signaling Regulates B Lymphocyte Proliferation through a LEF-1 Dependent Mechanism. *Immunity* **13**, 15–24 (2000).
414. Archbold, H. C. *et al.* How do they do Wnt they do?: regulation of transcription by the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *Acta Physiol.* **204**, 74–109 (2012).
415. Hikasa, H. & Sokol, S. Y. Phosphorylation of TCF Proteins by Homeodomain-interacting Protein Kinase 2\*. *J. Biol. Chem.* **286**, 12093–12100 (2011).
416. Chen, T. W. *et al.* Wnt Signal Transduction in the Cytoplasm: an Introduction to the Destruction Complex. in *Wnt Signaling in Development and Disease: Molecular Mechanisms and Biological Functions* (John Wiley & Sons, 2014).
417. Hart, M. J. *et al.* Downregulation of  $\beta$ -catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor,  $\beta$ -catenin and GSK3 $\beta$ . *Curr. Biol.* **8**, 573–581 (1998).
418. Amit, S. *et al.* Axin-mediated CKI phosphorylation of  $\beta$ -catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Dev.* **16**, 1066–1076 (2002).
419. Liu, C. *et al.* Control of  $\beta$ -Catenin Phosphorylation/Degradation by a Dual-Kinase Mechanism. *Cell* **108**, 837–847 (2002).
420. Latres, E. *et al.* The human F box protein  $\beta$ -Trop associates with the Cull1/Skp1 complex and regulates the stability of  $\beta$ -catenin. *Oncogene* **18**, 849–854 (1999).
421. Lee, E. *et al.* The Roles of APC and Axin Derived from Experimental and Theoretical Analysis of the Wnt Pathway. *PLOS Biol.* **1**, e10 (2003).
422. Schaefer, K. N. *et al.* Supramolecular assembly of the beta-catenin destruction complex and the effect of Wnt signaling on its localization, molecular size, and activity in vivo. *PLOS Genet.* **14**, e1007339 (2018).
423. Kitazawa, M. *et al.* Determination of Rate-Limiting Factor for Formation of Beta-Catenin Destruction Complexes Using Absolute Protein Quantification. *J. Proteome Res.* **16**, 3576–3584 (2017).
424. Pronobis, M. I. *et al.* Reconstituting regulation of the canonical Wnt pathway by engineering a minimal  $\beta$ -catenin destruction machine. *Mol. Biol. Cell* **28**, 41–53 (2017).
425. Willert, K. *et al.* Wnt-induced dephosphorylation of Axin releases  $\beta$ -catenin from the Axin complex. *Genes Dev.* **13**, 1768–1773 (1999).
426. Gao, Z.-H. *et al.* Casein kinase I phosphorylates and destabilizes the  $\beta$ -catenin degradation complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 1182–1187 (2002).
427. Yamamoto, H. *et al.* Phosphorylation of Axin, a Wnt Signal Negative Regulator, by Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$  Regulates Its Stability\*. *J. Biol. Chem.* **274**, 10681–10684 (1999).

428. Tacchelly-Benites, O. *et al.* Axin phosphorylation in both Wnt-off and Wnt-on states requires the tumor suppressor APC. *PLoS Genet.* **14**, e1007178 (2018).
429. Ha, N.-C. *et al.* Mechanism of Phosphorylation-Dependent Binding of APC to  $\beta$ -Catenin and Its Role in  $\beta$ -Catenin Degradation. *Mol. Cell* **15**, 511–521 (2004).
430. Xing, Y. *et al.* Crystal structure of a  $\beta$ -catenin/Axin complex suggests a mechanism for the  $\beta$ -catenin destruction complex. *Genes Dev.* **17**, 2753–2764 (2003).
431. Su, Y. *et al.* APC Is Essential for Targeting Phosphorylated  $\beta$ -Catenin to the SCF $\beta$ -TrCP Ubiquitin Ligase. *Mol. Cell* **32**, 652–661 (2008).
432. Li, V. S. W. *et al.* Wnt Signaling through Inhibition of  $\beta$ -Catenin Degradation in an Intact Axin1 Complex. *Cell* **149**, 1245–1256 (2012).
433. Bilić, J. *et al.* Wnt Induces LRP6 Signalosomes and Promotes Dishevelled-Dependent LRP6 Phosphorylation. *Science* **316**, 1619–1622 (2007).
434. Anthony, C. C. *et al.* Nuclear Regulation of Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling: It's a Complex Situation. *Genes* **11**, 886 (2020).
435. He, T.-C. *et al.* Identification of c-MYC as a Target of the APC Pathway. *Science* **281**, 1509–1512 (1998).
436. Jho, E. *et al.* Wnt/ $\beta$ -Catenin/Tcf Signaling Induces the Transcription of Axin2, a Negative Regulator of the Signaling Pathway. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 1172–1183 (2002).
437. Tetsu, O. & McCormick, F.  $\beta$ -Catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* **398**, 422–426 (1999).
438. Hernández, A. R. *et al.* Kinetic Responses of  $\beta$ -Catenin Specify the Sites of Wnt Control. *Science* **338**, 1337–1340 (2012).
439. Piao, S. *et al.* Direct Inhibition of GSK3 $\beta$  by the Phosphorylated Cytoplasmic Domain of LRP6 in Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling. *PLoS ONE* **3**, e4046 (2008).
440. Wu, G. *et al.* Inhibition of GSK3 phosphorylation of beta-catenin via phosphorylated PPPSPXS motifs of Wnt coreceptor LRP6. *PLoS One* **4**, e4926 (2009).
441. Hua, Y. *et al.* Oligomerization of Frizzled and LRP5/6 protein initiates intracellular signaling for the canonical WNT/ $\beta$ -catenin pathway. *J. Biol. Chem.* **293**, 19710–19724 (2018).
442. Schwarz-Romond, T. *et al.* The DIX domain of Dishevelled confers Wnt signaling by dynamic polymerization. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 484–492 (2007).
443. Taelman, V. F. *et al.* Wnt Signaling Requires Sequestration of Glycogen Synthase Kinase 3 inside Multivesicular Endosomes. *Cell* **143**, 1136–1148 (2010).
444. Kim, S.-E. *et al.* Wnt Stabilization of  $\beta$ -Catenin Reveals Principles for Morphogen Receptor-Scaffold Assemblies. *Science* **340**, 867–870 (2013).
445. Polakis, P. The many ways of Wnt in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **17**, 45–51 (2007).
446. Wang, Z. *et al.* The Wnt signaling pathway in tumorigenesis, pharmacological targets, and drug development for cancer therapy. *Biomark. Res.* **9**, 68 (2021).
447. Tsukamoto, A. S. *et al.* Expression of the int-1 gene in transgenic mice is associated with mammary gland hyperplasia and adenocarcinomas in male and female mice. *Cell* **55**, 619–625 (1988).
448. Kim, S. & Jeong, S. Mutation Hotspots in the  $\beta$ -Catenin Gene: Lessons from the Human Cancer Genome Databases. **42**, 8–16 (2019).
449. Sanchez-Vega, F. *et al.* Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas. *Cell* **173**, 321–337.e10 (2018).

450. Muzny, D. M. *et al.* Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* **487**, 330–337 (2012).
451. Harmonized Cancer Datasets - Genomic Data Commons Data Portal. <https://portal.gdc.cancer.gov/genes/>.
452. Durand, J. *et al.* Characterization of differential gene expression in adrenocortical tumors harboring beta-catenin (CTNNB1) mutations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96**, E1206–1211 (2011).
453. Nhieu, J. T. V. *et al.* Nuclear Accumulation of Mutated  $\beta$ -Catenin in Hepatocellular Carcinoma Is Associated with Increased Cell Proliferation. *Am. J. Pathol.* **155**, 703–710 (1999).
454. Rebouissou, S. *et al.* Genotype-phenotype correlation of CTNNB1 mutations reveals different  $\beta$ -catenin activity associated with liver tumor progression. *Hepatology* **64**, 2047–2061 (2016).
455. Iwao, K. *et al.* Activation of the beta-catenin gene by interstitial deletions involving exon 3 in primary colorectal carcinomas without adenomatous polyposis coli mutations. *Cancer Res.* **58**, 1021–1026 (1998).
456. Murata, M. *et al.* Activation of the beta-catenin gene by interstitial deletions involving exon 3 as an early event in colorectal tumorigenesis. *Cancer Lett.* **159**, 73–78 (2000).
457. Miyoshi, Y. *et al.* Activation of the beta-catenin gene in primary hepatocellular carcinomas by somatic alterations involving exon 3. *Cancer Res.* **58**, 2524–2527 (1998).
458. Pilati, C. *et al.* Genomic Profiling of Hepatocellular Adenomas Reveals Recurrent FRK-Activating Mutations and the Mechanisms of Malignant Transformation. *Cancer Cell* **25**, 428–441 (2014).
459. Qiu, W. *et al.* ZNRF3 is downregulated in papillary thyroid carcinoma and suppresses the proliferation and invasion of papillary thyroid cancer cells. *Tumor Biol.* **37**, 12665–12672 (2016).
460. Wu, J. *et al.* Whole-exome sequencing of neoplastic cysts of the pancreas reveals recurrent mutations in components of ubiquitin-dependent pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 21188–21193 (2011).
461. Wang, K. *et al.* Whole-genome sequencing and comprehensive molecular profiling identify new driver mutations in gastric cancer. *Nat. Genet.* **46**, 573–582 (2014).
462. Giannakis, M. *et al.* RNF43 is frequently mutated in colorectal and endometrial cancers. *Nat. Genet.* **46**, 1264–1266 (2014).
463. Witkiewicz, A. K. *et al.* Whole-exome sequencing of pancreatic cancer defines genetic diversity and therapeutic targets. *Nat. Commun.* **6**, 6744 (2015).
464. Hao, H.-X. *et al.* Control of Wnt Receptor Turnover by R-spondin-ZNRF3/RNF43 Signaling Module and Its Dysregulation in Cancer. *Cancers* **8**, 54 (2016).
465. Zeineldin, M. & Neufeld, K. L. More than two decades of Apc modeling in rodents. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* **1836**, 80–89 (2013).
466. Prosperi, J. *et al.* Chapter 5 - Dysregulation of the Wnt Pathway in Solid Tumors. in *Targeting the Wnt Pathway in Cancer* (Springer Science & Business Media, 2011).
467. Sun, Y. *et al.* Frizzled Receptors in Tumors, Focusing on Signaling, Roles, Modulation Mechanisms, and Targeted Therapies. *Oncol. Res.* **28**, 661–674 (2021).
468. Cancer Genome Atlas Research Network. Electronic address: wheeler@bcm.edu & Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive and Integrative Genomic Characterization of Hepatocellular Carcinoma. *Cell* **169**, 1327–1341.e23 (2017).
469. Yardy, G. W. *et al.* Mutations in the AXIN1 Gene in Advanced Prostate Cancer. *Eur. Urol.* **56**, 486–494 (2009).
470. Pan, K.-F. *et al.* Mutations in components of the Wnt signaling pathway in gastric cancer. *World J. Gastroenterol. WJG* **14**, 1570–1574 (2008).

471. Jin, L.-H. *et al.* Detection of point mutations of the Axin1 gene in colorectal cancers. *Int. J. Cancer* **107**, 696–699 (2003).
472. Dahmen, R. P. *et al.* Deletions of AXIN1, a component of the WNT/wingless pathway, in sporadic medulloblastomas. *Cancer Res.* **61**, 7039–7043 (2001).
473. Richter, J. *et al.* CK1 $\alpha$  overexpression correlates with poor survival in colorectal cancer. *BMC Cancer* **18**, 1–11 (2018).
474. Richter, J. *et al.* Effects of altered expression and activity levels of CK1 $\delta$  and  $\epsilon$  on tumor growth and survival of colorectal cancer patients. *Int. J. Cancer* **136**, 2799–2810 (2015).
475. Wang, Z. *et al.* The CK1 $\delta/\epsilon$ -AES axis regulates tumorigenesis and metastasis in colorectal cancer. *Theranostics* **11**, 4421–4435 (2021).
476. Tung, E. K.-K. *et al.* Upregulation of the Wnt co-receptor LRP6 promotes hepatocarcinogenesis and enhances cell invasion. *PloS One* **7**, e36565 (2012).
477. Alrefaei, A. F. & Abu-Elmagd, M. LRP6 Receptor Plays Essential Functions in Development and Human Diseases. *Genes* **13**, 120 (2022).
478. Wang, Z.-M. *et al.* Harnessing low-density lipoprotein receptor protein 6 (LRP6) genetic variation and Wnt signaling for innovative diagnostics in complex diseases. *Pharmacogenomics J.* **18**, 351–358 (2018).
479. Hiremath, I. S. *et al.* The multidimensional role of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in human malignancies. *J. Cell. Physiol.* **237**, 199–238 (2022).
480. Ruckert, S. *et al.* T-cell Factor-4 Frameshift Mutations Occur Frequently in Human Microsatellite Instability-high Colorectal Carcinomas but Do Not Contribute to Carcinogenesis1. *Cancer Res.* **62**, 3009–3013 (2002).
481. Meng, W.-J. *et al.* Novel mutations and sequence variants in exons 3-9 of human T Cell Factor-4 gene in sporadic rectal cancer patients stratified by microsatellite instability. *World J. Gastroenterol.* **13**, 3747–3751 (2007).
482. Santiago, L. *et al.* Wnt signaling pathway protein LEF1 in cancer, as a biomarker for prognosis and a target for treatment. *Am. J. Cancer Res.* **7**, 1389–1406 (2017).
483. Gaujoux, S. *et al.* Silencing Mutated  $\beta$ -Catenin Inhibits Cell Proliferation and Stimulates Apoptosis in the Adrenocortical Cancer Cell Line H295R. *PLOS ONE* **8**, e55743 (2013).
484. van de Wetering, M. *et al.* Specific inhibition of gene expression using a stably integrated, inducible small-interfering-RNA vector. *EMBO Rep.* **4**, 609–615 (2003).
485. Giroux, P. *et al.* miRViz: a novel webserver application to visualize and interpret microRNA datasets. *Nucleic Acids Res.* **48**, W252–W261 (2020).
486. Wu, K. *et al.* miR-483-5p promotes growth, invasion and self-renewal of gastric cancer stem cells by Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Mol. Med. Rep.* **14**, 3421–3428 (2016).
487. Hantel, C. *et al.* Targeting heterogeneity of adrenocortical carcinoma: Evaluation and extension of preclinical tumor models to improve clinical translation. *Oncotarget* **7**, 79292–79304 (2016).
488. Smith, J. C. & Sheltzer, J. M. Genome-wide identification and analysis of prognostic features in human cancers. *Cell Rep.* **38**, 110569 (2022).
489. Costello, A. *et al.* Leaky Expression of the TET-On System Hinders Control of Endogenous miRNA Abundance. *Biotechnol. J.* **14**, 1800219 (2019).
490. Ebert, M. S. *et al.* MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nat. Methods* **4**, 721–726 (2007).
491. Kluiver, J. *et al.* Rapid generation of microRNA sponges for microRNA inhibition. *PloS One* **7**, e29275 (2012).

492. Haraguchi, T. *et al.* Vectors expressing efficient RNA decoys achieve the long-term suppression of specific microRNA activity in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **37**, e43 (2009).
493. Benetatos, L. *et al.* The microRNAs within the DLK1-DIO3 genomic region: involvement in disease pathogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 795–814 (2013).
494. Jouinot, A. *et al.* Intratumor heterogeneity of prognostic DNA-based molecular markers in adrenocortical carcinoma. *Endocr. Connect.* **9**, 705–714 (2020).
495. Reda El Sayed, S. *et al.* MicroRNA Therapeutics in Cancer: Current Advances and Challenges. *Cancers* **13**, 2680 (2021).
496. Sayag, D. *et al.* Phase-0/phase-I study of dye-loaded lipid nanoparticles for near-infrared fluorescence imaging in healthy dogs. *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Pharm. Verfahrenstechnik EV* **100**, 85–93 (2016).
497. Mérian, J. *et al.* Synthetic lipid nanoparticles targeting steroid organs. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **54**, 1996–2003 (2013).
498. Devel, L. *et al.* Biodistribution of Nanostructured Lipid Carriers in Mice Atherosclerotic Model. *Mol. Basel Switz.* **24**, E3499 (2019).
499. Reda el Sayed, S. Développement d'une stratégie anti-cancéreuse pour le carcinome corticosurrénalien par nanovectorisation de microARNs via les Lipidots®. (Université Grenoble Alpes, 2022).

N.B. : L'ensemble des figures présentées dans la thèse a été réalisé sur BioRender.com (<https://biorender.com/>)









# Résumé

Le carcinome corticosurrénalien (CCS) est un cancer rare, agressif et de mauvais pronostic. Les options thérapeutiques sont limitées et les chimiothérapies, thérapies ciblées et immunothérapies n'améliorent pas la survie globale des patients. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires qui sous-tendent la physiopathologie du CCS est donc indispensable, afin de développer de nouvelles thérapies plus efficaces. Deux grandes études de génomique intégrées des CCS ont montré qu'il existait une activation aberrante de la voie Wnt/ $\beta$ -Caténine dans environ 40% des CCS, en lien avec des mutations somatiques et des délétions homozygotes de deux gènes clés : CTNNB1 ( $\beta$ -Caténine) et ZNRF3. Par ailleurs, elles ont permis l'identification de signature de microARN spécifiques aux CCS de bon et de mauvais pronostics. Les microARN (miRs) sont de petits ARN non codants, d'environ 20 nucléotides, dont le rôle majeur est la régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique. Notre équipe a identifié deux miRs surexprimés dans les CCS agressifs et associés au mauvais pronostic : miR-139-5p et miR-483-5p.

L'objectif de ma thèse était de déterminer l'impact de l'activation aberrante de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -Caténine sur l'expression des miRs dans le CCS, en particulier sur miR-139-5p et miR-483-5p.

La lignée cellulaire de CCS H295R présente une activation constitutive de la voie Wnt/ $\beta$ -Caténine en lien avec une mutation activatrice de la  $\beta$ -Caténine. Nous avons montré que l'extinction de l'expression de la  $\beta$ -Caténine dans cette lignée modulait l'expression de 54 miRs, en diminuant l'expression de 42 d'entre eux (77.8%). Parmi les miRs dont l'expression était impactée par la diminution de la  $\beta$ -Caténine, on retrouvait notamment miR-139-5p mais pas miR-483-5p, ainsi que plusieurs miRs du locus chromosomique 14q32, locus connu pour être impliqué dans la carcinogenèse dans d'autres cancers. Nous avons ensuite montré que la diminution de miR-139-5p était corrélée à celle de son gène hôte, PDE2A, récemment identifié comme une cible de la  $\beta$ -Caténine. Par ailleurs, la diminution de miR-139-5p induit l'augmentation de la protéine NDRG4, un des gènes cibles de miR-139-5p identifié par notre équipe.

Nous avons ensuite analysé les données publiques de transcriptome et de miRnome des cohortes de patients COMETE-ENSAT et TCGA. Nous avons montré que les patients présentant une mutation somatique ou une altération moléculaire de CTNNB1 ou ZNRF3 avaient un niveau de miR-139-5p et de PDE2A significativement plus élevé et un niveau d'expression de NDRG4 significativement plus bas que les autres patients. Nous avons également montré que le niveau d'expression de miR-139-5p est parfaitement corrélé à celui de son gène hôte PDE2A chez les patients. Toutefois, l'analyse d'un sous-groupe de patients présentant un haut niveau de miR-139-5p sans altération génomique identifiée de CTNNB1 ou ZNRF3 nous a permis de découvrir que le niveau d'expression du facteur de transcription LEF1, un partenaire de la  $\beta$ -Caténine, était associé à l'expression de miR-139-5p, indépendamment du statut mutationnel de la voie Wnt/ $\beta$ -Caténine. Par ailleurs, les patients présentant un haut niveau d'expression de LEF1 présentaient une moins bonne survie globale que ceux avec un bas niveau de LEF1. De manière intéressante, le niveau d'expression de LEF1 était un meilleur prédicteur de survie globale que la présence d'altérations moléculaires de CTNNB1 ou ZNRF3.

Ainsi, mon travail de thèse constitue la première analyse globale de la modulation du miRnome par la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -Caténine dans le CCS et d'une manière générale dans le cancer. L'expression de miR-139-5p, un miR associé au mauvais pronostic, est contrôlée par le niveau d'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -Caténine, en corrélation avec son gène hôte PDE2A. Par ailleurs, nous avons identifié LEF1 comme un nouveau marqueur pronostic de survie dans le CCS.

**Mots clés :** carcinome corticosurrénalien, voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -Cat, microARN, pronostic, miR-139-5p