



Caractérisation moléculaire des formes métastatiques de carcinome médullaire de la thyroïde

Amélie Boichard

► To cite this version:

Amélie Boichard. Caractérisation moléculaire des formes métastatiques de carcinome médullaire de la thyroïde. Cancer. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT : 2014PA11T015 . tel-01325214

HAL Id: tel-01325214

<https://theses.hal.science/tel-01325214>

Submitted on 2 Jun 2016

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

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

UNIVERSITE PARIS-SUD XI

École doctorale : Cancérologie (CBMS – ED 418)
Champ disciplinaire : Médecine

THÈSE DE DOCTORAT

Présentée et soutenue publiquement
par

Amélie BOICHARD

le 08 avril 2014

CARACTÉRISATION MOLÉCULAIRE DES FORMES MÉTASTATIQUES DE CARCINOME MÉDULLAIRE DE LA THYROÏDE.

Directeur de thèse : Jean-Michel BIDART
Co-directeur de thèse : Ludovic LACROIX

*PU-PH – Université Paris Sud
PH – Institut Gustave Roussy*

Composition du jury :

Président du jury : Jean-Yves SCOAZEC
Rapporteurs : Paul HOFMAN
Ivan BIÈCHE
Examineurs : Anne BARLIER
Karen LEROY
Martin SCHLUMBERGER

*PU-PH – Université Claude Bernard Lyon
PU-PH – Université Nice Sophia Antipolis
MCU-PH – Université Paris Descartes
PU-PH – Université Aix-Marseille
PU-PH – Université Paris Est Créteil
PU-PH – Université Paris Sud*

LABORATOIRES D'ACCUEIL

Ce travail a été préparé conjointement au sein des équipes suivantes :

- **Laboratoire de Recherche Translationnelle** de l'Institut Gustave Roussy
Gustave Roussy – 114 rue Édouard Vaillant – 94805 Villejuif Cedex – France
Référent : Dr Ludovic LACROIX

- **Unité mixte de recherche UMR8200 Stabilité Génétique et Oncogénèse**
Gustave Roussy – 114 rue Édouard Vaillant – 94805 Villejuif Cedex – France
Référents : Pr Jean-Michel BIDART – Dr Corinne DUPUY

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier mes directeurs de thèse, **Messieurs le Professeur Jean-Michel Bidart et Docteur Ludovic Lacroix**, pour la confiance qu'ils m'ont accordée.

Jean-Michel, merci de m'avoir permis de réaliser ce travail dans de très bonnes conditions, de m'avoir fait bénéficier de votre ouverture d'esprit et de vos multiples conseils.

Ludovic, merci pour votre grande disponibilité, votre soutien et votre patience. Je vous suis extrêmement reconnaissante de m'avoir guidé et encouragé dans cette recherche. J'apprécie votre qualité de travail et aurai beaucoup de plaisir à continuer à exercer avec vous.

Je sais infiniment gré à **Monsieur le Professeur Jean-Yves Scoazec** d'avoir accepté de présider mon jury de thèse.

Je suis sensible à l'honneur que vous me faites.

Je remercie **Messieurs le Professeur Paul Hofman et Docteur Ivan Bièche**, de l'intérêt qu'ils ont manifesté à l'égard de ce travail en s'engageant à en être rapporteurs.

J'aimerais vous signifier à quel point j'ai apprécié vos remarques constructives et votre disponibilité, malgré un délai serré de lecture des documents adressés. Soyez assurés de ma sincère reconnaissance.

Je souhaiterais exprimer ma gratitude à **Monsieur le Professeur Martin Schlumberger**, pour m'avoir donné envie de travailler sur cette pathologie rare - mais pour le moins passionnante - qu'est le carcinome médullaire de la thyroïde.

Je vous remercie pour votre accueil chaleureux à chaque sollicitation et également d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse.

Mes remerciements vont également à **Mesdames les Professeurs Karen Leroy et Anne Barlier**, pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse.

Vous vous êtes rendues disponibles bien que venant parfois de loin. Discuter avec vous de mon sujet d'étude m'enthousiasme grandement, et votre présence en ce jour de soutenance m'est précieuse.

Mon travail de recherche a été particulièrement facilité par les équipes « Stabilité génétique et oncogénèse » et le laboratoire de Recherche Translationnelle de l'Institut Gustave Roussy.

Je remercie **Madame le Docteur Patricia Kannouche**, pour son accueil au sein de l'unité UMR8200.

Merci pour l'attention que vous portez à chaque étudiant.

Je souhaiterais particulièrement remercier **Madame le Docteur Corinne Dupuy**, qui dirige la « petite équipe thyroïde », dont elle peut être fière. J'ai une pensée toute particulière à l'ensemble des personnes rencontrées dans cette équipe : **Monique, Aurore, Jérémy, Naïma, Rabii, Ilya, Raphaël, Cristina, Françoise, Myriem, Fanny, Céline, Ruy, Maria-Carolina, Odile.**

Corinne, j'ai été très sensible à tes qualités d'écoute et de compréhension. Merci d'avoir laissé la porte ouverte et de m'avoir toujours soutenue.

À tous, merci pour votre amitié, pour les sourires, les rires et les fous-rires. Merci pour les pauses-café, les confidences et tous les agréables moments partagés.

Je remercie **Mesdames les Docteurs Abir Al Ghuzlan et Isabelle Borget**, pour la participation à ce projet et leurs sages conseils « thyroïdiens ».

A toutes deux, merci pour votre aide et votre bienveillance.

Je n'oublie pas les moments partagés avec le module 'BMO' du 'LRT' de l'IGR', et surtout **Nelly, Isabelle, Patrick, Ludovic, Mélanie, Clélia, Marie, Stéphanie.**

Grand merci pour l'aide que vous m'avez apportée. Travailler avec vous est un grand plaisir, votre bonne humeur indéfectible et votre accueil chaleureux me sont vraiment précieux.

Il reste un peu de place pour **Laëtitia, Sophie, Nabahet, Cécile et Diana**, mes 'camarades de CMT'.

Merci pour les échanges d'expériences enrichissants. Nos mésaventures nous laisseront de très bons souvenirs, sans aucun doute !

Je tiens à remercier chaleureusement l'ensemble des personnes que j'ai eu plaisir à côtoyer durant ces quelques années à l'Institut Gustave Roussy, et en particulier les équipes du service de Pathologie Moléculaire, de l'Unité de Génomique Fonctionnelle, de Bio-informatique et du CIC Biothérapies.

Merci à tous pour votre gentillesse, votre accueil et votre patience.

Enfin, je remercie toutes les personnes que j'aurais pu oublier et qui, de par leur générosité, leur bonne humeur ou l'intérêt manifeste à l'égard de ce travail, m'ont aidé dans les moments délicats.

À Caroline, Sandrine, Émilie, Mélanie et Alison.
Parce que je ne suis riche que de mes amies.

À ma famille, grands-parents, oncles et tantes, cousins.
Parce qu'ils ont su accepter mes choix et m'encourager souvent.

À mes parents et à mes frères.
Parce que je suis fière d'eux et de leurs valeurs.

RESUME

Le carcinome médullaire de la thyroïde (CMT) est une tumeur neuroendocrine rare, se développant à partir des cellules sécrétant la calcitonine. Cette tumeur survient dans un contexte familial dans un tiers des cas. Toutes les formes germinales et près de 40% des formes sporadiques sont causées par une mutation ponctuelle activatrice de l'oncogène *RET*, codant pour un récepteur membranaire à activité tyrosine kinase. Les événements oncogéniques à l'origine des formes sporadiques non mutées *RET* restent mal définis, à l'exception de mutations activatrices des oncogènes *RAS* découvertes récemment.

Le pronostic péjoratif du CMT est essentiellement lié à un envahissement ganglionnaire précoce. A ce titre, la chirurgie initiale est souvent insuffisante et les formes métastatiques ont longtemps été considérées en impasse thérapeutique. L'avènement récent des inhibiteurs sélectifs de tyrosine kinases (ITK) a apporté un nouvel élan à la prise en charge des tumeurs réfractaires, certains d'entre eux incluant dans leur spectre d'action le récepteur RET. Mais l'optimisation de ces traitements requiert une connaissance préalable des mécanismes moléculaires sous-jacents au développement tumoral.

Dans ce contexte et en nous appuyant sur une collection importante de prélèvements humains, nous avons cherché à approfondir la description du 'paysage génomique' du CMT.

Dans un premier temps, nous avons évalué les anomalies structurales ponctuelles et chromosomiques présentées par les CMT. Nous avons montré, par optimisation de méthodes de séquençage, que les mutations des gènes *RET* et *RAS* interviennent dans plus de 96% des cas et que ces événements sont mutuellement exclusifs. Ces mutations permettent de distinguer plusieurs groupes d'agressivité et de réponse aux traitements par ITK. Nous avons également observé - par technique d'hybridation génomique comparative - des anomalies de grande ampleur récurrentes dans cette pathologie : les délétions du bras court du chromosome 1 et des chromosomes entiers 4 et 22 apparaissent comme étant des événements précoces et indépendants de la tumorigenèse du CMT.

Dans un second temps, nous avons déterminé - par approche de type biopuce - les profils d'expression de microARN dans les CMT. Certains de ces régulateurs post-transcriptionnels majeurs semblent liés au caractère invasif de la tumeur, et notamment les miR-21, miR-199 et miR-129. Nous avons également démontré le potentiel d'utilisation des microARN miR-21 et miR-199 en tant que biomarqueurs circulants du CMT. L'impact fonctionnel des formes précurseurs mir-21 et mir-129 a ensuite été évalué par transfection dans les modèles cellulaires TT et MZ-CRC1.

Les observations ainsi obtenues offrent de nombreuses perspectives d'études. Elles permettent la définition de marqueurs tissulaires distinguant *a priori* les tumeurs métastatiques et/ou réfractaires aux thérapies. Enfin, elles mettent en lumière de nouvelles pistes pour la découverte de cibles thérapeutiques additionnelles dans cette pathologie.

Mots-clés : carcinome médullaire de la thyroïde, CMT, tumeur neuroendocrine, caractérisation moléculaire, altérations géniques, altérations chromosomiques, microARN, RET, RAS.

ABSTRACT

Medullary thyroid carcinoma (MTC) is a rare neuroendocrine tumor, arising from calcitonin-secreting cells. This cancer occurs in a family context in a third of cases. All inherited forms and nearly 40% of sporadic forms are caused by activating point-mutations in the RET oncogene, coding for a tyrosine-kinase receptor. Other oncogenic events causing sporadic cases remain unclear, but activating mutations of RAS oncogenes have been discovered recently.

Prognosis of MTC is essentially linked to early lymph node occurrence. Initial surgery of metastatic forms is often insufficient and patients are considered in therapeutic dead-end. The recent advent of selective tyrosine-kinase inhibitors (TKIs) has brought a new impetus to the management of refractory tumors, some of them targeting the RET receptor. Optimization of these treatments require improving knowledge of the underlying molecular mechanisms of tumor development.

In this context and helped by a large collection of human specimens, we have sought to deepen the description of genomic landscape of MTC.

At first, we evaluated the structural and chromosomal abnormalities presented by MTC. We showed, by optimizing sequencing methods, that RET and RAS mutations are involved in over 96% of the cases, these events are mutually exclusives. These mutations can distinguish several groups of aggressiveness and of response to TKI treatments. We also observed, by comparative genomic hybridization techniques, recurrent abnormalities such as deletion of the short arm of chromosome 1 and loss of entire chromosomes 4 and 22. These losses appear to be early events of tumorigenesis MTC.

In a second step, we determined - by a microarray approach – the microRNA expression profile of MTC. Some of these post-transcriptional regulators seem related to tumor invasiveness, such as miR-21, miR-199 and miR-129. We demonstrated the potential of microRNAs miR-21 and miR-199 as circulating diagnosis biomarkers of MTC. The functional impact of the precursor forms mir-21 and mir-129 was then evaluated by transfection in TT and MZ- CRC1 cellular models.

Observations obtained pave the way for a lot of new potential studies. They allow the definition of tissue biomarkers distinguishing metastatic forms or refractory patients. Finally, they highlight new pathways for the discovery of additional therapeutic targets in this disease.

Key-words : medullary thyroid carcinoma, CMT, neuroendocrine tumor, molecular characterization, gene alterations, chromosomal alterations, microRNA, RET, RAS.

TABLE DES MATIERES

LABORATOIRES D'ACCUEIL	3
REMERCIEMENTS	5
RESUME	11
ABSTRACT	13
TABLE DES MATIERES.....	15
ABREVIATIONS.....	17
LISTE DES FIGURES	19
LISTE DES TABLES	21
LISTE DES ANNEXES	23
PREAMBULE	25

LE CMT : GENERALITES ET ASPECTS PHENOTYPIQUES..... 27

1.1. La thyroïde : bases anatomiques et fonctionnelles29

1.1.1. Anatomie et histologie thyroïdienne.....	29
1.1.2. Physiologie thyroïdienne	30
1.1.2.1. Activité endocrine des thyrocytes	30
1.1.2.2. Activité endocrine des cellules parafolliculaires.....	31
1.1.3. Origine embryologique de la thyroïde	33
1.1.3.1. Cas particulier des cellules parafolliculaires	34
1.1.3.2. Embryologie moléculaire à l'origine des cellules parafolliculaires	36
1.1.3.3. Développement post-natal du contingent parafolliculaire	37

1.2. La thyroïde : éléments de pathologie38

1.2.1. Pathologies thyrocytaires.....	39
1.2.2. Pathologies du contingent parafolliculaire	42
1.2.2.1. Hyperplasie des cellules C (HCC).....	42
1.2.2.2. Carcinome médullaire de la thyroïde (CMT)	43

1.3. Caractéristiques cliniques du CMT43

1.3.1. Épidémiologie du CMT.....	43
1.3.2. Présentations cliniques du CMT	44
1.3.3. Critères diagnostiques du CMT	46
1.3.4. Critères pronostiques du CMT	48
1.3.5. Prise en charge thérapeutique du CMT.....	50
1.3.6. Modèles d'étude du CMT.....	54

LE CMT : PROBLEMATIQUE ET ENJEUX ACTUELS 57

2.1. Spécificités et modalités d'étude du CMT59

2.2. Objectifs du travail.....61

GENOMIQUE STRUCTURALE DU CMT 63

3.1. Introduction65

3.1.1. Principe général d'évolution somatique des cancers.....	65
3.1.2. Hétérogénéité tumorale et avancées technologiques	68
3.1.3. Hétérogénéité tumorale et thérapies personnalisées.....	69

3.2. Analyse du statut mutationnel somatique ponctuel des CMT	72
3.2.1. Etat des connaissances : altérations géniques connues.....	72
3.2.1.1. Le proto-oncogène RET.....	72
3.2.1.1. Autres anomalies géniques structurales.....	79
3.2.1.2. Impact thérapeutique des mutations <i>RET</i> et <i>RAS</i> dans le CMT.....	83
3.2.2. Travaux personnels.....	85
3.2.2.1. Objectifs.....	85
3.2.2.2. Matériel et méthodes	86
3.2.2.3. Résultats.....	89
3.2.2.4. Résultats complémentaires	121
3.2.3. Discussion.....	122
3.3. Analyse des anomalies chromosomiques des CMT.....	129
3.3.1. Etat des connaissances : altérations chromosomiques connues.....	129
3.3.2. Travaux personnels.....	131
3.3.2.1. Objectifs.....	131
3.3.2.2. Matériel et méthodes	131
3.3.2.3. Résultats.....	132
3.3.2.1. Résultats complémentaires	133
3.3.3. Discussion.....	135
 GENOMIQUE FONCTIONNELLE ET IMPLICATION DE LA VOIE	
MICROARN DANS LE CMT	143
4.1. Introduction	145
4.1.1. Génome, synthèse protéique et ARN non-codants.....	145
4.1.2. Spécificités des microARN	147
4.1.3. Implication des microARN en cancérologie	153
4.1.3.1. Importance des microARN dans la maladie cancéreuse	153
4.1.3.2. Potentiels d'utilisation des microARN en cancérologie.....	154
4.2. Etude de l'expression des microARN dans le CMT	156
4.2.1. Etat des connaissances : altérations du miRNome connues.....	156
4.2.2. Travaux personnels.....	157
4.2.2.1. Objectifs.....	157
4.2.2.2. Matériel et méthodes	158
4.2.2.3. Résultats.....	163
4.2.3. Discussion.....	171
4.3. Etude fonctionnelle des miR-21 et miR-129 dans les lignées TT	
et MZ-CRC1.....	179
4.3.1. Objectifs.....	179
4.3.2. Matériel et méthodes	179
4.3.3. Résultats	184
4.3.4. Discussion.....	193
 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	197
ANNEXES	205
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	225

ABREVIATIONS

ACE	antigène carcinoembryonnaire
ADN	acide désoxyribonucléique
Ago	protéine Argonaute
AKT	protéine kinase B
APUD	système endocrine diffus (<i>amine precursor uptake decarboxylation</i>)
ARN	acide ribonucléique
ATA	<i>American Thyroid Association</i>
ATC	carcinome anaplasique de la thyroïde
ATP	adénosine tri-phosphate
AUC	aire sous la courbe
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i> (gène)
BRAF	<i>V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i> (gène)
CALCA	calcitonine (gène)
CCLE	<i>Cancer Cell Line Encyclopedia</i>
cel-	<i>Caenorhabditis elegans</i> (espèce)
CGH	hybridation génomique comparative
CMT	carcinome médullaire de la thyroïde
COSMIC	<i>Catalogue Of Somatic Mutation In Cancer</i>
CT	calcitonine
Ct	cycle-seuil
Dex	exosomes de cellules dendritiques
DNM	dynamine
EGFR	récepteur à l'EGF
ENCODE	<i>ENCyclopedia Of Dna Elements</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
F-CMT	CMT familial
FDR	<i>false discovery rate</i>
FFPE	fixation au formol puis inclusion en paraffine
FITC	isothiocyanate de fluoresceine
FTC	carcinome folliculaire de la thyroïde
GDNF	facteur neurotrophe dérivé de la glie
GDP	guanosine tri-phosphate
GTP	guanosine di-phosphate
HCC	hyperplasie des cellules C
HES	coloration hématoxiline-éosine-safran
HR	<i>hazard ratio</i>
HRAS	<i>Harvey Rat Sarcoma viral oncogene homolog</i> (gène)
hsa-	<i>Homo sapiens</i> (espèce)
IGR	Institut Gustave Roussy
INCa	Institut National du Cancer
IP	indice pronostic / iodure de propidium
ITK	inhibiteur de tyrosine-kinase
KRAS	<i>Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homolog</i> (gène)
LNA	<i>lock nucleic acid</i>
MAPK	protéines kinases activées par les mitogènes
Mb	mégabases
miARN	microARN
miR	microARN mature
mir	microARN précurseur
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>

MYC	<i>V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog</i> (gène)
NBPF	<i>neuroblastoma breakpoint family</i> (gène)
NEM	néoplasie endocrinienne multiple
NGS	séquençage de nouvelle génération
NRAS	<i>neuroblastoma Rat Sarcoma viral oncogene homolog</i> (gène)
NSE	énolase neurone-spécifique
NTR	région non traduite
pb	paires de bases
PCR	réaction en chaîne par polymérase
PCT	procalcitonine
PD	<i>progressive disease</i>
PDCD4	<i>programmed cell death 4</i>
PDX	<i>patient-derived xenograft</i>
PIK3	famille des phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinases
POMC	pro-opiomélanocortine
PTC	carcinome papillaire de la thyroïde
PTEN	<i>Phosphatase and TENsin homolog</i>
PTH	parathormone
PTK9	protéine tyrosine kinase 9 (gène)
RB1	protéine du rétinoblastome Rb (gène)
RET	<i>REarranged during Transfection</i> (gène)
RIN	<i>RNA integrity number</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNase	ribonucléase
ROC	<i>receiver operating characteristic</i>
ROS	espèces réactives de l'oxygène
RP	<i>partial response</i>
RQ	expression relative
SD	<i>stable disease</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
Tex	exosomes de cellules tumorales
TGCA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TNM	score tumeur-ganglions-métastases
TP53	protéine tumorale p53 (gène)
TuThyRef	Réseau français des Tumeurs Thyroïdiennes Réfractaires

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Organisation anatomique et architecture folliculaire de la thyroïde	29
Figure 2 : Expression différentielle du gène <i>CALCA</i>	32
Figure 3 : Développement embryonnaire de la thyroïde (semaines 4 à 8)	34
Figure 4 : Pathogenèse moléculaire des carcinomes différenciés de la thyroïde	41
Figure 5 : Coupes histologiques de tissu thyroïdien après immunomarquage calcitonine	42
Figure 6 : Incidence et mortalité du CMT en France	44
Figure 7 : Aspect microscopique d'un CMT	47
Figure 8 : Processus d'évolution somatique du génome tumoral	67
Figure 9 : Fréquence des mutations somatiques ponctuelles dans les cancers	69
Figure 10 : Classes thérapeutiques ciblant le processus tumoral	70
Figure 11 : Structure du récepteur RET	73
Figure 12 : Mutations du gène <i>RET</i> et corrélation génotype/phénotype dans le CMT	77
Figure 13 : Fréquence des mutations ponctuelles du gène <i>RET</i> dans les tumeurs humaines	79
Figure 14 : Structure tridimensionnelle des protéines RAS	80
Figure 15 : Transduction du signal médié par RAS	81
Figure 16 : Homologies de séquences et locus mutationnels des gènes <i>RAS</i>	82
Figure 17 : Activation oncogénique du CMT et sensibilité aux ITK	84
Figure 20 : Répartition des mutations oncogéniques majeures retrouvées dans notre cohorte de CMT	125
Figure 21 : Impact phénotypique des mutations <i>RET</i> et <i>RAS</i> dans notre cohorte de CMT	127
Figure 22 : Chromosomes perdus dans le modèle de CMT murin <i>RET</i> ⁶³⁴	130
Figure 23 : Diagramme du nombre de copies chromosomiques observées par CGH dans 5 tumeurs primitives héréditaires mutées en <i>RET</i> ⁶³⁴	132
Figure 24 : Anomalies chromosomiques présentées par une série de 29 tumeurs primitives	134
Figure 25 : Diagramme du nombre de copies chromosomiques observées par NGS dans les modèles cellulaires TT et MZ-CRC1	135
Figure 26 : Synténie du chromosome 22 humain et de ses homologues murins	137
Figure 27 : Synténie du chromosome 1 humain et de ses homologues murins	140
Figure 28 : Région du chromosome 1 délétée chez l'Homme et synténie à la souris	141
Figure 29 : Les différentes classes d'ARN et leurs implications fonctionnelles	146
Figure 30 : Des précurseurs aux microARN matures	148
Figure 31 : Synthèse et mécanisme d'action des microARN	149
Figure 32 : Modalités d'appariement d'un microARN sur une cible	150
Figure 33 : Implication des microARN dans la pathologie tumorale	153
Figure 34 : Classification hiérarchique des CMT en fonction de leur profil d'expression microARN	163
Figure 35 : Expression des miR-21, miR-199 et miR-129 et relation au pronostic du CMT	166
Figure 36 : Evaluation du score pronostique IP	167
Figure 37 : Expression de miR-21 évaluée à partir de tissus FFPE	168
Figure 38 : Evaluation des miR-21 et miR-199 sériques chez les patients CMT	169
Figure 39 : Caractérisation des exosomes issus de cellules TT	170
Figure 40 : Expression des microARN dans les CMT : revue de la littérature	171
Figure 41 : Organisation génomique de <i>MIR199</i> et <i>MIR124</i>	173
Figure 42 : Implication des microARN dans la régulation du cycle cellulaire	174
Figure 43 : MicroARN et différenciation neurale	175
Figure 44 : Origine des microARN circulants	178
Figure 45 : Quantification de miR-21 après transfection de son précurseur	181
Figure 46 : Sur-expression de miR-21 après transfection transitoire dans les cellules TT et MZ-CRC1	181
Figure 47 : Régulation de PTK9 induite par l'apport de miR-1 exogène	182
Figure 48 : Expression basale de miR-21 dans nos modèles d'étude	184

Figure 49 : Régulation de PTEN et PDCD4 par miR-21 dans les cellules TT	186
Figure 50 : Principales observations transcriptomiques observées après sur-expression de miR-21 dans les cellules MZ-CRC1	188
Figure 51 : Régulation de PTEN et de PDCD4 par miR-21 dans les cellules MZ-CRC1.....	188
Figure 52 : Evaluation de la production de ROS intracellulaires après sur-expression miR-21 dans les cellules MZ-CRC1	189
Figure 53 : Expression basale de miR-129 dans nos modèles d'étude.....	189
Figure 54 : Effets de la sur-expression de miR-129 sur le transcriptome de cellules TT.....	191
Figure 55 : Cibles de miR-21 expérimentalement validées.	193
Figure 56 : Modèle hypothétique de l'oncogenèse moléculaire des CMT	202
Figure 57 : Modalités de traitement en fonction de la mutation oncogénique dominante du CMT	203

LISTE DES TABLES

Table 1 : Classification des pathologies thyroïdiennes.....	38
Table 2 : Classification TNM des CMT	49
Table 3 : Molécules en cours d'essai pour le traitement des CMT réfractaires	53
Table 4 : Gènes-candidats analysés.....	86
Table 5 : Variants retrouvés dans une tumeur non mutée <i>RET</i> ni <i>RAS</i>	91
Table 6 : Mutations <i>RAS</i> et CMT - Revue de la littérature et situation du travail.....	122
Table 7 : Anomalies chromosomiques et CMT – revue de la littérature et situation du travail	136
Table 8 : Evaluation de la methode d'extraction des microARN circulants.....	161
Table 9 : MicroARN différentiellement exprimés en fonction de la forme clinique et de l'invasivité du CMT.....	164
Table 10 : Quantité de microARN retrouvée dans les Dex.....	170
Table 11 : Contrôle des interférences de détection de la méthode de quantification utilisée	180

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Principales thérapies personnalisées utilisées en oncologie en France.....	207
Annexe 2 : Revue : Experience du NGS à l'Institut Gustave Roussy	208
Annexe 3 : Modalités de réalisation de la librairie ciblée RET et RAS en NGS.....	216
Annexe 4 : Principales mutations retrouvées dans la lignée cellulaire TT.....	217
Annexe 5 : Principales mutations retrouvées dans la lignée cellulaire MZ-CRC1	218
Annexe 6 : Principe de quantification des microARN matures par PCR quantitative (système d'amorces stem-loop)	219
Annexe 7 : Correlation inter-méthode et inter-collection des résultats de quantification des microARN .	220
Annexe 8 : Quantification absolue des microARN circulants.....	221
Annexe 9 : Effets de la sur-expression de miR-21 sur le transcriptome de cellules TT.....	222
Annexe 10 : Principaux gènes dérégulés par miR-21 dans les cellules TT et MZ-CRC1.....	223
Annexe 11 : Principaux gènes dérégulés par miR-129 dans les cellules TT et MZ-CRC1.....	224

PREAMBULE

Le carcinome médullaire de la thyroïde (CMT) est un cancer rare, dont l'enjeu actuel est le développement de nouvelles thérapies permettant d'offrir aux patients porteurs de formes réfractaires, un traitement adapté et efficace. La mise en place d'une telle prise en charge nécessite, au préalable, de connaître les anomalies moléculaires caractéristiques de la tumeur. Or, jusqu'à récemment, nous ne disposions que de très peu d'éléments concernant les mécanismes sous-jacents à l'oncogenèse de cette maladie. Dans ce contexte, ce travail de thèse a eu pour objectif de caractériser, au niveau génomique, les particularités de ces tumeurs, afin d'identifier des indicateurs moléculaires de pronostic ou de réponse aux drogues actuellement utilisées dans cette pathologie.

Ce travail a été réalisé, pour sa partie moléculaire, au sein du laboratoire de Recherche Translationnelle de l'Institut Gustave Roussy dirigé par le Dr Ludovic Lacroix; et pour sa partie cellulaire, au sein de l'unité de recherche CNRS UMR8200 dirigée par le Dr Patricia Kannouche. Il a donné lieu à deux articles, dont un a été publié en octobre 2012 dans la revue *Journal Of Endocrinology and Metabolism* et un est en cours de soumission.

Somatic RAS mutations occur in a large proportion of sporadic RET-negative medullary thyroid carcinomas and extend to a previously unidentified exon. Boichard A, Croux L, Al Ghuzlan A, Broutin S, Dupuy C, Leboulleux S, Schlumberger M, Bidart JM, Lacroix L. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 Oct;97(10):E2031-5.

Mutational screening of refractory medullary thyroid carcinomas by targeted next-generation sequencing methods. Boichard A and Chougnnet C.N., Marty V, Saulnier P, Al Ghuzlan A, Borget I, Schlumberger M, Bidart JM, Lacroix L. *En cours de soumission.*

- Partie 1 -

**LE CMT : GENERALITES ET ASPECTS
PHENOTYPIQUES**

1.1. LA THYROÏDE : BASES ANATOMIQUES ET FONCTIONNELLES

1.1.1. Anatomie et histologie thyroïdienne

La thyroïde est une glande située sur la face antérieure du cou, en avant de la trachée (entre les 2ème et 3ème anneaux trachéaux), se composant de **deux lobes** situés de part et d'autre du larynx, reliés par une partie intermédiaire appelée **isthme** (Figure 1). Elle est limitée par une capsule conjonctive avasculaire, projetant au niveau intraglandulaire des septas fibreux qui délimitent des lobules et est alimentée par l'artère thyroïdienne supérieure et l'artère thyroïdienne inférieure. Le parenchyme thyroïdien est très vascularisé et le drainage lymphatique est ipsilatéral, indépendant pour chaque lobe. Les glandes parathyroïdes (sources physiologiques de parathormone PTH), se situent généralement aux quatre pôles thyroïdiens (Leclère et al., 2001) (Nikiforov et al., 2012).

Chez l'adulte, en situation physiologique normale, cette glande est imperceptible, mesure entre 6 et 8 centimètres de hauteur et pèse moins de 20 grammes. En cas d'anomalies diverses, son volume peut considérablement être augmenté, induisant au niveau clinique un gonflement de la région cervicale appelé goitre.

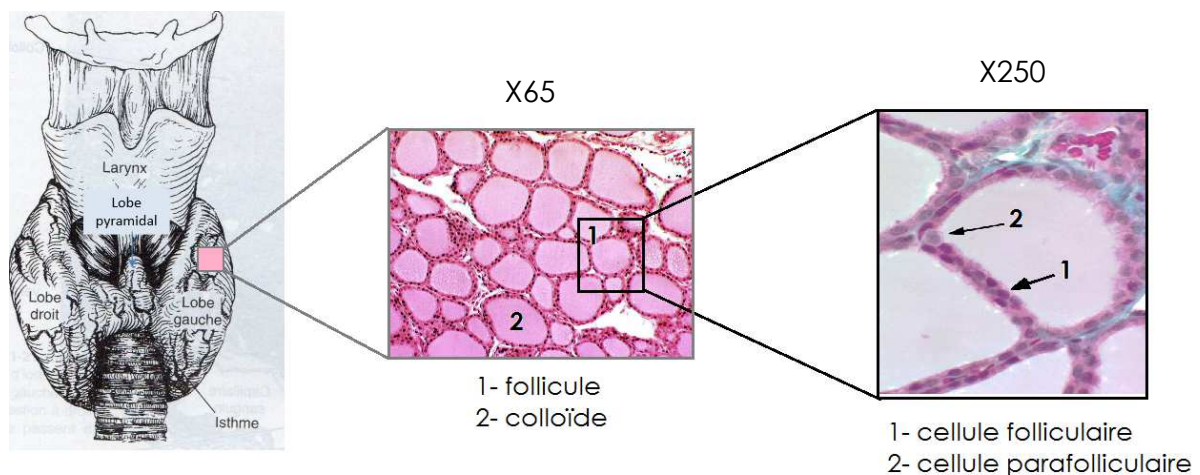


FIGURE 1 : ORGANISATION ANATOMIQUE ET ARCHITECTURE FOLLICULAIRE DE LA THYROÏDE

Sources : <http://www.normalhistology.com/> et <http://library.med.utah.edu>

Au niveau microscopique, l'unité élémentaire morpho-fonctionnelle de la glande thyroïde est **le follicule** (ou vésicule) thyroïdien. Il est composé d'un épithélium unistratifié de thyrocytes (également appelés thyrocytes), reposant sur une lame basale et disposés en sphère autour d'une lumière centrale. Cette lumière contient un liquide colloïde

éosinophile riche en thyroglobuline, précurseur des hormones thyroïdiennes (Figure 1) (Leclère et al., 2001) (Nikiforov et al., 2012). Les thyrocytes ont une forme variable (cubique, cylindrique ou aplatie) en fonction de l'état fonctionnel de la glande. Ils présentent un noyau central ou basal rond à chromatine homogène, un cytoplasme contenant un réticulum endoplasmique granuleux riche et des microvillosités au niveau de leur membrane apicale (Leclère et al., 2001) (Nikiforov et al., 2012).

Le parenchyme thyroïdien contient un second contingent cellulaire, beaucoup plus restreint (moins de 0,1% des cellules thyroïdiennes) : **les cellules parafolliculaires** (Baber, 1876) (Braunstein and Stephens, 1968) (Nikiforov et al., 2012). Ces cellules sont disséminées entre les thyrocytes mais n'entrent jamais en contact avec la substance colloïde (Figure 1). Elles sont préférentiellement retrouvées au niveau de la partie postéro-latérale de chaque lobe, à la jonction des tiers supérieurs et moyens.

Plus volumineuses que les thyrocytes (>40µm de diamètre), elles présentent un noyau pâle, un cytoplasme clair à aspect granuleux et un rapport nucléo-cytoplasmique élevé (Hazard, 1977). Elles sont de ce fait également appelées **cellules claires**, ou encore **cellules C**, car sécrétrices de **calcitonine** (Copp and Cheney, 1962) (Hazard, 1977). Cette production hormonale caractéristique est utilisée comme marqueur spécifique du type cellulaire (cf. chapitre 1.1.2.2 en page 31).

1.1.2. Physiologie thyroïdienne

La thyroïde est une **glande endocrine** régulant, par la production et la sécrétion d'hormones au niveau systémique, de très nombreuses fonctions intervenant au cours du développement, de la croissance et du métabolisme énergétique (Leclère et al., 2001).

1.1.2.1. Activité endocrine des thyrocytes

Les thyrocytes sont à l'origine de la production et de la sécrétion des **hormones thyroïdiennes tri-iodothyronine (T3)** et **tétra-iodothyronine** (ou thyroxine T4), intervenant dans la maturation du système nerveux central fœtal et post-natal, dans la différenciation tissulaire ainsi que dans la stimulation du métabolisme basal.

Après stimulus par la thyrotrophine hypophysaire (ou thyroïdostimuline TSH, dont la sécrétion est elle-même déclenchée par le signal thyroïdrotrope hypothalamique TRH), les cellules

folliculaires synthétisent une glycoprotéine appelée thyroglobuline (Tg). La thyroglobuline est déversée par exocytose au pôle apical des cellules, dans la lumière des follicules contenant la substance colloïde, où elle sera iodée sur ces résidus tyrosine (mono- ou di-iodation). Après condensation des tyrosines (menant à la formation de groupements thyronines), la thyroglobuline est de nouveau phagocytée par les cellules folliculaires, où elle sera hydrolysée pour libérer - dans les capillaires sanguins situés au pôle basal de la cellule - les hormones T3 ou T4. Les hormones thyroïdiennes circulantes, liées à des protéines plasmatiques, sont inactives. La T4 est majoritaire (80%) et constitue la forme de réserve de l'hormone. Elle est convertie par déiodation au niveau tissulaire en hormone libre active T3, présentant la demi-vie plasmatique la plus courte.

1.1.2.2. Activité endocrine des cellules parafolliculaires

Les cellules parafolliculaires sont responsables de la production et de la sécrétion de la **calcitonine** (CT) (*Foster et al., 1964*) (*Pearse, 1966*). Il s'agit d'une hormone hypocalcémiante (*Copp and Cameron, 1961*) jouant un rôle très important au cours de la croissance, de la grossesse et de la lactation (*Huebner et al., 2008*) (*Davey and Findlay, 2013*). Elle inhibe la résorption, diminue l'absorption et augmente l'excrétion calcique. Son action sur les cellules osseuses, intestinales et rénales est médiée par le récepteur CTR (*Calcitonin Receptor*), de la superfamille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires, ayant pour effecteurs l'adénylate cyclase et la phospholipase C (*Naot and Cornish, 2008*)

D'un point de vue protéique, la CT est un petit peptide monocaténaire de 32 acides aminés, de structure simple hélicoïdale et dont la séquence est codée par le gène CALCA, situé en 11p15.2. Elle est produite après épissage alternatif d'un transcrit primaire puis clivage post-traductionnel tissu-dépendant d'un polypeptide (*Amara et al., 1982*) (*Rosenfeld et al., 1983*) (*Jonas et al., 1985*), dont la maturation différentielle (exons 4 et 5-6) conduit à 2 produits distincts (*Rosenfeld et al., 1984*) (*Emeson et al., 1992*) (Figure 2):

- La **procalcitonine** (PCT) (*Jacobs et al., 1981*), une pré-hormone ubiquitaire synthétisée par tous les types cellulaires (*Oberhoffer et al., 1999*), stockée dans des granules et libérée au niveau systémique en cas de stimuli inflammatoires - sa fonction exacte dans ce processus restant mal connue. Seules les cellules parafolliculaires possèdent la capacité à cliver la PCT, à partir des stocks cellulaires endogènes. Ce clivage libère alors 3 peptides : un peptide N-terminal inactif, la

katacalcine (CCP-1 ou PDN-2) (Hillyard *et al.*, 1983) et la calcitonine mature (Burns *et al.*, 1989).

- Les **CGRP** (Calcitonin-Gene Related Peptides), neuromodulateurs et vasodilatateurs du système nerveux central, uniquement exprimés dans les cellules d'origine neurale (Zaidi *et al.*, 1990).

Notons qu'un paralogue du gène CALCA, colocalisé en 11p15.2 et présentant 90% d'homologie avec celui-ci, permet la synthèse de peptides CGRP de type II (gène CALCB). Enfin, un pseudogène nommé CALCP est également situé en 11p15.1 (Hoovers *et al.*, 1993).

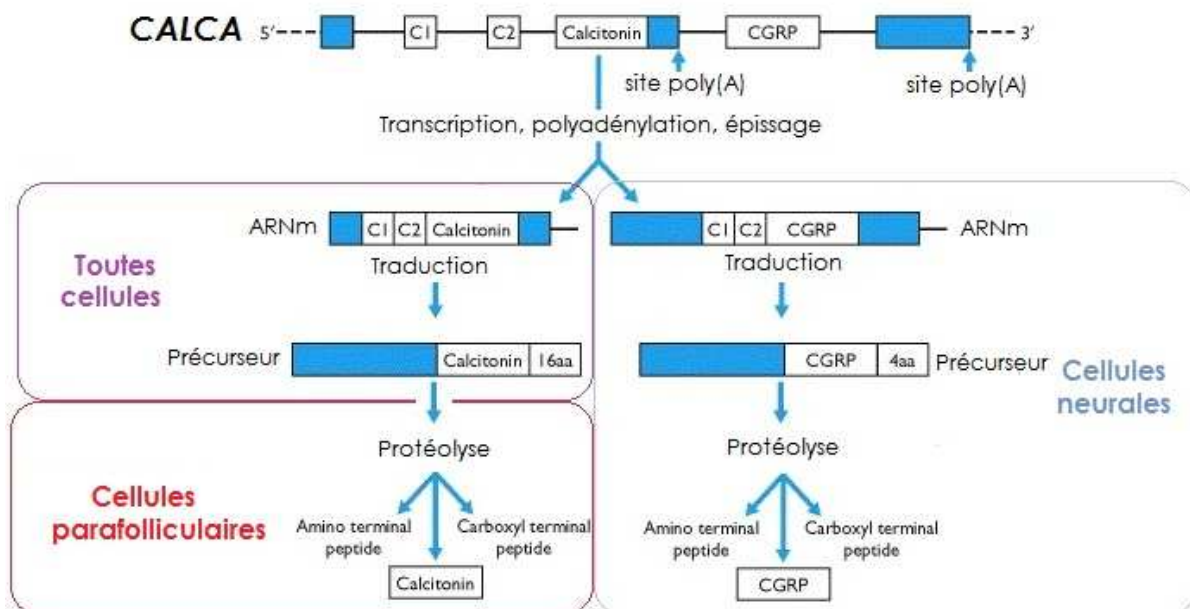


FIGURE 2 : EXPRESSION DIFFÉRENTIELLE DU GÈNE CALCA

Modifié de (Nussey and Whitehead, 2001).

L'expression et la sécrétion de calcitonine sont régulées indépendamment de l'hypophyse, principalement par la **concentration extra-cellulaire en calcium**, via le récepteur-senseur CaSR (récepteur couplé aux protéines G de classe III, activant la voie de la phospholipase C) (Garrett *et al.*, 1995). Cette sécrétion est influencée positivement par le calcitriol (vitamine D), la sérotonine, les œstrogènes, la gastrine, la cholécystokinine, le glucagon, la sécrétine, la somatotropine et les agonistes β -adrénergiques. Elle est en revanche inhibée par la dopamine, la somatostatine (selon un mécanisme autocrine - (Zabel, 1984)) et les agonistes α -adrénergiques (Sethi *et al.*, 1981) (Zabel, 1985) (Endo *et al.*, 1988) (Agnusdei *et al.*, 1990) (Raue *et al.*, 1992).

La calcitonine circulante a une demi-vie courte (< 1 heure), comparativement à la procalcitonine (25 à 30 heures). Elle est liée à 30% aux protéines plasmatiques et est métabolisée essentiellement au niveau rénal.

Additionnellement à cette spécificité de sécrétion, les cellules parafolliculaires partagent les caractéristiques physiologiques et cytochimiques des cellules du **système neuroendocrinien diffus APUD** (*Amine Precursor Uptake Decarboxylase*) (Pearse, 1969). Elles sont capables de sécréter d'autres hormones sous forme d'amines biogènes ou de polypeptides de faible masse moléculaire, après captation, stockage, décarboxylation des amines et de leurs précurseurs. Elles constituent donc une source secondaire de dérivés tels que la sérotonine, la somatostatine, la gastrine, la pro-opiomélanocortine, la neurotensine, les kinines, les prostaglandines et la chromogranine A (Ahrén, 1991) (Sawicki, 1995) (Liu et al., 2003).

1.1.3. Origine embryologique de la thyroïde

Les ébauches de la glande thyroïde apparaissent dès la 3^{ème} semaine de développement foetal, à la fin de la phase de gastrulation (Leclère et al., 2001) (Nikiforov et al., 2012). Une invagination épithéliale issue du plancher pharyngien d'origine **endodermique** va migrer dans le mésoblaste en suivant la ligne médiane, à partir du foramen caecum vers le bas. Cette **ébauche thyroïdienne centrale**, prenant la forme d'un diverticule bilobé, reste reliée à l'ébauche de la langue via le canal thyroéoglosse (disparaissant à la 5^{ème} semaine mais dont un reliquat perdure à l'âge adulte au niveau isthmique, formant le lobe pyramidal de Lalouette). Elle parvient à sa position définitive au cours de la 7^{ème} semaine (Figure 3). Les bourgeons distaux se différencient en cordons thyroïdiens et en vésicules (Nikiforov et al., 2012), permettant une activité fonctionnelle endocrine indépendante de la mère à la fin de la 10^{ème} semaine de développement (Costa et al., 1991).

Des anomalies survenant lors de l'ontogenèse thyroïdienne peuvent causer des agénésies totales ou partielles, des ectopies (fonctionnelles ou non) au niveau lingual, cervical ou endothoracique (par défaut ou excès de migration), ou encore des kystes thyroéoglosses.

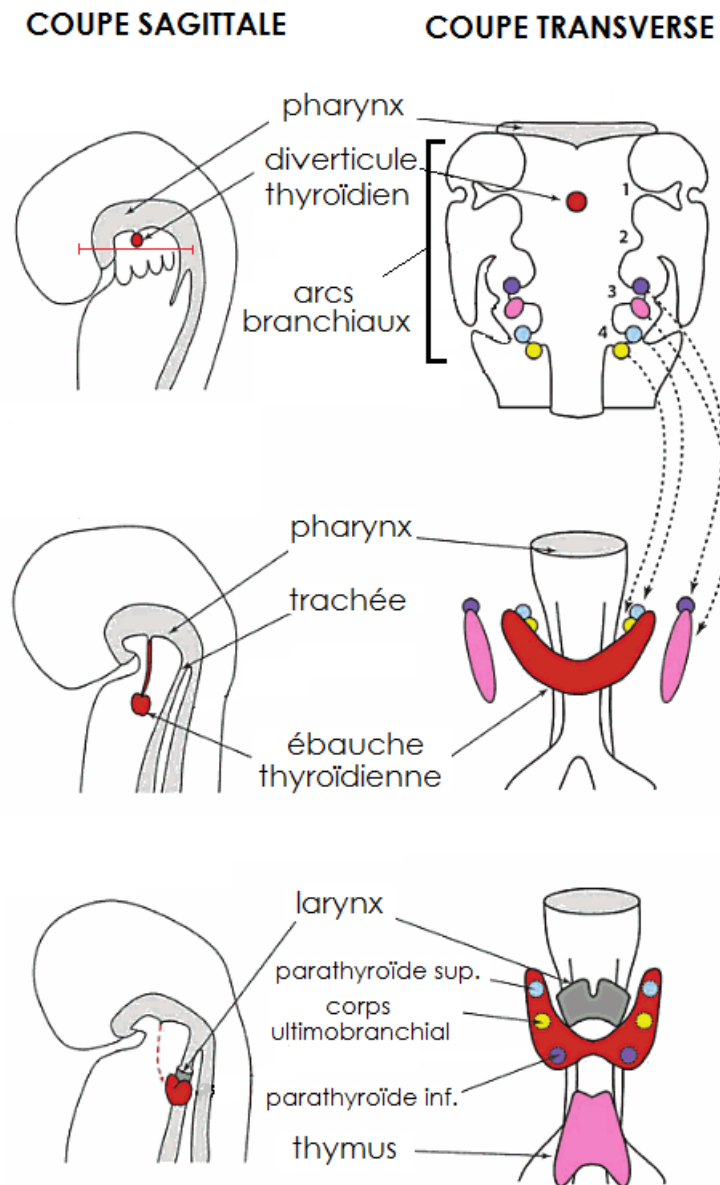


FIGURE 3 : DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DE LA THYROÏDE (SEMAINES 4 À 8)
Modifié de (Nikiforov et al., 2012).

1.1.3.1. Cas particulier des cellules parafolliculaires

Bien qu'elles soient situées au sein du parenchyme thyroïdien, les cellules parafolliculaires présentent une origine embryonnaire distincte des thyrocytes (Pearse & Carvalho, 1967) (Polak et al., 1974) (Nikiforov et al., 2012). Elles proviennent des **crêtes neurales de la région céphalique**, dont les autres dérivés à l'âge adulte sont les cellules gliales et méningiales.

Les crêtes neurales troncales et lombosacrées donnent quant à elles naissance au système nerveux entérique, aux mélanocytes, aux cellules de Merkel et aux cellules chromaffines de la médullosurrénale.

Après la fermeture du **tube neural** d'origine **ectodermique**, lors de la phase de neurulation, des cellules issues de la partie dorsale du tube s'individualisent pour former les **crêtes neurales**. Au niveau céphalique, les cellules des crêtes neurales se mélangent avec les cellules du mésoderme et forment 5 unités métamériques appelés **arcs branchiaux**. Ces arcs se forment par élongation de part et d'autre de l'embryon (élongation dorso-ventrale) et selon un gradient céphalo-caudal, à partir de la 4^{ème} semaine de développement (Figure 3). Ils sont constitués, *in fine*, d'ectoderme (face externe des arcs délimitant les fentes branchiales), d'endoderme (face interne des arcs délimitant les poches branchiales) et de mésoderme (en profondeur). Chaque arc est parfaitement séparé des autres et peut être considéré comme un compartiment d'évolution autonome. Ils produisent les cartilages, os, nerfs, muscles, glandes et tissus conjonctifs de l'ensemble du visage et du cou.

Les cellules parafolliculaires sont dérivées de diverticules paires ventraux issus des **4^{ème} poches branchiales** (constituées d'endoderme colonisé par des cellules ectodermiques issues des crêtes neurales), appelés **corps ultimobranchiaux** (*Pearse and Carvalheira, 1967*) (*Polak et al., 1974*), s'individualisant à la 5^{ème} semaine de développement. Ils se détachent peu à peu de la paroi de l'arc branchial et migrent dans le mésenchyme pour s'incorporer à l'ébauche thyroïdienne centrale au cours de la 7^{ème} semaine (cette migration est couplée à celle des parathyroïdes supérieures), expliquant la localisation anatomique définitive des cellules parafolliculaires (Figure 3). La différenciation en cellules sécrétrices de calcitonine s'opère au cours de la 10^{ème} semaine (*Cutler et al., 1977*) (*Fagman et al., 2006*). Des remnants des corps ultimobranchiaux (*solid cell nests*) sont retrouvés dans 30 à 80% des thyroïdes adultes, ce pourcentage variant en fonction des modalités de coupe histologique (en nombre et en localisation).

Il est important de noter que, si l'origine branchiale des cellules parafolliculaires est très clairement démontrée, leur **origine endodermique ou ectodermique** reste **très controversée** (*Pearse, 1969*) (*Kameda et al., 2007a*).

1.1.3.2. Embryologie moléculaire à l'origine des cellules parafolliculaires

De nombreuses études, réalisées chez le porc, le poulet ou la souris, ont permis d'identifier précisément les mécanismes moléculaires sous-jacents à l'ontologie du contingent parafolliculaire thyroïdien.

Les crêtes neurales se forment sous l'influence des facteurs morphogénétiques **BMP4**, **BMP7**, **WNT6** et **FGF** sécrétés par le mésenchyme (*Villanueva et al., 2002*) ; et essentiellement par activation des facteurs de transcription **PAX3/7**, **ZIC**, **GLI3**, **SLUG**, **SOX8/9/10**, **AP-2**, **MYC** et **FOXD3**. Le devenir des cellules issues des crêtes neurales est ensuite régi selon l'axe antéro-postérieur par les gènes homéotiques *HOX*. La branchiomérisation est ainsi la résultante d'une combinatoire d'expression des gènes *HOX1* (dans la partie mésenchymateuse interne des arcs uniquement), *HOX2*, *HOX3*, *HOX4* et *HOX5* à partir des clusters génomiques de gènes *HOXA@*, *HOXB@*, *HOXC@* et *HOXD@* (*Hunt et al., 1991*) (*Trainor and Krumlauf, 2000*) (*Trainor and Krumlauf, 2001*).

La spécification du 4^{ème} arc branchial fait intervenir majoritairement les gènes **HOX4** (paralogues **A** à **D**) et **HOXB5** (*Nelms and Labosky, 2010*), dont la transcription est très fortement dépendante de l'acide rétinoïque (*Marshall et al., 1996*) (*Wendling et al., 2000*). L'élongation dorso-ventrale des arcs est médiée, au niveau du mésenchyme, par les facteurs de transcription **TWIST** (*Stoetzel et al., 1995*) (*Soo et al., 2002*), **SLX**, **PAX3** et par des substances régulatrices de croissance (molécules-guides) telles que les **éphrines** (*Smith et al., 1997*), les agonistes des **neuropilines** ou d'autres régulateurs des sémaphorines comme le **GDNF** (Glial cell-line Derived Neurotrophic Factor) (*Charoy and Castellani, 2013*). Une forte expression de **SHH** (Sonic HedgeHog) et de **BMP7** est observée au niveau des faces internes des arcs, constituées d'endoderme (la face ectodermique exprimant quant à elle *FGF8*) (*Trainor and Krumlauf, 2001*). À cet endroit, l'activation de **PAX1/9** semble délimiter les poches branchiales (*Peters et al., 1998*).

Au niveau de la 4^{ème} poche branchiale, l'activation de l'effecteur organe-spécifique **TTF-1** (ou *NKX2.1 - Thyroid-Transcription Factor 1*) provoque la formation des corps ultimobranchiaux (étape de détermination tissulaire) puis leur migration vers l'ébauche thyroïdienne (*Suzuki et al., 1998*) (*Kusakabe et al., 2006*). L'expression de **PAX8**, également nécessaire à la détermination et à la migration est observée uniquement chez l'Homme (*Trueba et al., 2005*). Cette isoforme inexistante chez la souris serait complétée par l'expression de **PAX2** (*Poleev et al., 1992*) (*Batista and Lewis, 2008*) (*Bouchard et al., 2010*). La

migration des corps ultimobranchiaux fait également intervenir un des récepteurs aux éphrines **EPHA4**, dont l'expression est stoppée lors de la fusion avec les bourgeons thyroïdiens (Trueba et al., 2005) (Fagman et al., 2006) (Andersson et al., 2011). Enfin, durant la migration toujours, **ASCL1** (hASH1 - facteur de transcription exprimé concomitamment à TTF-1) est réprimé par **HES1** (effecteur de la voie Notch) (Carre et al., 2011). Par la suite, la levée d'inhibition de HES1 sur ASCL1 entraîne la sortie du cycle cellulaire (possiblement par compétition avec N-MYC (Álvarez-Rodríguez and Pons, 2009)), la spécification parafolliculaire (Kameda et al., 2007b) (Kameda et al., 2013) et l'inhibition de l'apoptose nécessaire au maintien d'un contingent *in situ* (Kameda et al., 2007b). Ces phénomènes sont régis par la séquence d'expression des facteurs de transcription **ASCL1 > Neurogénine > NEUROD** (Kameda et al., 2007b), dépendante de l'imprégnation en hormones thyroïdiennes d'origine folliculaire (Chantoux and Francon, 2002).

Enfin, la différenciation embryonnaire terminale des cellules fait intervenir les signaux **NGF, FGF β et EGF** (Neurotrophic, Fibroblast et Epidermal Growth Factors). Leur action est médiée au niveau intracellulaire par FRS2 (Fibroblast growth factor Receptor Substrate 2) (Califano et al., 2000) (Kameda et al., 2009) et SHB (Src Homology 2 domain containing adaptor protein B) (Karlsson et al., 1998). Ces derniers, dans leur état phosphorylé, induisent une activation de la **cascade RAS/MAPK**, indispensable à ce processus.

1.1.3.3. Développement post-natal du contingent parafolliculaire

Les reliquats des corps ultimobranchiaux retrouvés dans certaines thyroïdes adultes présentent **2 contingents cellulaires**, dont le majoritaire exprime l'antigène carcino-embryonnaire ACE (Harach, 1985), l'énolase neuro-spécifique NSE (Cameselle-Teijeiro et al., 1994), les protéines OCT-4, p63 (Reis-Filho et al., 2003), BCL-2, CD5 (Yerly et al., 2013), galectine-3 (Faggiano et al., 2003) et les cytokératines CAM5.2, AE1/AE3, 19, 7 et 34 β E12 (Harach and Wasenius, 1987) (Harach et al., 1993) (Ríos Moreno et al., 2011). Ces cellules sont en revanche négatives pour la cytokératine 20 et les marqueurs de différenciation thyroïdienne telles que thyroglobuline, calcitonine et parathormone (Reis-Filho et al., 2003) (Ríos Moreno et al., 2011). Ces marqueurs embryonnaires d'indifférenciation suggèrent des caractéristiques de **cellules souches de nature épithéliale et d'origine neurale** (Ríos Moreno et al., 2011). Le second contingent, quant à lui, exprime la calcitonine, la somatostatine, les facteurs de transcription NEUROD (Faggiano et al., 2003) (Kameda et al., 2007b). L'expression de TTF-1 et de p63 n'est pas ou très peu retrouvée (Reis-Filho et al., 2003) (Ríos Moreno et al., 2011). Il s'agirait de **cellules parafolliculaires en cours de différenciation**. Ainsi

les *solid crest nests* constitueraient des réserves de progéniteurs parafolliculaires, dont la différenciation terminale serait post-natale (1 à 2 ans de vie).

Cette hypothèse est corroborée par 2 observations distinctes :

- durant la vie foétale, les cellules parafolliculaires et leurs progéniteurs expriment très fortement à leur surface la forme polysialée de la molécule d'adhésion neurospécifique **N-CAM**. Cette forme présentant un très grand encombrement stérique empêche la fixation des cellules entre elles, leur conférant des propriétés de migration. Cette expression diminue très rapidement quelques semaines après la naissance (*Nishiyama et al., 1996*) ;
- les cellules parafolliculaires du fœtus et du nouveau-né expriment de manière nette et égale la **calcitonine**, la **somatostatine** et la **cholécystokinine 4** (CCK4) (*Zabel, 1984*). Les cellules exprimant la somatostatine et CCK4 diminuent très fortement au cours des premiers temps de vie (par modification de l'activité sécrétoire et/ou disparition des clones pluripotents). Les cellules parafolliculaires matures, présentant un marquage calcitonine majoritaire, deviennent prépondérantes (*Kameda, 1991*) (*Majdic et al., 1993*) (*Seidel et al., 2003*).

1.2. LA THYROÏDE : ÉLÉMENTS DE PATHOLOGIE

Les pathologies concernant la glande thyroïde peuvent être classées en fonction du type cellulaire altéré (Table 1). Les anomalies du contingent folliculaire n'entrant pas dans le cadre de ce travail de thèse, celles-ci ne seront abordées que très succinctement dans ce chapitre.

Contingent cellulaire	Type d'altération	Pathologie
Thyrocytes	Dysfonction	Hypothyroïdie / hyperthyroïdie
	Hyperplasie	Adénome thyroïdien
	Néoplasie	Carcinome différencié de type papillaire
		Carcinome différencié de type folliculaire
		Carcinome peu différencié
		Carcinome anaplasique
Cellules parafolliculaires	Hyperplasie	Hyperplasie des cellules C
	Néoplasie	Carcinome médullaire de la thyroïde

TABLE 1 : CLASSIFICATION DES PATHOLOGIES THYROÏDIENNES

1.2.1. Pathologies thyrocytaires

Les anomalies thyroïdiennes folliculaires concernent plus de 10% de la population, et majoritairement les femmes. Leurs conséquences cliniques sont importantes du fait du grand nombre de fonctions régulées par les hormones thyroïdiennes, mais les symptômes sont pour la plupart aspécifiques. Ces altérations peuvent impacter la **fonction** ou le **nombre** de thyrocytes.

Les **dysfonctions thyroïdiennes** sont de deux types : l'**hypothyroïdie**, traduisant une impregnation insuffisante de l'organisme en hormones, et l'**hyperthyroïdie**, résultant d'une augmentation de synthèse ou d'une hyperactivité des hormones thyroïdiennes. Ces dysthyroïdies peuvent être causées par des facteurs génétiques, des mécanismes auto-immuns et réactionnels ou encore par une carence ou une surcharge iodée.

Les **hyperplasies bénignes thyroïdiennes** sont appelées **nodules ou adénomes** et peuvent se présenter sous forme de lésions isolées ou multiples, lobaires ou isthmiques, uni- ou bilatérales. Si ces formations sont capables de fixer les isotopes radioactifs de l'iode, elles sont dites fonctionnelles ou 'chaudes'.

Il s'agit d'événements fréquents, peu symptomatiques, retrouvés dans 50% de la population et notamment chez les femmes et les personnes de plus de 60 ans. Ces néoplasmes peuvent être spontanés, compensatoires, réactionnels ou auto-immuns, et ne sont pas toujours associés à un goître ou à une dyfonction hormonale. Moins de 5% de ces lésions présentent un potentiel dégénératif en néoplasie maligne.

Les **néoplasmes malins de la thyroïde** sont de type carcinome. On distingue les carcinomes différenciés, conservant les caractéristiques phénotypiques des cellules folliculaires saines ; et les carcinomes anaplasiques ou atypiques, souvent pauci- ou dédifférenciés.

Les **cancers thyroïdiens différenciés** ont une incidence de 1,2 à 3,8 cas pour 100000 habitants par an en fonction des régions, les chiffres les plus élevés étant observés sur les territoires insulaires d'Islande, de Hawaï et de Nouvelle-Calédonie (*Figge, 2006*) (*Davies and Welch, 2006*) (*Colonna et al., 2007*) (*Kilfoy et al., 2009*). On en distingue 2 types histologiques :

- les **carcinomes papillaires de la thyroïde (PTC)**, les plus fréquemment observés (80% des tumeurs thyroïdiennes malignes). Ils touchent les individus de tous âges

(moyenne = 45 ans) et sont 2 fois plus fréquents chez les femmes. 3 à 5% des PTC arrivent dans un contexte familial de polypose adénomateuse ou de maladie de Cowden. Les principaux facteurs de risques de PTC sont l'existence de lésions pré-néoplasiques et l'irradiation cervicale (à des fins thérapeutiques ou accidentelle), particulièrement durant l'enfance (*Figge, 2006*) (*Taylor et al., 2009*) (*Veiga et al., 2012*)(*Reiners et al., 2013*). Ils forment des nodules fermes souvent multifocaux, caractérisés au niveau histologique par la présence majoritaire de papilles (monocouche épithéliale entourant un centre fibro-vasculaire).

Près d'un tiers des PTC présentent une extension extra-glandulaire et une invasion lymphatique précoce. Des métastases pulmonaires sont retrouvées dans 5 à 10% des cas. La survie globale en cas de PTC est estimée à 20 ans à 92%.

- Les **carcinomes folliculaires de la thyroïde (FTC)**, retrouvés chez des individus de plus de 50 ans et en cas de carence iodée. La tumeur est un nodule isolé, au sein duquel la structure des follicules est conservée bien que présentant quelques anomalies architecturales. Les FTC extensifs présentent des métastases pulmonaires, osseuses et cérébrales, l'invasion s'effectuant par voie sanguine essentiellement. La survie globale des patients porteurs de ce type de tumeur est estimée à 70% à 20 ans (*Figge, 2006*).

Il existe des variantes histologiques des carcinomes papillaires et folliculaires, comme par exemple le carcinome papillaire à cellules hautes ou cylindriques, le carcinome oncocytaire à cellules de Hürthle, les carcinomes insulaires ou trabéculaires.

Les **carcinomes thyroïdiens peu différenciés**, très rares, sont considérés comme des tumeurs hétérogènes à contingent cellulaire polymorphe. Retrouvées chez les personnes âgées, ces tumeurs sont toujours létales.

Enfin, le **carcinome anaplasique de la thyroïde (ATC)** constitue une des entités les plus agressives de tumeurs humaines et sa progression est très rapide (*Schlumberger and Pacini, 2012*). Il concerne moins de 2% des tumeurs thyroïdiennes (*Nikiforov and Nikiforova, 2011*) et survient chez des patients âgés (maximum d'incidence à 70 ans). Toujours métastatique d'emblée, la survie à 3 ans est considérée comme exceptionnelle (*Figge, 2006*). Il s'agit la plupart du temps de tumeurs constituées de cellules de type folliculaire dédifférenciées, la cause de ce phénomène restant inconnue. Les cellules tumorales ne présentent plus de marqueurs folliculaires spécifiques tels que la thyroglobuline, les transporteurs d'iode ou le récepteur à la TSH.

❖ BASES MOLECULAIRES DES TUMEURS DU CONTINGENT FOLLICULAIRE

Les anomalies génétiques somatiques mises en évidence dans les PTC siègent au niveau de la voie des MAP kinases (*Mitogen-Activated Protein*), principale voie de transmission des signaux de prolifération des facteurs de croissance. L'activation permanente de cette voie est provoquée par des mutations ponctuelles activatrices des gènes *BRAF* (40-45%), *RAS* (10-20%) et *TRK* (5%), ainsi que par des réarrangements impliquant le récepteur membranaire *RET* (formant les transcrits de fusion *RET/PTC*) entraînant son expression et son activation ectopiques (Nikiforov, 2002) (Sapio et al., 2007) (Nikiforov and Nikiforova, 2011) (Xing, 2013) (Figure 4).

Des mutations ponctuelles des gènes *RAS* sont également retrouvées dans 40 à 50% des FTC. Les autres anomalies présentées par ce type de tumeurs étant les réarrangements *PPARγ-PAX8* (30-35%), les mutations activatrices des gènes *PIK3CA* (10%) et les mutations inhibitrices de *PTEN* (10%), impliquées dans la voie de régulation de l'apoptose et du cycle cellulaire *PI3K/Akt* (Nikiforov and Nikiforova, 2011) (Xing, 2013) (Figure 4).

Des mutations inactivatrices de *TP53* et activatrices de *AKT1* et *CTNNB1* sont observées dans les tumeurs pauci- ou indifférenciées (Figure 4). D'autres anomalies moléculaires secondaires ont été décrites dans ces tumeurs, telles que la surexpression de *VEGF*, *VEGFR*, *EGFR*, la diminution de l'expression du symporteur de l'iode (*NIS*) ou encore la perte d'expression de la peroxydase thyroïdienne (*TPO*).

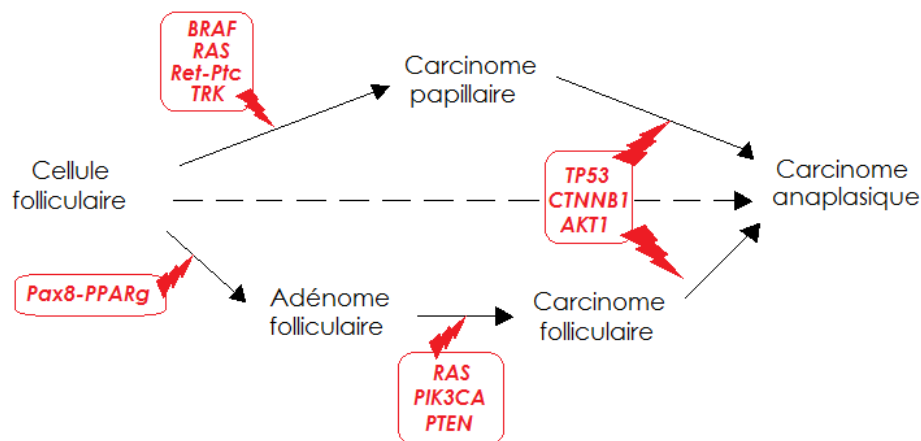


FIGURE 4 : PATHOGENÈSE MOLÉCULAIRE DES CARCINOMES DIFFÉRENCIÉS DE LA THYROÏDE

D'après les données de (Nikiforov and Nikiforova, 2011).

Il est à noter que le carcinome papillaire de la thyroïde fait partie des 25 types tumoraux sélectionnés par le consortium TCGA (*The Cancer Genome Atlas*, phase II – cf. chapitre 3.1.2) pour une analyse génomique complète, dont les données sont librement accessibles en ligne (<http://cancergenome.nih.gov/cancersselected/thyroid>).

1.2.2. Pathologies du contingent parafolliculaire

Les pathologies du contingent parafolliculaire thyroïdien sont en rapport avec un défaut d'homéostasie cellulaire, et il est très rare d'en observer une dysfonction primaire. On distingue l'hyperplasie bénigne des cellules C et les carcinomes médullaires de la thyroïde.

1.2.2.1. Hyperplasie des cellules C (HCC)

L'hyperplasie des cellules C résulte de **l'augmentation du nombre de cellules parafolliculaires** au sein du parenchyme thyroïdien, n'entraînant **pas d'altération structurale ou fonctionnelle** de celui-ci.

D'un point de vue histologique, l'hyperplasie est définie par la détection immunohistochimique d'au moins 50 cellules exprimant la calcitonine par champ d'observation microscopique (au grossissement x100). L'observation doit être effectuée sur 1 ou 3 champs de la région tiers-supérieure de chacun des 2 lobes (*Albores-Saavedra and Krueger, 2001*) (*Kaserer et al., 2001*) (*Guyétant et al., 2003*). L'hyperplasie peut être diffuse, focale ou nodulaire (*Perry et al., 1996*) (Figure 5). Seules les hyperplasies nodulaires, formant des structures bien délimitées en coloration standard Hématéine-Éosine-Safran (HES), sont dites néoplasiques. La présence d'atypies cellulaires et d'un pléomorphisme nucléaire serait indicative d'un **état pré-cancéreux**, possiblement évolutif en carcinome (*Sheu et al., 2003*) (*Guyétant et al., 2006*). En effet, des nodules hyperplasiques sont observés chez les jeunes apparentés ou en association avec des carcinomes déjà développés dans les formes familiales de CMT (*Kaserer et al., 1998*) (*Ashworth, 2004*).

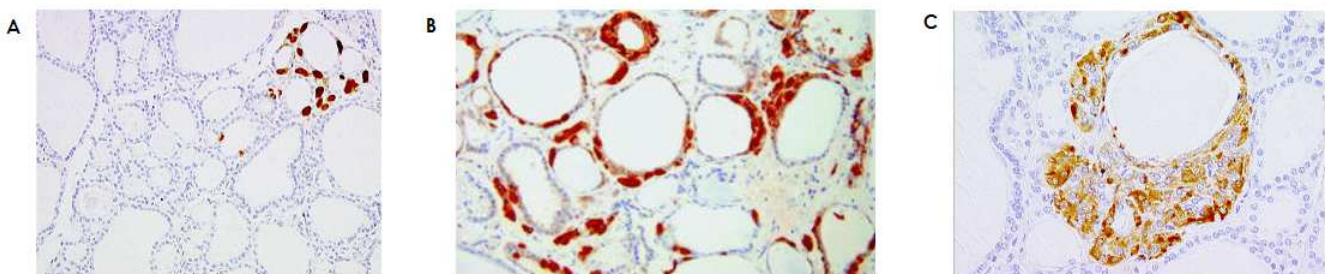


FIGURE 5 : COUPES HISTOLOGIQUES DE TISSU THYROÏDIEN APRÈS IMMUNOMARQUAGE CALCITONINE

A. HCC focale (x100) **B.** HCC diffuse (x150) **C.** HCC nodulaire (x200)

Source : (*DeLellis, 2010*)

Des hyperplasies peuvent être observées de manière **physiologique** aux âges extrêmes (nouveau-né et personne âgée) et chez l'homme comparativement à la femme. Elles peuvent également être réactionnelles, **secondaires** à certaines situations comme l'hypercalcémie chronique, l'hémodialyse périodique, l'hyperparathyroïdie, l'hypergastrinémie ou les autres pathologies thyroïdiennes (thyroïdite lymphocytaire ou carcinome différencié). Les hyperplasies correspondantes sont toujours diffuses ou locales, difficilement détectables en HES et sans atypies cellulaires.

Au niveau biologique, l'hyperplasie des cellules C peut être responsable d'une **hypercalcitoninémie modérée**. Ce symptôme n'étant toutefois pas obligatoire, celles-ci sont souvent diagnostiquées de manière fortuite (*Kaserer et al., 1998*) (*Albores-Saavedra and Krueger, 2001*) (*Sheu et al., 2003*) (*Guyétant et al., 2003*).

1.2.2.2. Carcinome médullaire de la thyroïde (CMT)

Le carcinome médullaire de la thyroïde est une **hyperplasie invasive des cellules parafolliculaires**, ayant pour conséquence une **altération structurale et fonctionnelle** du parenchyme thyroïdien et parfois des structures anatomiques avoisinantes. Il est considéré comme **tumeur thyroïdienne** de par sa localisation anatomique et comme **tumeur neuroendocrine** de par son origine embryologique.

1.3. CARACTÉRISTIQUES CLINIQUES DU CMT

1.3.1. Épidémiologie du CMT

Le CMT est un cancer **très rare**, qui concerne moins de 6% des cancers de la thyroïde (cette fréquence de diagnostic est similaire aux cancers thyroïdiens peu différenciés et anaplasiques), soit **moins de 0,1% de l'ensemble des cancers** (*Richards, 2010*). Sa prévalence dans la population générale est estimée à 1/14300 habitants (*Leboulleux et al., 2004*) et son incidence semble stable au cours des dernières décennies (*Davies and Welch, 2006*). Selon le réseau français des registres des cancers (Francim), **102 nouveaux cas de CMT ont été diagnostiqués en France entre 2000 et 2004** (estimation par extrapolation des données obtenues à partir des registres de 16 réseaux généraux départementaux), correspondant à une moyenne de 20 cas diagnostiqués sur l'ensemble du territoire par

an. L'incidence la plus élevée est observée **entre 45 et 65 ans** (chiffres donnés pour la période 1980-2004) (*Colonna et al., 2010*). La mortalité du CMT est évaluée à 18%, 25% et 75% à 5, 10 et 20 ans respectivement. Celle-ci augmente de façon exponentielle avec l'âge, très prononcée après 75 ans (Figure 6) (*Colonna et al., 2010*). Ces chiffres révèlent le **développement lent, mais souvent léthal** de cette pathologie. Enfin, rappelons que le CMT est responsable de près de **15% des décès dus à un cancer de la thyroïde** (*Roman et al., 2006*).

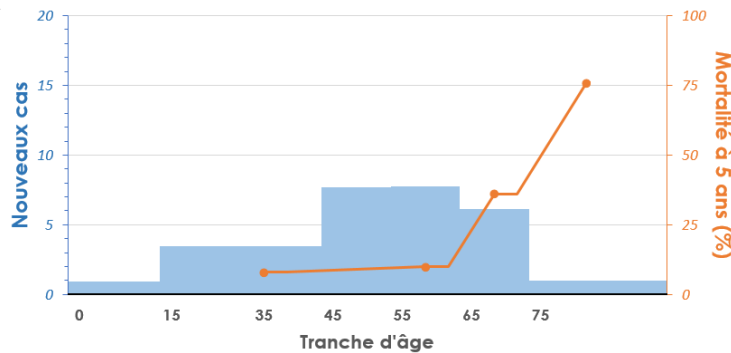


FIGURE 6 : INCIDENCE ET MORTALITÉ DU CMT EN FRANCE

En fonction de l'âge, pour la période 1980-2004.
D'après les données de (*Colonna et al., 2010*).

Le CMT présente une composante familiale forte comparativement aux autres types de cancers. En effet, près d'**un tiers des cas sont transmis de manière héréditaire**. A l'exception de cette spécificité, peu d'autres facteurs de risque du CMT ont été définis. Le sexe ratio est proche de 1 (la mortalité semblant toutefois plus importante pour les hommes), et contrairement aux tumeurs thyroïdiennes différenciées, il n'est lié ni à une carence ou surcharge iodée, ni à une exposition aux radiations ionisantes (*Roman et al., 2006*).

1.3.2. Présentations cliniques du CMT

❖ FORMES FAMILIALES DE CMT

Le CMT est transmis de manière héréditaire dans **20 à 30% des cas**. Il peut être retrouvé de manière isolée (CMT familial ou syndrome de Farndon - (*Farndon et al., 1986*)) ou en association à d'autres désordres endocriniens : ces entités représentent les néoplasies endocriniennes multiples NEM de type 2a et 2b, également appelées syndromes de Sipple et de Gorlin. Dans tous les cas, le CMT est pathognomonique du syndrome familial. Il est transmis selon un mode **autosomique dominant**, dont la **pénétrance est complète à 40 ans**, mais d'**expressivité clinique variable**. La prévalence des cas de CMT familiaux de novo (sans contexte familial connu) est estimée entre 5 et 16 %.

Le **syndrome NEM2a** représente plus de 60% des CMT d'origine familiale. Il associe à la tumeur parafolliculaire (*Sipple, 1961*):

- un phéochromocytome (tumeur des cellules chromaffines de la médullosurrénale) dans 50% des cas,
- une hyperparathyroïdie en rapport avec une hyperplasie ou un adénome parathyroïdien dans 20% des cas,
- et plus rarement une maladie de Hirschsprung (aganglionose intestinale congénitale) ou une notalgie parésthésique (neuropathie sensitive).

Le pic d'incidence du syndrome NEM2a est situé **entre 20 et 30 ans**, son développement paraît plus précoce qu'en cas de CMT familial isolé.

Le **syndrome NEM2b** est plus rare (5% des cas). Il correspond à une tumeur parafolliculaire agressive (*Pacini et al., 2010*), jamais associée à une hyperparathyroïdie primaire, mais possiblement à (*Gorlin et al., 1968*):

- un phéochromocytome (50%),
- des neuromes cutanéomuqueux et digestifs (pseudo-Hirschsprung),
- une hypertrophie des nerfs cornéens,
- une dysmorphie marfanoïde (grande taille, croissance exagérée des membres).

L'expressivité du syndrome NEM2b entraîne un diagnostic anticipé de la maladie, souvent **avant l'âge de 10 ans**.

Au niveau histologique, les CMT familiaux correspondent à des nodules froids multifocaux bilatéraux, le plus souvent associés à un fond hyperplasique diffus ou nodulaire (*Franc and Modigliani, 1998*) (*Leboulleux et al., 2004*).

❖ FORMES SPORADIQUES DE CMT

Le CMT est d'apparition sporadique dans la **majorité des cas** (70%). Ces formes ne concernent que des tumeurs isolées, non particulièrement associées à une hyperplasie sous-jacente. Il s'agit le plus souvent de **nodules monofocaux**, retrouvés à la jonction du tiers supérieur et des 2 tiers inférieurs d'un des lobes thyroïdiens (*Leboulleux et al., 2004*). De diagnostic tardif, il présente un pic d'incidence **entre 40 et 60 ans** et est souvent **métastatique d'emblée** (*Pacini et al., 2010*).

Les CMT sporadiques peuvent, de manière rarissime (3% des cas), être associés à un contingent tumoral folliculaire. L'origine de ces formes mixtes reste inconnue et leur pronostic est comparable à celui d'un CMT sporadique commun.

1.3.3. Critères diagnostiques du CMT

❖ CRITERES CLINIQUES

Il existe peu de symptômes cliniques spécifiques évocateurs d'un CMT, hormis une agrégation familiale pour les CMT transmis à la descendance. Les nodules les plus volumineux peuvent être détectés à la palpation du cou ou par des signes d'envahissement (altération de la fonction thyroïdienne) ou de compression (gêne cervicale, dysphagie). Les tumeurs les plus évoluées sont responsables de bouffées de chaleur et de diarrhées motrices importantes. Les techniques d'imagerie, telles que l'échographie thyroïdienne, peuvent également révéler un nodule suspect.

❖ CRITERES BIOLOGIQUES

Le CMT possède une spécificité biologique par la **sécrétion de la calcitonine (CT)**, qui en est de ce fait le marqueur tumoral de diagnostic et de suivi (*Tubiana et al., 1968*) (*Leboulleux et al., 2004*). Le dépistage systématique, réalisé en préopératoire par le dosage immunologique de la calcitonine sérique, permet de diagnostiquer le CMT à un stade précoce dans 60 à 70 % des cas (*Iacobone et al., 2002*) (*Rieu et al., 1995*) (*Niccoli et al., 1997*) (*Kaserer et al., 1998*).

Une élévation modérée de la calcitoninémie basale (inférieure à 10 pg/mL chez le sujet sain) n'est pas un marqueur spécifique du CMT : elle peut être observée en cas de thyroïdite, d'hyperplasie réactionnelle ou s'il existe d'autres tumeurs neuroendocrines (*Karanikas et al., 2004*) (*Gibelin et al., 2005*). En revanche, son augmentation nette (supérieure à 30 pg/mL) ou après stimulation par injection de pentagastrine (prélèvements réalisés 0, 1, 3, 5 et 10 minutes après injection intra-veineuse lente d'un analogue de la gastrine) signe avec plus de certitude une pathologie des cellules parafolliculaires, hyperplasie ou CMT (*Niccoli et al., 1997*) (*Hahm et al., 2001*) (*Elisei et al., 2004*). Enfin, puisqu'il existe une bonne **corrélation entre le taux de calcitonine et le volume tumoral** (*Cohen et al., 2000*), une hypercalcitoninémie très élevée (souvent supérieure à 100 pg/mL) est un signe très évocateur de CMT (*Hahm et al., 2001*) (*Elisei et al., 2004*).

L'**ACE** (Antigène Carcino-Embryonnaire) est, de façon inconstante, également augmenté (taux sérique supérieur à 5ng/mL) (*Brandi et al., 2001*). Son dosage est souvent réalisé concomitamment à la calcitoninémie.

❖ CRITERES CYTO-HISTOLOGIQUES

Le diagnostic histologique permet l'identification certaine du CMT dans 88 à 100% des cas. Il peut être réalisé sur 2 types de prélèvements :

- Sur un liquide de cytoponction ; mais la morphologie relativement peu spécifique des cellules parafolliculaires rend cet examen délicat (risque de faux négatifs). Un immunomarquage calcitonine et une analyse tissulaire complémentaire sont toujours nécessaires.
- Par analyse d'une pièce opératoire (thyroïdectomie, curage ganglionnaire, métastase tissulaire), de manière extemporanée ou après fixation.

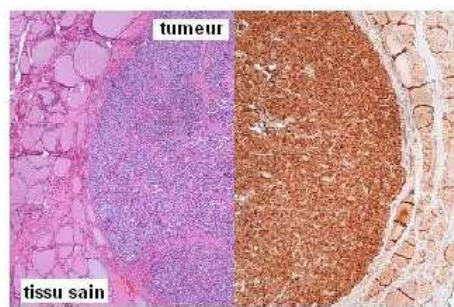


FIGURE 7 : ASPECT MICROSCOPIQUE D'UN CMT

Coloration HES (à gauche) et immunomarquage calcitonine (à droite).

Source : Pathology and Lab Medicine Group <http://www.flickrriver.com/groups/labmed/>

Au niveau macroscopique, le CMT forme des nodules non-encapsulés de couleur blanche à jaunâtre, retrouvés **préférentiellement au tiers supérieur des lobes**, mono- ou pluri-focaux, uni- ou bilatéraux.

En microscopie, l'architecture est variable (travées, lobules, massifs, pseudo-papilles), les cellules sont polymorphes rondes, fusiformes ou polyédriques. Le stroma est abondant, fibreux, et présente de dépôts amyloïdes dans 80% des cas (cette observation étant directement liée à l'activité sécrétoire des cellules) (*Hazard et al., 1959*) (*Thliveris et al., 1976*) (*Das et al., 2007*) (*Pinto and Nosé, 2013*). En immunohistochimie, le **marquage calcitonine, positif au niveau cellulaire et stromal**, est le seul obligatoire afin d'affirmer le diagnostic (Figure 7). Notons tout de même que les cellules sont également positives aux anticorps anti-ACE, anti-chromogranine et anti-TTF-1.

Une recherche d'**hyperplasie associée** doit être menée de façon systématique, autour de la tumeur et dans le lobe contralatéral, afin de distinguer une éventuelle forme familiale. De ce fait, un diagnostic histologique négatif ne peut être rendu sans l'observation minutieuse de chacun des lobes.

Enfin, le CMT constituant une entité relativement rare et bien que n'entrant pas dans les types tumoraux éligibles à la cryopréservation à visée sanitaire définis par l'INCa (*INCa*,

2011), il est fortement recommandé de conserver les tissus ayant permis d'établir le diagnostic, de manière pérenne, au sein d'une tumorothèque.

❖ CRITERES MOLECULAIRES

Les patients porteurs d'une forme familiale de CMT présentent tous une **mutation ponctuelle germinale de l'oncogène RET**, codant un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase (Donis-Keller et al., 1993) (Mulligan et al., 1993b). Ces mutations sont également retrouvées **au niveau somatique dans 40% des formes sporadiques** et sont considérées comme anomalies moléculaires causales du CMT (Eng et al., 1994). L'anomalie moléculaire causale des autres formes sporadiques demeurerait, jusqu'à il y a peu, inconnue.

Devant la forte proportion des formes familiales, tout nouveau CMT doit être considéré comme cas index potentiel et l'analyse moléculaire du gène *RET* au niveau germinale est donc proposée à titre systématique. L'identification d'un cas index induit le dépistage des apparentés à risque, permettant ainsi une prise en charge thérapeutique ou prophylactique précoce (par thyroïdectomie) : le dépistage génétique chez les enfants de moins de 5 ans permet, après chirurgie, de réduire de 50% le risque de développement d'un CMT à l'âge adulte (Kloos et al., 2009).

L'ensemble des anomalies moléculaires présentées par les tumeurs de type CMT faisant l'objet de ce travail, celles-ci seront décrites en de plus amples détails dans chacun des paragraphes concernés.

1.3.4. Critères pronostiques du CMT

Le CMT est une tumeur lymphophrile, sa **dissémination précoce par voie ganglionnaire** est très fréquente, y compris en cas de microcarcinome (Moley and DeBenedetti, 1999) (Tamagnini et al., 2005). Des **adénopathies cervicales** ou des **métastases à distance, de localisation hépatique, pulmonaire ou osseuse**, constituent le mode de révélation dans près de 20 % des cas (Barbet et al., 2005).

L'invasivité extra-thyroïdienne est un critère fort de pronostic du CMT, quel que soit l'âge du patient au diagnostic (Modigliani et al., 1998) (Hyer et al., 2000) (de Groot et al., 2006). Les métastases à distance représentent la **cause majeure de mortalité**, avec un abaissement de la survie à moins de 20 % à 10 ans après leur diagnostic (contre plus de 65% pour les formes localisées). Cette corrélation est la plus significative chez les hommes (Modigliani et

al., 1998). La guérison biologique est en revanche quasi constante pour tous les patients sans métastases ganglionnaires.

L'exploration et la localisation de sites secondaires peut être réalisée à l'aide de méthodes d'imagerie conventionnelle (échographie, tomodensitométrie, imagerie par résonnance magnétique, scintigraphie) ou avec des techniques spécifiques, telles que la laparoscopie ou le cathétérisme veineux étagé (*Medina-Franco et al., 2001*).

❖ ÉVALUATION HISTOLOGIQUE DES LOCALISATIONS SECONDAIRES

L'évaluation de l'invasivité du CMT est établie à l'aide de la **classification TNM** (*Tumor Node Metastasis*), qui distingue les microcancers (tumeur de taille inférieure à 1 cm), les formes localisées intra-glandulaires, les formes localement avancées avec envahissement ganglionnaire et les formes métastatiques avec envahissement d'organes à distance (Table 2). Les métastases ganglionnaires surviennent dans 20 à 30% des cas de microcarcinomes, 50% dans les cas présentant une tumeur de taille comprise entre 1 et 4cm, et 90% au-delà (*Moley and DeBenedetti, 1999*) (*Scollo, 2003*).

Dans la suite de ce travail, nous nommerons :

- tumeur **localisée**, toute tumeur classée $T_{(1,2,3)}$ **N0M0** (stades I à III);
- tumeur **localement invasive**, toute tumeur $T_{(1,2,3,4)}$ **N1M_(X,0)** (stades III, IVa/b);
- tumeur **métastatique**, toute tumeur $T_{(1,2,3,4)}$ **N1M1** (stade IVc).

TUMEUR PRIMAIRE (T)	
Tx	Tumeur non évaluable
T0	Aucune tumeur trouvée
T1	Tumeur de taille ≤2cm, limitée à la thyroïde
T1a	Tumeur de taille ≤1cm, limitée à la thyroïde
T1b	Tumeur de taille >1cm et ≤2cm, limitée à la thyroïde
T2	Tumeur de taille >2cm et ≤4cm, limitée à la thyroïde
	Tumeur de taille >4cm, limitée à la thyroïde
T3	ou
	Toute tumeur présentant une extension extrathyroïdale minimale (tissus mous périthyroïdaux)
T4a	Tumeur de toute taille s'étendant en dehors de la capsule (tissus mous sous-cutanés, larynx, trachée, œsophage ou nerf laryngé récurrent)
T4b	Tumeur de toute taille envahissant le fascia prévertébral, l'artère carotidienne ou les vaisseaux médiastinaux
GANGLIONS LYMPHATIQUES REGIONAUX (N) (compartiment central, cervical latéral et ganglions médiastinaux supérieurs)	
Nx	Ganglions non évaluables
N0	Pas de métastase ganglionnaire retrouvée
N1	Présence de métastases ganglionnaires
N1a	Métastases du niveau IV (prétrachéal, paratrachéal, préaryngé)
N1b	Métastases unilatérales, contralatérales ou bilatérales cervicales, rétroaryngées ou du médiastin supérieur
METASTASES DISTANTES (M)	
Mx	Métastases à distance non évaluables
M0	Pas de métastase à distance
M1	Présence de métastase(s)

TABLE 2 : CLASSIFICATION TNM DES CMT

D'après les données de (*Edge and American Joint Committee on Cancer, 2010*)

❖ SIGNES D'APPEL BIOLOGIQUES D'UNE MALADIE RESIDUELLE

En sus de son intérêt diagnostique, la **calcitonine sérique** est également utilisée en tant que marqueur de maladie métastatique ou résiduelle après traitement du CMT :

- La **calcitoninémie basale** étant corrélée au volume tumoral, un bilan d'extension se justifie si les valeurs de celle-ci sont élevées ou si un non-retour aux valeurs usuelles après thyroïdectomie totale est observé. Le temps de demi-vie de la calcitonine est estimé entre 15 et 120 minutes, ces valeurs dépendant fortement de sa concentration (*Algeciras-Schimmich et al., 2009*).
- Le calcul du **temps de doublement de la calcitonine** permet d'évaluer la vitesse d'évolution des sites tumoraux. Celui-ci est directement relié à l'agressivité et au pronostic du CMT : un temps de doublement inférieur à 24 mois révèle une forme explosive de la maladie (*Miyauchi et al., 1984*) (*Barbet et al., 2005*) (*Laure Giraudet et al., 2008*) (*Meijer et al., 2010*) (*Gawlik et al., 2010*).

Il est important de souligner que le dosage et l'immunomarquage calcitonine, bien que tests spécifiques au CMT, peuvent présenter un intérêt limité dans les tumeurs exposant un phénotype de dédifférenciation marqué (perte d'expression de CALCA). Dans ces tumeurs constituant les entités les plus agressives de CMT, la sécrétion d'ACE est augmentée et son évaluation, au niveau sérique ou tissulaire, constitue donc également un indicateur de mauvais pronostic.

1.3.5. Prise en charge thérapeutique du CMT

Avant toute action, l'évocation clinique de CMT doit entraîner la recherche de comorbidités associées, et notamment d'un éventuel phéochromocytome (*Pacini et al., 2010*). La suite de la prise en charge du CMT (auscultation, actes invasifs, imagerie, chirurgie) est susceptible d'induire de fortes poussées hypertensives et doit être adaptée en ce cas.

❖ THERAPIES CONVENTIONNELLES

La prise en charge en première intention d'un CMT est toujours chirurgicale. Celle-ci consiste en une **thyroïdectomie totale** et un **curage ganglionnaire bilatéral** (y compris en cas de nodule unilatéral).

Une exérèse complète et rapide de la tumeur impacte très fortement le pronostic en post-opératoire (*Pacini et al., 2010*), le taux de survie à 10 ans atteignant 70 à 95% pour les CMT biologiquement guéris (*Scollo, 2003*) (*Schlumberger et al., 2008*). Ses modalités sont conditionnées par la forme clinique et les indices pré-opératoires d'invasivité du CMT : elle doit être réalisée moins d'un an après le diagnostic en cas de forme familiale de type NEM2b et avant 5 ans pour les formes NEM2a ou si une augmentation de la calcitoninémie stimulée est observée (*Gimm et al., 2004*). Une reprise chirurgicale peut être indiquée en cas de maladie résiduelle locorégionale, néanmoins celle-ci ne permet la normalisation de la calcitoninémie que dans 30% des cas (*Pellegriti et al., 2003*).

Il n'existe **pas de traitement conventionnel efficace en seconde intention** du CMT, pour les cas dont la résection n'a pas permis la guérison. Les traitements systémiques sont essentiellement à visée palliative (traitement de la diarrhée et de la douleur) (*Schlumberger et al., 2008*). La chimiothérapie montre un taux de réponse objective de 20%, une amélioration symptomatique partielle et transitoire et aucun bénéfice sur la survie (*Orlandi et al., 1994*) (*Modigliani et al., 1998*) (*Nocera et al., 2000*). La radiothérapie cervicale ou médiastinale et la radio-immunothérapie anti-ACE ont été proposées, sans plus de succès (*Stein et al., 2002*) (*Pellegriti et al., 2003*). Les cellules parafolliculaires ne fixant pas l'iode, elles sont par conséquent insensibles aux traitements de radiothérapie métabolique utilisant l'isotope radioactif ^{131}I .

La chimio-embolisation, la radiofréquence ou l'exérèse chirurgicale peuvent être appliquées aux métastases hépatiques.

❖ THERAPIES SPECIFIQUES

De nouvelles perspectives prometteuses sont apportées par les thérapies ciblant spécifiquement les anomalies moléculaires des tumeurs (cf. chapitre 3.1.3 en page 69). Plusieurs **inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK)** - incluant **RET** dans leur spectre d'activité - sont actuellement à l'essai en France pour un usage en cas de CMT métastatique (Table 3).

Nous citerons comme exemples les 2 molécules pour lesquelles les essais sont les plus avancés :

- le **vandétanib (CAPRELSA®, AstraZeneca)**, ayant montré de bons résultats chez des patients atteints de maladie résiduelle non résécable et ayant obtenu une autorisation conditionnelle de mise sur le marché en Europe pour cette application en février 2012 (dans l'attente d'études complémentaires concernant les critères

moléculaires de réponse - rapport d'évaluation EMEA/H/C/002315-R/0002). Le vandétanib cible, en sus de RET, les récepteurs EGFR et VEGFR (*Herbst et al., 2007*).

- le **cabozantinib (XL-184, COMETRIQ®, Exelixis)**, approuvé par l'agence du médicament américaine (FDA) depuis novembre 2012 et en cours d'évaluation pour une autorisation de mise sur le marché européenne courant 2014. Le cabozantinib cible les récepteurs RET, VEGFR, MET, FLT-3 et KIT (*Kurzrock et al., 2011*).

Il est intéressant de constater que l'ensemble des ITK utilisés présentent un spectre d'activité large, incluant des cibles additionnelles à RET, comme les récepteurs de facteurs de croissance VEGFR (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*), EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), MET (ou HGFR, *Hepatocyte Growth Factor Receptor*) et KIT (ou SCFR, *Stem Cell Factor Receptor*). Bien que ces cibles soient exprimées en proportions variables dans les tumeurs de type CMT (*Rodríguez-Antona et al., 2013*), leur implication dans la réponse aux traitements par ITK n'a - jusqu'à présent - pas encore été évaluée. Chez certains patients, la réponse à ces drogues semble être limitée et/ou transitoire, mais les mécanismes moléculaires à l'origine de ces **résistances primaires et secondaires** n'ont pas encore été expliqués (cf. chapitre 3.1.3 en page 69).

Notre équipe a récemment réalisé une étude d'évaluation de **marqueurs protéiques de réponse** au sunitinib et au vandétanib dans le CMT, décrivant un rôle prépondérant des protéines impliquées dans l'invasion tissulaire et le pouvoir métastatique comme le récepteur **VEGFR2**, les **métalloprotéases**, l'**urokinase**, les **cadhérines**, l'**interleukine 8**, la **tenascine C**, le **TGF β 2** l'**ostéonectine** ou encore **CD44** (*Broutin, 2011*) (*Broutin et al., 2011*) (*Broutin et al., 2014*).

Enfin, si ces thérapies innovantes semblent montrer une certaine efficacité dans le traitement des CMT réfractaires, elles ne sont pourtant pas dénuées de **toxicité**. Elles induisent très souvent des **effets indésirables sévères** de grade 2, tels que de fortes diarrhées (70% des patients en phase II d'évaluation du vandétanib, pour exemple), des éruptions acnéiques (63%), des troubles du sommeil et une fatigue importante (63%).

Des effets indésirables de grade 3 et 4, tels que l'allongement de l'onde cardiaque QT (8%) ou l'augmentation de la pression artérielle de plus de 30mmHg (75%) nécessitent une diminution de posologie voire l'arrêt du traitement. Quelques **décès** directement imputables à l'utilisation de ces molécules ont été rapportés.

Ainsi, en dépit de l'efficacité observée chez la majorité des patients traités, l'ensemble de ces arguments négatifs sont susceptibles de limiter l'emploi de telles drogues, qui sont, de surplus, très coûteuses.

Molécule	Classe	Statut/Phase/Objectif
Cabozantinib (XL184, Cometriq - Exelixis)	ITK ciblant VEGFR2, MET, RET	Actif, recrutement terminé Phase III Etude d'efficacité (internationale, randomisée vs placebo, en double aveugle)
Vandétanib (ZD6474, Caprelsa - AstraZeneca)	ITK ciblant VEGFR, EGFR, RET	Actif, recrutement terminé Phase III Etude d'efficacité (internationale, randomisée vs placebo, en double aveugle) Actif, recrutement terminé Phase II Etude d'efficacité et de tolérance (non randomisée) En cours d'ouverture "- Etude bénéfice/risque (européenne, observationnelle, prospective)
Sunitinib (SU11248, Sutent - Pfizer)	ITK ciblant PDGFR, VEGFR, KIT, RET	Complet Phase II Etude d'efficacité et de tolérance (multicentrique, non randomisée)
Motésanib (AMG-706 - Amgen)	ITK ciblant VEGFR, PDGFR, KIT, RET	Complet Phase II Etude d'efficacité et de tolérance (non randomisée)
Sorafénib (BAY-43-9006, Nexavar - Bayer) + Évérolimus (AFINITOR - Novartis Europharm)	ITK ciblant VEGFR, PDGFR, KIT, RET FGFR, RAF, p38 inhibiteur ciblant mTORC1	Actif, recrutement terminé Phase I/II Etude d'efficacité et de tolérance
Lenvatinib (E7080 - Eisai)	ITK ciblant VEGFR2, VEGFR3	Actif, recrutement terminé Phase II Etude d'efficacité et de tolérance (multicentrique, non randomisée)
Nintédanib (BIBF1120, Vargatef - Boehringer Ingelheim)	ITK ciblant VEGFR1/2, PDGFR, FGFR	En cours de recrutement Phase II Etude d'efficacité et de tolérance (européenne, randomisée vs placebo, en double aveugle)
Lucitanib (E-3810 - Ethical Oncology Science)	ITK ciblant FGFR1/2, VEGFR1/3	En cours de recrutement Phase I/II Etude d'efficacité et de tolérance (non randomisée, en escalade de doses)
Irovulfen + capécitabine	Chimiothérapie combinée	Complet Phase II Etude d'efficacité et de tolérance (non randomisée)
Anticorps bispécifiques anti-CEA / anti-DTPA + anti-¹³¹I / anti-DTPA	Radioimmunothérapie combinée	Complet Phase II Etude d'efficacité et de tolérance (non randomisée)

TABLE 3 : MOLÉCULES EN COURS D'ESSAI POUR LE TRAITEMENT DES CMT RÉFRACTAIRES
Études en cours en France, d'après le répertoire américain ClinicalTrials (<http://www.clinicaltrials.gov>).

1.3.6. Modèles d'étude du CMT

❖ MODELES D'ETUDE IN VITRO DU CMT

Très peu de **modèles d'études humains** du CMT existent. A l'heure actuelle, la seule lignée cellulaire commercialisée est la **lignée TT** (*Thyroid Tumor* – ATCC CRL-1803). Cette lignée constitue le modèle de référence du CMT, utilisé dans de très nombreuses études. Établie en 1978 et principalement décrite par ([Leong et al., 1981](#)), elle dérive d'une tumeur primaire prélevée chez une femme de 77 ans. Les cellules TT sont spontanément immortelles et conservent leur pouvoir tumorigène dans le temps (après injection sous-cutanée chez des souris *nude*), y compris aux passages très tardifs. Elles présentent une activité sécrétoire continue d'un très grand nombre de molécules : calcitonine, ACE ([Leong et al., 1981](#)), somatostatine ([Gagel et al., 1986](#)), POMC (pro-opiomélanocortine), neurotensine, enképhaline, PTHrP (*PTH-Releasing Peptide*), GRP (*Gastrin-Releasing Peptide*), sérotonine, chromogranine, synaptophysine, NSE (*NeuroSpecific Enolase*), calbindine et tyrosine hydroxylase ([Zabel & Grzeszkowiak, 1997](#)). Leur temps de doublement est évalué à plus de **83 heures (3,5 jours)** et elles ne prolifèrent qu'à forte densité. Ces cellules présentent une mutation activatrice **RET p.Cys634Arg** semblable à celle retrouvée dans les formes familiales NEM2a ([Carlomagno et al., 1995](#)).

Une seconde lignée humaine est également très souvent utilisée en tant que référence : il s'agit des cellules **MZ-CRC1**. Cette lignée présente une mutation **RET p.Met918Thr** et a été établie à partir d'un épanchement pleural présenté par une femme de 43 ans. Non commercialisée celle-ci reste, à ce jour, peu caractérisée ([Cooley et al., 1995](#)).

Quelques autres lignées humaines ont été établies mais n'apparaissent que très rarement dans les études, comme par exemple les cellules HMCa ou MTC-SK ([Pfragner et al., 1990](#)). Enfin, citons le cas des cellules RO-H85-1, RO-D81-1, quelques fois utilisées comme modèles mais dont l'analyse moléculaire récente révèle qu'il s'agit en réalité de lignées cellulaires issues de cancers vésicaux et coliques ([Dadon et al., 2013](#)).

Il existe plusieurs lignées d'origine animale (lignées murines MTC-M et 6-23, entre autres), mais leur usage est également parcimonieux ([Zeytinoğlu et al., 1980](#)).

Enfin, à défaut de modèles existants, les études fonctionnelles des différents génotypes de **RET** en vue d'évaluer leur implication dans l'oncogenèse du CMT sont réalisées à l'aide de fibroblastes NIH-3T3 transformés par transfection de vecteurs d'expression ([Santoro et al., 1995](#))([Watanabe et al., 2002](#))([Plaza-Menacho et al., 2007](#))([Ercolino et al., 2008](#))([Prazeres et al., 2011](#)).

❖ *MODELES D'ETUDE IN VIVO DU CMT*

La tumorigenèse du CMT ainsi que la réponse aux différentes drogues peuvent être évaluées *in vivo* par des expérimentations utilisant des modèles animaux, prenant ainsi en compte les éventuelles interactions avec le micro-environnement tumoral. Dans le cas du CMT, il existe plusieurs modèles murins présentant une tumeur spontanée.

En 1997, notre équipe a établi un modèle de **souris transgéniques** porteuses d'une mutation *RET* au niveau germinale (mutation de type **NEM2a p.Cys634Arg** – souche murine C57BL6/DBA2), le transgène étant placé sous le contrôle du promoteur du gène *CALCA*. Le CMT, seule pathologie observée chez ces animaux, survient **en 7 à 14 mois**. Il est toujours bilatéral et de pénétrance totale. Ce modèle présente, en sus, l'avantage de développer précocement une **hyperplasie des cellules C** (35% des individus – survenue en 3 semaines à 2 mois) et possiblement des **métastases à distance** (hépatiques et pulmonaires) (*Michiels et al., 1997*).

De façon étonnante, d'autres modèles murins présentent des CMT spontanés. C'est le cas par exemple des souris sur-exprimant les antigènes ST et MT du **polyomavirus SV40** (*Baetscher et al., 1991*) (*Felici et al., 1999*), **c-mos** (*Schulz et al., 1992*) ou **HRAS** (*Johnston et al., 1998*) ; celles présentant une mutation inactivatrice du gène **RB1** (pRb – Protéine du RétinoBlastome) (*Williams et al., 1994*) ou encore des souris invalidées pour le gène du **récepteur à la prolactine PRLR** (*Kedzia et al., 2005*). Plus intrigant encore, le rat Sprague-Dawley - espèce la plus couramment utilisée en expérimentation animale - présente une susceptibilité notoire aux tumeurs endocrines, et particulièrement aux CMT (*Suzuki et al., 1979*). Pourtant, à l'heure actuelle, aucune anomalie moléculaire n'a pu être associée à cette prédisposition.

Enfin, des **souris immunodéficientes xéno greffées** sont également utilisées pour les expérimentations. La greffe, cellulaire ou tissulaire (*patient-derived xenograft – PDX*), est très rarement réalisée de manière orthotopique pour des raisons anatomiques (technique nécessitant des compétences en microchirurgie) ; les flancs et la capsule surrénalienne y sont préférés. Les modèles expérimentaux de xéno greffes cellulaires ont été en particulier utilisés précédemment par notre équipe pour l'évaluation de la réponse thérapeutique du CMT aux inhibiteurs de tyrosine kinases (*Broutin et al., 2011*) (*Broutin et al., 2014*).

- Partie 2 -

**Le CMT : PROBLEMATIQUE et ENJEUX
ACTUELS**

2.1. SPÉCIFICITÉS ET MODALITÉS D'ÉTUDE DU CMT

Nous avons abordé, en introduction à ce travail, les spécificités du CMT.

Il s'agit d'une tumeur rare, mal définie au niveau phénotypique et dont les mécanismes moléculaires sous-jacents – à l'exception des mutations activatrices de l'oncogène *RET* (cf. chapitre 3.2.1.1, en page 72) – demeurent assez obscurs.

Si les formes localisées montrent une guérison quasi-totale après thyroïdectomie, les formes localement invasives et métastatiques sont pour la plupart réfractaires aux traitements adjuvants actuellement disponibles. L'utilisation récente des inhibiteurs de tyrosine kinase ciblant RET semble prometteuse, mais révèle de grandes disparités de réponses qui restent à expliquer. Dès lors, une amélioration de la connaissance des spécificités moléculaires physiologiques et/ou pathologiques des cellules parafolliculaires apparaît être un préambule indispensable à l'amélioration de la prise en charge thérapeutique des patients atteints.

Durant la dernière décennie, des avancées technologiques majeures ont permis une nette amélioration de la caractérisation des tumeurs, qu'il s'agisse de descriptions génomiques, transcriptomiques, protéomiques ou encore métabolomiques. Si ces techniques peuvent sans conteste être appliquées au CMT, celles-ci ne sont que très rarement réalisées, en raison de difficultés diverses spécifiques à ce type tumoral. Nous aborderons, au cours des paragraphes suivants, les principaux écueils pouvant expliquer la méconnaissance relative du CMT.

❖ LE CMT EST UNE TUMEUR NEUROENDOCRINE

Le CMT dérive des cellules parafolliculaires, dont l'origine embryologique et l'activité sécrétrice sont distinctes des thyrocytes. Le CMT constitue donc une **entité à part, biologiquement et moléculairement très différente des tumeurs différenciées** plus connues (Hedinger et al., 1989). Il se rapproche en revanche des tumeurs impliquant les autres cellules dérivées des crêtes neurales, possédant ou non une activité neuroendocrine. Selon toute vraisemblance, le CMT possède une grande similarité avec les gliomes, les méningiomes, les phéochromocytomes, ainsi qu'avec les mélanomes et les carcinomes à cellules de Merkel.

❖ LE CMT N'A PAS D'EQUIVALENT NON NEOPLASIQUE DISPONIBLE

Le nombre de cellules parafolliculaires dans le parenchyme thyroïdien humain sain est extrêmement faible (**moins de 0,1% des cellules**). Cette réalité entraîne de grandes difficultés d'analyse, et notamment lors des expérimentations comparatives entre le tissu tumoral et son équivalent non néoplasique. La microdissection laser ou le tri cellulaire après digestion tissulaire pourraient permettre d'obtenir un contingent de référence, mais ces techniques restent marginales, coûteuses et complexes. De ce fait, les échantillons correspondant à des CMT sont très souvent - et à tort - comparés à des tissus thyroïdiens sains, composés à plus de 95% de thyrocytes.

❖ LE CMT EST UNE TUMEUR RARE

Avec une incidence de **moins de 25 nouveaux cas par an en France**, le CMT fait partie des pathologies tumorales très rares. Dans ce contexte, les études cliniques sur des patients atteints sont limitées, les cohortes étant le plus souvent restreintes à quelques individus, bien souvent non représentatifs de la grande diversité phénotypique du CMT. De la même façon, les collections sériques et tissulaires accessibles restent faibles en effectifs et font souvent appel à des échantillons prélevés depuis longtemps (plus de 20 ans pour certains). Cette longue conservation soulève un autre problème : les techniques de conservation utilisées ont évolué au cours du temps, rendant les échantillons non comparables entre eux (modalités de recueil, de fixation ou de congélation différentes). De plus, certains prélèvements sont inutilisables pour des techniques de biologie moléculaire : ils ont par exemple été fixés à l'aide de solution d'acide picrique (liquide de Bouin), méthode de fixation avantageuse pour l'observation de la morphologie tissulaire et cellulaire mais altérant grandement les acides nucléiques (*Srinivasan et al., 2002*).

❖ LE CMT EST UNE TUMEUR A DEVELOPPEMENT LENT

Le CMT se développe lentement, du fait d'un **temps de division cellulaire long**. Cette caractéristique impacte fortement les études cliniques, qui demandent un recul d'observation important avant toute conclusion : l'évaluation des rechutes, de la réponse aux traitements et de la survie doit être effectuée sur plusieurs décennies (*Machens et al., 2013*). Cette propriété induit également une grande difficulté à développer des modèles d'étude de cette pathologie et explique la disponibilité restreinte de ces derniers, qu'il s'agisse de modèles cellulaires ou animaux.

2.2. OBJECTIFS DU TRAVAIL

Si la mise en évidence de mutations du gène *RET* dans des familles prédisposées au CMT a permis d'expliquer le développement tumoral de la majorité des formes familiales, leur présence n'est retrouvée que dans une partie seulement des cas sporadiques.

Il semblerait que d'autres altérations moléculaires soient impliquées dans ces formes, mais celles-ci restent très largement méconnues du fait des caractéristiques de la pathologie énoncées plus haut. Or, la description complète des anomalies génétiques portées par les CMT représente un enjeu majeur pour en améliorer leur prise en charge. Comme cela a déjà été réalisé pour d'autres types tumoraux, elle pourrait permettre une meilleure définition *a priori* des groupes de patients à risque métastatique, et un meilleur aiguillage *a posteriori* de ces mêmes patients vers des thérapies ciblées existantes efficaces.

L'objectif principal de ce travail de thèse est donc d'enrichir la compréhension des mécanismes moléculaires initiant la tumorigenèse et gouvernant le pouvoir invasif des cellules parafolliculaires néoplasiques. Il pourrait permettre, par la suite, une définition plus précise des modalités thérapeutiques à appliquer à chaque patient atteint de CMT, dans une démarche de médecine personnalisée.

L'Institut Gustave Roussy (IGR) est le centre expert national coordinateur du réseau français des tumeurs de la thyroïde réfractaires (réseau TuThyRef). Il a été labellisé ainsi par l'INCa, conformément à la mesure 23 du Plan Cancer 2009-2013, permettant l'amélioration de la prise en charge de patients atteints de tumeurs rares. Il est, de ce fait, un des centres de références du CMT en France. Cette centralisation nous permet de disposer d'une collection tissulaire humaine très précieuse et non négligeable, au regard de la rareté de la pathologie.

Le travail présenté ici a débuté par la constitution d'une base de données cliniques décrivant une large cohorte de CMT humains, comprenant des tissus cryopréservés et des tissus fixés puis conservés en paraffine (tissus FFPE – *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded*), collectés de manière rétrospective (patients diagnostiqués entre 1986 et 2013) ou prospective (d'avril à octobre 2013), à l'IGR ou dans d'autres centres collaborateurs français.

Nous avons par la suite cherché à caractériser cette cohorte, en utilisant des techniques de biologie moléculaire à haut-débit permettant la description de ces tumeurs à plusieurs niveaux :

- Dans un premier temps, nous avons recherché les **anomalies génomiques structurales** présentées par de telles tumeurs, comparativement au génome humain sain de référence. Pour ce faire, nous avons utilisé des méthodes de séquençage direct et de nouvelle génération (NGS – *Next-Generation Sequencing*), ainsi que d'hybridation comparative sur puce à ADN (CGH-array). Les résultats obtenus, qu'il s'agisse de mutations ponctuelles ou d'anomalies de grandes ampleurs, sont présentés en partie 3 de ce manuscrit, débutant en page 63.
- Dans un second temps, nous avons décrit – par technique de **génomique fonctionnelle** de type puce à ADN puis validation par PCR quantitative - les profils différentiels d'**expression des microARN** entre groupes de tumeurs. La recherche de microARN d'intérêt au niveau circulant a ensuite été effectuée après adaptation d'une technique de PCR quantitative, sur des échantillons sériques d'individus sains et de patients atteints de CMT. Enfin, l'analyse fonctionnelle de ces mêmes microARN a été réalisée sur les lignées cellulaires TT et MZ-CRC1, à l'aide de techniques de transcriptomique (permettant la définition d'ARN messagers directement ou indirectement régulés par lesdits microARN). L'ensemble des résultats correspondants constitue la partie 4 de ce manuscrit, débutant en page 143.

Ainsi, nous avons souhaité apporter une vision globale du '**paysage moléculaire**' des **tumeurs de type CMT**. Cette démarche de biologie intégrative s'est appuyée sur les données précédemment obtenues par notre équipe, dans les modèles murins *RET*⁶³⁴ ([Ameur, 2008](#)) ainsi que dans certaines tumeurs humaines, dont l'étude du transcriptome avait été relatée par ([Ameur et al., 2009b](#)).

Enfin, nous avons également cherché à améliorer les conditions d'études du CMT, par la caractérisation complète des 2 lignées cellulaires à notre disposition, mais également par la production de nouveaux modèles. Les données obtenues pour les cellules TT et MZ-CRC1 seront données en résultats complémentaires de chacune des parties de ce manuscrit. Les tentatives d'isolement de cellules parafolliculaires saines à partir de produits de thyroïdectomie (par tri cellulaire après immunomarquage), ainsi que l'établissement de xénogreffes (PDX sur souris *nude*) et de cultures primaires de CMT ne seront pas présentées ici, puisque restées infructueuses.

- Partie 3 -

GENOMIQUE STRUCTURALE DU CMT

3.1. INTRODUCTION

3.1.1. Principe général d'évolution somatique des cancers

Une cellule, au cours du temps et sous l'influence de facteurs exogènes (carcinogènes tabagiques, substances chimiques, radiations ionisantes...), accumule un grand nombre de variants. Ces anomalies sont pour la plupart transitoires, car prises en charge par les mécanismes endogènes de réparation qui assurent le maintien de l'intégrité cellulaire. Lorsqu'elles persistent, elles peuvent soit présenter une pénétrance nulle, soit se traduire par des modifications phénotypiques plus ou moins conséquentes. Les tumeurs peuvent être considérées comme des mosaïques de cellules dont les changements génétiques et/ou épigénétiques non réparés ont conduit à une modification de leur **capacité à proliférer**, à une altération des mécanismes de **mort programmée** ou encore à des capacités accrues de **migration** et d'**invasion** tissulaire. Si l'hypothèse d'une origine génétique du développement tumoral a été énoncée pour la première fois en 1914 par le biologiste allemand Theodor Boveri (*Goldschmidt, 1916*), les concepts d'oncogène, d'anti-oncogène et de gène suppresseur de tumeur n'ont quant à eux été décrits qu'à partir des années 1970 (*Huebner and Todaro, 1969*) (*Knudson, 1971*) (*Stehelin et al., 1976*).

D'un point de vue phylogénétique, les premières cellules à l'origine de la tumeur sont appelées **cellules-souches cancéreuses** (cancer stem cells) (*Reya et al., 2001*). Très rares au sein d'une tumeur (leur proportion a été estimée au maximum à 0,1% dans les tumeurs solides), elles seraient dotées de capacités d'auto-renouvellement et de prolifération semblables aux cellules souches tissulaires et seraient à l'origine, par leur dissémination systémique, de la formation de nouveaux foyers tumoraux (métastases). Elles peuvent se différencier en clones cellulaires présentant ou non de capacités tumorigènes. Ainsi, par le biais de mécanismes de sélection clonale, la composition cellulaire d'une tumeur change au cours du temps : on parle d'**évolution somatique des cancers** (*Gerlinger et al., 2012*).

D'un point de vue moléculaire, les clones cellulaires qui composent une tumeur présentent des **anomalies génétiques** qui leur sont propres, indépendamment du génome de l'organisme hôte. Ces mutations sont de nature très variée : il peut s'agir de substitutions nucléotidiques simples, d'insertions ou de délétions de petits fragments d'ADN, d'amplifications ou de délétions géniques, de réarrangements chromosomiques importants, voire de modifications de la ploïdie. Certaines tumeurs présentent des

modifications moins classiques, telles que des acquisitions d'ADN exogène (cas des infections virales), des modifications épigénétiques (altération de la structure chromatinienne ou dérégulation de l'expression génique au niveau post-transcriptionnel) ou encore un phénotype d'hyper-mutativité secondaire à une altération des voies de réparation de l'ADN.

Quelques soient leurs propriétés structurales, les mutations somatiques tumorales peuvent être classées en 2 catégories (Figure 8) (*Stratton et al., 2009*) (*Stratton, 2013*) (*Vogelstein et al., 2013*) :

- Les **mutations conductrices ou fondatrices (drivers)**, impliquées de manière causale dans les différents aspects du processus oncogénique énoncés par (*Hanahan and Weinberg, 2011*) (cf. Figure 10, en page 70). Elles permettent la sélection positive (ou avantage sélectif) des cellules présentant un fort potentiel de survie, de prolifération et/ou de migration. Ces variants sont souvent spécifiques et récurrents à un même type de tumeurs, comme par exemple la translocation t(9;22) communément retrouvée dans les cellules de leucémie myéloïde chronique (*Rowley, 1973*). Leur introduction dans une cellule de phénotype normal conduit à sa conversion en cellule cancéreuse (*Krontiris and Cooper, 1981*). Leurs conséquences variées sont à l'origine de l'**hétérogénéité phénotypique inter-tumorale**, en termes de taille, de survie, de vitesse d'expansion, de capacités de migration et d'invasion cellulaires (*Marusyk et al., 2012*) (*Burrell et al., 2013*) (*Vogelstein et al., 2013*).

Plusieurs mutations conductrices peuvent coexister dans un même clone tumoral, confirmant la théorie des « hits » multiples de (*Nordling, 1953*), reformulée par (*Knudson, 1971*), et leur apparition peut se faire de manière séquentielle (*Armitage and Doll, 1954*). *A contrario*, si celles-ci ne sont pas requises pour le maintien de la tumeur, elles peuvent disparaître au cours du développement tumoral. On parle d'**hétérogénéité moléculaire intra-tumorale** (*Marusyk et al., 2012*).

Exceptionnellement, ces mutations peuvent être présentes à l'état constitutionnel : elles sont alors à l'origine des formes familiales de cancer, transmissibles à la descendance.

- Les **mutations secondaires (passengers)**, ne présentant pas de conséquences fonctionnelles directes sur le développement tumoral. Considérées comme des événements aléatoires dus à l'instabilité génétique des cellules tumorales, elles peuvent être situées au niveau d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeurs sans pour autant intervenir dans la sélection positive. Elles sont souvent

phénotypiquement silencieuses mais peuvent néanmoins jouer un rôle de modificateurs de phénotype et intervenir de manière indirecte (par modification de l'environnement par exemple) dans le processus oncogénique (McFarland *et al.*, 2013). Retrouvées en grand nombre dans la tumeur finale, ces variations participent également à l'**hétérogénéité moléculaire inter- et intra-tumorale** (Burrell *et al.*, 2013)(Gerlinger *et al.*, 2012)(Marusyk *et al.*, 2012).

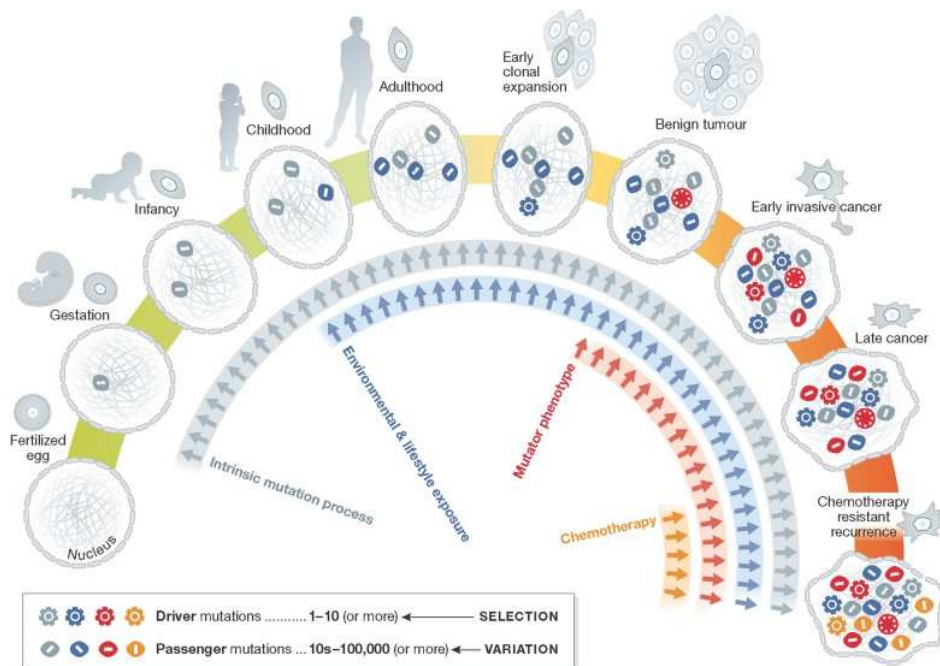


FIGURE 8 : PROCESSUS D'ÉVOLUTION SOMATIQUE DU GÉNOME TUMORAL
D'après (Stratton, 2013).

Le nombre ainsi que le délai d'apparition de mutations conductrices et secondaires dans les cellules tumorales ont été modélisés, selon des algorithmes de reconstruction phylogénétiques (travaux établis à partir de carcinomes rénaux métastatiques- (Gerlinger *et al.*, 2012)) et des algorithmes de probabilités de mutations (à partir des données disponibles dans la base COSMIC de l'Institut Wellcome Trust Sanger - *Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer* - <http://cancer.sanger.ac.uk>) (Bozic *et al.*, 2010)). Certains auteurs ont par ailleurs montré qu'il existait une corrélation qualitative et quantitative entre les variants conducteurs et secondaires dans une tumeur (Illingworth and Mustonen, 2011).

3.1.2. Hétérogénéité tumorale et avancées technologiques

Les récentes avancées technologiques en matière de biologie moléculaire ont aidé à l'établissement de descriptions exhaustives du génome et du transcriptome d'un grand nombre d'organismes et de types cellulaires. Ainsi, la démocratisation des techniques de séquençage à haut débit et de puces à ADN a permis la caractérisation quasi-complète des anomalies présentées par les sites primitifs de nombreux types tumoraux (*Ciriello et al., 2013*), là où nous ne disposions auparavant que d'approches de type gène-candidat (abstraction faite des caryotypes). Ces expérimentations génèrent une quantité très importante de données et nécessitent de nouvelles solutions d'analyse à grande échelle, voire quelques fois des logiciels bioinformatiques utilisant des algorithmes spécifiques. Certains consortiums permettent d'accéder librement à ces données en ligne, comme c'est le cas du projet américain TCGA (*The Cancer Genome Atlas* - <http://cancergenome.nih.gov/>) - réalisé sur 21 types et plus de 4700 échantillons tumoraux différents (*Weinstein et al., 2013*) (*Kandoth et al., 2013*) (*Lawrence et al., 2014*), ou encore du projet CCLE (*Cancer Cell Line Encyclopedia* - <http://www.broadinstitute.org/ccle>), réalisé sur plus de 950 lignées cellulaires tumorales humaines.

Si elles ne tiennent pas pour l'instant compte de l'évolution temporelle d'une même lésion tumorale, de telles études ont tout de même permis de confirmer une hypothèse majeure en oncologie : l'hétérogénéité moléculaire permet de définir de nouveaux sous-types tumoraux et ainsi d'étayer les classifications histologiques tumorales existantes (*Golub et al., 1999*) (*Aparicio et al., 2000*). De la même façon que les profils transcriptomiques réalisés au début des années 2000, les informations obtenues par le biais des nouvelles techniques de génotypage/séquençage montrent des profils mutationnels spécifiques (*Kan et al., 2010*) (*Vogelstein et al., 2013*). Pour exemple, les fréquences les plus élevées de substitutions simples nucléotidiques sont observées dans les tumeurs liées à une exposition aux carcinogènes environnementaux tels les mélanomes ou les carcinomes bronchiques (rayonnement UV, tabac, virus – plus de 10 mutations par Mb) ; celles-ci présentent près de 100 fois plus de mutations ponctuelles que les tumeurs pédiatriques ou les hémopathies malignes (environ 0,1 variants par Mb) (*Lawrence et al., 2013*).

Les cancers thyroïdiens (analyse réalisée sur 52 échantillons de type papillaire), quant à eux, présentent une fréquence moyenne de 0,5 mutation/Mb, constituant la fréquence la plus faible observée dans les tumeurs de l'adulte. Il s'agit dans ce cas essentiellement de transversions T↔G ou T↔A, particulièrement causées par une exposition aux rayonnements ionisants ou aux agents alkylants, facteurs de risques connus du cancer de la thyroïde (*Tucker et al., 1991*) (*Cohen et al., 2007*) (Figure 9).

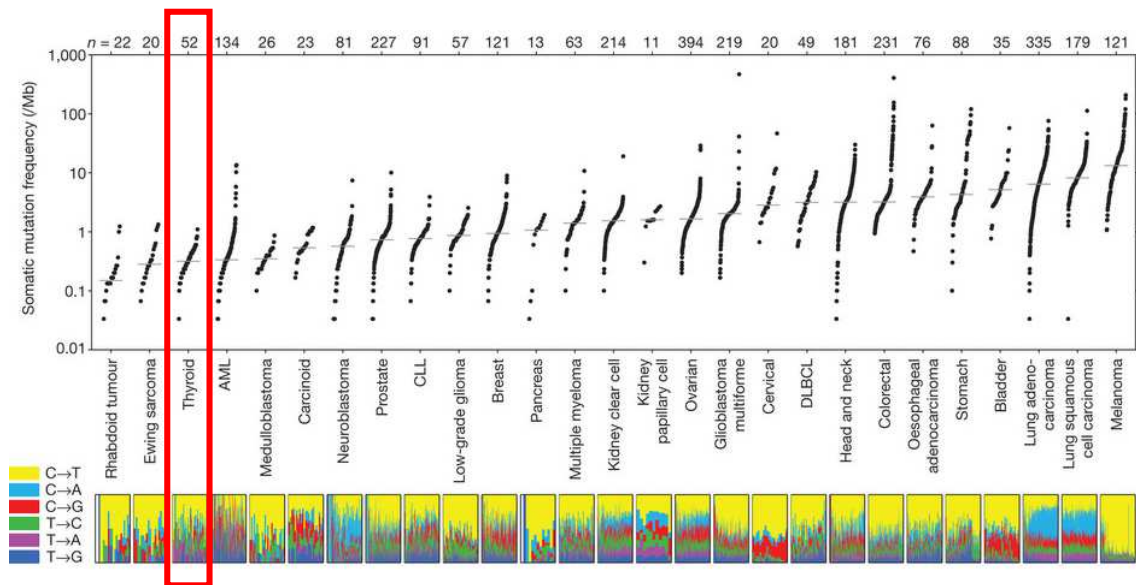


FIGURE 9 : FRÉQUENCE DES MUTATIONS SOMATIQUES PONCTUELLES DANS LES CANCERS

D'après (Lawrence et al., 2013).

3.1.3. Hétérogénéité tumorale et thérapies personnalisées

Les drogues utilisées en chimiothérapie conventionnelle induisent un arrêt de la multiplication cellulaire par action sur les mécanismes généraux de réplication et de mitose, suivie d'une cytotoxicité. Cette action n'est pas spécifique au phénotype cellulaire, et les cellules saines sont lésées de la même façon que les cellules néoplasiques, induisant des effets délétères sévères à plus ou moins long terme.

La mise en évidence du phénomène d'addiction oncogénique des tumeurs (Weinstein, 2002) a permis le développement d'une nouvelle stratégie de traitement : les thérapies ciblées sur une anomalie moléculaire (Weinstein and Joe, 2006). Chacune des caractéristiques du développement tumoral peut être indépendamment visée (Figure 10). Ainsi, en contrecarrant spécifiquement les anomalies biologiques pertinentes pour l'oncogénèse - véritables « talons d'Achille » des tumeurs - seules les cellules cancéreuses sont lésées.

L'utilisation d'une drogue, rationnellement décidée au regard des éléments diagnostiques définis *a priori* et par génie moléculaire, entre dans le domaine de la **théranostique**. En oncologie, cette approche médicale innovante porte également le nom de **médecine de précision** (ou médecine stratifiée), permettant l'orientation des patients vers des **thérapies personnalisées**.

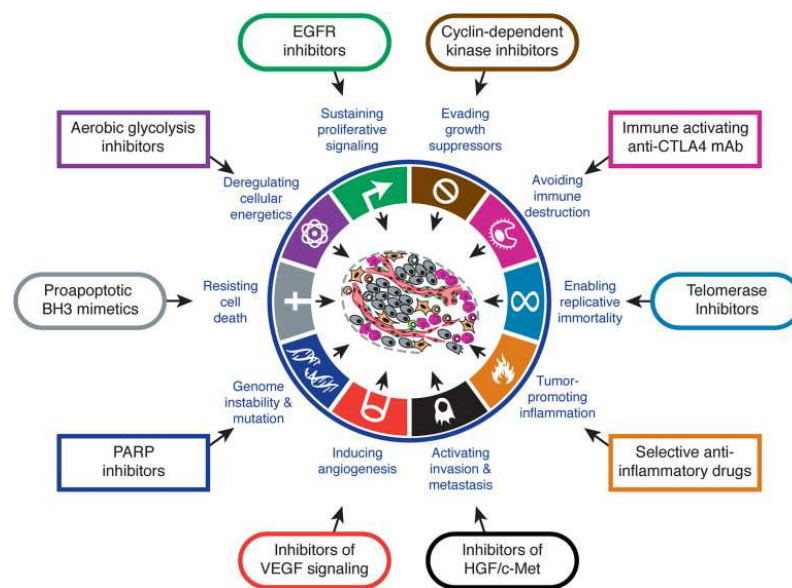


FIGURE 10 : CLASSES THÉRAPEUTIQUES CIBLANT LE PROCESSUS TUMORAL
D'après (Hanahan and Weinberg, 2011)

L'utilisation de telles molécules nécessite, au préalable, une définition précise des anomalies conductrices portées par les lésions néoplasiques. Cette caractérisation moléculaire permet (Chin et al., 2011a):

- d'affiner le diagnostic, par la définition de nouveaux sous-types tumoraux en complément des classifications cliniques, radiologiques et anatomopathologiques traditionnelles ;
- de présager du pouvoir métastatique d'une tumeur primaire ;
- de définir des groupes de patients répondeurs aux molécules disponibles ;
- d'anticiper les phénomènes de résistances aux traitements.

Celle-ci doit prendre en compte deux concepts primordiaux. Premièrement, toutes les variations présentées par un type ou un sous-type tumoral n'ont pas la même valeur théranostique, et il convient de distinguer les **variations réellement conductrices de l'oncogenèse** de celles plus indolentes. Celles-ci pourront par la suite être considérées comme cibles thérapeutiques, ou *a contrario*, comme de nouveaux marqueurs de résistance primaire aux drogues (Kaiser, 2013) (Mitsudomi et al., 2013). L'étude fonctionnelle de centaines de mutations ne pouvant être conduite *in vitro*, celles-ci sont de plus en plus souvent évaluées *in silico*, par analyse des fréquences d'observation dans les tumeurs et à l'aide d'algorithmes basés sur l'effet prévisible de telles variations au sein de systèmes biologiques complexes (Chin et al., 2011b) (Tamborero et al., 2013).

Deuxièmement, les déterminants moléculaires d'une tumeur ne sont **pas figés dans le temps**. L'**hétérogénéité tumorale** doit donc être considérée aussi bien **au niveau spatial** (tissulaire) que **temporel**, et il faut tenir compte de la possible apparition de variants conférant une résistance secondaire de la tumeur au traitement. Rencontrés uniquement après un premier contact, ceux-ci peuvent être portés par des clones modifiés (par activation de voies de signalisation additionnelles, modification de la conformation de la cible ou encore altération des mécanismes d'influx ou d'efflux de la drogue) (*Blair et al., 2013*) ou par des populations cellulaires minoritaires non détectées lors de la caractérisation initiale. Ces deux phénomènes obligent à une administration rationnelle, séquentielle et/ou couplée de plusieurs thérapies ciblées ; ainsi qu'à des analyses moléculaires des foyers tumoraux avant et pendant la prise en charge, lorsque cela est possible (*Torti and Trusolino, 2011*) (*Majewski and Bernards, 2011*).

Ainsi, l'avènement des thérapies personnalisées en cancérologie a permis d'améliorer considérablement la balance bénéfices/risques des thérapies anti-cancéreuses, de façon directe par augmentation de l'efficacité pharmacologique, et de façon indirecte par facilitation de l'adaptation posologique et amélioration de l'observance par les patients. Mais si leur application aux formes réfractaires de CMT est proposée depuis quelques temps déjà, celle-ci n'est basée que sur le principe d'une anomalie moléculaire causale unique, à savoir les mutations ponctuelles du gène *RET* (cf. chapitre 3.2.1.1 en page 72). Or le CMT est une tumeur rare, jamais représentée dans les études moléculaires pan-cancers pré-citées et aucune évaluation de son degré d'hétérogénéité n'a été réalisée jusqu'à présent. Il convient alors d'en améliorer la caractérisation moléculaire, et notamment de définir les anomalies additionnelles à *RET*, afin d'anticiper les variabilités de réponse aux traitements.

Quelques exemples de thérapies ciblant une anomalie moléculaire oncogénique et autorisées en France sont donnés en Annexe 1.

3.2. ANALYSE DU STATUT MUTATIONNEL SOMATIQUE PONCTUEL DES CMT

3.2.1. Etat des connaissances : altérations géniques connues

3.2.1.1. Le proto-oncogène RET

L'existence de formes héréditaires de CMT a permis la mise en évidence - de manière concomitante par (Mulligan et al., 1993b) et (Donis-Keller et al., 1993) - de l'implication du proto-oncogène RET (*REarranged during Transfection*) dans cette pathologie.

Le gène RET, localisé en région péricentromérique du chromosome 10 (bande 10q11.2 (Mathew et al., 1987)(Pasini et al., 1995)), est composé de 20 exons (Ceccherini et al., 1993). Il code pour un **récepteur membranaire à activité tyrosine kinase** dont l'expression est spécifique aux cellules issues des crêtes neurales embryonnaires (Takahashi, 1988). La voie de signalisation RET entre en jeu au cours du développement, de la survie et de la régénération des populations neuronales des systèmes nerveux entériques et sympathiques (Sariola and Saarma, 2003) ; du développement de certains organes neuroendocrines (Takahashi, 2001). Elle intervient également lors du développement des reins et au cours de la spermatogenèse (Schuchardt et al., 1994).

En situation physiologique, le récepteur RET est activé par **les ligands de la famille du GDNF** (*Glial cell line Derived Neurotrophic Factor*): GDNF, neutrine, artémine et persépine (Durbec et al., 1996). La liaison au ligand se fait au niveau extra-cellulaire, avec la collaboration d'un **co-récepteur GFRa** (*GDNF Family Receptor Alpha*) (Buj-Bello et al., 1997). La partie N-terminale glycosylée est constituée d'un domaine *cadherin-like* permettant l'association RET-ligand-GFRa, dépendante du calcium (Nozaki et al., 1998). Celle-ci est suivie d'une **homo- ou hétéro-dimérisation du récepteur**, rendue possible par l'existence d'un domaine riche en cystéines favorisant la formation de ponts disulfure (Figure 11). Cette modification conformationnelle entraîne la fixation d'une molécule d'ATP au niveau cytoplasmique, conduisant à la **transphosphorylation de résidus tyrosines** intracytoplasmiques spécifiques (entre 16 et 18 sites en fonction de l'isoforme) (Plaza-Menacho et al., 2006). Cette phosphorylation est régulée par l'action de phosphatases SHP1 et SHP2 (*alias* PTPN6 et PTPN11 - *Protein Tyrosine Phosphatase Non-receptor*) (Hennige et al., 2001) (Perrinjaquet et al., 2010). L'activation des domaines à activité tyrosine kinase initie la transduction du signal par action sur des **adaptateurs** de diverses cascades de signalisation (Knowles et al., 2006) (Manié et al., 2001) (Kurokawa et al., 2003) : la **voie JNK** et

la **voie JAK/STAT** via la phosphorylation des tyrosines 752 et 928, la **voie de la protéine kinase C (PKC)** via la tyrosine 1015, **les voies PI3K/Akt, MAPK et Ras/ERK** via la tyrosine 1062. Ainsi, l'activation du récepteur intervient dans les processus de prolifération, de différenciation, de motilité et de survie cellulaire (Figure 11).

Le nombre d'acides aminés formant la partie C-terminale est variable, le transcrit RET subissant un épissage alternatif. On distingue les isoformes RET9, RET43 et RET51 (1072, 1106 et 1114 acides aminés respectivement) (Myers et al., 1995), dont les fonctions semblent spécifiques (Richardson et al., 2012) (Degl'Innocenti et al., 2004) bien que largement méconnues (Figure 11).

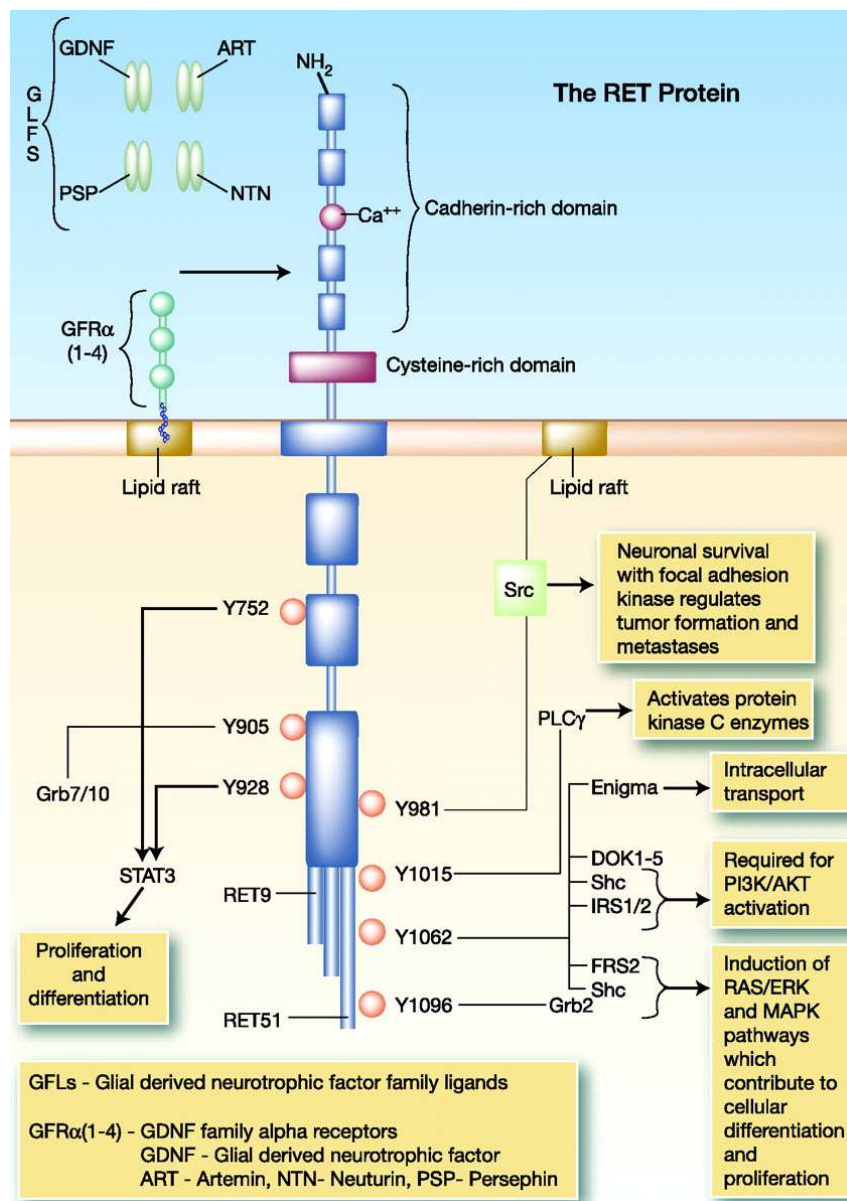


FIGURE 11 : STRUCTURE DU RÉCEPTEUR RET
D'après (Wells and Santoro, 2009)

Différentes situations pathologiques impliquent des mutations du récepteur RET et il existe une corrélation étroite entre le génotype du proto-oncogène et le phénotype observé. Il convient de distinguer les situations de perte ou de gain de fonction, par effet ectopique ou orthotopique (Mulligan, 2014). Nous nous intéresserons ici plus particulièrement aux gains de fonction de RET, seules variations à l'origine de pathologies néoplasiques (Santoro et al., 1999).

❖ Perte de fonction

Les variants géniques (mutations ponctuelles essentiellement) induisant une perte de fonction du récepteur se traduisent au niveau intestinal par une aplasie des cellules neuroganglionnaires, également appelée aganglionose intestinale congénitale de Hirschsprung (Luo et al., 1993) (Romeo et al., 1994) et au niveau rénal par une agénésie.

❖ Gain de fonction ectopique

Le pouvoir tumorigène de RET a été établi dès 1985 par (Takahashi et al., 1985). Ce dernier l'a identifié en tant que composant d'un **transcrit de fusion** lors d'expériences de transfection cellulaire menées sur des cellules NIH-3T3. La translocation du gène *RET* avec un partenaire fortement exprimé induit une **expression ectopique** de celui-ci, possiblement son auto-activation, et *in fine* la transformation cellulaire.

Ce phénomène est à l'origine de certains carcinomes papillaires de la thyroïde (Grieco et al., 1990) et des néoplasies affectant les cellules de Hürthle (Chiappetta et al., 2002). Récemment, de tels variants ont également été décrits dans les carcinomes bronchiques non à petites cellules non mutés pour d'autres oncogènes (Lipson et al., 2012) (Kohno et al., 2012) (Wang et al., 2012) (Ju et al., 2012) (Takeuchi et al., 2012), ainsi que dans certaines néoplasies hématopoïétiques (Bossi et al., 2013), permettant d'envisager une utilisation des ITK ciblant RET dans ces pathologies (Kohno et al., 2012) (Drilon et al., 2013). Notons que les partenaires à l'origine de l'expression de ces oncoprotéines de fusion – plus d'une dizaine identifiés à ce jour – sont distincts en fonction du type tumoral. Les formes *CCDC6-RET*, *NCOA4-RET* et *TRIM33-RET* sont préférentiellement retrouvés dans les tumeurs thyroïdiennes, alors que la forme la plus fréquente dans le carcinome pulmonaire est *KIF5B-RET* (Mulligan, 2014).

❖ Gain de fonction orthotopique

Dans les CMT, le mécanisme à l'origine de l'hyper-activation de RET est différent : les variants impliqués constituent des **allèles néomorphes de RET**, entraînant une **activation du récepteur non régulé** par le ligand, dans des **conditions physiologiques d'expression** (Santoro et al., 1990).

Il s'agit, dans la grande majorité des cas, de **mutations ponctuelles** du gène, dont la modification d'un seul allèle suffit à induire l'effet oncogénique. Des telles mutations sont retrouvées dans **toutes les formes familiales** (mutations germinales) et dans **plus de 40% des formes sporadiques** (mutations somatiques). Les mutations de novo (variants germinaux absents chez les parents) sont retrouvées chez 4 à 10% des cas index familiaux, il s'agit toujours d'une modification de l'allèle d'origine paternelle (*Schlumberger and Pacini, 2012*). Le nombre de cas faussement sporadiques (dont l'histoire familiale est inconnue) est évalué à 5%. A l'heure actuelle, un seul cas de mosaïcisme post-zygotique a été décrit dans la littérature (*Komminoth et al., 1995*).

L'implication causale des variants ponctuels de *RET* dans la tumorigenèse a été établie dans des lignées de fibroblastes humains NIH-3T3 et de phéochromocytomes murins PC12. L'introduction de constructions portant les principales mutations énoncées ci-après induit une transformation néoplasique et une différenciation des cellules transfectées, en présence ou en absence de ligand GDNF (*Borrello et al., 1995*) (*Cranston et al., 2006*).

Néanmoins, il convient de distinguer 2 catégories de variants, présentant des expressivités cliniques distinctes (Figure 12):

- Les **mutations concernant le domaine riche en cystéines** (exons 8 à 11 – cystéines 609, 611, 618, 620, 630, 634) ont été les premières découvertes, en 1993 par (*Mulligan et al., 1993b*) et (*Donis-Keller et al., 1993*). Elles sont observées dans plus de 98% des formes familiales de type NEM2a (la mutation p.Cys634Arg étant retrouvée dans plus de 50% des cas) et dans 50% des formes familiales F-CMT (*Donis-Keller et al., 1993*) (*Ito et al., 1997*). Elles sont également retrouvées dans quelques cas sporadiques, sous formes des petites délétions, duplications ou dél-insertions au niveau de l'exon 11, ainsi que dans la lignée TT (*Ceccherini et al., 1997*) (*Höppner and Ritter, 1997*) (*Höppner et al., 1998*) (*Arlt et al., 2000*).

Ce type de mutations entraîne la formation d'**homo-dimères activés** du récepteur, indépendamment de la liaison à un ligand (*Mulligan et al., 1993b*) (*Asai et al., 1995*). Elles sont liées à des **phénotypes peu sévères** et d'apparition tardive de CMT, ainsi qu'aux formes associant phéochromocytomes et/ou néoplasies parathyroïdiennes. Elles confèrent au CMT un **risque de niveau A, B ou C selon le consortium ATA** (American Thyroid Association), entraînant des mesures simplifiées de suivi des patients et de prophylaxie des rechutes, comparativement au groupe à haut risque ATA-D (*Kloos et al., 2009*).

Certaines de ces mutations ont également été rapportées dans 10 à 20% des phéochromocytomes isolés (*Eng et al., 1994*).

Notons que les variants impliquant les codons 609 à 620 présentent une particularité : ils confèrent des effets antinomiques en fonction des tissus d'expression et expliquent la possibilité de formes cliniques familiales mixtes associant maladie de Hirschsprung et NEM2a (*Chappuis-Flament et al., 1998*) (*Virtanen et al., 2013*).

- Les **mutations touchant les domaines à activité tyrosine kinase du récepteur** (exons 13 à 16 – codons 790, 791, 804, 883, 891, 912, 918). Elles sont retrouvées dans toutes les formes syndromiques NEM2b, dans 50% des formes F-CMT, dans la majorité des tumeurs sporadiques *RET*-mutées (environ 33% de l'ensemble des tumeurs sporadiques) et dans la lignée MZ-CRC1. Dans 95% des cas, il s'agit d'une substitution p.Met918Thr, entraînant l'activation constitutive du récepteur monomérique par autophosphorylation. Plus rarement, des doubles mutations impliquant le codon 804 et d'autres locus intra-cellulaires peuvent être retrouvées, les mutations isolées du codon 804 n'ayant qu'un faible pouvoir oncogène (*Lombardo et al., 2002*) (*Lesueur et al., 2005*) (*Mukherjee and Zakalik, 2011*).

Ces mutations sont associées aux **formes plus agressives** de CMT, souvent métastatiques d'emblée. Elles définissent le groupe de patients **à risque ATA-D**, pour lesquels une thyroïdectomie totale immédiate, un évidement ganglionnaire élargi et un suivi clinique et biologique régulier sont recommandés (*Kloos et al., 2009*).

De façon exceptionnelle, ces variations qualitatives peuvent être associées à des anomalies quantitatives induisant, en sus de l'hyper-activation, une sur-expression de *RET*. Il s'agit notamment de **trisomies du chromosome 10** et d'**amplifications géniques** (*Huang et al., 2000*) (*Koch et al., 2001*) (*Koch et al., 2006*) (*Ciampi et al., 2012*). Citons le cas de la lignée TT, qui présente une mutation ponctuelle hétérozygote p.Cys634Arg ainsi qu'une duplication en tandem du gène, induisant un déséquilibre allélique en faveur du variant oncogénique (*Huang et al., 2003*).

Les mutations activatrices de *RET* semblent assez spécifiques des tumeurs thyroïdiennes. La base de données COSMIC indique qu'environ 30% d'entre elles présentent de tels variants (sur 1991 tumeurs répertoriées, tous types de lésions confondus). Ils sont également observés dans les tumeurs surrénaliennes et divers tumeurs d'origine épithéliale, leur fréquence ne dépassant jamais 10% (Figure 13). Toujours selon COSMIC, des gains ou pertes du locus génique *RET* sont observés dans 10 à 25% des tumeurs ovariennes, endométriales, pulmonaires, mammaires et intestinales ; sans conséquence connue sur le phénotype tumoral.

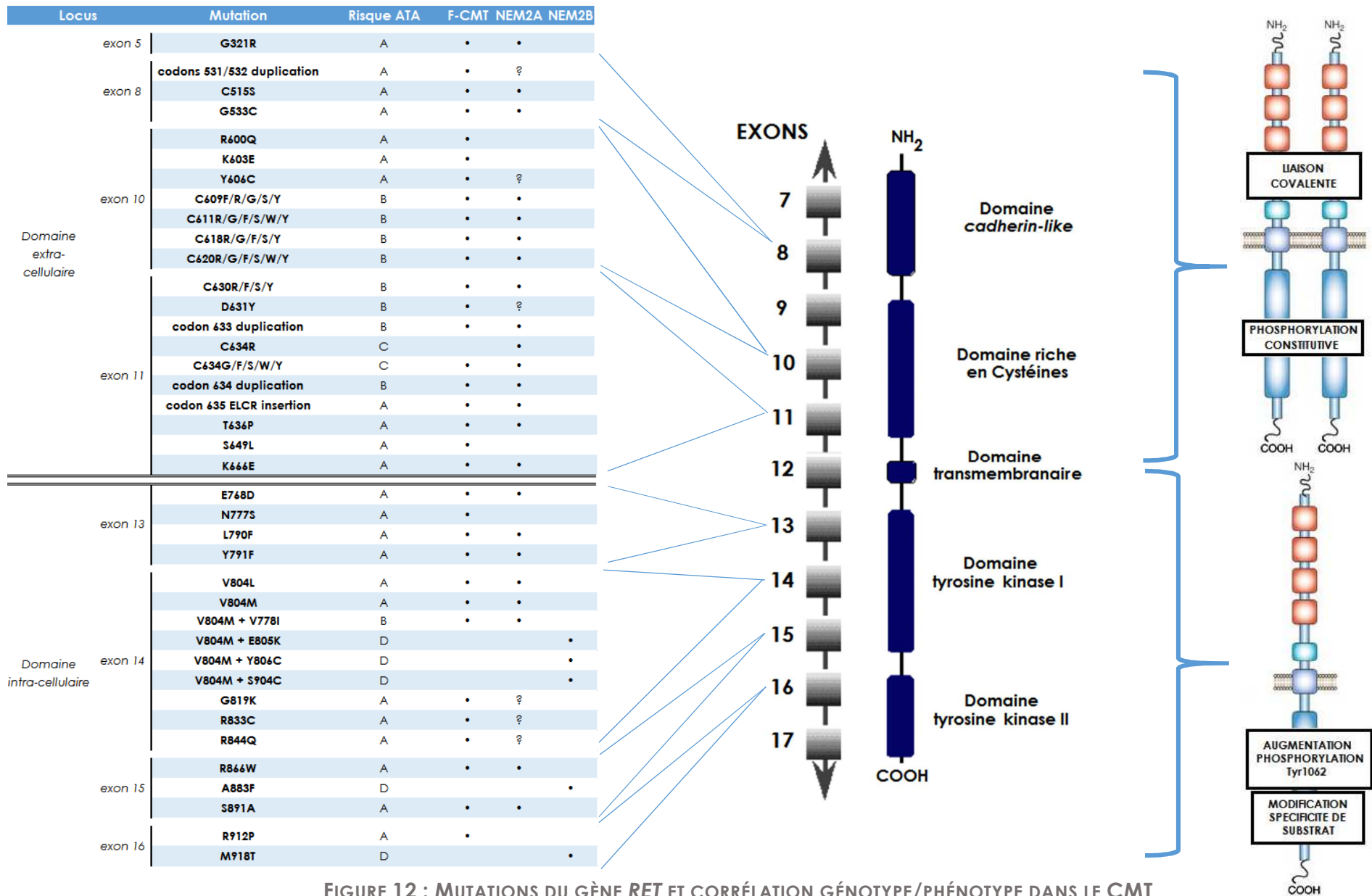


FIGURE 12 : MUTATIONS DU GÈNE *RET* ET CORRÉLATION GÉNOTYPE/PHÉNOTYPE DANS LE CMT

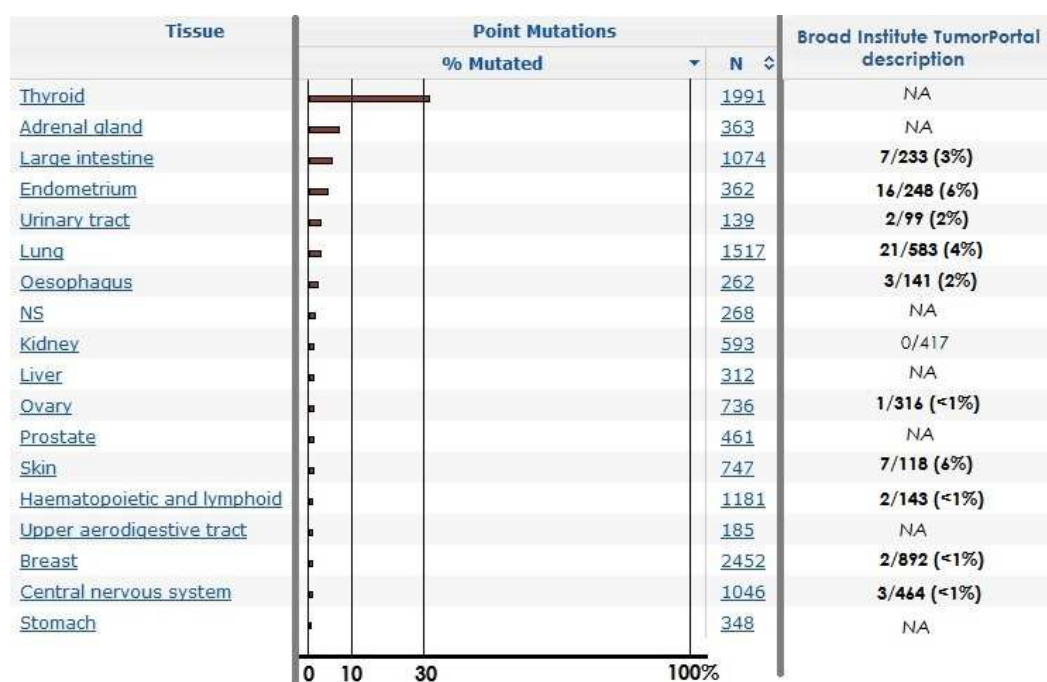


FIGURE 13 : FRÉQUENCE DES MUTATIONS PONCTUELLES DU GÈNE *RET* DANS LES TUMEURS HUMAINES

D'après les bases de données COSMIC et Broad Institute TumorPortal
(<http://cancer.sanger.ac.uk/> et <http://cancergenome.broadinstitute.org/>)

3.2.1.1. Autres anomalies géniques structurales

Si l'implication de l'oncogène *RET* est clairement démontrée dans la tumorigenèse du CMT, celui-ci ne permet pas d'expliquer la totalité des cas rencontrés : en effet, **plus de la moitié des tumeurs sporadiques ne présentent pas de mutations *RET*** (Leboulleux *et al.*, 2004). La recherche d'autres mutations ponctuelles potentiellement conductrices est longtemps restée infructueuse. Le séquençage de locus oncogéniques connus tels que *BRAF* (exon 15, codon 600), *EGFR* (exons 18, 19 et 21), *PIK3CA* (exons 9 et 20) et *JAK2* (exon 12) réalisés précédemment dans notre équipe n'a révélé aucun variant d'intérêt (Ameur *et al.*, 2009a). Les gènes ***TP53* et *RB1* ne présentent pas de mutations ponctuelles** dans ce type tumoral (Herfarth *et al.*, 1997).

❖ Délétions ou amplifications géniques

Si aucune amplification *MYC* ou *MYCN* n'a pu être observée dans les CMT (Yang *et al.*, 1990a), ***NF2*** (22q12.2), ***MYCL1*** (1p34.2), ***TP53*** (17p13.1) et ***VHL*** (3p25.3) semblent quant à eux présenter fréquemment des **pertes alléliques** (Sheikh *et al.*, 2004). Une **amplification de *EGFR*** (7p11.2) est observée dans 15% des cas (Rodríguez-Antona *et al.*, 2010).

Ces anomalies sont possiblement associées à des pertes ou gains de plus grande ampleur abordés au chapitre 3.3.

❖ *Implication de la superfamille RAS*

En 2011, (*Moura et al., 2011*) décrit pour la première fois l'existence de mutations au niveau des oncogènes RAS dans les CMT sporadiques¹. Selon cette étude, plus de 26% des tumeurs sporadiques non mutées RET présenteraient un variant **HRAS** (*Harvey RA^t Sarcoma viral oncogene homolog*) ou **KRAS** (*Kirsten RA^t Sarcoma viral oncogene homolog*). Par la suite, la présence de tels variants a été confirmée par d'autres auteurs, mais ces derniers ont estimé leur fréquence plus faible (*Schulten et al., 2011*) (cf. chapitre 3.2.3 en page 122).

Les oncoprotéines RAS (également nommées p21/^{Ras}) sont des **petites molécules GTPasiques** qui interviennent dans la **transduction du signal intra-cellulaire des récepteurs aux facteurs de croissance**. Elles sont ancrées au niveau de radeaux lipidiques membranaires par leur partie C-terminale hypervariable. Leur domaine catalytique intra-cytoplasmique est globulaire, il présente un domaine de fixation au GTP/GDP appelé *p-loop* et 2 domaines *switch* très flexibles, permettant un changement conformationnel en fonction du substrat (Figure 14).

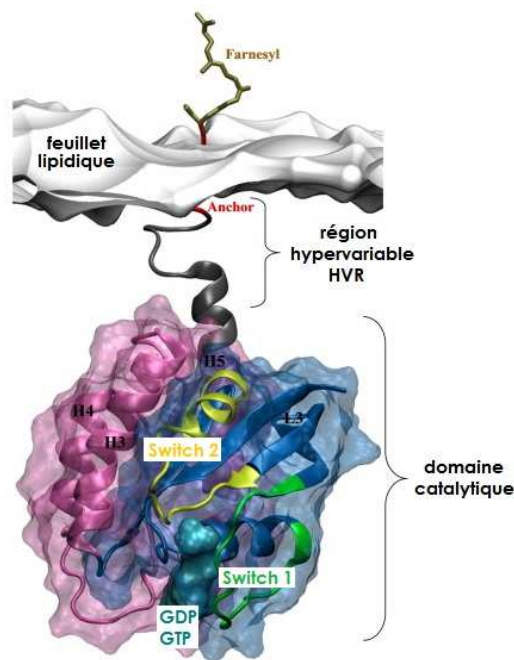


FIGURE 14 : STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DES PROTÉINES RAS

Modifié de (*Prakash and Gorfe, 2013*)

¹ *Nota Bene* : une publication de (*Goutas et al., 2008*) avait précédemment révélé une fréquence élevée de mutations KRAS et BRAF dans une cohorte de CMT d'origine grecque, mais les conditions de PCR-RFLP utilisées laissaient entrevoir un nombre non négligeable de faux positifs.

L'activation des protéines RAS est induite après liaison d'une protéine adaptatrice de type GRB (*Growth factor Receptor-Bound protein*) sur un récepteur membranaire à activité tyrosine kinase activé, via leurs domaines SH2 respectifs (*Src-Homology region 2 domain*). L'adaptateur recrute (via son domaine SH3) le facteur d'échange guanidique SOS (*Son Of Sevenless*), qui se rapproche de la GTPase RAS et lui impose la libération de son résidu guanine (GTP ou GDP). Celle-ci s'empare à nouveau d'un résidu, préférentiellement GTP (forme majoritaire disponible).

La **forme RAS-GTP** « ouverte » est la forme permettant la transduction du signal. Elle active des enzymes à activité kinase telles que **RAF** ou **PI3K** – modulateurs des **voies des MAP kinases** (MEK/ERK) et **mTOR** (PI3K/AKT/mTOR). La forme RAS-GDP « fermée » est elle inactive. Les protéines RAS sont ainsi considérées comme des **commutateurs moléculaires** de cascades de signalisation régulant la prolifération, la survie ou encore le métabolisme cellulaire (*Pylayeva-Gupta et al., 2011*) (Figure 15).

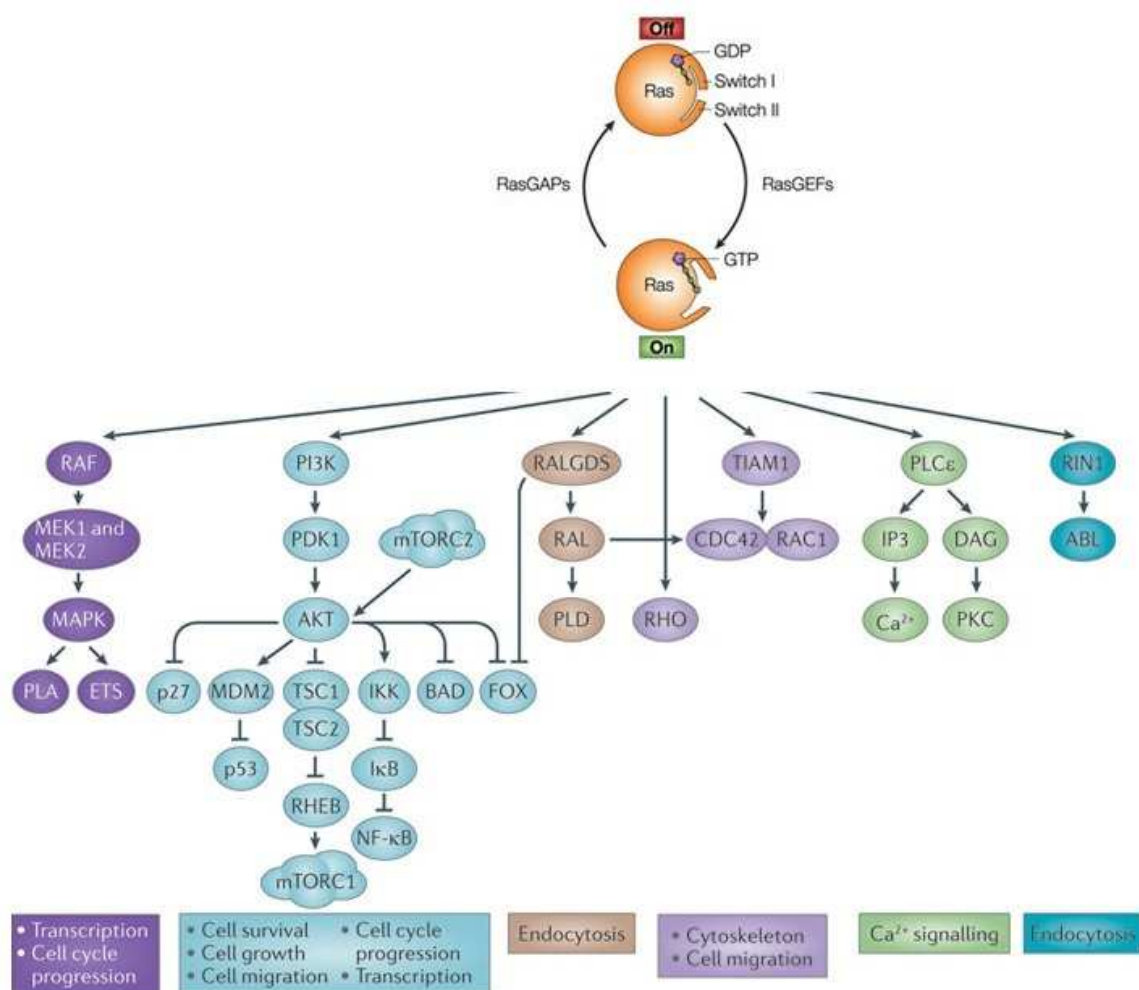


FIGURE 15 : TRANSDUCTION DU SIGNAL MÉDIÉ PAR RAS

Modifié de (*Kinbara et al., 2003*) (*Berndt et al., 2011*)

Les gènes qui codent pour la super-famille des RAS - au nombre de 3 (**HRAS**, **KRAS** et **NRAS**) - ont été clonés dans le génome humain au début des années 80 (*Santos et al., 1982*) (*Parada et al., 1982*) (*Der et al., 1982*) (*Shimizu et al., 1983*) (*Hall et al., 1983*). Il s'agit d'homologues de rétrovirus murins dont le potentiel transformant avait été mis en évidence par Jennifer Harvey dès 1964 (*Harvey, 1964*). La détection de mutations nucléotidiques ponctuelles au sein de ces gènes a constitué, en 1982, la première description d'activation oncogénique par un mécanisme de ce type dans des tumeurs humaines (*Reddy et al., 1982*) (*Tabin et al., 1982*) (*Taparowsky et al., 1982*).

De structures moléculaires proches, ces oncogènes présentent un **panel restreint de mutations** menant toutes à l'**activation constitutive** de la protéine par altération de son activité GTPasique et accumulation de formes RAS-GTP.

On distingue communément (Figure 16):

- Les mutations affectant les codons 12 et 13, situés au niveau de la boucle de liaison au GTP/GDP ;
- Les mutations affectant le domaine switch 2 (au niveau des codons 59 et 61), influençant grandement l'activité hydrolytique sur le GTP.
- Les mutations affectant les codons 117 et 146, de description récente.

Ces 3 types de mutations mènent à un échappement de régulation de la forme RAS-GTP par les RAS-GAP (RAS GTPase Activating Proteins), par abolition des contraintes spatiales nécessaires à leur action (*Scheffzek et al., 1997*).

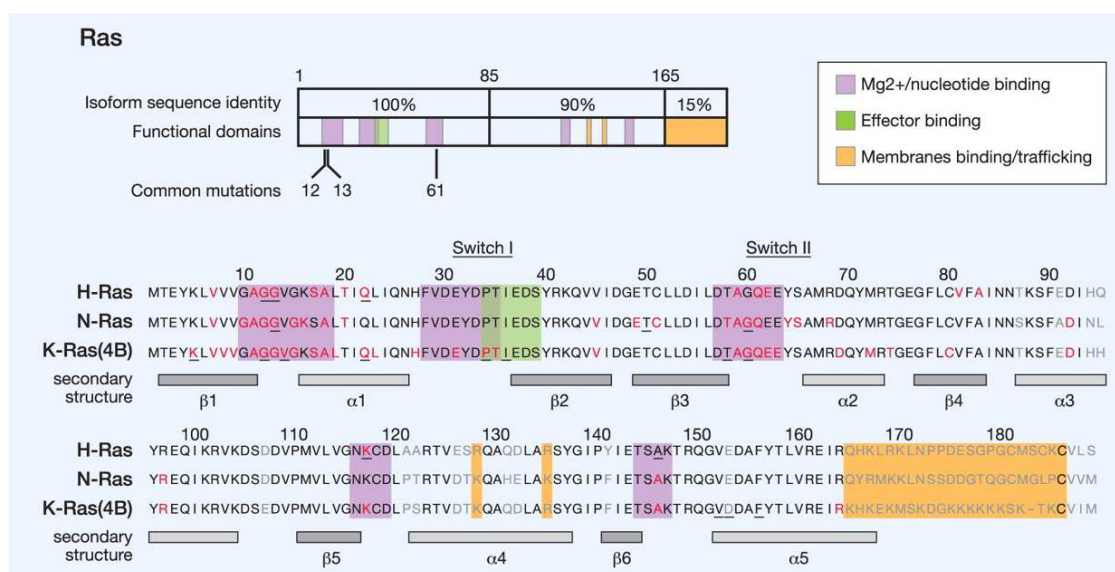


FIGURE 16 : HOMOLOGIES DE SÉQUENCES ET LOCUS MUTATIONNELS DES GÈNES RAS

D'après (*Prior et al., 2012*)

Plus d'un tiers des tumeurs humaines présentent une mutation somatique RAS et il existe une **association préférentielle entre l'oncogène muté et le type de tumeur**, bien que cette liaison ne soit pas complètement bi-univoque (*Lau and Haigis, 2009*) (*Fernandez-Medarde and Santos, 2011*). Les variations de KRAS sont retrouvées dans les adénocarcinomes pancréatiques (58% des tumeurs selon la base de données COSMIC), les tumeurs coliques (35%), les tumeurs de l'endomètre et cervicales (15%), les carcinomes bronchiques (17%). HRAS est plus souvent muté dans les cancers de la vessie (10%) et NRAS est plutôt spécifique des tumeurs hématopoïétiques (10%) et des mélanomes (16%).

Au niveau thyroïdien, des mutations des 3 gènes ont été observées dans les lésions bénignes, les carcinomes anaplasiques (*Suárez et al., 1988*) et les carcinomes différenciés (2 à 6% des tumeurs) (*Suarez et al., 1990*) (*Namba et al., 1990*), sans prédominance de locus ou de type de substitution (*Schlumberger and Pacini, 2012*).

Enfin, les mutations RAS peuvent être observées au niveau germlinal. Elles occasionnent des pathologies congénitales malformatives graves (syndromes de Noonan et de Costello) (*Schubbert et al., 2007*) et confèrent une prédisposition au développement de tumeurs de type leucémie, rhabdomyosarcome et neuroblastome.

3.2.1.2. Impact thérapeutique des mutations RET et RAS dans le CMT

Jusqu'à l'avènement des thérapies moléculaires ciblées, les patients atteints d'un CMT localement avancé ou métastatique étaient considérés en **impasse thérapeutique**.

L'existence de **mutations activatrices RET** impliquées dans la tumorigénèse du CMT a constitué un rationnel fort pour l'usage des **thérapies innovantes** dans cette pathologie, définissant ainsi une cible que certains ITK sont en mesure de bloquer.

Plusieurs de ces drogues sont en cours d'évaluation dans cette pathologie et l'une d'entre elles - le vandétanib - a obtenu une autorisation de mise sur le marché européen pour cet usage. Pourtant, il existe une **grande hétérogénéité de réponse** à ces traitements, y compris chez les patients porteurs d'une mutation du gène RET bien caractérisée. En effet, à l'instar des mutations de type p.Thr790Met du récepteur EGFR conférant une résistance à ses inhibiteurs, il a été montré que certains variants des amino-acides 804 à 806 de RET (résidus 'gardiens' de la poche à ATP) induisent une insensibilité aux ITK (*Carlomagno et al., 2004*) (*Cranston et al., 2006*) (*Mologni et al., 2006*) (*Carlomagno et al., 2009*) (*George Priya Doss et al., 2014*).

La découverte de **mutations activatrices RAS** dans les CMT – second type d'anomalies oncogéniques majeures dans cette pathologie – laisse présager d'éventuelles variations phénotypiques de la pathologie, mais aussi et surtout de grandes disparités de réponse aux

traitements. En effet, les protéines RAS, médiateurs majeurs de la transduction des signaux provenant des récepteurs à activité tyrosine kinase, ont été rendues responsables de phénomènes de **résistance aux inhibiteurs de l'EGFR** utilisés dans d'autres types tumoraux (Jänne et al., 2005) (Massarelli et al., 2007) (Karapetis et al., 2008) (Bardelli and Siena, 2010).

D'intérêt récent, celles-ci ne sont actuellement pas prise en compte pour la mise en place d'un schéma thérapeutique par ITK chez les patients atteints de CMT réfractaire. Il est pourtant aisé d'imaginer que celles-ci puissent également être responsables des phénomènes de résistance primaire aux molécules actuellement à l'essai dans les formes réfractaires de CMT, par un mécanisme similaire d'activation des voies de signalisation en aval du récepteur RET (Figure 17).

Leur considération ultérieure pourrait conduire à une **adaptation de la prise en charge** des patients :

- par l'utilisation de drogues inhibant directement les protéines RAS hyper-activées, comme par exemple les **inhibiteurs de la farnésyltransférase** rendant les protéines RAS inopérables par défaut d'ancrage à la membrane (Mattingly, 2013), ou encore les **inhibiteurs irréversibles des variants oncogéniques** en cours de développement (Ostrem et al., 2013) (Stephen et al., 2014);
- par action sur les voies effectrices de RAS, dont un grand nombre de partenaires peuvent être ciblés par des thérapies déjà validées ou en cours d'essais cliniques (**inhibiteurs de BRAF, bithérapies anti-MEK/anti-mTOR,...**).

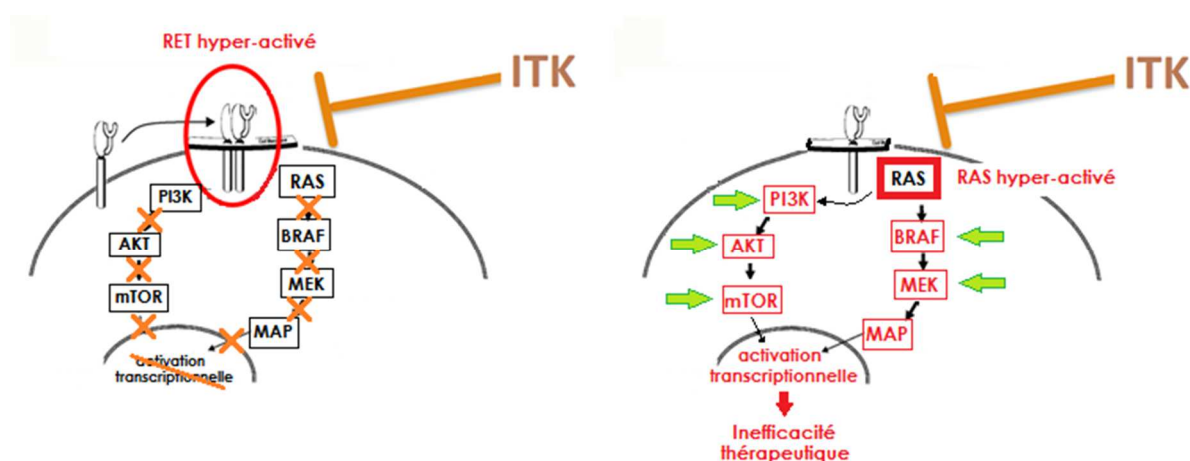


FIGURE 17 : ACTIVATION ONCOGÉNIQUE DU CMT ET SENSIBILITÉ AUX ITK

3.2.2. Travaux personnels

3.2.2.1. Objectifs

L'objectif premier de ce travail était l'**identification des anomalies somatiques ponctuelles à l'origine des formes de CMT sporadiques non mutées au niveau de l'oncogène RET**.

Pour rappel, ces formes représentent plus de 40% de l'ensemble des CMT et étaient, jusqu'à très récemment, non expliquées à un niveau moléculaire.

Nous avons donc débuté par des expérimentations de séquençage de **gènes-candidats**, en complément des analyses réalisées précédemment dans notre laboratoire (*Ameur et al., 2009a*).

Mais en 2011, et alors que ceux-ci avaient été édictés comme non-intervenants dans le développement du CMT, l'**implication des oncogènes RAS** a été démontrée (*Moura et al., 2011*). Le caractère inédit de la description de telles mutations dans ce type de cancers ainsi que l'ambiguïté concernant leur fréquence nous ont conduits à vérifier le statut mutationnel d'une série rétrospective non sélectionnée de tumeurs. Par la suite, nous avons cherché à **évaluer l'impact de ces variants sur la réponse au traitement par ITK**, à l'aide d'une collection de tissus représentant l'ensemble des patients traités de cette manière sur le territoire français.

Cet objectif biologique était doublé d'un objectif analytique : les échantillons à notre disposition étant pour la plupart de type FFPE (tumeur rare, collections d'archive), nous souhaitons **mettre au point une méthode de détection des variants adaptée**, permettant d'obtenir de manière fiable et sensible le statut mutationnel de la totalité des échantillons (la technique de séquençage direct conventionnelle jusqu'alors utilisée montrant près de 50% d'échecs sur ces mêmes échantillons).

Enfin, au vu des performances de séquençage offertes par les nouvelles techniques d'analyse à haut débit sur des échantillons de moindre qualité, nous avons souhaité parfaire la **caractérisation de l'ensemble des mutations conductrices prédominantes** présentées par nos tissus. Nous avons recherché d'éventuelles **co-mutations** oncogéniques dans des tumeurs *RET* ou *RAS* positives, mais également des **mutations non encore connues** dans des tumeurs sporadiques de génotype apparemment sauvage pour ces 2 locus.

3.2.2.2. Matériel et méthodes

❖ APPROCHE PAR SEQUENCAGE DIRECT ET STRATEGIE GENE-CANDIDAT

Nous avons dans un premier temps établi le statut mutationnel de gènes connus comme étant impliqués dans l'oncogenèse d'autres tumeurs d'origine neurale et susceptibles d'induire les mêmes effets dans le CMT. Ces cibles ont été définies après analyse de la littérature : **ALK** (exons 21 à 28 – NM_004304.4), **GNAS** (exons 8 et 9 – NM_00516.4), **GNAQ** (exons 5 et 6 – NM_002072.2), **IDH1** (exon 4 – NM_005896.2) et **IDH2** (exon 4 – NM_002168.2) (Table 4). Ces 5 oncogènes ont été investigués sur une collection de 198 tumeurs neuroendocrines précédemment utilisée par notre équipe (Ameur et al., 2009a) et comprenant, entre autres, 43 CMT.

Gène	Locus	Implication tumorale (par mutation ponctuelle)	Références
ALK	2p23.1	- neuroblastomes (7% des tumeurs)	(Janoueix-Lerosey et al., 2008)
GNAS	20q13.3	- adénomes hypophysaires (28%) - carcinomes pancréatiques endocrines (10%)	(Ruggeri et al., 2008)
GNAQ	9q21.2	- méningiomes mélanocytiques (13%) - mélanomes uvéaux (10%)	(Van Raamsdonk et al., 2009) (Küsters-Vandeveldt et al., 2010)
IDH1	2q33.3	- gliomes (32%) - chondrosarcomes (24%)	(Parsons et al., 2008) (Green and Beer, 2010)
IDH2	15q26.1	- leucémies myéloïdes (6%)	(Amary et al., 2011)

TABLE 4 : GÈNES-CANDIDATS ANALYSÉS

Nous avons ensuite établi une **collection indépendante de tumeurs**, de façon à disposer d'une estimation de la cellularité tumorale des échantillons avant utilisation, et sur laquelle nous avons réalisé le génotypage **RET** (exons 8, 11, 11, 13, 14, 15 et 16 – NM_020975.4), **HRAS** (exons 2, 3 et 4 – NM_005343.2), **KRAS** (exons 2, 3 et 4 – NM_033360.2), **NRAS** (exons 2, 3 et 4 – NM_002524.3) et **BRAF** (exons 11 et 15 – NM_004333.4).

Les échantillons utilisés comprennent des CMT d'origine familiale (n=20) ou sporadique (n=30), dont l'ADN génomique a été extrait à partir de tissu congelé (n=42) ou FFPE (n=8).

Ces analyses successives ont été réalisées par séquençage de produits de PCR selon la **méthode de Sanger** (Sanger et al., 1977) puis migration sur séquenceur multicapillaires ABI 3730 DNA Analyzer® (Applied Biosystems).

❖ APPROCHE PAR SEQUENCAGE HAUT-DEBIT ET STRATEGIE 'SUR-MESURE'

Par la suite et avec l'aide du **réseau national TuThyRef** (réseau 'Tumeurs Rares', créé en 2009 et soutenu par l'INCa afin d'harmoniser la prise en charge des cancers réfractaires de la thyroïde en France - <http://www.tuthyref.com/>), nous avons sélectionné 41 échantillons tumoraux issus de **patients ayant bénéficié d'au moins une ligne de traitement par ITK** sur le territoire français. Les molécules reçues sont le vandétanib, le cabozantinib, le sunitinib, le lenvatinib, le motésanib et le soréfanib (drogues décrites en Table 3, page 53).

Les échantillons, tous **de type FFPE**, correspondent pour 27 d'entre eux à une localisation primaire et pour 14 autres à une localisation métastatique de la tumeur. Nous disposons, pour chacun de ces échantillons, de données cliniques telles que l'âge du patient au diagnostic (pathologie initiale et diagnostic métastatique), le type et le nombre de lignes de traitement reçues, l'estimation de la meilleure réponse radiologique observée (ou nadir, obtenu selon les critères RECIST sur des cibles définies), ainsi que des données de survie globale (date de point au 1^{er} octobre 2013).

La recherche de variants géniques dans cette cohorte a été réalisée par une technique de **séquençage à haut-débit** (NGS – *Next-Generation Sequencing*), sur la **plateforme Ion Torrent PGM™** (*Personal Genome Machine* – Life Technologies) ordinairement utilisée au sein du Laboratoire de Recherche Translationnelle de l'Institut Gustave Roussy et dont l'expérience fait l'objet de l'article suivant (Annexe 2) :

Genomes in the clinic : the Gustave Roussy Cancer Center experience.

Lacroix L, Boichard A, André F, Soria JC.

Current Opinion in Genetics and Development, mars 2014. Sous presse.

Cette méthodologie consiste en une amplification multiplexe en phase huileuse (PCR-émulsion) d'une banque d'ADN génomique, suivie d'une réaction de séquençage sur puce semi-conductrice permettant la détection des ions hydrogène libérés à chaque incorporation de nucléotides naturels (signal permettant la retranscription informatique de la séquence matrice d'origine). La banque d'ADN initialement introduite peut contenir des fragments correspondant à la totalité d'un génome¹ (approche génome entier – *whole genome*), aux exons et parties codantes uniquement (approche exome entier – *whole exome*) ou à des locus d'intérêt plus restreints (approche ciblée).

¹ *Nota Bene* : sur ce type de plateforme, seuls les génomes de petite taille (micro-organismes) peuvent être séquencés avec une couverture optimale.

Pour cette application à des tissus de type CMT, nous avons adopté une stratégie ciblée et avons réalisé un séquençage en utilisant 2 banques d'ADN distinctes :

- Une première banque résultant de l'amplification de 32 locus situés sur 12 oncogènes fréquemment étudiés au laboratoire (**EGFR** , **KRAS** , **NRAS**, **HRAS** , **BRAF** , **HER2**, **PIK3CA** , **RET** , **CTNNB1** , **MAP2K1** , **ALK** , **AKT1** , **ROS1**). Les régions à cibler ont été soumises à un service de conception à-façon (Ion Ampliseq™ Designer - <https://www.ampliseq.com> – Life Technologies). Ces amorces sont reçues sous forme d'un mélange permettant la réalisation d'une amplification multiplexe (Ion Ampliseq™ Custom Panels – Life Technologies). **La longueur moyenne des amplicons est de 120 pb.**
- Une seconde banque, réalisée dans le laboratoire et restreinte aux locus mutationnels connus des gènes **RET**, **HRAS** et **KRAS** (12 amplicons). Les amorces utilisées dans ce cas ont été objectivement choisies au regard de la qualité moyenne des ADN obtenus à partir de tissus FFPE (ADN hyper-fragmenté et présentant de nombreux adduits (*Dietrich et al., 2013*)). Elles ciblent **des fragments d'ADN génomique n'excédant pas 70 pb** et présentent, à leur extrémité 5', une séquence supplémentaire permettant la liaison ultérieure d'adaptateurs nécessaires au séquençage. Le principe et les amorces permettant l'amplification de cette librairie sont présentés en Annexe 3.

Après analyse bio-informatique des résultats obtenus, nous avons choisi de ne conserver que les variants présentant les critères qualitatifs suivants (spécifiques aux techniques NGS):

- Substitution non-sens ou faux sens, variant situé au niveau d'un site d'épissage ou mutation décalante (délétion, insertion) ;
- Fréquence du variant dans l'échantillon étudié d'au moins 10% en cas de variant inconnu et de minimum 5% lorsqu'il s'agit d'un locus mutationnel oncogénique connu dans la base de données COSMIC (recommandations dconstructeur) ;
- Fréquence du variant dans la population caucasienne de moins de 1% à l'état hétérozygote (d'après les données HapMap <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/> et NHLBI Exome Sequencing Project <https://esp.gs.washington.edu/>) ;
- Locus d'intérêt présentant une profondeur de lecture minimale de 30X ;
- Allèle variant observé sur 15 lectures minimum (15X).

❖ APPROCHE PAR SEQUENCAGE HAUT-DEBIT ET STRATEGIE GLOBALE

Quatre tumeurs apparemment non mutées RET ou RAS et pour lesquelles nous disposions d'un ADN de bonne qualité (extrait de tissu congelé, non dégradé et en quantité adéquate) ont été analysées en séquençage NGS ciblant les exons de plus de **400 oncogènes** (Ion Ampliseq™ Comprehensive Cancer Panel - 16000 amplicons – Life Technologies).

Enfin, une large cohorte de tissus tumoraux collectés à l'Institut Gustave Roussy (n=35) a été transmise à une équipe collaboratrice (National Cancer Institute Bethesda / Université de Turin) pour séquençage de type exome-entier.

Les conclusions de cette expérimentation n'étant pas disponibles au moment de la rédaction de ce mémoire, nous n'en présenterons pas les résultats.

3.2.2.3. Résultats

❖ ONCOGENES ALK, GNAS, GNAQ, IDH1 ET IDH2

Aucune mutation oncogénique ponctuelle des gènes *ALK*, *GNAS*, *GNAQ*, *IDH1* et *IDH2* n'a été retrouvée dans les 43 CMT de la première cohorte.

Parmi les autres tumeurs neuroendocrines étudiées, seules 2 tumeurs hypophysaires ont présenté une mutation *GNAS* p.Arg201Cys (mutation connue dans cette pathologie) et un phéochromocytome s'est avéré positif pour une mutation *IDH1* p.Gln138Lys (variant retrouvé dans un cas de mélanome selon la base COSMIC).

❖ EVALUATION DE LA PREVALENCE DES MUTATIONS RET ET RAS DANS LE CMT

Nous avons observé une mutation activatrice de l'oncogène *RET* dans tous les cas familiaux (n=20) et dans 47% des cas sporadiques (n=14/30) de notre cohorte prospective non sélectionnée de CMT. Ces mutations sont localisées au niveau de locus connus de *RET* ; 14 tumeurs sont mutées au niveau du codon 634 (exon 11 – groupe de risque ATA-A), 12 au niveau du codon 918 (exon 16 - groupe ATA-D) et 8 au niveau d'autres codons (risque ATA intermédiaire).

Parmi les tumeurs non mutées pour *RET*, nous avons retrouvé une **forte prévalence de mutations activatrices des gènes HRAS et KRAS** (n=13/16 – soit 81% des tumeurs non *RET* mutées et 43% de l'ensemble des tumeurs sporadiques). Trois de ces variants sont situés au niveau de **locus mutationnels peu décrits** jusqu'alors, codant pour les résidus lysine 117 et alanine 146 (situés dans l'exon 4).

Aucune de ces tumeurs ne présente de co-mutation RET et RAS et seules 3 tumeurs se sont révélées sauvages pour tous les locus étudiés. Enfin, aucune mutation au niveau des gènes NRAS et BRAF n'a été retrouvée.

Ce travail a fait l'objet de l'article suivant et sera discuté au chapitre 3.2.3, en page 122 :

Somatic RAS mutations occur in a large proportion of sporadic RET-negative medullary thyroid carcinomas and extend to a previously unidentified exon.

Boichard A, Croux L, Al Ghuzlan A, Broutin S, Dupuy C, Leboulleux S, Schlumberger M, Bidart JM, Lacroix L.

J Clin Endocrinol Metab. 2012 Oct;97(10):E2031-5.

❖ IMPACT DES MUTATIONS RET ET RAS SUR LA REPONSE AU TRAITEMENT

Confirmant la très forte proportion de mutations activatrices des gènes RET et RAS dans les tumeurs de type CMT, nous avons par la suite souhaité mettre au point une technique fiable et sensible permettant leur détection à partir d'échantillons d'archives FFPE, puis évaluer leur impact sur la réponse aux traitements par ITK.

Les résultats obtenus à partir des 2 types de bibliothèques de séquençage NGS décrites plus haut sont concordants pour la majorité des échantillons, mais la méthode utilisant la banque de petits amplicons limités aux locus d'intérêt RET et RAS présente un **taux de réussite supérieur** (moins d'échecs d'amplification et plus grande homogénéité de couverture inter-amplicons). Le statut mutationnel de 39/41 tissus a pu être correctement établi (1 échantillon n'a pu être amplifié et 1 échantillon a présenté une ambiguïté de résultats). **La quasi-totalité des tumeurs analysables (38/39) portent une mutation dominante - en terme de pourcentage de variant - au niveau des oncogènes RET, HRAS ou KRAS.** Aucune mutation additionnelle n'a été trouvée dans les 9 autres oncogènes étudiés à l'aide de la première banque génomique (BRAF, PI3KCA, EGFR, HER2, CTNNB1, MAP2K1, ALK, AKT1, ROS1). Un échantillon unique ne présente aucun variant oncogénique connu, selon les critères de sélection définis au chapitre 3.2.2.2.

Parmi les tumeurs mutées, 54% (21/39) entrent dans le groupe à risque RET ATA-D, 28% (11/39) dans le groupe RET ATA A et 15% (6/39) présentent une mutation de HRAS ou KRAS. Très peu d'autres mutations ont été décrites en sus de ces mutations dominantes, à l'exception d'une mutation codante du gène EGFR (p.Pro848Leu – variant affectant le domaine catalytique du récepteur, classé délétère par les logiciels de prédiction SIFT et PolyPhen-2 et retrouvé à l'état hétérozygote dans 0,1% de la population européenne selon les statistiques ESP).

L'analyse de la relation génotype-phénotype dans cette cohorte ne montre **pas de lien significatif entre la nature de la mutation dominante observée et les critères cliniques d'agressivité du CMT** (âge du patient au diagnostic, délai d'apparition des métastases et survie globale depuis la date du diagnostic). En revanche, dans cette collection sélectionnée de tumeurs réfractaires, la **mutation RET p.Met918Thr semble prépondérante**. Les patients de sexe masculin, dont le délai d'apparition de localisations métastatiques est le plus court, portent également préférentiellement ce variant.

Enfin, cette mutation – qu'elle soit d'origine germinale ou somatique – confère une **meilleure réponse à différents inhibiteurs de tyrosine kinase** tels que le vandétanib ou le cabozantinib (observation réalisée sur 33 cas les mieux documentés). Les patients portant une tumeur RAS-positive, quant à eux, sont peu répondeurs à ces traitements.

Ce travail a fait l'objet de l'article suivant et sera discuté au chapitre 3.2.3, en page 122 :

Mutational screening of refractory medullary thyroid carcinomas by targeted next-generation sequencing methods.

Boichard A and Chougnat C.N., Marty V, Saulnier P, Al Ghuzlan A, Borget I, Schlumberger M, Bidart JM, Lacroix L.

En cours de soumission.

❖ RECHERCHE DE MUTATIONS ONCOGENIQUES DANS LES TUMEURS NON MUTEES POUR RET ET RAS

Enfin, parmi les 4 tumeurs analysées à l'aide du panel Ion Ampliseq™ Comprehensive Cancer Panel (400 oncogènes), 3 se sont avérées être mutées pour *RET*, avec des fréquences de variants comprises entre 11 et 27%.

Le dernier tissu, non muté *RET* ni *RAS* a présenté plusieurs variants d'intérêt de signification inconnue, localisés – entre autres – au niveau des gènes ***PDGFRA***, ***ERBB3*** et ***AKT2*** (Table 5).

Chromosome	Position	Gène	Changement ADNc	Changement protéique	RefSeq	Fréquence (%)	Class. Polyphen
chr1	27099009	ARID1A	c.3425_3430AGGGGC>AGGG	p.Q1142fs	NM_006015	100	
chr4	1808286	FGFR3	c.2044G>A	p.V682I	NM_000142	57	neutre
chr4	55129902	PDGFRA	c.436_437GC>G	p.A146fs	NM_006206	100	
chr8	48841708	PRKDC	c.2083C>T	p.P695S	NM_006904	60	neutre
chr9	32632574	TAF1L	c.3004G>C	p.A1002P	NM_153809	60	neutre
chr11	3723807	NUP98	c.3392_3398GCCCCAA>GCA	p.G1131fs	NM_016320	100	
chr12	56493764	ERBB3	c.3080_3081TG>T	p.L1027fs	NM_001982	100	
chr15	39884882	THBS1	c.2646G>T	p.Q882H	NM_003246	52	délétère
chr16	15826491	MYH11	c.3581T>G	p.V1194G	NM_002474	8	délétère
chr18	50936977	DCC	c.3091G>A	p.G1031R	NM_005215	11	délétère
chr19	40742255	AKT2	c.869A>G	p.K290R	NM_001626	44	délétère
chr21	46314907	ITGB2	c.1062A>T	p.Q354H	NM_001127491	100	délétère
chr22	42523858	CYP2D6	c.971A>C	p.H324P	NM_000106	46	
chrX	48547112	WAS	c.995T>C	p.V332A	NM_000377	58	neutre

TABLE 5 : VARIANTS RETROUVÉS DANS UNE TUMEUR NON MUTÉE *RET* NI *RAS*

Somatic *RAS* Mutations Occur in a Large Proportion of Sporadic *RET*-Negative Medullary Thyroid Carcinomas and Extend to a Previously Unidentified Exon

A. Boichard, L. Croux, A. Al Ghuzlan, S. Broutin, C. Dupuy, S. Leboulleux, M. Schlumberger, JM. Bidart, and L. Lacroix

Translational Research Laboratory (A.B., L.C., L.L.), Institut Gustave Roussy, 94805 Villejuif, France; Unité Mixte Recherche 8200 (A.B., L.C., C.D.), Centre National de Recherche Scientifique, Institut Gustave Roussy, 94805 Villejuif, France; Department of Medical Biology and Pathology (A.A.G., S.B., JM.B.), Institut Gustave Roussy, 94805 Villejuif, France; Department of Nuclear Medicine and Endocrine Oncology (S.L., M.S.), Institut Gustave Roussy, 94805 Villejuif, France

Context: Medullary thyroid carcinoma (MTC) is characterized by proto-oncogene *RET* mutations in almost all hereditary cases as well as in more than 40% of sporadic cases. Recently, a high prevalence of *RAS* mutations was reported in sporadic MTC, suggesting an alternative genetic event in sporadic MTC tumorigenesis.

Objective: This study aimed to extend this observation by screening somatic mutational status of *RET*, *BRAF*, and the three *RAS* proto-oncogenes in a large series of patients with MTC.

Materials and Methods: Direct sequencing of *RET* (exons 8, 10, 11, 13, 14, 15, 16), *BRAF* (exons 11 and 15), and *KRAS*, *HRAS*, and *NRAS* genes (exons 2, 3, and 4) was performed on DNA prepared from 50 MTC samples, including 30 sporadic cases.

Results: Activating *RET* mutations were detected in the 20 hereditary cases (germline mutations) and in 14 sporadic cases (somatic mutations). Among the 16 sporadic MTC without any *RET* mutation, eight *H-RAS* mutations and five *K-RAS* mutations were found. Interestingly, nine *RAS* mutations correspond to mutation hot spots in exons 2 and 3, but the other four mutations were detected in exon 4. The *RET* and *RAS* mutations were mutually exclusive. No *RAS* gene mutation was found in hereditary MTC, and no *BRAF* or *NRAS* mutation was observed in any of the 50 samples.

Conclusions: Our study confirms that *RAS* mutations are frequent events in sporadic MTC. Moreover, we showed that *RAS* mutation analysis should not be limited to the classical mutational hot spots of *RAS* genes and should include analysis of exon 4. (*J Clin Endocrinol Metab* 97: E2031–E2035, 2012)

Medullary thyroid carcinoma (MTC) is a rare tumor, accounting for less than 5% of all thyroid cancers, that arises from neuroendocrine cells secreting calcitonin called “C cells” or parafollicular cells. MTC appears in a sporadic context in 70% of cases or in an inherited context in the other 30% of cases. Activating mutations of the *RET* (REarranged during Transfection) (1) proto-oncogene are identified in almost all familial cases and in about 40% of sporadic forms. Therefore, nearly 45% of cases

are not associated with an oncogenic *RET* mutation (2). *RET* tyrosine kinase receptor is involved in the regulation of differentiation, proliferation, survival, and cell motility processes through several intracellular signaling pathways, including MAPK and PI3K/AKT/mTOR pathways.

Oncogenic mutations in the *RAS* proto-oncogenes are frequently detected in follicular thyroid tumors (3, 4). For years, mutations in *RAS* or *BRAF* genes were considered absent in MTC (5–8). However, mutations in *HRAS* and

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197

Printed in U.S.A.

Copyright © 2012 by The Endocrine Society

doi: 10.1210/je.2012-2092 Received April 30, 2012. Accepted July 16, 2012.

First Published Online August 3, 2012

Abbreviations: MTC, Medullary thyroid carcinoma; TKI, tyrosine kinase inhibitor.

KRAS genes were recently found in a significant proportion of non-*RET*-mutated MTC (9, 10), suggesting that *RAS* mutations could represent alternative genetic events in sporadic MTC tumorigenesis. This observation could be of value for defining therapeutic strategies in non-*RET*-

mutated tumors. Indeed, a lack of response to tyrosine kinase inhibitors (TKI) of the epidermal growth factor receptor has been reported in colorectal or lung tumors presenting a *RAS* mutation (11).

Thus, the aim of this study was to analyze the frequency

TABLE 1. Mutational status of 50 MTC samples analyzed in this study

No.	MTC tissue type	Transmission	Sex	Age at diagnosis (yr)	RET		KRAS, HRAS, NRAS, and BRAF mutational status		
					mutational	status			
1	Lymph node	Frozen	Familial	F	38	p.Cys634Arg	Germline	WT	
2	Lymph node	Frozen	Familial	M	48	p.Cys634Tyr	Germline	WT	
3	Primary tumor	Frozen	Familial	F	4	p.Cys634Ser	Germline	WT	
4	Primary tumor	Frozen	Familial	F	49	p.Lys666Asn	Germline	WT	
5	Primary tumor	Frozen	Familial	F	53	p.Cys531Arg	Germline	WT	
6	Primary tumor	Frozen	Familial	F	73	p.Leu790Phe	Germline	WT	
7	Primary tumor	Frozen	Familial	M	8	p.Cys634Ser	Germline	WT	
8	Primary tumor	Frozen	Familial	M	10	p.Cys634Arg	Germline	WT	
9	Primary tumor	Frozen	Familial	M	39	p.Cys620Tyr	Germline	WT	
10	Primary tumor	Frozen	Familial	M		p.Ser891Ala	Germline	WT	
11	Primary tumor	Frozen	Familial	F	18	p.Cys634Ser	Germline	WT	
12	Primary tumor	Frozen	Familial	F	24	p.Cys634Tyr	Germline	WT	
13	Primary tumor	Frozen	Familial	F	32	p.Cys634Arg	Germline	WT	
14	Primary tumor	Frozen	Familial	F	59	p.Cys618Ser	Germline	WT	
15	Primary tumor	Frozen	Familial	F	11	p.Met918Thr	Germline	WT	
16	Primary tumor	Frozen	Familial	F	25	p.Met918Thr	Germline	WT	
17	Primary tumor	Frozen	Familial	M	8	p.Met918Thr	Germline	WT	
18	Lymph node	FFPE	Familial	F	35	p.Cys634Arg	Germline	WT	
19	Lymph node	FFPE	Familial	F	66	p.Gln780Arg	Germline	WT	
20	Lymph node	FFPE	Familial	M	29	p.Cys634Arg	Germline	WT	
21	Lymph node	Frozen	Sporadic	F	30	WT		HRAS c.182A>G	p.Gln61Arg
22	Lymph node	Frozen	Sporadic	F	45	WT		HRAS c.182A>G	p.Gln61Arg
23	Lymph node	Frozen	Sporadic	M	46	p.Met918Thr	Somatic	WT	
24	Lymph node	Frozen	Sporadic	M	61	WT		KRAS c.35G>T	p.Gly12Val
25	Primary tumor	Frozen	Sporadic	F	37	WT		HRAS c.181C>M	p.Gln61Lys
26	Primary tumor	Frozen	Sporadic	F	47	WT		HRAS c.37G>C	p.Gly13Arg
27	Primary tumor	Frozen	Sporadic	F	49	p.Cys634Tyr	Somatic	WT	
28	Primary tumor	Frozen	Sporadic	F	49	p.Met918Thr	Somatic	WT	
29	Primary tumor	Frozen	Sporadic	F	51	WT		HRAS c.181C>M	p.Gln61Lys
30	Primary tumor	Frozen	Sporadic	F	55	WT		KRAS c.437C>T	p.Ala146Val
31	Primary tumor	Frozen	Sporadic	F	56	WT		KRAS c.437C>T	p.Ala146Val
32	Primary tumor	Frozen	Sporadic	F	63	WT		HRAS c.182A>G	p.Gln61Arg
33	Primary tumor	Frozen	Sporadic	F	73	WT		WT	
34	Primary tumor	Frozen	Sporadic	M	21	p.Met918Thr	Somatic	WT	
35	Primary tumor	Frozen	Sporadic	M	27	p.Met918Thr	Somatic	WT	
36	Primary tumor	Frozen	Sporadic	M	34	WT		KRAS c.34G>C	p.Gly12Arg
37	Primary tumor	Frozen	Sporadic	M	45	p.Met918Thr	Somatic	WT	
38	Primary tumor	Frozen	Sporadic	M	48	p.Cys634del ^a	Somatic	WT	
39	Primary tumor	Frozen	Sporadic	M	48	p.Met918Thr	Somatic	WT	
40	Primary tumor	Frozen	Sporadic	M	50	p.Met918Thr	Somatic	WT	
41	Primary tumor	Frozen	Sporadic	M	53	WT		WT	
42	Primary tumor	Frozen	Sporadic	M	53	p.Met918Thr	Somatic	WT	
43	Primary tumor	Frozen	Sporadic	M	54	p.cys634ins ^b	Somatic	WT	
44	Primary tumor	Frozen	Sporadic	M	69	WT		KRAS c.187G>A	p.Glu63Lys
45	Primary tumor	Frozen	Sporadic	M	74	p.Ala883Phe	Somatic	WT	
46	Lymph node	FFPE	Sporadic	F	42	WT		HRAS c.351G>T	p.Lys117Asn
47	Lymph node	FFPE	Sporadic	M	34	p.Met918Thr	Somatic	WT	
48	Lymph node	FFPE	Sporadic	M	46	WT		WT	
49	Lymph node	FFPE	Sporadic	M	51	p.Cys634del ^a	Somatic	WT	
50	Primary tumor	FFPE	Sporadic	F	47	WT		HRAS c.182A>G	p.Gln61Arg

Bold, Samples wild-type for all tested genes. WT, Wild-type; FFPE, formalin-fixed, paraffin-embedded; F, female; M, male.

^a p.Glu632_Ile638del.

^b p.Cys634_Arg635insProLys.

of *RET*, *RAS*, and *BRAF* mutations in a large series of familial and sporadic MTC tumors. Mutational status of *HRAS*, *KRAS*, and *NRAS* genes was examined not only on classical hot spot codons 12, 13, and 61 (located in exons 2 and 3), but also on codons 117, 146, and 147 in exon 4 of the three *RAS* genes. Interestingly, we found that mutations are also present in this particular region that has never been investigated.

Patients and Methods

Patients

A total of 50 tumoral tissues were collected at the Institut Gustave Roussy (Villejuif, France) and stored in the tumor biobank according to local ethics recommendations (Table 1). These tissues correspond to 42 frozen samples and eight formalin-fixed, paraffin-embedded samples, including 37 primary tumors and 13 metastasis. There were 26 females and 24 males, with a mean age at diagnosis of 43 ± 5 yr; 20 were inherited MTC (seven MEN2A, three MEN2B, and 10 FMTC), and 30 were sporadic cases without any familial history and without any detected germline *RET* mutation. A germline *RET* mutation was found for all MTC cases occurring in a family context. Among the other cases, 26 showed no germline *RET* mutation in the usually tested loci (exons 8, 10, 11, 13, 14, 15, and 16). Only four individuals (patients 22, 23, 35, and 37) were not screened for all exons due to a lack of blood sample, but these cases revealed no clinical clues in favor of a familial origin of the tumor. Before extraction, all samples were hematoxylin-eosin stained, and immunochemistry was performed using anti-calcitonin antibodies. Histological control was achieved by a pathologist, and all selected samples contained more than 50% of tumor cells.

DNA isolation

DNA was extracted from 20- μ m-section tumoral specimens after an overnight digestion by proteinase K, using the DNeasy Tissue Kit and the QIAcube automated extractor (QIAGEN, Hilden, Germany), according to the manufacturer's protocol. Yield and quality of DNA were assessed by Qubit fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Mutational analysis

Exons 8, 10, 11, 13, 14, 15, and 16 of *RET*; exons 11 and 15 of *BRAF*; and exons 2, 3, and 4 of *KRAS*, *HRAS*, and *NRAS* genes were analyzed by direct Sanger's sequencing after a specific amplification by PCR as previously described (12). Briefly, PCR were carried out on 20 ng of DNA in 10 μ l final volume and 1 U of Hot Start Taq polymerase (QIAGEN). PCR primer sequences are available on demand. The amplified products were analyzed by direct sequencing after clean-up exonuclease ExoSAP-IT (Affymetrix, Santa Clara, CA) using the Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit and capillary electrophoresis on the automated sequencer ABI3730 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). Sense and antisense sequences were screened for exonic alterations using SeqScape v2.5 software (Applied Biosystems) and compared with the NCBI reference sequences: *RET* (NM_020975.4), *KRAS* (NM_033360.2), *HRAS* (NM_005343.2), *NRAS* (NM_002524.3), and *BRAF* (NM_004333.4). All mutations identified were further confirmed by independent PCR amplification.

Results

Mutational screening of exons 2, 3, and 4 of *RAS* genes and exons 11 and 15 of *BRAF* was performed on the 50 MTC samples. All familial cases ($n = 20$) showed an activating germline mutation of *RET*: 10 in exon 11 (MEN2A), three in exon 16 (MEN2B), and seven in other exons (FMTC). Among the sporadic cases ($n = 30$), 14 carried a somatic *RET* mutation—four at codon 634, one at codon 883, and nine at codon 918. No tumor presenting a *RET* mutation was found with any *RAS* or *BRAF* mutation. Details of all detected mutations are reported in Table 1.

A *RAS* mutation was found in 13 of 16 *RET*-negative MTC samples (81%) and in 13 of 50 tumors, considering the entire collection (26%). Only three tumors appear to be *wild-type* for *RET*, *RAS*, and *BRAF* genes (6% of the collection). *KRAS* mutations were identified in five *RET*-negative sporadic tumors (10% of the samples and 31% of *RET* *wild-type* tumors) and were located at codon 12 ($n = 2$, exon 2), at codon 63 ($n = 1$, exon 3), and at codon 146 ($n = 2$, exon 4). Mutations in the coding sequence of *HRAS* were found in eight tumors (16% of the samples and 50% of *RET* *wild-type* tumors): one at codon 13 (exon 2), six at codon 61 (exon 3), and one at codon 117 (exon 4). No mutation was found in *NRAS* and in *BRAF* genes in any tumor sample.

Discussion

Somatic mutations in genes involved in the Ras/Raf kinase pathway are common in several types of tumors, including differentiated thyroid cancers. Hitherto, with the exception of two controversial studies (5–13), it was admitted that *RAS* and *RAF* mutations were not involved in MTC oncogenesis. However, recent studies reported *HRAS* and *KRAS* mutations in two independent MTC series (9, 10) (Table 2), and among 47 MTC, an *HRAS* mutation was found in two and a *KRAS* mutation in one other patient (14).

In the present study, analysis of *HRAS*, *KRAS*, *NRAS*, and *BRAF* coding sequences was performed in a series of 50 tumors, including familial and sporadic forms. In our collection, mutations in *RET* and *RAS* genes seem to be mutually exclusive. In fact, these redundant genetic events (Ras protein signal occurs downstream of the *RET* receptor) do not appear to confer additional oncogenic benefit to parafollicular cells, in contrast to what has been de-

TABLE 2. Previous studies of *RAS* and *BRAF* genes in various collections of MTC

First author, year (Ref.)	Gene(s)	Locus studied	Method	n	Mutated samples
Okazaki, 1989 (5)	<i>HRAS</i>	Codon 61	NA	18	1/18
Yang, 1990 (20)	<i>NRAS</i>	NA	Southern blot	7	0/7
Horie, 1995 (3)	<i>HRAS, KRAS, NRAS</i>	Exon 2	Direct sequencing	9	0/9, 0/9, 0/9
Fenton, 1999 (21)	<i>HRAS, KRAS, NRAS</i>	Codons 12, 13, 61	Specific hybridization	2	0/2, 0/2, 0/2
Bockhorn, 2000 (6)	<i>HRAS, KRAS</i>	Codons 12, 13, 61	Direct sequencing	15	0/15, 0/15
Nikiforova, 2003 (7)	<i>BRAF</i>	Exon 15	Direct sequencing	13	0/13
Xing, 2004 (4)	<i>BRAF</i>	Exon 15	Direct sequencing	14	0/14
Perren, 2004 (8)	<i>BRAF</i>	Exons 11, 15	Direct sequencing	25	0/25
Goutas, 2008 (13)	<i>KRAS</i>	Codon 12	PCR-RFLP	44	18/44
Goutas, 2008 (13)	<i>BRAF</i>	Codon 600	PCR-RFLP	44	30/44
Ameur, 2009 (12)	<i>BRAF</i>	Exon 15	Direct sequencing	25	0/25
Schulten, 2001 (10)	<i>HRAS, KRAS</i>	Exons 2, 3	Direct sequencing	13	1/13, 0/13
Schulten, 2001 (10)	<i>NRAS, BRAF</i>	Exon 15	Direct sequencing	13	0/13, 0/13
Moura, 2011 (9)	<i>HRAS, KRAS</i>	Exons 2, 3	Direct sequencing	65	5/65, 3/65
Moura, 2011 (9)	<i>NRAS, BRAF</i>	Exon 11, 15	Direct sequencing	65	0/65, 0/65
Current study	<i>HRAS, KRAS</i>	Exons 2, 3, 4	Direct sequencing	50	8/50, 5/50
Current study	<i>NRAS, BRAF</i>	Exons 11, 15	Direct sequencing	50	0/50, 0/50

scribed in other cancers such as colorectal cancer. Among the 16 *RET*-negative tumors, we observed 13 *RAS* mutations. Nine mutations correspond to mutation hot spots known in other types of tumors described in the COSMIC database (15), namely at exon 2 (codons 12 and 13) and exon 3 (codon 61) of *HRAS* and *KRAS* genes. However, four *RAS* mutations were rare but known mutations, including mutations at exon 3 of *KRAS* ($n = 1$, codon 63) and at exon 4 of *HRAS* ($n = 1$, codon 117) and *KRAS* ($n = 2$, codon 146). The detection of these mutations in exon 4 could be related to the slightly higher proportion of *RAS* positive-*RET* negative sporadic MTC identified in our study (81%) compared with the Moura *et al.* (9) study (78%). These mutations have been previously described only in digestive cancers and leukemias, and the authors suggest that *RAS* mutational status should be assessed beyond the most frequently mutated codons (16–18). To our knowledge, these exon 4 mutations have not yet been reported in thyroid cancers. This finding highlights the importance of sequencing MTC not only for the classical hot spots but also for these additional exons. This high frequency of *RAS* mutations is in total agreement with the previous reports (9, 10), and the paradigm in which the *RAS* mutations were present in thyroid cancers of follicular origin but absent from medullary carcinomas (6–8) cannot be retained any more. In accordance with previous studies, point mutations in *NRAS* and *BRAF* genes do not appear to be involved in MTC oncogenesis.

To date, no Ras-targeted therapies have been successful. However, the presence of such mutations may be an interesting marker for drug management, including TKI. Indeed, they are associated with a lack of efficacy of epidermal growth factor receptor inhibitors in patients with a colorectal or lung cancer (11). Con-

versely, in a phase III trial using vandetanib (ZD6474) in metastatic MTC, efficacy was observed in patients carrying a *RET* p.Met918Thr mutation, but also in patients in whom the search for *RET* mutation was negative or incomplete. However, no *RAS* analysis was performed, and no conclusion can be made regarding the impact of *RAS* mutation in non-*RET*-mutated sporadic tumors (19). Thus, the screening for *RAS* mutations in tumors should be performed for the assessment of the effectiveness of *RET*-specific TKI for the treatment of MTC.

In conclusion, we confirm that an activating mutation of known oncogenes is present in 94% of our series (47 of 50 tumors). In sporadic MTC, almost half of the detected mutations are located in *HRAS* or *KRAS* genes. Moreover, we showed that *RAS* mutations are not limited to classical mutational hot spots of *RAS* genes and suggest that analysis should include exon 4 sequencing. To date, there are no data establishing a link between the presence of these abnormalities and efficacy of TKI drugs in MTC, but this point should be considered for future drug development.

Acknowledgments

The authors dedicate the manuscript in memory of their colleague, Dr. Bernard Caillou.

Address all correspondence and requests for reprints to: Dr. Ludovic Lacroix, PharmD, Ph.D., Institut Gustave Roussy, Translational Research Laboratory, Medical Biology and Pathology Department, 114 Rue Édouard Vaillant, 94805 Villejuif, France. E-mail: lacroix@igr.fr, or lacroixpsca@yahoo.fr.

This work was supported by grants from the Institut Gustave Roussy. A.B. is a recipient a doctoral grant from the

Association pour la Recherche sur le Cancer (allocation doctorale ARC–2011/2012).

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

References

1. Takahashi M, Ritz J, Cooper GM 1985 Activation of a novel human transforming gene, *ret*, by DNA rearrangement. *Cell* 42:581–588
2. Leboulleux S, Baudin E, Travagli JP, Schlumberger M 2004 Medullary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 61:299–310
3. Horie H, Yokogoshi Y, Tsuyuguchi M, Saito S 1995 Point mutations of *ras* and *Gsa* subunit genes in thyroid tumors. *Jpn J Cancer Res* 86:737–742
4. Xing M, Vasko V, Tallini G, Larin A, Wu G, Udelsman R, Ringel MD, Ladenson PW, Sidransky D 2004 BRAF T1796A transversion mutation in various thyroid neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab* 89:1365–1368
5. Okazaki M, Miya A, Tanaka N, Miki T, Yamamoto M, Motomura K, Miyauchi A, Mori T, Takai S 1989 Allele loss on chromosome 10 and point mutation of *ras* oncogenes are infrequent in tumors of MEN 2A. *Henry Ford Hosp Med J* 37:112–115
6. Bockhorn M, Frilling A, Kalinin V, Schröder S, Broelsch CE 2000 Absence of H- and K-ras oncogene mutations in sporadic medullary thyroid carcinoma. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 108:49–53
7. Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, Biddinger PW, Knauf JA, Basolo F, Zhu Z, Giannini R, Salvatore G, Fusco A, Santoro M, Fagin JA, Nikiforov YE 2003 BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 88:5399–5404
8. Perren A, Schmid S, Locher T, Saremaslani P, Bonvin C, Heitz PU, Komminoth P 2004 BRAF and endocrine tumors: mutations are frequent in papillary thyroid carcinomas, rare in endocrine tumors of the gastrointestinal tract and not detected in other endocrine tumors. *Endocr Relat Cancer* 11:855–860
9. Moura MM, Cavaco BM, Pinto AE, Leite V 2011 High prevalence of RAS mutations in RET-negative sporadic medullary thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 96:E863–E868
10. Schulten HJ, Al-Maghrabi J, Al-Ghamdi K, Salama S, Al-Muhayawi S, Chaudhary A, Hamour O, Abuzenadah A, Gari M, Al-Qahtani M 2011 Mutational screening of RET, HRAS, KRAS, NRAS, BRAF, AKT1, and CTNNB1 in medullary thyroid carcinoma. *Anticancer Res* 31:4179–4183
11. Di Fiore F, Sesboué R, Michel P, Sabourin JC, Frebourg T 2010 Molecular determinants of anti-EGFR sensitivity and resistance in metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 103:1765–1772
12. Amez N, Lacroix L, Motte N, Baudin E, Caillou B, Ducreux M, Elias D, Chanson P, Schlumberger M, Bidart JM 2009 Mutational status of EGFR, BRAF, PI3KCA and JAK2 genes in endocrine tumors. *Int J Cancer* 124:751–753
13. Goutas N, Vlachodimitropoulos D, Bouka M, Lazaris AC, Nasoulas G, Gazouli M 2008 BRAF and K-RAS mutation in a Greek papillary and medullary thyroid carcinoma cohort. *Anticancer Res* 28:305–308
14. Schlumberger MJ, Elisei R, Bastholt L, Wirth LJ, Martins RG, Locati LD, Jarzab B, Pacini F, Daumerie C, Droz JP, Eschenberg MJ, Sun YN, Juan T, Stepan DE, Sherman SI 2009 Phase II study of safety and efficacy of motesanib in patients with progressive or symptomatic, advanced or metastatic medullary thyroid cancer. *J Clin Oncol* 27:3794–3801
15. Forbes SA, Bhamra G, Bamford S, Dawson E, Kok C, Clements J, Menzies A, Teague JW, Futreal PA, Stratton MR 2008 The catalogue of somatic mutations in cancer (COSMIC). *Curr Protoc Hum Genet* Chapter 10:Unit 10.11
16. Smith G, Bounds R, Wolf H, Steele RJ, Carey FA, Wolf CR 2010 Activating K-Ras mutations outwith ‘hotspot’ codons in sporadic colorectal tumours—implications for personalised cancer medicine. *Br J Cancer* 102:693–703
17. Tyner JW, Erickson H, Deininger MW, Willis SG, Eide CA, Levine RL, Heinrich MC, Gattermann N, Gilliland DG, Druker BJ, Loriaux MM 2009 High-throughput sequencing screen reveals novel, transforming RAS mutations in myeloid leukemia patients. *Blood* 113:1749–1755
18. Janakiraman M, Vakiani E, Zeng Z, Pratilas CA, Taylor BS, Chitale D, Halilovic E, Wilson M, Huberman K, Ricarte Filho JC, Persaud Y, Levine DA, Fagin JA, Jhanwar SC, Mariadason JM, Lash A, Ladanyi M, Saltz LB, Heguy A, Paty PB, Solit DB 2010 Genomic and biological characterization of exon 4 KRAS mutations in human cancer. *Cancer Res* 70:5901–5911
19. Wells Jr SA, Robinson BG, Gagel RF, Dralle H, Fagin JA, Santoro M, Baudin E, Elisei R, Jarzab B, Vasselli JR, Read J, Langmuir P, Ryan AJ, Schlumberger MJ 2012 Vandetanib in patients with locally advanced or metastatic medullary thyroid cancer: a randomized, double-blind phase III trial. *J Clin Oncol* 30:134–141
20. Yang KP, Castillo SG, Nguyen CV, Hickey RC, Samaan NA 1990 C-myc, N-myc, N-ras, and c-erb-B: lack of amplification or rearrangement in human medullary thyroid carcinoma and a derivative cell line. *Anticancer Res* 10:189–192
21. Fenton C, Anderson J, Lukes Y, Dinanier CA, Tuttle RM, Francis GL 1999 Ras mutations are uncommon in sporadic thyroid cancer in children and young adults. *J Endocrinol Invest* 22:781–789

MUTATIONAL SCREENING OF REFRACTORY MEDULLARY THYROID CARCINOMAS BY TARGETED NEXT-GENERATION SEQUENCING METHODS.

Boichard A^{1,2} and Chougnet C.N.^{3,4}, Marty V¹, Saulnier P¹, Al Ghuzlan A², Borget I^{4,5}, Schlumberger M^{3,4}, Bidart JM², Lacroix L^{1,2}.

¹ *Translational Research Laboratory and Biobank, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France.*

² *Department of Medical Biology and Pathology, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France.*

³ *Department of Nuclear Medicine and Endocrine Oncology, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France.*

⁴ *French National Network TUTHYREF, coordinating center, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France.*

⁵ *Department of Biostatistics and Epidemiology, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France.*

Acknowledgments

The authors thank Marie Breckler, Stéphanie Coulon, Mélanie Laporte, Isabelle Miran, Nelly Motté for their precious help.

ABSTRACT

CONTEXT: Medullary thyroid carcinoma (MTC) is caused by RET proto-oncogene mutations, found in all familial cases and in a part of sporadic forms. Recently, oncogenic RAS mutations have been described in RET-non-mutated tumors. These different mutational profiles could explain the phenotypic variation of MTC in terms of prognosis and regarding the response to targeted therapies. But due to the rarity of the tumor, the screening of these mutations must be achieved on archival FFPE tissue collections.

OBJECTIVE: This study aimed to adequately describe mutations carried by a French series of metastatic MTC FFPE samples, and to connect them to a potential clinical impact.

MATERIALS AND METHODS: High-throughput sequencing using 2 different targeted DNA libraries was applied to the entire collection. The first library allowed the description of 12 oncogenes, whereas the second was restricted to RET and RAS mutational hotspots.

RESULTS: Mutation status was obtained for 40 tumors. A single dominant mutation of RET or RAS genes was found in 38 of them. One tumor was found wild-typed and another presented uninterpretable results. 20 tumors carried a RET p.Met918Thr variant. This mutation was associated with good-responder phenotype to TKI therapies, whereas RAS mutations seemed to be less sensitive.

CONCLUSIONS: Our study confirms the high prevalence of RET and RAS mutations in MTC. We have developed a highly targeted library system, applicable to low-quality samples, allowing a fast, sensitive and low-cost molecular screening of MTC. In future and if association between type of RET-RAS mutation and prognosis of MTC is confirmed, this type of library could be run on platform routinely used, replacing direct sequencing method.

Medullary thyroid carcinoma (MTC) is a rare tumor, which molecular profile remained understudied during long time. In 1993, activating mutations in the tyrosine-kinase receptor RET have been described in association with familial and some sporadic forms of MTC [1][2]. No other driver mutations have been found until recently, with the discovery of mutations in RAS oncogenes [3][4]. These mutations, present at codons 2, 3 and 4 of the HRAS and KRAS genes are found in nearly 40% of sporadic tumors and appear to be mutually exclusive with RET somatic mutations in this type of tumor [5].

In the field of oncology, next-generation sequencing approaches (NGS) allow to screen for - with an interesting sensitivity - large number of somatic variants harboured by tumors (from tens or hundreds target genes up to whole-exome or whole-genome sequencing). By this flexibility, analyze of samples of middling quality, such as fixed and paraffin-embedded tissues presenting hyper-fragmented and degraded DNA, is made possible [6]. High-throughput sequencing was used on various cohorts of thyroid carcinomas, including different collections of MTC [7][8]. These studies have confirmed the dominance and the mutually exclusivity of RAS and RET mutations. A set of primers for the preparation of specific library targeting oncogenes involved in all thyroid tumors has been recently developed and validated [9]. The recent advances in personalized treatment of cancer have shown the worth of molecular screening of lesions to suppress. The search for driver-mutations or prospective mutations of resistance to targeted therapies has become an important preliminary step before the set-up of treatment strategy [10]. This is the case of metastatic forms of MTC, which are potentially treated by tyrosine kinase inhibitors (TKI). This molecular screening was first performed by direct sequencing, but this analysis was highly dependent on the initial quality of the extracted DNA and presented a very high failure rate. Here, we aimed to develop an alternative approach, based on the next-generation sequencing methods and using a DNA library containing only small amplicons. For this, we relied on a series of 41 samples collected

consecutively by the French study network of refractory thyroid tumors TuThyRef, for which we had clinical data about initial MTC specificity and various TKI's response to treatment.

PATIENTS & METHODS

Clinical samples

This study used 41 formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) MTC samples, related to 40 patients not cured after initial thyroidectomy and presenting a progressive disease. There were 13 females and 27 males, with a mean age at diagnosis of 47 years. 9 patients had inherited MTC and 31 were sporadic carcinomas (neither familial history nor RET germline mutation detected). These tissues, including 27 primary tumors and 14 metastases, were collected consecutively in centers listed by the French network TuThyRef, following local ethics recommendations. 2 tissues were primary tumor and metastasis of the same MTC patient. Details of collection are presented in table 1.

Besides usual clinical data, information regarding vital status and best response rates after treatment with tyrosine kinase inhibitors (first and second line of treatment) was available for most patients (data not shown).

Histological control of each sample was achieved by a pathologist, using hematoxylin and eosin staining on 5- μ m sections. Neoplastic cellularity greater than 60% and suitable fixative/conservation methods were used for all the selected cases. Genomic DNA was extracted from three 15- μ m tissue sections, after an overnight digestion by proteinase K and using the DNeasy Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), according to the manufacturer's protocol. Yield and quality of DNA were assessed by Qubit fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Sanger Sequencing

Exons 10, 11, 13, 14, 15, 16 of RET as well as 2, 3, 4 of HRAS and KRAS genes were analyzed by Sanger's sequencing as described previously [5]. Briefly, each PCR was carried out on 20 ng of genomic DNA with Hot Start Taq polymerase

(Qiagen, Hilden, Germany). After clean-up, the amplified products were investigated by direct sequencing using the Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) and capillary electrophoresis on automated sequencer ABI3730 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). Sequences were screened for exonic coding alterations using SeqScape v2.5 software (Applied Biosystems Carlsbad, CA).

Preparation of DNA libraries and Ion Torrent sequencing

The collection was analyzed by high-throughput sequencing, using 2 distinct protocols.

The first approach, based on AmpliSeq Custom library application was designed online with the AmpliSeq Designer Tool (Life Technologies, Palo Alto, CA). This library preparation was built using 2 multiplex pool of primers, targeting 32 mutational hotspot regions in 12 oncogenes (EGFR, KRAS, NRAS, HRAS, BRAF, HER2, PIK3CA, RET, CTNNB1, MAP2K1, ALK, AKT1, ROS1). The 2 multiplex PCR were carried out on 10ng of genomic DNA of each sample with Ion AmpliSeq HiFi Master Mix (Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 - Life Technologies, Carlsbad, CA). A positive control, presenting known mutations in several oncogenes was equally amplified in order to ensure the robustness and the sensibility of the method (Quantitative Multiplex DNA Reference Standard – Horizon Diagnostics, Cambridge, UK). After purification by FuPa Reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA), amplicons were ligated to sequencing adapters and nucleotides barcodes (Ion A and P1 Adapters for and Ion Xpress Barcode Adapters 1–96 Kit – Life Technologies, Carlsbad, CA), according to manufacturer's instructions (1 barcode per initial sample). Quality of libraries was determined using Agilent BioAnalyzer High Sensitivity DNA kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Barcoded libraries from each sample were equimolarly mixed to obtain 180pg of multiplex templates, enriched by emulsion-PCR allowing clonal amplification on Ion Sphere Particles, using Ion PGM Template OT2 200 Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA).

The second approach was based on a RET-RAS library built with home-designed primers allowing the amplification of short amplicons (70-103pb)

targeting hotspot mutational regions in RET and HRAS/KRAS oncogenes (codons 620, 634, 804, 918 and 12-13, 61, 117, 146 respectively). This approach was developed in accordance to the Fusion Sequencing protocol recommended by Life Technologies. Primers includes additional universal sense and antisense tails. Each PCR was carried-out on 10ng of genomic DNA of each sample with Hot Start Taq Polymerase (QIAGEN, Hilden, Germany). A second round amplification, using primers including sequencing A and truncated-P1 adapters, Ion Xpress barcode sequences (one barcode per initial sample) and sequences complementary to universal sense and antisense tails was performed on a 1/400 dilution of the first PCR product. This step allowed forthcoming bi-directional sequencing in two distinct strand senses. Exonuclease clean-up (Illustra exoSTAR - GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden) was achieved and each barcoded libraries were equimolarly blended in multiplex templates. Quality of mixed libraries was assessed by Qubit fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA). 4pg of multiplexed barcoded libraries were enriched by emulsion-PCR allowing clonal amplification on Ion Sphere Particles, using Ion PGM Template OT2 200 Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA).

For both approaches, the final amplified templates from AmpliSeq Custom libraries and RET-RAS hotspots libraries were loaded on Ion 316 Chips and Ion 314 Chips respectively (Life Technologies, Carlsbad, CA). The sequencing was carried out on an Ion Torrent Personal Genome Machine Sequencer, using the Ion PGM Sequencing 200 v2 Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA).

Data analysis

Sequencing signals processing, base calling and alignment to the 19th version of the human reference genome (Genome Reference Consortium – build GRCh37) were performed using Torrent Suite v 4.0 software (Life Technologies, Carlsbad, CA). Coverage analysis and variant calling were made using Coverage Analysis v.4.0 (r73765) and Variant Caller v.4.0 (r73742) plugins, taking into account several quality scores such as read length, base quality, frequency of variants and possible strand bias. Only modifications showing more than 30 reads (30X), with a minimum of variant allele of

15 reads (15X), an observed frequency greater than 5% for hotspot variants and 10% for other variants, were retained. Analysis were focus only on nonsense/missense/splicing substitutions or deletion/insertion variants presenting a prevalence less than 1% in the European population (ESP and Hapmap CEU projects).

RESULTS

Robustness and sensitivity evaluation

A multiplex reference standard, combining the DNA of 20 isogenic cell lines and containing precisely defined allelic frequencies for several oncogenic targets, was used as a control of sensitivity for each type of library (Horizon Diagnostics, Cambridge, UK).

For the Ampliseq Custom library, control-DNA was added twice (1 barcode per chip). Final alignment presented parameters corresponding to good quality of sequencing (46000 and 115000 mapped reads respectively). All targeted amplicons were covered and mean depth by amplicon was $2\,222 \pm 730$ X (mean $\pm$ SD). Eight expected variants, with a frequency over 3% were found (figure 1A). The allelic frequencies were found to be in the manufacturer's recommendations. The low variations between chips reflected good inter-chip reproducibility.

For the RET-RAS hotspots library, control-DNA was analyzed once. Final alignment showed 10150 mapped reads and all targeted amplicons were covered. Mean depth by amplicon was 805 ± 274 X. Among the mutations in the control, only KRAS variants were explored (other loci were not covered). The two KRAS p.Gly13Asp and p.Gly12Asp were observed at 11% and 6% respectively (figure 1A).

Based on this result and manufacturer's recommendations, we retained a limit of detection of 5% for hotspots variants and 10% for other mutations.

Oncogenes targeted analysis on FFPE samples.

The 33 first samples were initially explored by Sanger sequencing after PCR amplification of 12 targeted exons. Because of limited quality of DNA extracted from FFPE samples, only 17 samples

provided suitable results to positively determine somatic RET and RAS status of tumors (figure 2A). Then, the study was carried out on 41 tumors, applying Ampliseq Custom library use in the laboratory and covering mutational hotspots regions of 12 oncogenes including RET and RAS genes. The 41 tumors were analyzed on two runs (100Mb 316 Ion chips) with more than 2 360 000 good quality reads each (quality Phred score over 20). The sequencing failed for all amplicons for only 6 samples (figure 2A - mean coverage for all amplicons = 0X). Successful sequencing samples shown 103223 ± 94721 mapped reads each and a mean coverage of 2350 ± 2473 X by amplicons. Globally homogenous average coverage deepness was observed between each amplicons (figure 1B). After filtering, 116 variants were retained for the 41 samples. Only 2 MTC did not harbour any variants of interest, despite high average coverage deepness for all amplicons. Four MTC displayed a higher level of variants not previously described in COSMIC Database (<http://cancer.sanger.ac.uk/>), compared to other samples. This excess of variants was found in several genes, mainly at low frequency and was not confirmed by independent sequencing. Those "not-confirmed" variants could be associated to low quality of DNA. All other cases presented a major variant belonging to the known spectrum of RET and RAS gene mutations: 17 samples carried a RET p.Met918Thr mutation, 5 carried point or complexes mutation involving the codon 634, 1 carried other RET variants and 7 samples presented a HRAS or a KRAS mutation. One of these samples harbour a RAS mutation at low frequency (10% allele frequency) associated to a RET exon 11 mutation (48% allele frequency). One tissue revealed additional major variant in EGFR (p.Pro848Leu – 51% allele frequency). This variant was controlled on an independent sequencing run. Located in the catalytic domain of the receptor, it is considered as probably damaging by the prediction software PolyPhen-2.

In parallel, the 41 tumors were analyzed using the RET-RAS hotspots library in two runs (10Mb 314 Ion chips), generating 69000 and 165000 mapped good quality reads (quality Phred score over 20). Only 1 sample failed for all amplicons. Other 40 samples showed 10076 ± 4317 mapped reads each

and a mean coverage of 653 ± 233 X by amplicons. Distribution of depth for each amplicon was homogeneous and showed less variability than for the first library (figure 1B). After filtering, 47 variants were retained for the 41 samples. Four MTC did not harboured any variants of interest and 36 tumor samples presented a known RET or RAS mutation: 20 samples carried a RET p.Met918Thr mutation, 8 carried mutation involving the codon 634 (including 1 at a low level in a tumor with a 918 major variant), 3 in other RET locus and 7 samples presented HRAS or KRAS mutations (including 1 at a low level in a tumor with a 918 major variant).

Results obtained with the two methods are consistent for 40 of the 41 tissues, including 1 failed sample, 1 sample apparently wild-typed for all genes studied and 38 samples carried a RET or RAS dominant mutation (figure 2B). In contrast, 1 sample showed a discrepancy concerning the major oncogenic mutation found. Because of absence of remaining DNA or tissue for this sample, it was not possible to perform any independent validation.

Clinical relevance of dominant variants observed

No link between dominant mutation and patient's age at diagnosis or time of metastasis occurrence has been demonstrated. However, distribution of these mutations was significantly different between inherited types of disease ($p\text{-value}\chi^2 < 0.0001$): variant RET p.Met918Thr was found in sporadic cases (62% versus 22% for inherited cases) whereas other variants of RET were more prevalent in familial forms (66% versus 17%). In this selected cohort, male patients had a metastases relieve shorter than women (without significant impact on overall survival) and harboured more often a RET p.Met918Thr variant (62% versus 33% in female - $p\text{-value}\chi^2 < 0.0001$).

Finally, response to TKI treatment analysis was performed on 33 well-documented cases of the initial cohort (patients excluded concerned 1 patient found to be included in the placebo arm of a clinical trial and best-response rate observed was not available for all other patients). Among these patients, 27 harboured RET mutation, including 19 (53%) were p.Met918Thr. Five patients carried a HRAS or KRAS mutation (Figure 4A). Overall, the

group of RET p.Met918Thr patients had a greater partial response profile than others. Moreover, progressive disease under treatment arrived mostly within patients carrying a RAS mutation (respectively in xx% and y%, $p\text{-value}\chi^2 < 0.0001$ – figure 3A). Patients in this cohort were treated with 6 different TKIs (vandetanib and 5 currently tested molecules, called ITK1 to ITK5), but only vandetanib cohort permitted a more detailed analysis. Again, the best tumor reduction observed in this group was those concerning RET p.Met918Thr variants (figure 3B).

DISCUSSION

In the current work, we analyzed RET and RAS mutational somatic status of 41 archived MTC samples including 40 samples actually treated by tyrosine kinase inhibitors (TKI). The used of Sanger's direct sequencing gold-standard approach leads with more than 50% of unamplified or unreadable amplicons. This high rate of failed analyses was due to the limited quality of DNA extracted from archive FFPE blocks coming from several laboratories and not compatible with the usual length of amplicons required for direct sequencing approaches (200-300pb). For hyper-fragmented DNA, as those extracted from rare tumors FFPE biobanks, it would be wise to use techniques allowing analysis of smaller locus, more easily amplifiable, as is the case of recent next-generation sequencing methods. Also, we sought to test 2 different sequencing approaches allowing the analysis of RET and RAS oncogenes frequently mutated in MTC tumors. The sequencing of short amplicons to identify hotspots or novel mutations is now possible thanks to NGS methods.

We first tested, on a set of 41 consecutively collected MTC tissues, a NGS-library commonly used in our laboratory. This approach, targeting 12 well-known oncogenes with multiplex amplification of 32 PCR-products of approximately 120bp in length, provided better results and sensitivity than direct sequencing but still lead to some failure. In our experiment, this rate was evaluated at 15% (6/41 samples). Therefore, although all expected amplicons were covered, they showed a large amplitude in terms of quality of coverage, which can be attributed to the multiplex amplification. Knowing

the high prevalence of RET and RAS mutations in MTC tumors, we then wanted to test a library specially designed for this purpose. We have taken into account the low quality of DNA extracts derived from FFPE tissues and have chosen 12 short loci to amplify (100bp maximum) and applied the fusion sequencing protocol recommended by manufacturer. With this second method, all loci of interest had adequate coverage for the study of somatic variants (more than 300X for all amplicons), and no inter-locus amplification bias could be detected. The least significant item is the very low rate of failure, estimated here at less than 1% (1/41 samples).

Thus, we were able to describe a large part of our collection of tumors from metastatic MTC patients, including several patients treated by tyrosine kinase inhibitors. Not surprisingly, at least 38 of 41 samples (90%) presented a mutation in RET, HRAS or KRAS genes. In this selected collection of refractory MTC, we observed a high proportion of tumors carrying a p.Met918Thr RET mutation, previously described as conferring a poor-prognosis to the disease. Finally, only 1 good-quality samples appeared to be completely wild-typed for all genes studied. By merging the data from the current analysis with cases previously published by our group [5], and in accordance with other published studies [3][4][7], we confirmed the high RET-RAS mutation frequency in MTC, estimated at more than 93% in all tumors.

We sought to establish a possible relationship between the dominant mutation carried by the tumor and its aggressiveness or its response to targeted therapies such as tyrosine kinase inhibitors. Although our cohort is not enough important to draw

major conclusions, we observed a significant part of partial response in RET-tumors, especially in p.Met918Thr mutated tumors. This observation also applied to the small cohort of patients treated with vandetanib. Conversely, tumors bearing RAS mutations showed a higher proportion of non-responders or stable patients. Like what has been previously described about the resistance to EGFR inhibitors therapies of KRAS-mutated colorectal carcinomas [11], we could imagine that the presence of a RAS mutation in a MTC tumor causes its reduced sensitivity to TKI. These preliminary results support the importance of the mutational profiling of tumors, leading to definition of patients groups presenting several degrees of sensibility to drugs, as is the case here. In addition, observation of EGFR mutation concomitant to the RET-RAS dominant mutation in a good-responder tumor of our cohort requires more investigation. This mutation - although poorly studied so far - seem to have a functional impact on the activity of EGFR receptor [12][13].

In conclusion, we confirmed the high prevalence of RET and RAS dominant and mutually exclusive mutations in MTC tumors. We have developed a highly targeted library system, specific to this type of tumors and allowing a fast, sensitive and low-cost molecular screening of MTC. This method is applicable to fixed and low-quality tissues, with a very low failure rate. In future and if an association between type of mutation and prognosis of MTC is confirmed, this type de library could be run on sequencing platform compatible daily clinical practice in term of throughput and turn around time, replacing the direct sequencing method.

REFERENCES

- [1] L. M. Mulligan, J. B. Kwok, C. S. Healey, M. J. Elsdon, C. Eng, E. Gardner, D. R. Love, S. E. Mole, J. K. Moore, et L. Papi, « Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A », *Nature*, vol. 363, no 6428, p. 458-460, juin 1993.
- [2] H. Donis-Keller, S. Dou, D. Chi, K. M. Carlson, K. Toshima, T. C. Lairmore, J. R. Howe, J. F. Moley, P. Goodfellow, et S. A. Wells Jr, « Mutations in the RET proto-oncogene are associated with MEN 2A and FMTC », *Hum. Mol. Genet.*, vol. 2, no 7, p. 851-856, juill. 1993.
- [3] M. M. Moura, B. M. Cavaco, A. E. Pinto, et V. Leite, « High prevalence of RAS mutations in RET-negative sporadic medullary thyroid carcinomas », *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 96, no 5, p. E863-868, mai 2011.
- [4] H.-J. Schulten, J. Al-Maghrabi, K. Al-Ghamdi, S. Salama, S. Al-Muhayawi, A. Chaudhary, O. Hamour, A. Abuzenadah, M. Gari, et M. Al-Qahtani, « Mutational screening of RET, HRAS, KRAS, NRAS, BRAF, AKT1, and CTNNB1 in medullary thyroid carcinoma », *Anticancer Res.*, vol. 31, no 12, p. 4179-4183, déc. 2011.
- [5] A. Boichard, L. Croux, A. Al Ghuzlan, S. Broutin, C. Dupuy, S. Leboulleux, M. Schlumberger, J. M. Bidart, et L. Lacroix, « Somatic RAS mutations occur in a large proportion of sporadic RET-negative medullary thyroid carcinomas and extend to a previously unidentified exon », *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 97, no 10, p. E2031-2035, oct. 2012.
- [6] A. G. Hadd, J. Houghton, A. Choudhary, S. Sah, L. Chen, A. C. Marko, T. Sanford, K. Buddavarapu, J. Krosting, L. Garmire, D. Wylie, R. Shinde, S. Beaudenon, E. K. Alexander, E. Mambo, A. T. Adai, et G. J. Latham, « Targeted, high-depth, next-generation sequencing of cancer genes in formalin-fixed, paraffin-embedded and fine-needle aspiration tumor specimens », *J. Mol. Diagn. JMD*, vol. 15, no 2, p. 234-247, mars 2013.
- [7] N. Agrawal, Y. Jiao, M. Sausen, R. Leary, C. Bettgowda, N. J. Roberts, S. Bhan, A. S. Ho, Z. Khan, J. Bishop, W. H. Westra, L. D. Wood, R. H. Hruban, R. P. Tufano, B. Robinson, H. Dralle, S. P. A. Toledo, R. A. Toledo, L. G. T. Morris, R. A. Ghossein, J. A. Fagin, T. A. Chan, V. E. Velculescu, B. Vogelstein, K. W. Kinzler, N. Papadopoulos, B. D. Nelkin, et D. W. Ball, « Exomic sequencing of medullary thyroid cancer reveals dominant and mutually exclusive oncogenic mutations in RET and RAS », *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 98, no 2, p. E364-369, févr. 2013.
- [8] R. L. Margraf, J. D. Durtschi, J. E. Stephens, M. Perez, et K. V. Voelkerding, « Determination of RET Sequence Variation in an MEN2 Unaffected Cohort Using Multiple-Sample Pooling and Next-Generation Sequencing », *J. Thyroid Res.*, vol. 2012, p. 318232, 2012.
- [9] M. N. Nikiforova, A. I. Wald, S. Roy, M. B. Durso, et Y. E. Nikiforov, « Targeted Next-Generation Sequencing Panel (ThyroSeq) for Detection of Mutations in Thyroid Cancer », *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 98, no 11, p. E1852-1860, nov. 2013.
- [10] M. C. De Martino, A. Al Ghuzlan, S. Aubert, G. Assié, J.-Y. Scoazec, S. Leboulleux, C. Do Cao, R. Libè, C. Nozières, M. Lombès, F. Pattou, F. Borson-Chazot, S. Hescot, C. Mazoyer, J. Young, I. Borget, A. Colao, R. Pivonello, J.-C. Soria, J. Bertherat, M. Schlumberger, L. Lacroix, et E. Baudin, « Molecular screening for a personalized treatment approach in advanced adrenocortical cancer », *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 98, no 10, p. 4080-4088, oct. 2013.
- [11] C. J. Allegra, J. M. Jessup, M. R. Somerfield, S. R. Hamilton, E. H. Hammond, D. F. Hayes, P. K. McAllister, R. F. Morton, et R. L. Schilsky, « American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy », *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 27, no 12, p. 2091-2096, avr. 2009.
- [12] C. Q. Cai, Y. Peng, M. T. Buckley, J. Wei, F. Chen, L. Liebes, W. L. Gerald, M. R. Pincus, I. Osman, et P. Lee, « Epidermal growth factor receptor activation in prostate cancer by three novel missense mutations », *Oncogene*, vol. 27, no 22, p. 3201-3210, 2008.
- [13] B. HAN, X. ZHOU, R.-X. ZHANG, W.-F. ZANG, Z.-Y. CHEN, H.-D. SONG, H.-Y. WAN, et C.-X. ZHENG, « Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in NSCLC patients », *Oncol. Lett.*, vol. 2, no 6, p. 1233-1237, nov. 2011.

LEGEND TO FIGURES

TABLE 1 : Description of the collection used.

FIGURE 2 : Ampliseq custom and *RET-RAS* hotspots library efficiencies comparison.

- A. Variants and allelic frequencies observed in DNA positive control sample.
- B. Mean depth of reading (+/-SD) for each common amplicon in all samples (n=43).

FIGURE 3 : Genotypes observed in our cohort.

- A. Quality assessment of sequencing methods used.
 - for direct sequencing : black = not realized / red >75% failure / orange =50-75% / light green = 25-50% and dark green <25%
 - for NGS : red <50X / orange =50-100X / light green = 100-500X and dark green >500X)
- B. Dominant mutation retained
(*=cases showing multiple low frequency variants).
- C. Relationship with response to several 1st line ITKs therapies
(SD = stable disease, PR = partial response, PD = progressive disease).

FIGURE 4 : Response to 1st line ITK treatment regarding mutational status of MTC.

- A. Global repartition of dominant mutations in patients treated (n=33).
- B. Best clinical response observed in well-documented cases.
- C. Best percentage change in tumor size regarding ITK treatment.
(*=*case showing EGFR significant variant*)

TABLE 1

Sample	MTC inheritance	Tissue type	Patient gender	Age at dianosis	Metastase disclosure [£]	ITK1	best response*	ITK2	best response*
MTC 01	spo	primary tumor	M	59	1	<i>ITK1</i>	RP (-73%)	<i>vandetanib</i>	?
MTC 02	fam	primary tumor	F	63	0	<i>ITK1</i>	RP (-58%)	-	
MTC 03	fam	metastase	F	35	-	<i>ITK1</i>	RP (-44%)	<i>vandetanib</i>	SD
MTC 04	spo	primary tumor	M	49	1	<i>ITK1</i>	RP (-42%)	-	
MTC 05	spo	primary tumor	M	50	-5	<i>ITK1</i>	SD (-26%)	<i>vandetanib</i>	PD
MTC 06	spo	primary tumor	F	73	0	<i>ITK1</i>	SD (0%)	-	
MTC 07	fam	primary tumor	M	61	0	<i>ITK1</i>	PD	(<i>temozolomide</i>)	?
MTC 08	fam	primary tumor	M	51	1	<i>ITK1</i>	PD	-	
MTC 09	spo	primary tumor	M	59	1	<i>ITK2</i>	SD (-26%)	-	
MTC 10	spo	primary tumor	M	57	2	<i>ITK2</i>	SD	<i>vandetanib</i>	?
MTC 11	spo	primary tumor	M	21	1	<i>ITK3</i>	SD	-	
MTC 12	spo	metastase	F	60	0	<i>ITK4</i>	SD (-27%)	-	
MTC 13	spo	lymph node	M	55	6	<i>vandetanib</i>	RP (-100%)	-	
MTC 14	spo	primary tumor	F	34	11	<i>vandetanib</i>	RP (-78%)	-	
MTC 15	spo	metastase	M	39	11	<i>vandetanib</i>	RP (-77%)	-	
MTC 16	spo	primary tumor	F	45	8	<i>vandetanib</i>	RP (-73%)	-	
MTC 17	spo	primary tumor	M	42	0	<i>vandetanib</i>	RP (-57%)	<i>ITK4</i>	PD
MTC 18	spo	primary tumor	M	27	0	<i>vandetanib</i>	RP (-53%)	-	
MTC 19	spo	primary tumor	F	73	6	<i>vandetanib</i>	RP (-48%)	-	
MTC 20	spo	lymph node	M	46	1	<i>vandetanib</i>	RP (-40%)	-	
MTC 21	fam	lymph node	M	63	0	<i>vandetanib</i>	RP (-35%)	<i>ITK5</i>	?
MTC 22	spo	primary tumor	M	52	6	<i>vandetanib</i>	RP		
MTC 23	spo	primary tumor	M	44	-	<i>vandetanib</i>	RP	-	
MTC 24	spo	metastase	M	44	8	<i>vandetanib</i>	SD (-20%)	-	
MTC 25	spo	lymph node	M	43	9	<i>vandetanib</i>	SD (-11%)	-	
MTC 26	fam	primary tumor	M	24	1	<i>vandetanib</i>	SD (-10%)	-	
MTC 27	spo	primary tumor	M	53	0	<i>vandetanib</i>	SD (-9%)	-	
MTC 28	spo	primary tumor	M	36	1	<i>vandetanib</i>	SD (-9%)	-	
MTC 29	spo	metastase	F	42	-	<i>vandetanib</i>	SD (-5%)	-	
MTC 30	spo	primary tumor	F	49	11	<i>vandetanib</i>	SD (-3%)	-	
MTC 31	fam	metastase	M	30	3	<i>vandetanib</i>	SD (+6%)	<i>ITK1</i>	RP
MTC 32	spo	metastase	M	61	2	<i>vandetanib</i>	SD (+11%)	<i>ITK4</i>	SD
MTC 33	fam	lymph node	F	44	1	<i>vandetanib</i>	SD (+12%)	-	
MTC 34	fam	primary tumor	F	44	1	<i>vandetanib</i>	SD (+12%)	-	
MTC 35	spo	primary tumor	M	32	3	<i>vandetanib</i>	SD	-	
MTC 36	spo	primary tumor	F	37	13	<i>vandetanib</i>	SD	-	
MTC 37	fam	metastase	F	37	29	<i>vandetanib</i>	?	-	
MTC 38	spo	metastase	M	33	-	<i>vandetanib</i>	?	-	
MTC 39	spo	primary tumor	F	-	-	<i>vandetanib</i>	?	-	
MTC 40	spo	primary tumor	M	46	0	<i>vandetanib</i>	?	-	
MTC 41	spo	primary tumor	M	53	0	<i>placebo</i>	-	-	

£ Metastase disclosure = time between initial diagnosis and metastase highlighting, in years.

* SD = stable disease, PR = partial response, PD = progressive disease.

FIGURE 2

A.

Variant	EXPECTED frequency (%)	OBSERVED frequencies (%)		
		Custom library		RET-RAS library
		chip 1	chip 2	
<i>EGFR</i> p.Gly719Ser	24.5	24.7	26.2	NC
<i>PIK3CA</i> p.His1047Arg	17.5	18.2	19	NC
<i>KRAS</i> p.Gly13Asp	15	15.6	13.1	11.1
<i>NRAS</i> p.Gln61Lys	12.5	12.9	14.4	NC
<i>BRAF</i> p.Val600Glu	10.5	10.6	10.7	NC
<i>PIK3CA</i> p.Glu545Lys	9	8.1	7	NC
<i>KRAS</i> p.Gly12Asp	6	6	5.5	5.8
<i>EGFR</i> p.Leu858Arg	3	2.3	1.7	NC

NC=non-contributory

B.

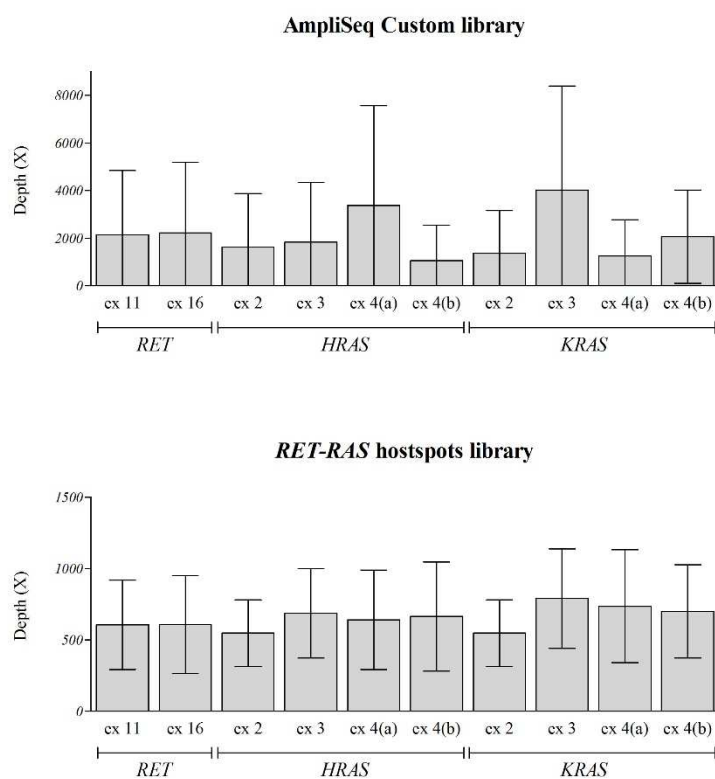


FIGURE 3

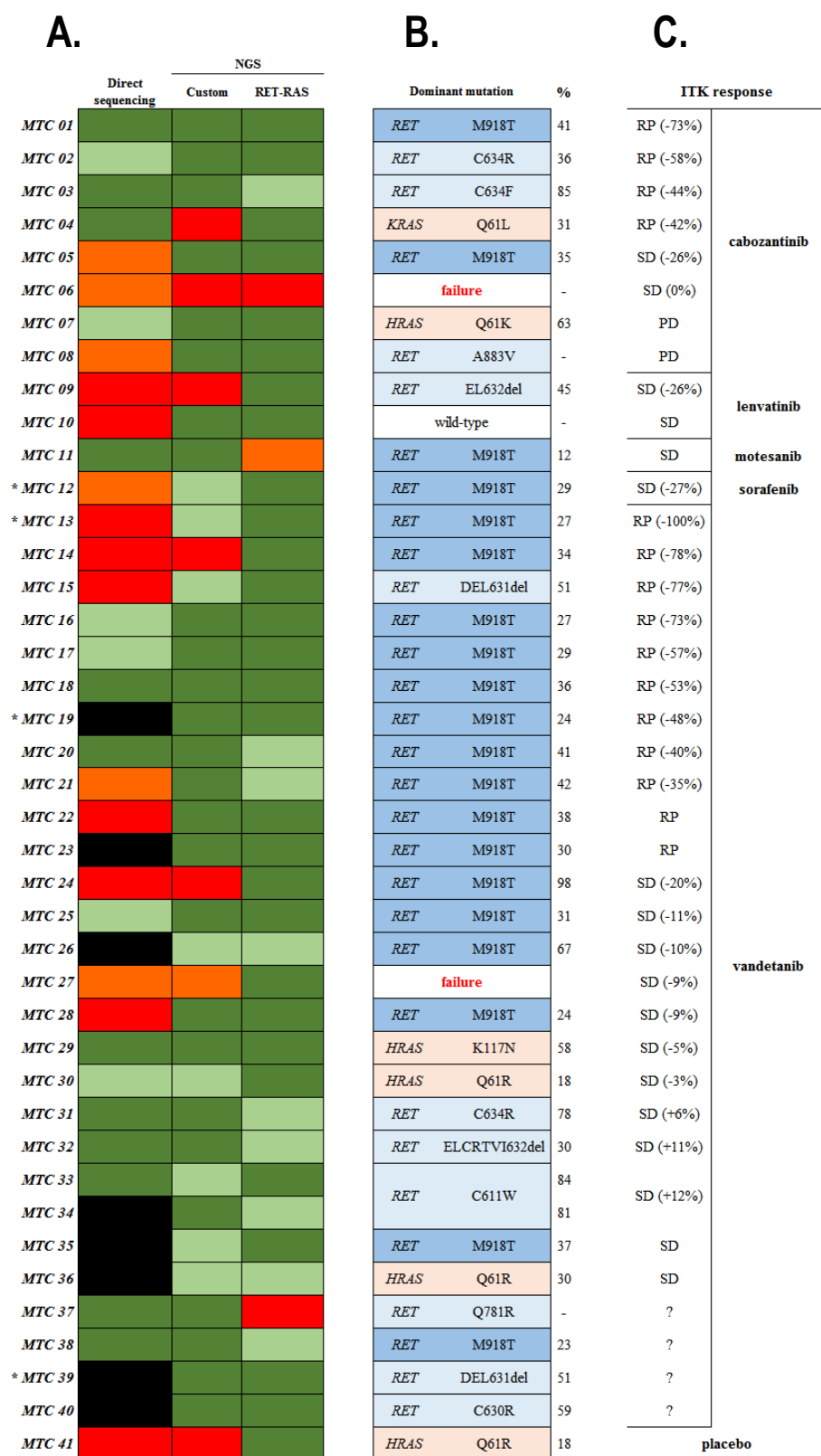
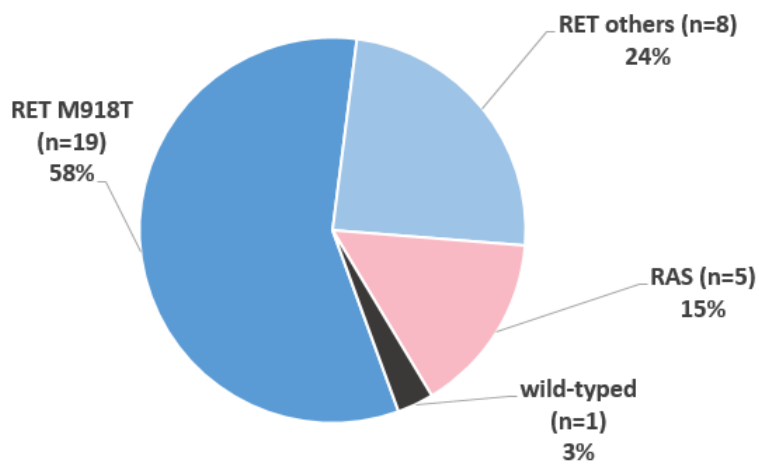
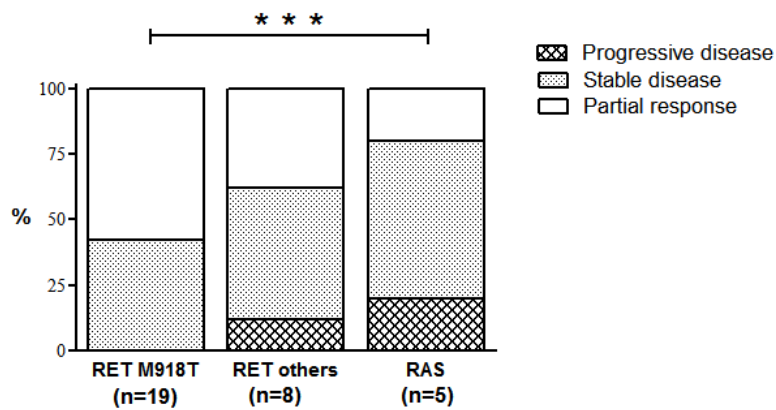


FIGURE 4 :

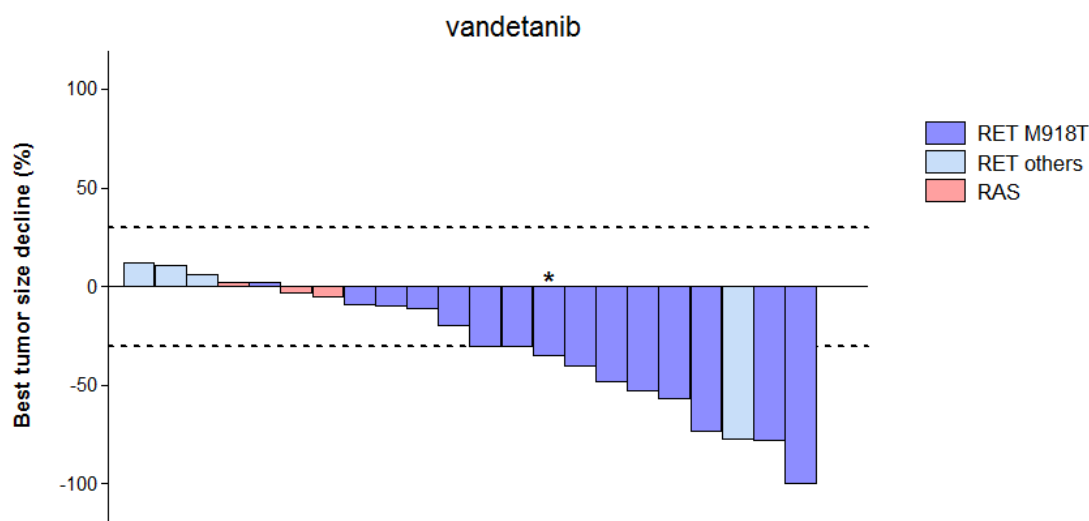
A.



B.



C.



3.2.2.4. Résultats complémentaires

Enfin, nous avons souhaité compléter la caractérisation des **2 modèles cellulaires** de CMT à notre disposition, par séquençage de type NGS de leur **exome complet**. La banque génomique a été obtenue après fragmentation mécanique et enrichissement ciblé de la totalité des exons (kit de capture SureSelect^{XT} Human All ExonTM v4 + UTRs – Agilent Technologies) puis le séquençage a été réalisé sur une plateforme HiSeqTM 2000 de type Illumina® (PCR-bridge sur support solide puis séquençage par synthèse *de novo*).

Les 2 échantillons ont montré des qualités de séquençage similaires (profondeurs moyennes de 89X et 86X respectivement – score de qualité Q30 évalué à 91,11% et 91,04%).

Au total, 54594 et 52117 variants ont été détectés dans chacune des lignées. L'application des filtres qualitatifs similaires à ceux utilisés pour l'analyse de la collection sélectionnée de tumeurs (cf. chapitre 3.2.2.2 en page 86) permet la distinction de **707 et 598 variants d'intérêts**, dont 436 et 309 touchant des gènes déjà décrits comme étant mutés au niveau somatique dans les tumeurs (selon la base de données COSMIC).

Les **mutations conductrices majeures de RET** connues dans ces cellules ont été retrouvées :

- la substitution **p.Cys634Trp** est présente sur **66% des allèles pour la lignée TT**,
- la substitution **p.Met918Thr** est présente sur **58% des allèles pour la lignée MZ-CRC1**.

Les autres variations prépondérantes mises en évidence dans ces cellules sont présentées en Annexe 4 et Annexe 5.

La lignée TT ayant également été séquencée dans le projet de caractérisation moléculaire des lignées tumorales initié par le Broad Institute (Cancer Cell Line Encyclopedia - <http://www.broadinstitute.org/ccle/>), les variants communs à cette étude sont indiqués en gras en Annexe 4. Notons que ce projet décrit 2 variants d'intérêt additionnels au niveau des gènes *FLNC* (Filamin-C – p.Gly947fs) et *ITPR2* (inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, type 2 – p.Arg470_splice).

3.2.3. Discussion

Jusqu'à très récemment et à l'exception des mutations *RET*, aucune autre mutation ponctuelle récurrente n'avait été décrite dans le CMT. Nous avons recherché d'autres mutations susceptibles d'influencer l'oncogenèse des CMT, comme par exemple au niveau des gènes *EGFR*, *BRAF*, *PI3KCA*, *JAK2*, *ALK*, *GNAS*, *GNAQ*, *IDH1* ou encore *IDH2* ; mais n'avons jamais retrouvé d'autres mutations pouvant compléter l'effet de *RET* oncogénique dans les tumeurs apparemment sauvages pour ce dernier.

Les bases de données accessibles gratuitement en ligne et ayant vu le jour avec l'essor des techniques de NGS sont des sources d'informations précieuses en pathologie moléculaire, permettant de connaître de façon rapide les principales mutations conductrices retrouvées dans les sous-types tumoraux. Cependant, compte tenu de leur rareté, les CMT et leurs tumeurs associées n'y sont jamais représentées (à l'exception des données concernant la lignée TT disponibles sur le site CCLE).

En 2011, la publication de (Moura et al., 2011) a décrit une proportion non négligeable de tumeurs *RET*-négatives présentant des variants oncogéniques *RAS*, ces variants étant jusqu'alors décrits comme exceptionnels dans ce type de tumeurs (Table 6). Depuis, cette description a été confirmée par un grand nombre d'équipes, et nous nous sommes - de la même façon - focalisés sur ce point majeur.

Gène	Locus étudiés	Méthode	Echantillons mutés	Références
H-RAS	Codon 61	NA	1/18	Okazaki et al., 1989
N-RAS	NA	Southern blot	0/7	Yang et al., 1990
H-N-K-RAS	Exon 2	Séquençage direct	0/9	Horie et al., 1995
H-N-K-RAS	Codons 12, 13, 61	Hybridation	0/2	Fenton et al., 1999
H-K-RAS	Codons 12, 13, 61	Séquençage direct	0/15	Bockhorn et al., 2000
K-RAS	Codon 12	PCR-RFLP	18/44	Goutas et al., 2008
B-RAF	Codon 600		30/44	
H-RAS	Exons 2, 3	Séquençage direct	1/13	Schulten et al., 2011
K-N-RAS	Exon 15		0/13	
B-RAF			0/13	
H-RAS	Exons 2, 3	Séquençage direct	15/65	Moura et al., 2011
K-RAS			3/65	
N-RAS			0/65	
B-RAF	Exon 11, 15		0/65	
H-RAS	Exons 2, 3, 4	Séquençage direct	8/50	Boichard et al., 2011
K-RAS			5/50	
N-RAS			0/50	
B-RAF	Exon 11, 15		0/50	
H-RAS	Codons 12, 13, 61	Séquençage direct	13/188	Ciampi et al., 2012
K-RAS			4/188	
N-RAS			2/188	
H-RAS	Exons 2, 3	NGS - amplification ciblée	3/15	Nikiforova et al., 2013
K-RAS			1/15	
N-RAS			0/15	
H-RAS	all exons	NGS - capture exomique	7/57	Agrawal et al., 2013
K-RAS			2/57	
N-RAS			0/57	

TABLE 6 : MUTATIONS *RAS* ET CMT - REVUE DE LA LITTÉRATURE ET SITUATION DU TRAVAIL

Nous avons établi le profil mutationnel ponctuel des gènes *RET* et *RAS* sur 2 cohortes distinctes de CMT, en utilisant 2 techniques de séquençage présentant des sensibilités différentes (seuil de détection des variants en séquençage direct évalué à environ 15% d'allèles mutés, contre 3 à 5% en séquençage NGS de type Ion Torrent).

Dans un premier temps, nous avons utilisé une technique de séquençage de type Sanger, sur des échantillons d'archives de qualité moyenne. Malgré un pourcentage d'échec important (environ 50% des amplicons), nous avons confirmé la **présence de variants oncogéniques des gènes *HRAS* ou *KRAS* dans un grand nombre de tumeurs sporadiques non mutées *RET* (plus de 40%)**, représentant la quasi-totalité des tumeurs non mutées pour *RET* (Table 6).

Le **caractère mutuellement exclusif des variants *RET*, *HRAS* ou *KRAS*** démontre les effets biologiques redondants de ces 3 gènes lors du développement du CMT.

Certains des variants *RAS* retrouvés sont situés sur des **locus peu fréquemment étudiés**, mais néanmoins connus pour leur effet oncogénique :

- Les mutations touchant le **codon 117** de *KRAS* sont retrouvées dans les carcinomes colorectaux, avec la même fréquence que les variants situés en position 61 ([Wójcik et al., 2008](#)). Une étude menée sur des individus atteints du syndrome de Costello a montré que ces mutations engendrent une anomalie de fixation du nucléotide guanidique, conduisant à un effet fonctionnel semblable aux variations plus connues des codons 12 et 13 ([Denayer et al., 2008](#)). Les mutations de la lysine 117 de *HRAS* sont plus rares (4 cas répertoriés par la base COSMIC, dont 2 carcinomes thyroïdiens différenciés).
- Les mutations touchant le **codon 146** et semblant n'affecter que *KRAS*. Elles concernent près de 4% des carcinomes colorectaux ([Edkins et al., 2006](#)) ([Gaedcke et al., 2010](#)) ([Vaughn et al., 2011](#)) et seraient également retrouvées dans quelques cas de lymphomes thymiques ([Corominas et al., 1991](#)) et de leucémies myélomonocytiques chroniques ([Gelsi-Boyer et al., 2008](#)). Leur contribution à l'oncogenèse de ces types tumoraux a été évaluée au moins égale à celle provoquée par les variants du codon 61. Ces variants confèrent la même insensibilité aux inhibiteurs de l'EGFR que les mutations précédemment établies ([Douillard et al., 2013](#)), et leur recherche est maintenant nécessaire avant la mise en place de certaines thérapies telles que le panitumumab (Vectibix®, Amgen).

Dans un second temps, l'adaptation de méthodes de séquençage NGS à des locus de petites tailles a permis la **caractérisation sensible et fiable** (taux d'échec estimé à 3%), d'une collection de tissus correspondants à des patients ayant reçu un traitement par ITK. Certains **variants faibles** (fréquence de variation inférieure à 15%) ont ainsi pu être observés. Des **mutations complexes du gène RET**, essentiellement localisées au niveau de l'exon 11 (délétions et délétions-insertions entre les codons 630 et 638) ont également pu être identifiées, alors que le résultat obtenu en technique de Sanger demeurerait ininterprétable. Des **variants HRAS et KRAS** ont également été retrouvés, dans 12% et 1% des tumeurs respectivement.

La corrélation entre le type de variation conductrice dominante présentée par la tumeur et la réponse clinique à une première ligne de traitement par ITK demeure difficile à évaluer, du fait du faible nombre de cas et d'une très grande hétérogénéité de prise en charge des patients. Néanmoins, nous montrons que **les patients porteurs d'un variant RET du groupe ATA-D semblent être les meilleurs réponders au vandétanib** (CAPRELSA®, AstraZeneca – inhibiteur des récepteurs VEGFR-2/3, EGFR et RET), comparativement à ceux présentant une mutation RAS ou d'autres locus de RET. Il semblerait que ces variants, en plus d'une utilisation en tant que **marqueurs de classification**, puisse également être utilisés en tant que **marqueurs théranostiques** de réponse aux thérapies ciblées actuellement à l'essai dans les formes métastatiques de CMT. Nous confirmons ainsi le résultat de l'étude préliminaire du vandétanib (essai ZETA), distinguant les mutations RET p.Met918Thr de toutes les autres mutations en terme de survie sans progression et de réponse objective au traitement (hazard ratio PFS= 0,3 ; ORR=55%) (*Langmuir and Yver, 2012*).

Les techniques de séquençage NGS ont également permis d'évaluer à large échelle l'ensemble des variants portés par les tumeurs. En 2013, (*Agrawal et al., 2013*) ont montré, par l'analyse exome-entier de 17 tumeurs, que les mutations RET et RAS étaient les variants majoritairement retrouvés dans les CMT (en terme de pourcentage de variant dans un même tissu mais également à un niveau inter-tumoral). Chacune des tumeurs étudiées portait environ 18 variants potentiellement conducteurs. Après validation sur une seconde cohorte, seul le gène **MDC1** (*Mediator of DNA-damage Checkpoint 1*) a été retenu en sus de RET, HRAS et KRAS.

Nous avons étudié une **grande proportion de l'exome** (400 oncogènes) de 4 tumeurs que nous pensions non mutées pour RET ou RAS. Trois d'entre elles se sont révélées porteuses d'une mutation RET, au niveau des locus bien connus **RET⁶³⁴** ou **RET⁹¹⁸**, avec des **pourcentages alléliques compris entre 11 et 27%**. Ces cas ont possiblement été omis en séquençage direct, du fait d'une faible sensibilité technique, d'un biais d'amplification ou

encore d'une localisation tissulaire différente (ré-extraction nécessaire pour un des cas). La dernière tumeur, effectivement non mutée *RET* ou *RAS* présente – plusieurs variants d'intérêt au niveau des gènes ***PDGFRA***, ***ERBB3*** et ***AKT2***, dont l'expressivité clinique demeure inconnue. Notons que ce type d'analyse (séquençage de l'exome de plus de 400 oncogènes) est actuellement en cours de réalisation dans le cadre d'une collaboration internationale de grande ampleur incluant une collection de 29 tumeurs provenant de l'Institut Gustave Roussy.

In fine, au 1er janvier 2014, un total de **103 tissus tumoraux ont été analysés** (correspondant aux échantillons décrits dans les 2 articles présentés et à quelques prélèvements additionnels). Après sélection des cas non-apparentés, éviction d'une redondance correspondant à différents tissus prélevés sur un même patient (pour lesquels les profils mutationnels étaient identiques) et d'une ambiguïté, nous disposons de **100 statuts somatiques indépendants** (Figure 18) :

- 28 correspondent à des cas familiaux, dont 11 avec une mutation *RET* germinale au niveau du locus 630-638 de l'exon 11, 6 patients avec une mutation au niveau des codons 918 ou 883 et 11 avec une mutation de locus peu décrits (codons 531, 533, 618, 620, 781, 891...) ;
- 72 correspondent à des cas sporadiques, dont 20 tumeurs présentant une mutation du spectre *RAS*, 48 une mutation *RET* (dont 36 variants p.Met918Thr) et **seulement 4 tumeurs de génotype apparemment sauvage** pour ces oncogènes (correspondant à la tumeur non-mutée de la cohorte).

Les 4 tumeurs de génotype *RET/RAS* sauvage n'ont pu être plus amplement étudiées, faute de matériel disponible. Une d'entre elles (seule tumeur sauvage de la cohorte de patients traités par ITK) présente une suspicion de délétion au niveau de l'exon 11 du gène *RET*, à un taux d'observation et un score qualité trop faibles pour être retenue.

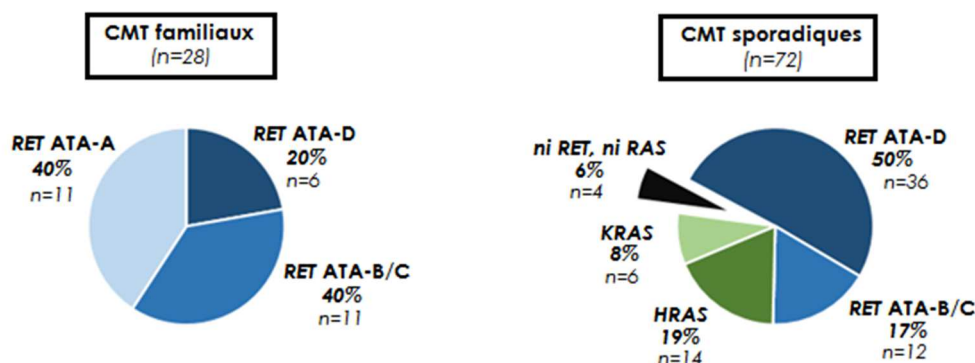


FIGURE 18 : RÉPARTITION DES MUTATIONS ONCOGÉNIQUES MAJEURES RETROUVÉES DANS NOTRE COHORTE DE CMT

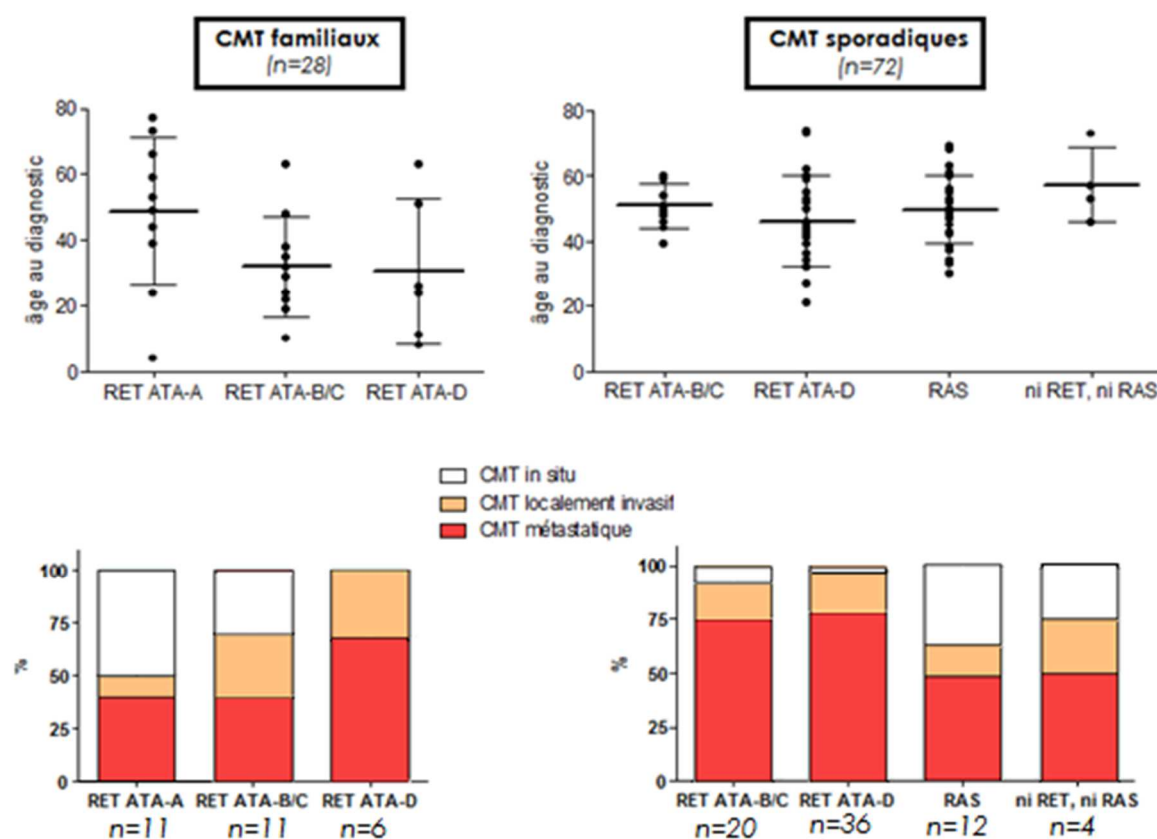
L'analyse de cette importante cohorte au regard de **critères d'agressivité** tels que l'âge au diagnostic ou le stade d'extension anatomique (classification TNM) confirme l'**impact phénotypique des mutations RET et RAS** dans le développement du CMT (Figure 19).

Dans le cas des **CMT héréditaires** - dont l'histoire familiale permet l'établissement d'un diagnostic précoce (âge moyen = 38 ans dans notre collection) - les phénotypes les plus agressifs sont observés chez les patients porteurs d'une **mutation RET de risque ATA-D** (codons 918 ou 883 – syndrome familial NEM2b). Pour cette sous-population, l'âge d'apparition des symptômes pathognomoniques est estimé à **30 ans** (contre 49 ans pour le groupe ATA-A) , et tous les cas sont d'**emblée invasifs**.

Les **CMT sporadiques** sont découverts plus tardivement (49 ans en moyenne). Les cas les plus invasifs sont observés parmi les patients porteurs d'une **mutation somatique RET, quelle que soit sa classification**. Les CMT porteurs d'une mutation RAS semblent présenter des caractéristiques cliniques d'agressivité semblables aux tumeurs non mutées RET ou RAS.

En conclusion, nous avons confirmé la présence de mutations oncogéniques RAS dans la quasi-totalité des tumeurs CMT non mutées pour RET. Ces variants paraissent mutuellement exclusifs, et constituent les 2 événements oncogéniques précoces majeurs du CMT. Contrairement à d'autres types tumoraux, et bien que peu de couples tumeur primitive/métastase aient été étudiés, l'hétérogénéité moléculaire intra- et inter-tumorale semble donc restreinte dans cette pathologie et met en lumière des caractéristiques de réponse aux traitements distinctes. Cet argument permet d'imaginer des projets thérapeutiques ciblés utilisant, en sus des ITK en cours d'essai, des molécules capables d'inhiber RAS ou les voies en aval de RAS, comme les inhibiteurs de BRAF, de MEK ou encore de mTOR.

Enfin, nous devons préciser que si l'implication de ces oncogènes dans le développement tumoral est maintenant confirmé (les modèles murins sur-exprimant HRAS développent spontanément un CMT), ceux-ci n'expliquent pas la variabilité phénotypique inter-tumorale observée.

FIGURE 19 : IMPACT PHÉNOTYPIQUE DES MUTATIONS *RET* ET *RAS* DANS NOTRE COHORTE DE CMT

3.3. ANALYSE DES ANOMALIES CHROMOSOMIQUES DES CMT

3.3.1. Etat des connaissances : altérations chromosomiques connues

Comparativement à d'autres types de tumeurs telles que les cancers colorectaux, les autres tumeurs épithéliales ou encore les cancers héréditaires impliquant un défaut de réparation de l'ADN, l'instabilité chromosomique paraît réduite dans les CMT. En règle générale, peu d'anomalies de grande ampleur y sont détectées et leur sensibilité au niveau des sites fragiles et/ou aux agents clastogènes est limitée.

Les premiers caryotypes ont été établis en 1981 sur des tumeurs d'origine familiale (NEM2A et NEM2B). Ils ont montré une prépondérance d'aberrations de type dicentriques ou acentriques, ainsi qu'une présence en nombre important de marqueurs chromosomiques (fragments génomiques non identifiables) (Hsu et al., 1981). Selon Wurster-Hill et al., le nombre modal de chromosomes dans le CMT est compris entre 42 et 44, correspondant à un profil de type **hypodiploïde** (Wurster-Hill et al., 1986)(Wurster-Hill et al., 1990). Les caryotypes des tumeurs primitives et des métastases associées sont très ressemblants, suggérant une apparition précoce des anomalies chromosomiques dans le processus oncogénique. En 1987 déjà, (Mathew et al., 1987) décrit 2 anomalies majeures précoces dans le CMT : la liaison génétique de marqueurs polymorphes situés en région centromérique du chromosome 10 (locus ayant permis le clonage ultérieur du gène RET) et la délétion distale du bras court du chromosome 1 (point de cassure décrit en 1p32).

Les études par CGH (Comparative Genomic Hybridization) précisent que ces anomalies quantitatives consistent essentiellement en des **pertes alléliques (pertes d'hétérozygotie) au niveau des bras 1p, 3q, 4q, 7q (7q36.1), 13q (13q12.11), 19p (19p13.3) et 22q**, et sont retrouvées indifféremment dans les formes héréditaires et sporadiques de CMT (Mulligan et al., 1993a)(Frisk et al., 2001)(Marsh et al., 2003). Une délétion en 11q23.3 serait associée spécifiquement aux formes non mutées pour RET (Ye et al., 2008). Une microdélétion (ou délétion-minute) du bras court du chromosome 20 (en 20p12.2) a longtemps été discutée mais n'a été que très rarement confirmée (Goodfellow et al., 1985)(Le Coniat et al., 1987)(Butler et al., 1987). Des **gains en 19q, 19p et 11q** seraient observés dans les CMT sporadiques (Frisk et al., 2001)(Marsh et al., 2003).

Très récemment, une étude par CGH-array très résolutive et réalisée sur une large collection de tissus (52 tumeurs primitives, 10 métastases et 5 lignées cellulaires) a confirmé

l'ensemble de ces descriptions, notant en revanche une plus large proportion de **gains dans les tissus métastatiques** (au niveau des chromosomes 6, 7, 15, 16 et 19) (Flicker *et al.*, 2012).

Enfin, de rares translocations équilibrées, uniques et clonales ont été décrites dans la littérature, faisant intervenir les chromosomes 3/7, 17/22, 9/12 et 10/16 (Scappaticci *et al.*, 1992).

Un travail antérieur de notre équipe, réalisé sur 21 échantillons prélevés sur des souris porteuses d'une mutation germinale *RET*⁶³⁴ (8 hyperplasies, 12 carcinomes, 1 métastase) et consistant en une analyse par puce CGH, a montré que des aberrations chromosomiques étaient présentes dès le stade hyperplasique précoce. Ces anomalies concernent les chromosomes murins entiers 1, 4 et 5. La perte d'une partie terminale du chromosome 4 murin (région strictement synténique au locus 1p31 à 1p36 chez l'Homme – Figure 20) est observée dans la totalité des tissus. Le nombre de délétions augmente avec la progression tumorale, et le tissu métastatique est le seul à présenter des gains de matériel (au niveau des chromosomes 7, 10, 11, 15 et 19) (données non publiées).

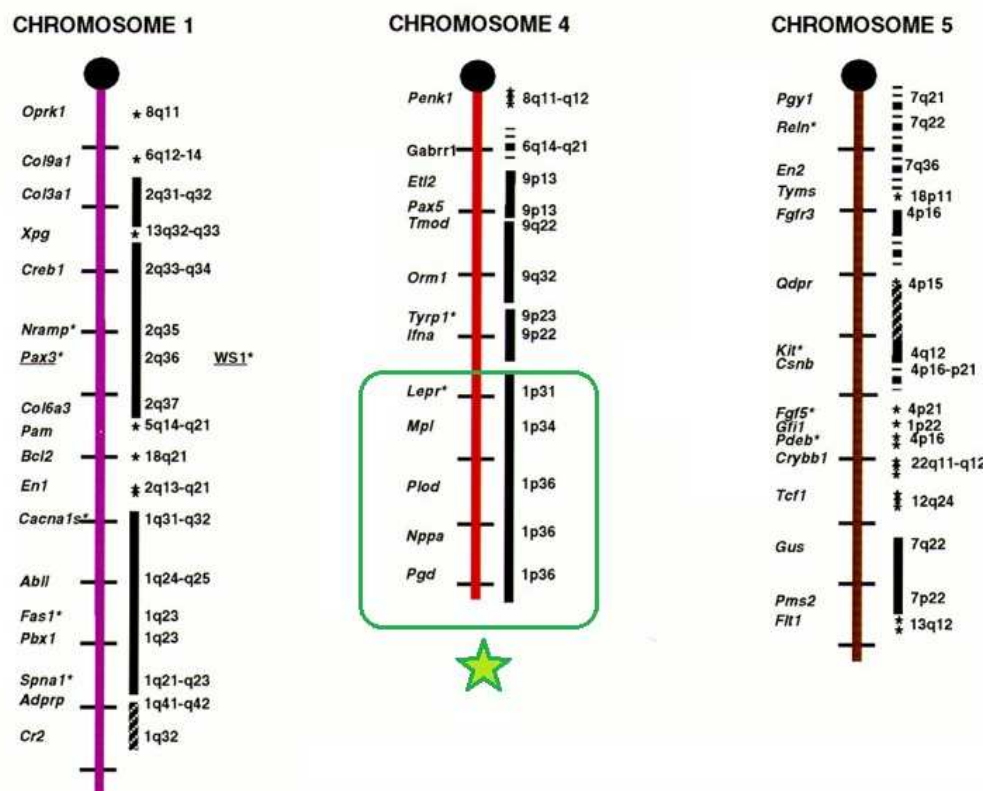


FIGURE 20 : CHROMOSOMES PERDUS DANS LE MODÈLE DE CMT MURIN *RET*⁶³⁴

Modifié de (Carver and Stubbs, 1997)

La synténie au génome humain est représentée à droite de chacun des chromosomes.

3.3.2. Travaux personnels

3.3.2.1. Objectifs

Au même titre que les mutations somatiques ponctuelles, les anomalies chromosomiques peuvent jouer un **rôle causal** dans le processus oncogénique, par délétion de gènes suppresseur de tumeurs ou par amplification d'oncogènes. *A contrario*, celles-ci peuvent être secondaires, **conséquences d'une altération du processus mitotique** (lors de la ségrégation anaphasique ou de la disjonction en cellules-filles) **ou de maintien du génome** (contrôle du cycle cellulaire, réparation des cassures). Dans ce cas, les points de cassures permettent la mise en lumière de régions chromatiniennes actives (en cours de transcription) spécifiques au type cellulaire étudié.

Concernant le CMT, ces anomalies semblent impacter des locus de grande ampleur (chromosomes ou bras entiers), apparaître de manière précoce, n'être pas liées à un processus d'instabilité chromosomique global (seuls quelques chromosomes sont concernés), être identiques entre le site primitif et les métastases à distance et être stables au cours des divisions. Ces critères nous orientent donc préférentiellement vers un rôle causal de ces anomalies.

Très peu d'études ont tenté d'établir un lien entre les variations de nombre de copies et les critères diagnostiques et pronostiques du CMT, comme par exemple les mutations ponctuelles *RET/RAS* et le pouvoir métastatique évalué par la classification TNM. La démocratisation des techniques de puces CGH et la mise à notre disposition d'une importante collection de tumeurs congelées (permettant l'extraction d'ADN intègre nécessaire à cette méthode), nous ont permis d'**établir le profil chromosomique d'une large cohorte de CMT**, pour lesquels nous disposons d'informations cliniques complètes.

Ainsi, les objectifs de cette étude étaient de vérifier les types, les spécificités et les fréquences d'apparition des anomalies chromosomiques à partir d'un grand nombre d'échantillons, et de définir des locus d'intérêt permettant une meilleure compréhension de l'oncogenèse du CMT.

3.3.2.2. Matériel et méthodes

Dans un premier temps, 5 tumeurs provenant de **cas familiaux mutés *RET*⁶³⁴** (1 homme, 4 femmes - >90% de cellules tumorales) ont été analysées sur la plateforme de l'Unité de Génomique Fonctionnelle de l'Institut Gustave Roussy (plateforme Agilent Technologies,

puces Human Genome CGH microarray 44K). Pour 2 de ces tumeurs, le tissu normal contre-latéral a été utilisé comme référence. Les 3 autres échantillons ont été appariés à des standards humains commerciaux de même sexe.

Par la suite et dans le cadre d'une collaboration internationale de grande ampleur (plus de **100 tumeurs analysées au total**, réunissant des échantillons provenant de l'Université de Washington, du National Institute of Health américain et de l'Institut Gustave Roussy), 29 tumeurs primitives ont été analysées sur le même type de plateforme. Parmi ces tumeurs, 5 correspondaient à des carcinomes d'origine familiale et 24 étaient des cas sporadiques. 9 tumeurs étaient strictement localisées à la glande thyroïde, et 20 présentaient une dissémination ganglionnaire, dont 6 au moins avec des métastases tissulaires avérées. 9 tumeurs portaient une mutation dominante *RAS*, 19 une mutation *RET* (dont 13 mutations appartenant au groupe à haut risque ATA-D). Une seule tumeur semblait exempte de mutations *RET/RAS*.

3.3.2.3. Résultats

❖ Tumeurs de type *NEM2a*

Une perte d'hétérozygotie d'une partie ou de la totalité du bras court du chromosome 1 a été observée dans 4/5 tumeurs familiales mutées *RET*⁶³⁴. Cette très grande région (>91Mb) est comprise entre les bandes cytogénétiques p36.13 et p13.3 (position chr1:19010985-110464710 – génome de référence GRCh37/hg19), entre les gènes ***PAX7*** et ***CSF1***. 2/4 tumeurs de génotype initialement féminin (X,X) ont **perdu un chromosome X entier**. D'autres anomalies telles que les larges délétions 3q, 4, 7p, 7q et 10q ou les gains de chromosomes entiers 6, 8, 17, 18 et 20 semblent être plus sporadiques (Figure 21).

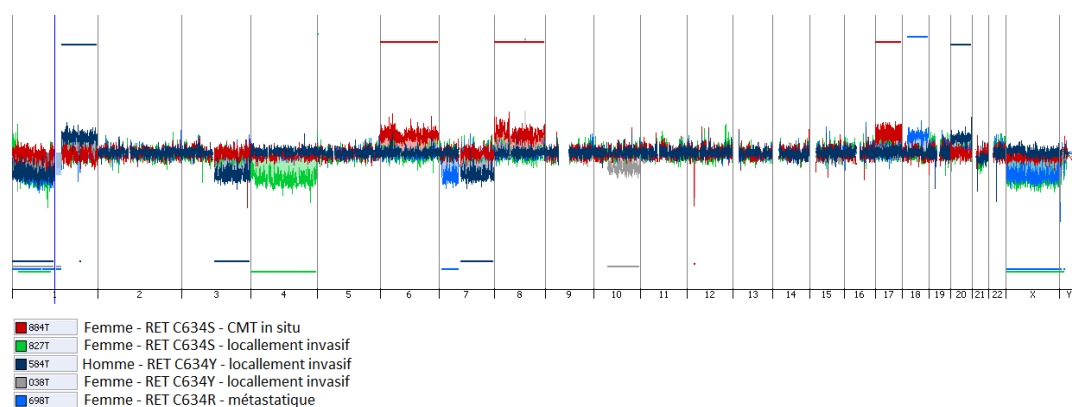


FIGURE 21 : DIAGRAMME DU NOMBRE DE COPIES CHROMOSOMIQUES OBSERVÉES PAR CGH DANS 5 TUMEURS PRIMITIVES HÉRÉDITAIRES MUTÉES EN *RET*⁶³⁴

Diagramme non cumulatif. Comparaison à un standard de même sexe, après normalisation sur la ploïdie globale.

❖ *Cohorte non sélectionnée de tumeur*

L'analyse de la cohorte de 29 CMT révèle des anomalies de grande ampleur de type délétions au niveau du **bras court du chromosome 1 (34% des cas)**, du **bras long du chromosome 22 (31%)** et la **perte du chromosome 4 entier (14%)**. Ces pertes ne semblent pas être spécifiquement reliées aux caractéristiques cliniques telles que le sexe, le mode de transmission du CMT, la mutation somatique majeure *RET/RAS* ou le pouvoir métastatique de la tumeur. La perte du chromosome 4 est toujours observée en cas de délétion 1p, alors que la perte 22q semble être indépendante.

En revanche et comme cela avait été décrit dans les modèles murins, les **gains de matériel ne sont observés que dans les tumeurs les plus agressives**, pour lesquelles une métastase à distance a été retrouvée de manière certaine. Il s'agit, dans la majorité des cas, d'un gain du bras long du chromosome 1 ou des chromosomes entiers 6, 7, 8 et 16 (Figure 22). Dans cette étude, aucune conclusion ne peut être apportée concernant les chromosomes sexuels.

3.3.2.1. Résultats complémentaires

L'analyse des lignées cellulaires TT et MZ-CRC1 par séquençage de nouvelle génération de type exome-entier a permis l'élaboration de leurs cartes chromosomiques, par quantification (profondeurs de lecture) des marqueurs localisés sur la totalité du génome.

Pour rappel, la caractérisation initiale de la lignée TT réalisée sur des passages précoces par (Leong et al., 1981) avait rapporté des cellules hypodiploïdes (nombre modal 37-44) présentant un caryotype relativement stable, avec des délétions distales de chromosomes impliquant les points de cassures suivants : **1p36, 3p12, 5q33, 7q22- 7q31, 8q24, 9p13, 10q25, 11p13, 12p13 et 20q13**. Après xénogreffe sur souris immunodéficiente, la population cellulaire se scinde en 2 clones distincts, présentant respectivement des nombres modaux de **37-44** et **78-80**. Cette hyperploïdie secondaire serait la résultante d'une endoréplication (ou endomitose), mécanisme de conservation de l'intégrité du génome engendré par l'accumulation de pertes chromosomiques.

Selon (Cooley et al., 1995), la lignée MZ-CRC1 présenterait un nombre modal de **64-82**, stable au cours des passages. Les principales anomalies structurales (pertes essentiellement) se situent au niveau des chromosomes **1p, 2p, 6p, 7q, 8q, 9p 10p, 11p, 19q et 21q**.

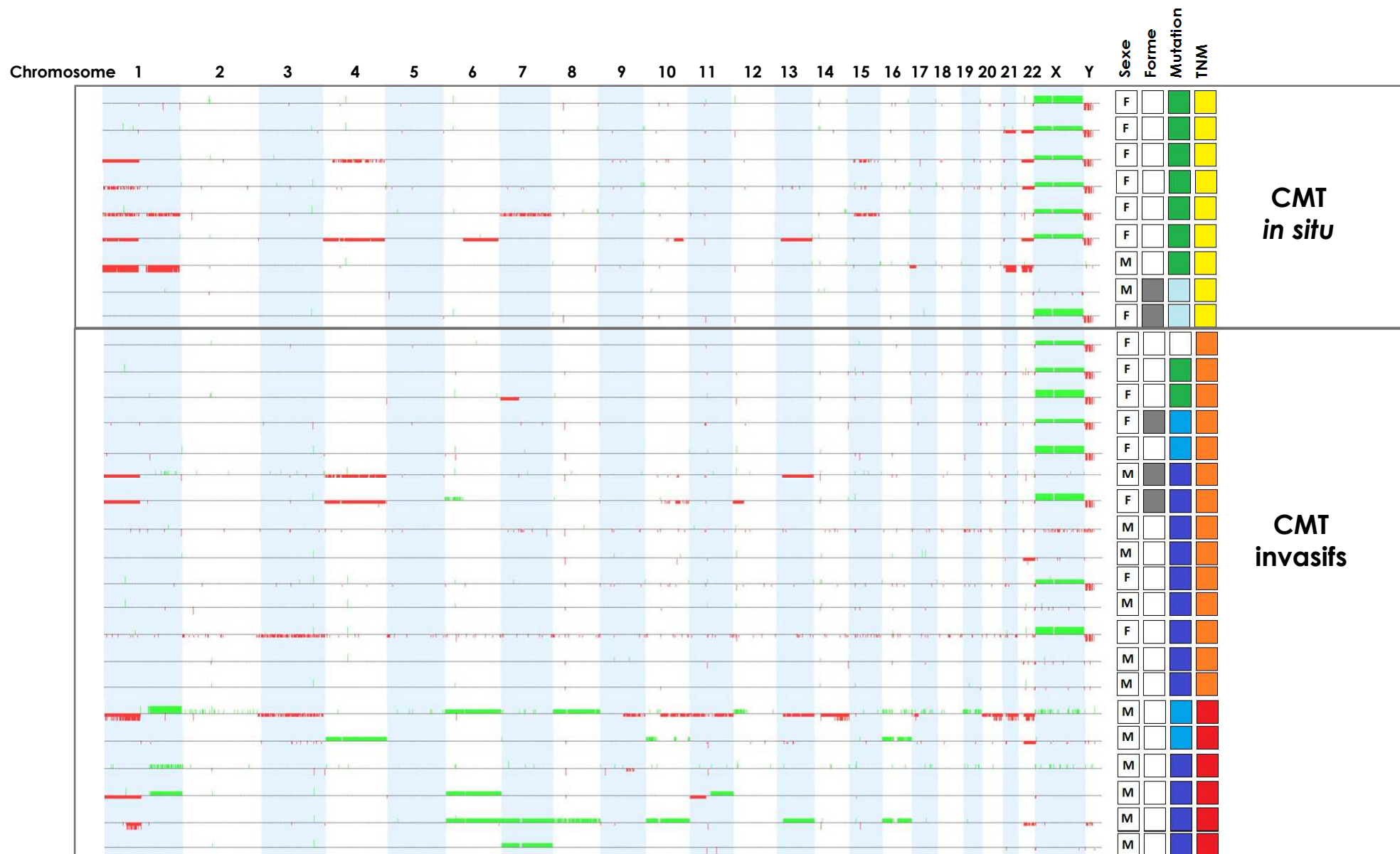


FIGURE 22 : ANOMALIES CHROMOSOMIQUES PRÉSENTÉES PAR UNE SÉRIE DE 29 TUMEURS PRIMITIVES

Tumeurs classées en fonction de leur agressivité.

Code couleur : gris=CMT familial / blanc = CMT sporadique ; vert = mutation RAS / bleu clair à foncé = mutation RET ATA-A à D / blanc = ni RET ni RAS ; jaune = CMT localisé / orange = CMT invasif / rouge : métastase à distance avérée

Lors de notre analyse, nous avons retrouvé (Figure 23):

- pour la lignée TT à des passages tardifs : les délétions 1p, 3p, 4p distal, 5q distal, 8p et 9 entier ainsi que les gains 1q, 3q partiel, 5q distal, 8q et 12p distal ;
- pour la lignée MZ-CRC1 (nombre de passages inconnu) : les délétions 1p partiel, 2p distal, 3 entier, 6q partiel, 9 partiel, 13 entier et 22 entier.

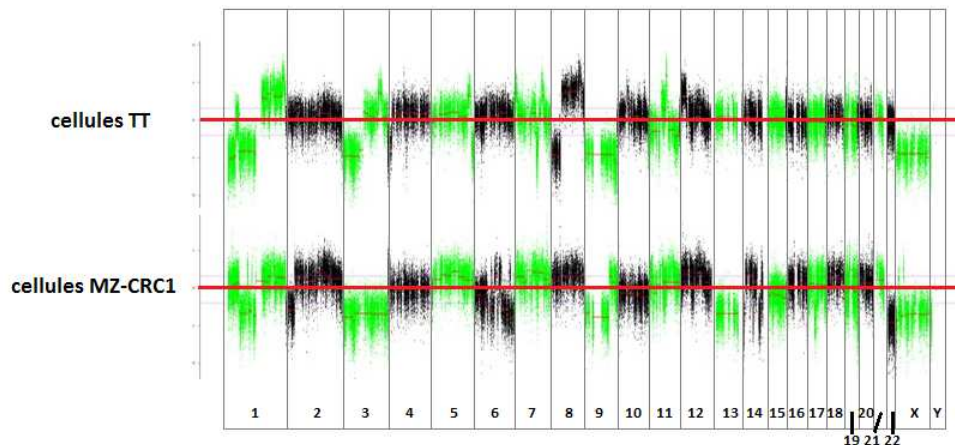


FIGURE 23 : DIAGRAMME DU NOMBRE DE COPIES CHROMOSOMIQUES OBSERVÉES PAR NGS DANS LES MODÈLES CELLULAIRES TT ET MZ-CRC1

3.3.3. Discussion

Ainsi, nous avons obtenu le profil chromosomique de 34 tumeurs primitives et de 2 lignées cellulaires issues de tumeurs humaines. Nous avons retrouvé les pertes d'hétérozygoties décrites par (Mulligan *et al.*, 1993a), et dans des proportions similaires : **-1p (34%), -11p (7%), -13q (10%), -17p (7%) et -22q (31%)** (Table 7). Seule la délétion du chromosome 3 n'a pas été retrouvée.

Chez l'Homme, les anomalies redondantes précoces et spécifiques semblent donc se restreindre à la perte du bras court du chromosome 1 et au bras long du chromosome 22. Une co-délétion 1p-4 est observée dans 14% des cas.

Les amplifications/gains présentés par les tumeurs à haut risque semblent apparaître de manière plus aléatoire et peuvent être attribués à un phénomène d'instabilité globale. Parmi les locus concernés, nous distinguons les fragments 1p, 7q et 8q ; fréquemment amplifiés dans les cancers de tous types. Hormis cette caractéristique, aucune autre anomalie chromosomique ne peut être reliée aux critères cliniques en notre possession (statut mutationnel ponctuel *RET/RAS*, transmission familiale, sexe, classification histologique TNM).

Méthode	Conclusions	Références
Caryotype	dicentrics, acentrics et marqueurs chromosomiques	Hsu et al., 1981
	n=(42-44)	Wurster-Hill et al., 1986
	association des anomalies en 10 et perte 1p32-pter	Mathew et al., 1987
aCGH	-1p, -3q, -4q, -7q, -13q, -19p, -22q, +19q, +19p, +11q	Mulligan et al., 1993 Frisk et al., 2001 Marsh et al., 2003
	(souris) -1, -4, -5, +7, +10, +11, +15, +19	Ameur (non publié, 2008)
	-1p (1p36.13 à 1p35.1 - 34%), -11p (7%), -13q (10%), -17p (7%) et -22q (31%)	Boichard (non publié, 2014)
	gains associés aux métastases	Flicker et al., 2002

TABLE 7 : ANOMALIES CHROMOSOMIQUES ET CMT – REVUE DE LA LITTÉRATURE ET SITUATION DU TRAVAIL

❖ Monosomie 22

Le chromosome 22 est le plus petit chromosome humain. Acrocentrique, son bras court ne contient aucune séquence codante et est donc souvent omis des analyses. Une perte du bras long entier peut donc être assimilée à une monosomie de ce dernier.

Si des délétions partielles du chromosome 22 sont retrouvées dans un grand nombre de cancers (pertes distales ou télomériques essentiellement), la perte complète de ce dernier reste un événement peu fréquent en pathologie moléculaire et semble spécifique aux tumeurs d'origine neurale.

Dans la **neurofibromatose de type 2**, la monosomie 22 est comparable aux autres altérations impliquant le gène *NF2* (localisé en 22q12.2), sans nécessité de mutation ponctuelle de celui-ci (Seizinger et al., 1986). Cette anomalie est également retrouvée dans les **méningiomes isolés** et les **schwannomes** (Zang and Singer, 1967)(Seizinger et al., 1987)(Bijlsma et al., 1992).

Plus d'un tiers des **astrocytomes** et des **glioblastomes** seraient porteurs d'une perte complète ou partielle du chromosome 22 (Hartmann et al., 2004)(Ino et al., 1999). Dans ces tumeurs, la plus petite région délétée est comprise entre les marqueurs polymorphiques D22S280 (22q12.3 - gènes *SYN3/TIMP3*) et D22S282 (22q13.31 – gène *MPPED1*) et comprend – entre autres - les gènes *MN1*, *MB*, *DMC1*, *PDGFB* et *MKL1*. Cette région est distincte de la région télomérique impliquée dans les cancers du sein et des ovaires (Castells et al., 2000). Enfin, en 22q11.21 (région centromérique) se situe un locus de cassure bien défini : le gène *BCR* (*Breakpoint Cluster Region*), impliqué dans la translocation équilibrée t(9 ;22) des leucémies myéloïdes chroniques (chromosome Philadelphie).

Dans notre cohorte, la perte du chromosome 22 est retrouvée dans **38%** et de manière isolée dans près de 10% des cas. Dans la collection présentée ici, cette délétion n'est

observée que dans les cas sporadiques. À ce jour, aucun mécanisme expliquant cette délétion précoce n'a été énoncé. Le chromosome 22 n'étant composé que de courts blocs de correspondance synténique avec la souris (bandes cytogénétiques 16B, 10C, 5F, 11A et 15E), nous ne pouvons établir de lien avec les résultats obtenus dans le modèle murins *RET*⁶³⁴ (Figure 24). La délétion du chromosome 22 dans les carcinomes médullaires de la thyroïde avait précédemment été rapportée par plusieurs auteurs, décrivant des **proportions allant de 5% (étude réalisée sur des CMT familiaux uniquement) à 36% des tumeurs** (Khosla et al., 1991)(Tanaka et al., 1992)(Mulligan et al., 1993a)(Marsh et al., 2003).

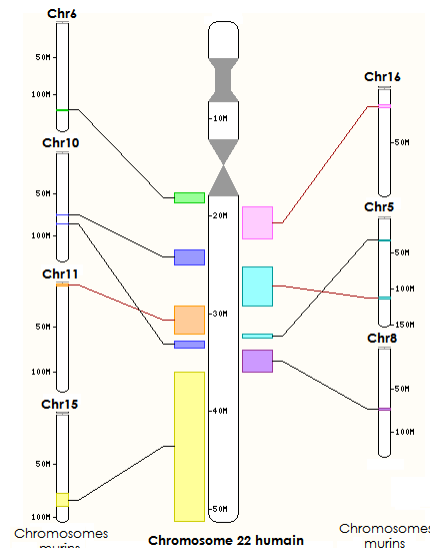


FIGURE 24 : SYNTÉNIE DU CHROMOSOME 22 HUMAIN ET DE SES HOMOLOGUES MURINS

❖ Délétion 1p

La délétion du bras court du chromosome 1 est un **évènement somatique tumoral fréquent**. Il est retrouvé dans certaines tumeurs épithéliales (thyroïde, colorectum, sein, col de l'utérus), dans les tumeurs lymphoïdes (leucémies myéloïdes, lymphomes non-Hodgkinien) et également dans les tumeurs neuro-associées (phéochromocytomes, neuroblastomes, méningiomes, oligodendrogliomes et autres gliomes).

Dans les **neuroblastomes**, un locus de délétion commun à un grand nombre de tumeur a été défini en 1p36.3 (région télomérique), qui est alors devenu un 'hotspot' d'intérêt pour la découverte de nouveaux gènes suppresseurs de tumeurs (Bagchi and Mills, 2008)(White et al., 2005). Cette anomalie serait préférentiellement associée à l'**amplification de MYCN** (en 2p24.3) et est considérée comme un marqueur pronostique des neuroblastomes à haut risque (Fong et al., 1989). Elle n'est pas liée au mécanisme d'empreinte parentale, les allèles d'origine paternelle ou maternelle étant indifféremment perdus (Hogarty et al.,

2002). Elle engendre une perte de fonction de **CHD5** (*Chromodomain Helicase DNA-binding protein 5* - en 1p36.31), protéine remodelante de la chromatine spécifiquement requise pour la neurogenèse (Fujita et al., 2008)(Thompson et al., 2003)(Koyama et al., 2012). **CHD5 médie, via les protéines Polycomb, l'expression du locus INK4/Arf** (ou CDKN2A – situé sur le chromosome 9). La perte de CHD5 entraîne alors une diminution de l'activation des voies p16^{INK4}/Rb et p19^{Arf}/p53, régulatrices du cycle cellulaire.

La délétion du locus 1p36 peut également être observée au niveau germinale (il s'agit de la perte chromosomique partielle congénitale la plus fréquente). Elle entraîne le **syndrome de délétion 1p36**, caractérisé par un fort retard de croissance, une déficience intellectuelle modérée à sévère possiblement associée à des malformations cérébrales, une hypotonie, des dysmorphies et malformations diverses ainsi qu'une susceptibilité accrue aux néoplasies (neuroblastomes, mélanomes, cancers épithéliaux et lymphomes). Cette symptomatologie diffère en fonction du point de cassure, toujours situé entre les bandes 1p36.13 et 1p36.33.

Dans les **phéochromocytomes** (qu'ils soient associés ou non à un syndrome familial NEM2a), la perte du bras court du chromosome 1 peut être complète ou partielle. Les cas de délétions partielles mettent en lumière **3 régions consensus de délétion** : le locus télomérique 1p36 (gènes *HES2-5*, *CCNL2*, *TP73*, *CHD5*, *CASP9*, *EPHA2*, *SDHB*, *PAX7* et *NBL1* entre autres), une région proximale avec un point de cassure commun en 1p32.3 (*CDKN2C*, *PCSK9*) et la région centromérique 1cen-1p13 (gènes *VAV3*, *PTPN22*, *NRAS*, *TSHB*, *NGF*, *NHLH2*, *TTF-2*, *REG4*, *NOTCH2*) (Aarts et al., 2006)(Benn et al., 2000). A l'instar de ce que nous observons dans le CMT, celles-ci sont **possiblement accompagnées de pertes du chromosome 22** (Shin et al., 1993).

L'analyse de notre cohorte de CMT confirme la **perte d'hétérozygotie partielle du chromosome 1**. Si cette observation a quelques fois été décrite dans la littérature (elle concernerait, selon les auteurs, entre 10 et 40% des CMT) (Yang et al., 1990b)(Khosla et al., 1991)(Kubo et al., 1991)(Mulligan et al., 1993a)(Moley et al., 1992)(Marsh et al., 2003), les points et le nombre de cassures impliqués n'ont jamais été précisément définis.

La comparaison des résultats obtenus par puce CGH entre notre modèle de progression tumorale murin (hyperplasies et CMT issus de souris *RET*⁶³⁴) et des tumeurs humaines présentant la même anomalie *RET* permet de définir un locus commun de délétion. En effet, le chromosome murin 4 et la partie distale du bras court du chromosome humain 1 présentent une très forte homologie de séquence. La superposition du locus délété chez l'Homme (chr1:19010985-110464710) à celui perdu dès les stades précoces de la

tumorigenèse murine (chr4 : 128884140-148626996 – référence GRCm38/mm10) rapporte une **région d'intérêt de 15Mb, comprise entre les gènes PAX7 et TRIM62 (chr1:19010985-33647671) et correspondant aux bandes 1p36.13 à 1p35.1. Cette région ne comprend pas la séquence CHD5, mais révèle un grand nombre d'autres gènes d'intérêts, tels que HDAC1, BAI3, NBL1, CDA, PINK1, SH2D5, NBPF3, CDC42, WNT4, EPHA8, FGR, EPHB2, E2F2, GRHL3, RUNX3 et TRNP1** (Figure 26).

Il faut pourtant souligner que la perte distale 1p36 ne paraît pas systématique (exemple des cellules MZ-CRC1). Comme dans les phéochromocytomes, il existerait dans ce type de tumeurs **au moins 2 régions de délétions distinctes**, impliquant les régions distale ([Yang et al., 1990b](#)) et centromérique ([Marsh et al., 2003](#)).

Nous remarquons que dans certaines tumeurs, le chromosome 1 est dichotomisé : le bras court et le centrosome sont délétés alors que le reste du chromosome est amplifié. La région de cassure, très comparable entre les tumeurs, concerne une bande de 22kb (chr1:145104076-145125198) localisée au niveau des gènes **SEC22B** et **NBPF9** (*Neuroblastoma BreakPoint Family member 9*). Le même point de cassure a été observé dans la lignée TT, mais la méthode utilisée ne permet pas une analyse fine de la région centromérique (technique NGS basée sur l'étude des parties codantes uniquement). Dans ce cas, le premier locus apparaissant amplifié sur le bras long du chromosome 1 est le gène *PDE4DIP* (*alias CDK5-regulatory subunit associated protein*), situé dans les régions non codantes de *NBPF9*, à 200kb du gène *SEC22B*.

Les **gènes NBPF**, dupliqués de nombreuses fois sur le chromosome 1 (plus de 20 paralogues situés en 1p36.12-13, 1p13.3 et 1q21 ([Vandepoele et al., 2005](#))) ne présentent pas d'orthologues dans le génome murin. Ils seraient apparus tardivement au cours de l'évolution - leur fonction demeurant inconnue - et seraient impliqués dans le développement cérébral des primates, ce qui pourrait expliquer l'absence d'observation similaire chez la souris. Le premier membre de cette famille découvert est *NBPF1*, situé en 1p36.13 et nommé ainsi en raison de sa localisation au niveau d'un site de cassure commun à de nombreux neuroblastomes.

Notons que la délétion 1p fréquemment rencontrée conduit à une perte allélique de *NRAS* (situé en 1p13.2), paraglogue de *KRAS* et *HRAS* dont nous ne connaissons pas les conséquences pour le moment. Il a été montré qu'**une perte de NRAS additionnelle à la perte de fonction de RB1 (pRB – protéine du rétinoblastome) induit, dans des cellules de CMT, une augmentation de leur pouvoir métastatique** ([Takahashi and Ewen, 2006](#)) ([Takahashi et al., 2006](#)).

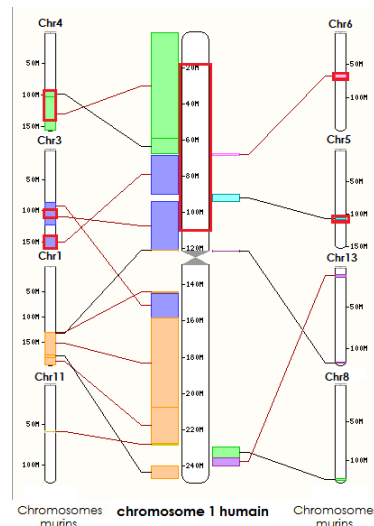


FIGURE 25 : SYNTÉNIE DU CHROMOSOME 1 HUMAIN ET DE SES HOMOLOGUES MURINS

❖ *Co-délétion 1p/4*

Enfin, si une codélétion 1p-19q a été clairement documentée dans les gliomes (oligodendrogliomes essentiellement) (*Perry et al., 2003*) (*Weller et al., 2007*), il n'existe en revanche, à notre connaissance, aucune description de codélétion 1p-4 dans d'autres types tumoraux. Cette dernière semble donc très spécifique au CMT.

La délétion du chromosome 4 entier isolée est un événement très rare, décrit dans des cancers du col utérin (*Narayan et al., 2009*) et des cancers du sein hypodiploïdes présentant une **amplification du gène de la cycline D1** (*Tanner et al., 1998*). Le chromosome 4 n'est pas soumis à l'empreinte parentale (mécanisme régulateur pouvant expliquer la perte de chromosomes entiers) et n'est pas spécifiquement impliqué dans des anomalies de disjonction mitotique. Selon Marsh *et al.*, une monosomie 4 s'observerait dans **18% des CMT** (*Marsh et al., 2003*), donnée similaire à ce que nous avons obtenu dans cette étude (4/29 tumeurs)

En conclusion, nous avons établi le profil chromosomique de 34 tumeurs, et avons observé une forte proportion de tissus présentant une perte du bras court du chromosome 1. Cette région comprend de très nombreux gènes d'intérêt, codant pour des effecteurs des voies de transduction et de régulateurs du cycle cellulaire. Elle est également très fortement conservée, et la synténie Homme/souris révèle de grands fragments d'homologie, suggérant des locus chromatinien structuraux et fonctionnels d'importance.

A l'heure actuelle, il n'existe aucune étude des mécanismes additionnels d'inactivation des gènes situés au niveau des locus d'intérêt ainsi définis dans les tumeurs de type CMT.

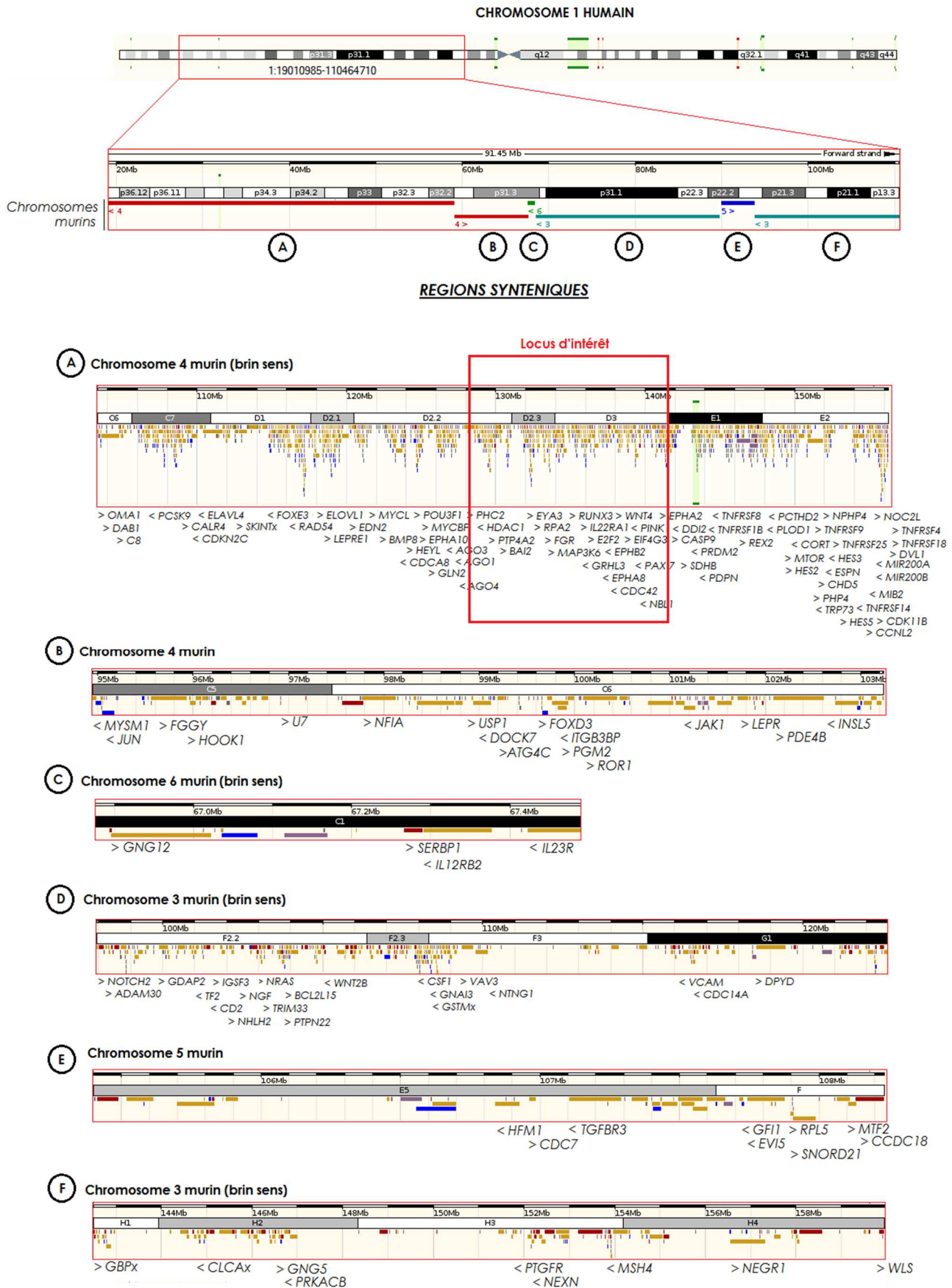


FIGURE 26 : RÉGION DU CHROMOSOME 1 DÉLÉTÉE CHEZ L'HOMME ET SYNTÉIE À LA SOURIS

- Partie 4 -

**GENOMIQUE FONCTIONNELLE ET
IMPLICATION DE LA VOIE MICROARN
DANS LE CMT**

4.1. INTRODUCTION

4.1.1. Génome, synthèse protéique et ARN non-codants

La génomique est une discipline biologique qui, par l'analyse globale du génome d'un organisme ou d'une cellule, tente d'en définir le fonctionnement. Il existe deux approches complémentaires d'analyse du génome :

- La **génomique structurale**, qui vise à définir l'architecture et l'organisation du génome. Il s'agit d'une observation qualitative de celui-ci et les anomalies recherchées sont toujours définies par comparaison à une référence.
- La **génomique fonctionnelle**, qui étudie le rôle du génome et de ses produits dans les processus biologiques, et notamment comment les régulations d'expression déterminent la destinée d'une cellule ou d'un organisme. Il s'agit d'une notion quantitative ou semi-quantitative, à un instant donné et possiblement comparable entre les observations.

❖ *RELATION STRUCTURE-FONCTION DU GENOME*

Un **gène** est défini comme une entité d'ADN présente dans toutes les cellules de l'organisme et permettant la **synthèse d'une protéine**, par transcription nucléaire d'un ARN messager (ARNm) puis maturation et traduction cytoplasmiques de celui-ci. Les parties du génome non utilisées pour la production de polypeptides ont été, pendant très longtemps, considérées comme de l'ADN « inutile » (*junk-DNA*) (*Ohno, 1972*). La mise en lumière d'un rôle régulateur des régions intergéniques et la découverte d'ARN intervenant dans la régulation des fonctions cellulaires sans jamais être traduits en protéines ont rendu cette notion obsolète (*Davidson et al., 1977*).

Au début des années 2000, les développements technologiques en matière de biologie moléculaire ont permis de mesurer l'importance et la diversité - en termes de structure, de localisation et de fonction - de ces ARN (*Mattick, 2001*). Débuté en 2003, un projet international visant à définir la totalité des séquences codantes contenues dans le génome humain (projet ENCODE - *ENcyclopedia Of DNA Elements*), a démontré que le terme d'ADN « poubelle » était très mal à propos : en effet, **plus de 80% du génome serait doté d'une fonction biochimique** (*ENCODE Project Consortium et al., 2007*). Ainsi, le génome humain présenterait plus de 65000 unités de transcription, dont moins d'un tiers coderait *in fine* pour une protéine (*Wright et al., 2001*) (*Consortium, 2004*), les autres transcrits formant le super-famille des **ARN non-codants**.

❖ FAMILLES D'ARN NON-CODANTS

Différents types d'ARN non-codants endogènes ont été décrits (Figure 27). Les plus communs sont :

- Les **ARN ribosomiques (ARNr)** ou ribozymes, constituants principaux des ribosomes (*McCarthy and Aronson, 1961*) et dotés d'une activité catalytique (*Kruger et al., 1982*) (*Guerrier-Takada et al., 1983*) ;
- Les **ARN de transfert (ARNt)**, utilisés au cours de la traduction par les ribosomes. Ils jouent le rôle d'adaptateurs entre l'information génétique nucléotidique et les acides aminés protéiques (*Holley et al., 1965*) ;
- Les **petits ARN nucléaires (snARN)**, contenus dans les spliceosomes et catalysant l'épissage des ARN messagers ; ainsi que les **petits ARN nucléolaires (snoARN)**, entrant en jeu lors de la maturation des ARN ribosomiques (*Kiss, 2002*) (*Matera et al., 2007*) ;
- Les **ARN interagissant avec les protéines piwi (ARNpi)** bloquant l'activité des transposons et des rétroéléments endogènes (*Girard et al., 2006*) et les **longs ARN non codants (lncARN)**, de fonction encore malconnue (*Derrien et al., 2012*).
- Et enfin les **microARN (miARN ou miR)**, permettant la régulation de l'expression génique par complémentarité aux ARNm. Ces derniers faisant l'objet de ce travail seront décrits plus en détails dans le chapitre suivant.

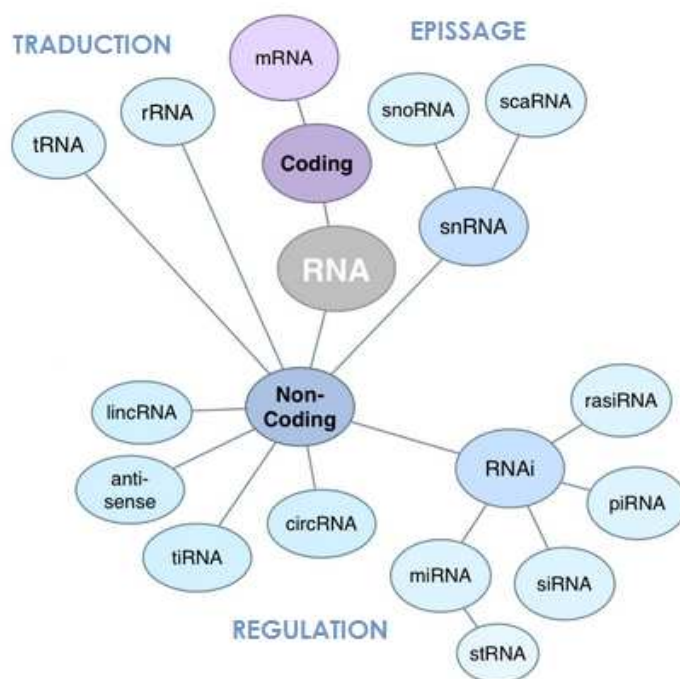


FIGURE 27 : LES DIFFÉRENTES CLASSES D'ARN ET LEURS IMPLICATIONS FONCTIONNELLES

4.1.2. Spécificités des microARN

Les microARN sont des **petits ARN non codants endogènes** d'une vingtaine de nucléotides, capables d'inhiber - par **appariement complet ou partiel** - un ARNm après sa transcription. Ces petits acides nucléiques semblent jouer un rôle physiologique majeur, d'une part puisqu'ils seraient impliqués dans quasiment tous les processus cellulaires (*Janga and Vallabhaneni, 2011*); et d'autre part puisqu'ils semblent très bien conservés entre espèces (*Landgraf et al., 2007*). La mise en lumière récente de ces petits ARN apporte un niveau de complexité supplémentaire à la compréhension de la régulation de l'expression génique et leur découverte constitue une des grandes avancées scientifiques de cette dernière décennie.

Chez l'Homme, on dénombre plus de **1872 séquences précurseurs** de microARN au niveau du génome (selon la base de données miRbase au 1er juillet 2013 - <http://mirbase.org/>) et on estime à plus de 30% la proportion des transcrits pouvant être régulés par appariement complet avec un microARN (*Lewis et al., 2005*). Cette proportion de cibles putatives est très largement sous-estimée, puisqu'il est aujourd'hui démontré que les microARN agissent majoritairement par complémentarité imparfaite avec leur cible.

❖ DECOUVERTE DES MICROARN

Les microARN ont été découverts par une équipe américaine qui, dès les années 80, avait montré que le produit du gène *lin-4* du nématode *Caenorhabditis elegans* régule négativement l'expression de la protéine LIN-14, facteur essentiel de la phase L2 du développement embryonnaire (*Ambros, 1989*). Quelques années plus tard, la même équipe démontra que le gène *lin-4* ne code pas pour une protéine, mais pour 2 petits ARN de 22 et de 61 nucléotides – nommés à l'époque respectivement *lin-4S* (Short) et *lin-4L* (Long) (*Lee et al., 1993*).

La séquence nucléotidique de *lin-4S*, homologue à une partie de *lin-4L*, est également partiellement complémentaire à la région 3' non traduite (région 3'-NTR) du transcrit LIN-14, suggérant un mécanisme d'inhibition de type anti-sens. Cette répression a été considérée à l'époque comme un phénomène rare et spécifique à *C.elegans* et *lin-4S* et *lin-4L* ont alors été dénommés **petits ARN temporels**.

Ce n'est qu'en 2000 que l'existence de petits ARN temporels endogènes et récurrents fut à nouveau évoquée. L'effet répresseur de *lin-4* sur LIN-14 et sur LIN-28 a été confirmé, mais également celui de *let-7*, de structure semblable à *lin-4*, et régulant quant à lui les transcrits

LIN-14, LIN-28, LIN-41, LIN-42 et DAF-12 (*Reinhart et al., 2000*). Le terme de **microARN** a finalement été proposé en 2001 par (*Lee and Ambros, 2001*).

Par la suite, l'observation de ce phénomène dans des espèces appartenant à tous les règnes biologiques, suggérant la **conservation de ce mécanisme de régulation à travers l'évolution**, en a souligné le rôle fondamental.

❖ SYNTHÈSE ET ÉDITION DES MICROARN

Les microARN sont transcrits à partir de **gènes isolés, polycistroniques** ou localisés **dans les introns de gènes codants** ('mirtrons') (*Kim and Kim, 2007*). Ces gènes possèdent un promoteur qui leur est propre ou dépendent de la transcription et de l'épissage de leur gène hôte.

Dans tous les cas, ceux-ci sont transcrits par l'ARN polymérase II (*Lee et al., 2004*) en une longue structure tige-boucle primaire, le **pri-microARN** (Figure 28) qui subit par la suite une maturation nucléaire via le **complexe Microprocessor** (composé de l'enzyme Drosha et de son partenaire DGCR8). Un précurseur **pré-microARN** de 70 nucléotides est libéré, pris en charge via son extrémité 3' par l'exportine 5 (transporteur GTP-dépendant) et exporté vers le cytoplasme. La ribonucléase **Dicer** clive le pré-microARN au niveau de sa boucle et libère un ARN duplexe, recruté par la protéine **Argonaute (Ago)**, constituant du **complexe catalytique RISC** (*RNA-Induced Silencing Complex*). Le brin d'ARN possédant la plus faible stabilité thermodynamique est sélectionné via son extrémité 5', constituant la **forme active** du microARN. L'autre brin est quant à lui la plupart du temps dégradé (Figure 29). Il est à noter que dans certains cas, le brin-sœur du microARN d'intérêt peut également être utilisé par la cellule, l'expression préférentielle de chacun des brins étant spécifique du tissu étudié (*Ro et al., 2007*).

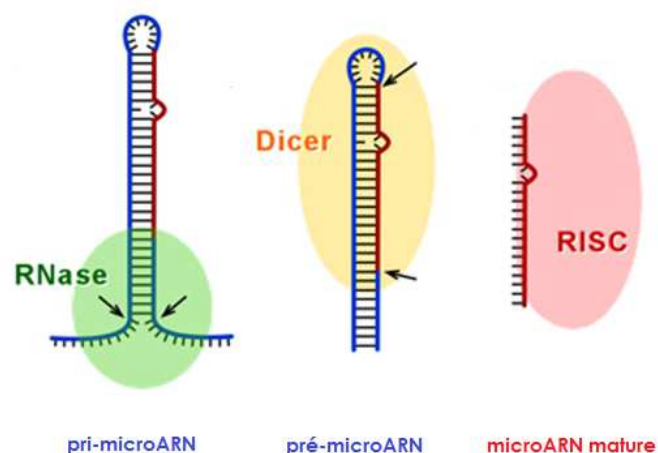


FIGURE 28 : DES PRÉCURSEURS AUX MICROARN MATURES

Au cours de leur maturation, les microARN peuvent subir un phénomène d'édition, correspondant à la modification post-transcriptionnelle de leurs nucléotides et conduisant à une modification de leur action. Ils pourraient également être dégradés par des exonucléases 3'-5', dont la nature demeure inconnue chez l'Homme.

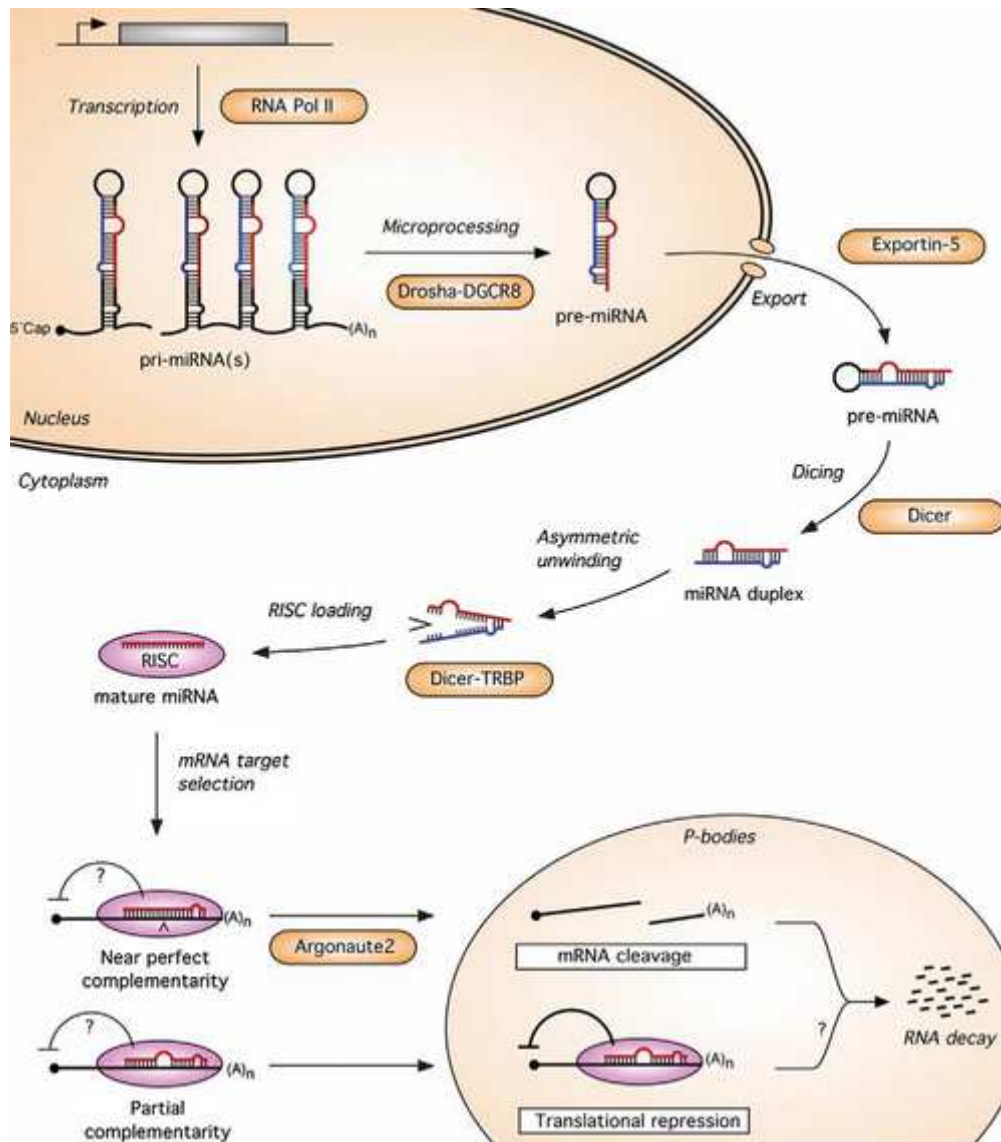


FIGURE 29 : SYNTHÈSE ET MÉCANISME D'ACTION DES MICROARN

D'après (He and Hannon, 2004)

❖ FONCTION DES MICROARN

La régulation de la synthèse protéique par les microARN fait intervenir plusieurs mécanismes : l'inhibition des ARNm cibles dépend du respect de certaines modalités d'interaction nucléotidique d'une part, et de composition et de conformation du complexe RISC d'autre part.

Un microARN reconnaît sa cible par **complémentarité nucléotidique**. Il se fixe de manière préférentielle au niveau de l'extrémité 3'-NTR d'un transcrit mature, mais peut également se fixer sur toute la séquence de celui-ci (y compris en 5'-NTR).

Chez les Métazoaires, cet appariement est rarement parfait (contrairement aux plantes chez lesquelles la complémentarité est totale), mais répond aux critères suivants (*Grimson et al., 2007*) (Figure 30) :

- ✓ la complémentarité doit être totale pour les nucléotides 2 à 8 du microARN. Cette région appelée **noyau (ou seed)** constitue l'élément principal et suffisant de reconnaissance de l'ARNm. La présence d'un résidu A ou U en position 1 ou 9 augmente d'autant plus cette efficacité d'inhibition (*Lewis et al., 2005*).
- ✓ La présence d'une **boucle de misappariement** au centre du microARN empêche les clivages endonucléolytiques.
- ✓ Enfin, un appariement moins exigeant sur 4 ou 5 nucléotides en région 3' du microARN permet de **stabiliser le complexe**, voire de compenser un éventuel mésappariement au niveau du noyau.

Ces modalités d'appariement conduisent à la possibilité, pour un même microARN, de réguler plusieurs centaines de transcrits différents.

L'efficacité de la répression exercée par un microARN sur une cible est influencée en premier lieu par l'absence d'obstacle à l'action catalytique, comme par exemple un encombrement protéique. La structure de l'ARNm en amont et en aval du site de fixation (15 nucléotides) ou la présence d'un codon stop influence également l'action du microARN (*Sun et al., 2010*).

Il est possible que les microARN ciblent un ARNm de manière simultanée, menant à une **synergie d'action** (à condition que les sites de liaison respectent les distances décrites ci-dessus).

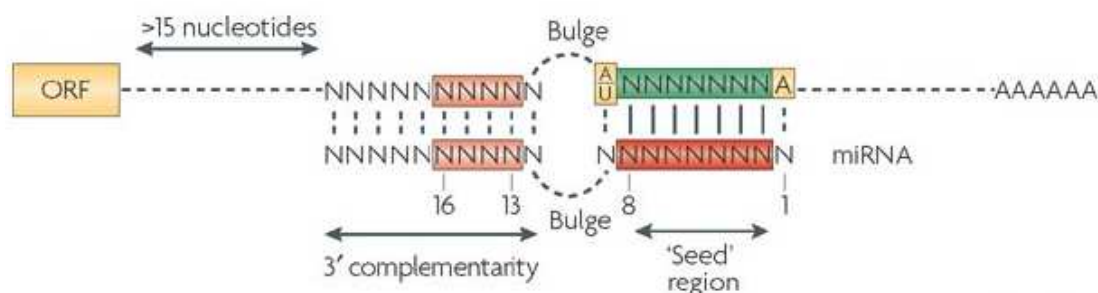


FIGURE 30 : MODALITÉS D'APPARIEMENT D'UN MICROARN SUR UNE CIBLE

D'après (Filipowicz et al., 2008)

L'activité catalytique des microARN est exercée par l'intermédiaire du complexe RISC, composé d'une protéine Ago et d'une hélicase permettant de dissocier les ARN double brin. Le type de protéine Ago confère au RISC sa spécificité d'action : une association avec **Ago2** possède une **activité endonucléolytique**, alors qu'une association avec les **autres types d'Ago (1, 3 ou 4)** confère une action d'**inhibition sans dégradation** de la cible (*Okamura et al., 2004*) (*Broderick et al., 2011*) (Figure 29). Les fonctions des protéines Ago sont également régulées par un jeu de modifications protéiques diverses (hydroxylation, ubiquitination, phosphorylation...) (*Meister, 2013*).

Chez l'Homme, l'inhibition de la cible serait le mécanisme dominant. Elle se traduirait par une **modification de la stabilité des ARNm** (déadénylation puis isolement dans les granules de stress à ARN) (*Leung et al., 2006*), une **inhibition de l'initiation de la traduction** (par compétition des complexes RISC et EIF4F au niveau de la coiffe méthylguanosine située en 5' de l'ARNm) (*Kiriakidou et al., 2007*) (*Ryu et al., 2013*) ; ou encore un **ralentissement de l'élongation polypeptidique** (par recrutement des protéines EIF6 ralentissant l'assemblage des ribosomes et provoquant relâchement prématuré de ces derniers) (*Maroney et al., 2006*) (*Chendrimada et al., 2007*). A l'heure actuelle, nous ne savons pas si ces régulations ont lieu de manière simultanée ou si elles sont spécifiques à la nature de chaque microARN.

S'il est maintenant bien établi que les microARN jouent un rôle de régulateurs négatifs de la traduction, de récents travaux semblent également montrer l'existence d'une régulation positive sur certaines cibles. Nous citerons pour exemple l'action du microARN miR-369-3 qui, par fixation en 3'-NTR du transcrit TNF α (*Tumor Necrosis Factor Alpha*), recrute la protéine FXR1 et les polyribosomes qui lui sont associés, induisant une activation de la traduction (*Vasudevan et al., 2007*). De plus, les microARN semblent également impliqués dans les boucles de régulation complexes, et un microARN peut - par inhibition d'un transcrit codant pour un facteur de modulation négatif de la transcription ou de la traduction – jouer un rôle d'activateur indirect d'une cible secondaire (*Tu et al., 2009*).

En 1998, (*Fire et al., 1998*) ont montré que des particules d'ARN double brin exogènes pouvaient inhiber, par un mécanisme de type catalytique et de façon spécifique, le transcrit mature d'un gène donné. Ces travaux sont à la base du concept d'interférence par l'ARN, qui n'est autre que l'application synthétique de l'action des microARN endogènes.

❖ NOMENCLATURE

Depuis leur révélation chez *C.elegans*, de nombreux microARN ont été découverts. Pour éviter les redondances et l'attribution anarchique de noms à ces nouvelles molécules, une nomenclature consensuelle a été proposée par (Ambros *et al.*, 2003), respectant les modalités suivantes :

- ✓ L'assignation d'un nom à un microARN n'a lieu qu'après publication de sa séquence confirmant expérimentalement son existence.
- ✓ À l'exception des premiers microARN décrits (présentant les préfixes *lin-* et *let-*), le nom d'un microARN est toujours composé d'un préfixe **mir-** pour les précurseurs ou **miR-** pour les formes matures ; **suivi d'un nombre** attribué de manière séquentielle, reflétant l'ordre de découverte de la molécule.
- ✓ Les gènes codant pour les microARN portent les mêmes noms que ces derniers, en conservant la codification conventionnelle relative à chaque organisme.
- ✓ Pour plus de clarté ou lorsque le microARN est spécifique d'une espèce donnée, il est possible d'ajouter, en début de nom, un **attribut d'espèce** (hsa- pour *H.sapiens*, cel- pour *C.elegans*, ebv- pour un microARN apporté par un génome viral...). Des microARN orthologues portent le même nombre principal, seul l'attribut d'espèce change.
- ✓ Deux microARN provenant des **bras opposés** d'un même pré-microARN, portent comme suffixe supplémentaire **-5p** et **-3p** (en fonction de l'extrémité 3' ou 5' du précurseur dont ils sont issus). Lorsque les niveaux d'expression relative des 2 formes de microARN sont connus, un astérisque remplace ce suffixe et indique le microARN le plus faiblement exprimé. Cependant, cette nomenclature dépendante du système biologique observé tend à être abandonnée.
- ✓ Des microARN présentant des séquences quasi-identiques porteront le même nom, suivi d'un suffixe lettré en minuscule.
- ✓ Des pré-microARN issus de gènes différents et donnant naissance aux même microARN matures seront suivis d'un second suffixe numéraire.

Les noms et séquences de tous les microARN décrits sont consultables en ligne sur la base de données miRbase (<http://microrna.sanger.ac.uk/>) (Griffiths-Jones *et al.*, 2006).

4.1.3. Implication des microARN en cancérologie

4.1.3.1. Importance des microARN dans la maladie cancéreuse

La forte implication des microARN au cours du développement embryonnaire, de la différenciation cellulaire ainsi que leur pleiotropisme avéré, ont naturellement et très rapidement poussé les scientifiques à les considérer comme des acteurs essentiels de l'oncogenèse. Les microARN jouent effectivement un rôle primordial dans divers processus cellulaires et ils peuvent être considérés – de par leurs propriétés intrinsèques ou par régulation indirecte – comme des **oncogènes ou des suppresseurs de tumeurs à part entière** (Figure 31). Notons que toutes les dérégulations des microARN ne sont pas initiatrices de l'oncogenèse : elles peuvent n'être que **la conséquence d'événements en amont**. Ainsi, un microARN intronique pourra être sur-exprimé par amplification de son gène hôte, et inversement, pourra paraître sous-exprimé du fait d'une perte de matériel génomique.

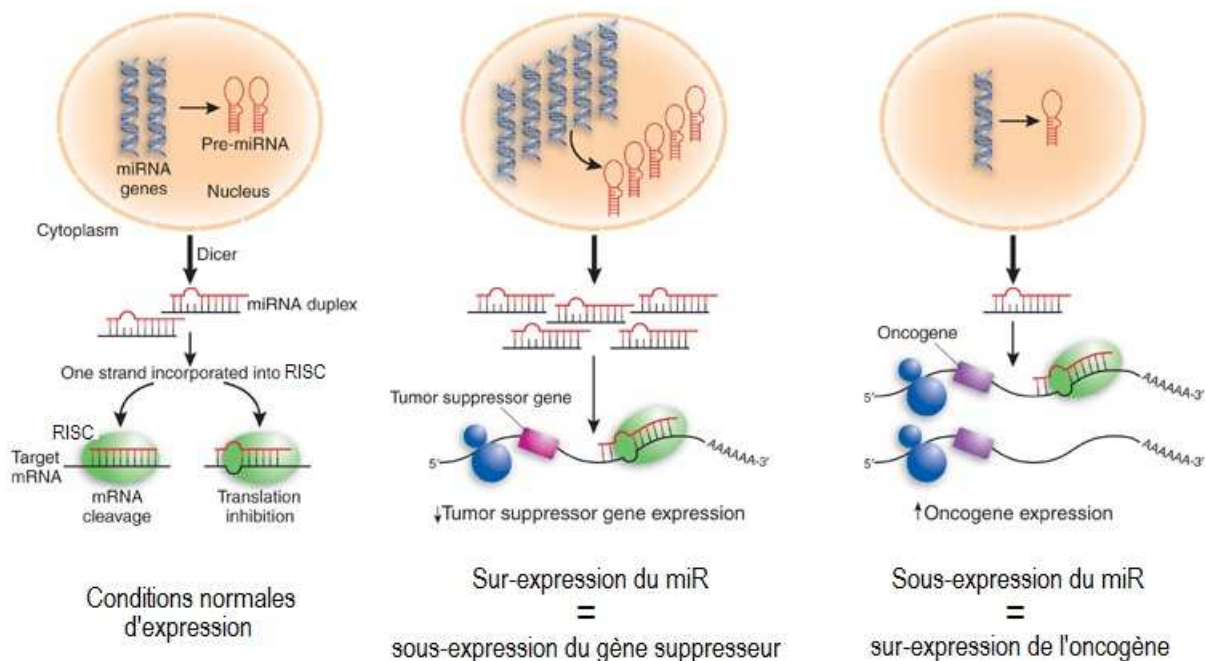


FIGURE 31 : IMPLICATION DES MICROARN DANS LA PATHOLOGIE TUMORALE

Modifié de (Caldas and Brenton, 2005)

Les premiers '**oncomirs**' (microARN impliqués dans l'oncogenèse) ont été décrits dans les leucémies lymphoïdes chroniques par l'équipe de Carlo Croce, en 2002. Il s'agit de mir-15a et mir-16, encodés au niveau du même cluster génomique en 13q14 (Calin et al., 2002) et régulant la protéine anti-apoptotique BCL-2 (Cimmino et al., 2005).

4.1.3.2. Potentiels d'utilisation des microARN en cancérologie

Depuis leur découverte, des dérégulations de microARN ont été observées dans tous les types de cancers. Les profils d'expression globaux des microARN permettent de **distinguer les types et sous-types tumoraux**, en fonction de leur localisation tissulaire, de leur origine embryologique ou encore de leur stade de différenciation. Le potentiel diagnostique des microARN prend alors tout son sens, puisqu'il permet – de manière comparable aux signatures ARNm – d'affiner les classifications histologiques pré-existantes des tumeurs.

Les analyses à haut débit ont permis de remarquer, de par leur redondance, certains microARN indicateurs de développement métastatique. Ceux-ci constituent la classe empirique des '**métastamir**' (*Hurst et al., 2009*), dont l'expression est directement corrélée aux critères cliniques pronostiques tels que la survie des patients ou la réponse aux traitements. Les microARN sont dorénavant considérés comme des **marqueurs tissulaires diagnostiques ou pronostiques** des tumeurs.

Certains microARN ont été **retrouvés au niveau circulant**, dans le sérum, le plasma, l'urine, la salive (*Mitchell et al., 2008*) (*Gilad et al., 2008*). Ces microARN semblent être protégés de l'activité des RNases endogènes et sont remarquablement stables dans les fluides biologiques. Ils constituent des biomarqueurs spécifiques, sensibles et aisément accessibles de certains états physiologiques ou pathologiques. Cette remarquable propriété les place en position de choix pour la définition de nouveaux **marqueurs tumoraux circulants**.

Enfin, puisque les dérégulations des microARN sont à l'origine de nombreuses pathologies, il est logique de penser que le rétablissement de leur expression normale pourrait être une méthode d'**intervention thérapeutique** adéquate, et notamment en oncologie (*Broderick and Zamore, 2011*).

L'utilisation d'oligonucléotides synthétiques capables d'**inhiber spécifiquement un microARN sur-exprimé** par complémentarité est, à première vue, un mode d'action possible. Les drogues utilisées peuvent être des acides nucléiques anti-sens bloqués au niveau de leurs résidus riboses induisant une forte affinité pour leur cible (*Lock Nucleic Acids - LNA*), ou des ARNm se synthèse présentant une forte homologie de séquence avec un transcrit endogène et capables de lier de façon compétitive plusieurs microARN d'une même famille (éponges à microARN) (*Stenvang et al., 2012*). Pourtant, si l'utilisation d'ARN interférents est désormais monnaie courante en expérimentation biologique, celle-ci se révèle de moindre efficacité lorsqu'on l'applique au domaine des microARN dans un organisme complexe. La multiplicité des ARNm régulés par les microARN au niveau

cellulaire est responsable d'effets hors-cibles inter- et intra-cellulaires fréquents, et l'utilisation de ces technologies à des fins thérapeutiques nécessite une amélioration de la vectorisation, de la stabilité des acides nucléiques synthétiques, et du coût de production de ces derniers.

Réciproquement, il est possible d'agir par **sur-expression d'un microARN manquant** dans un système donné. Mais à l'instar de la stratégie précédente, la vectorisation de microARN matures néosynthétiques conduit également à des effets hors-cibles. De plus, l'efficacité fonctionnelle de cette approche reste très en deça des attentes. Ce problème est en partie résolu lorsque la molécule vectorisée est un précurseur double brin, mettant en lumière des étapes de maturation intra-cellulaire indispensables et encore malconnues des microARN.

4.2. ETUDE DE L'EXPRESSION DES MICROARN DANS LE CMT

4.2.1. Etat des connaissances : altérations du miRNome connues

Très peu d'études d'expression des microARN (miRNome) ont été menées dans les tumeurs de type CMT.

La première expérimentation a été décrite par [\(Nikiforova et al., 2008\)](#) : 2 échantillons CMT ont été inclus dans une large cohorte de cancers différenciés, dont le profil d'expression a été obtenu par comparaison à des tissus thyroïdiens sains. Ainsi, ces échantillons ont révélé une grande proportion de microARN différentiellement exprimés, avec des facteurs différentiels d'expression de plus de 100X pour les **miR-129, miR-137, miR-323 et miR-370**.

En 2011, [\(Abraham et al., 2011\)](#) ont analysé 19 tumeurs, par technique à haut débit permettant de définir une signature de 10 microARN distinguant les tumeurs sporadiques des tumeurs familiales. Les miR-182, miR-183, miR-375, miR-551b seraient plus grandement exprimés dans les tumeurs sporadiques et les miR-7i, miR-9/9*, miR-23a, miR-199b-5p et miR-223 seraient indicateurs des tumeurs familiales. Seule l'expression différentielle des **miR-9*, miR-183 et miR-375** a ensuite été validée par PCR quantitative.

L'analyse de l'expression de ces 3 microARN a montré que les miR-183 et miR-375 étaient associés aux tumeurs de **mauvais pronostic** (développement de métastases locales ou distantes et mortalité), sans indiquer si cette donnée était un facteur indépendant du mode de transmission de la pathologie.

En 2012, une étude ciblant 9 microARN choisis arbitrairement à partir des résultats des articles précédents (**miR-9*, miR-21, miR-127, miR-154, miR-183, miR-224, miR-323, miR-370 et miR-375**) a confirmé la forte expression de ceux-ci dans les hyperplasies et les tumeurs des cellules parafolliculaires, comparativement au tissu thyroïdien non néoplasique. Si aucun lien n'a pu être établi entre l'origine sporadique ou familiale de la tumeur et l'un de ces ARN, la présence d'une mutation RET entraînerait une moindre sur-expression du miR-127 et le miR-224 serait un marqueur de meilleur pronostic du CMT [\(Mian et al., 2012\)](#).

Enfin, 2 travaux ont analysés des échantillons appariés de tumeurs primitives et de leurs métastases. La première, réalisée sur 7 couples d'échantillons, a montré que l'expression des **miR-9*, miR-183 et miR-375** était sensiblement comparable entre les différentes localisations, suggérant une relative **stabilité d'expression** de ces 3 marqueurs au cours de la progression tumorale [\(Gundara et al., 2012\)](#). La seconde, réalisée sur 6 couples

d'échantillons et utilisant une technique à haut débit, a montré que cette stabilité n'était pas équivalente pour tous les microARN, puisque 12 d'entre eux paraissent différentiellement exprimés entre les tumeurs primitives et leurs localisations secondaires (*Santarpia et al., 2013*).

Aucune donnée concernant la détection de microARN circulants en rapport avec la pathologie CMT n'est disponible dans la littérature. Pourtant, ceux-ci ont été quantifiés et corrélés au diagnostic ou au pronostic de nombreuses tumeurs (*Chen et al., 2008*), telles que les cancers du sein (*Zhao et al., 2010*), pulmonaires (*Zheng et al., 2011*) ou coliques (*Cheng et al., 2011*), mais aussi les tumeurs d'origines neurales : astrocytomes (*Yang et al., 2013*), glioblastomes (*Ilhan-Mutlu et al., 2012*) et mélanomes (*Greenberg et al., 2013*).

4.2.2. Travaux personnels

4.2.2.1. Objectifs

Comme nous l'avons évoqué précédemment, les mécanismes sous-tendant les différences d'évolution et d'invasivité du CMT sont encore largement incompris. L'un des défis actuels pour la prise en charge de cette pathologie est d'en compléter la description moléculaire, afin de mieux comprendre les voies biologiques impliquées dans l'oncogenèse de ce type tumoral.

Dans un travail précédent, notre équipe a montré que l'étude de l'**expression génique** des tumeurs de type CMT permet de distinguer 2 groupes de tumeurs, présentant des niveaux d'agressivité distincts, indépendamment du mode de transmission de la maladie. Ainsi, **ESM1**, **POMC**, **CDH11** et **PTN** paraissent sur-exprimés dans les formes les plus agressives, les formes localisées présentant quant à elles une expression majorée de **GEM**, **CAV1** ou **ITGAV** (*Ameur et al., 2009b*). Dans un second travail visant à définir des marqueurs de suivi thérapeutique, notre équipe a mis en lumière le potentiel de la **vimentine**, **l'urokinase**, **la tenascine C** ou encore **l'interleukine 8** en tant qu'indicateurs de progression de la pathologie et/ou de réponse au traitement (*Broutin et al., 2011*) (*Broutin et al., 2014*).

Outre les gènes et les protéines, nous pensons que les ARN non-codants pourraient tenir un rôle majeur dans les régulations des voies oncogéniques à l'origine du CMT. Dans le présent travail, nous avons donc cherché à **établir le profil d'expression global des**

microARN d'une large collection de tumeurs et tenter d'identifier des microARN différemment exprimés en fonction des critères phénotypiques de la pathologie. Par la suite, nous avons vérifié la possibilité d'utilisation des microARN ainsi définis en tant que **biomarqueurs tissulaires et circulants, diagnostiques et/ou pronostiques du CMT**.

Les étapes de mise au point technique nécessaires à la réalisation de ce travail apparaîtront dans la partie méthodologique de ce chapitre.

4.2.2.2. Matériel et méthodes

❖ ANALYSE GLOBALE DE L'EXPRESSION DES MICROARN DANS LES TUMEURS

L'analyse d'expression globale des microARN a été réalisée sur une collection de **47 tissus congelés**, correspondant à 43 tumeurs primitives, 3 métastases ganglionnaires et une métastase tissulaire. Toutes les localisations tumorales présentaient plus de 70% de cellules positives pour la calcitonine en immunohistochimie. Deux échantillons composés de tissu adjacent apparemment non-tumoral (cellules n'exprimant pas la calcitonine) ont été adjoints à cette cohorte, à titre comparatif. Les 47 cas utilisés ont été prélevés sur 11 patients porteurs d'une forme familiale et 36 patients porteurs d'une forme sporadique, dont 43 présentent une mutation somatique activatrice dominante des gènes *RET* ou *RAS*. Des métastases locales ou distantes ont été observées chez 33 de ces patients.

L'ARN total (comprenant les ARN codants et non-codants) de ces tissus a été extrait par méthode guanidinium thiocyanate-phénol-chloroforme (TRIzol® Reagent – Life Technologies). Le rendement d'extraction a été déterminé à l'aide du spectrophotomètre Nanodrop® ND1000 (Thermo Scientific). La qualité de l'ARN purifié a été contrôlée à partir du profil obtenu par migration électrophorétique sur Bioanalyzer® 2100 (Agilent Technologies). Tous les échantillons présentaient un ratio d'ARN ribosomiaux 28s/18s supérieur à 1,5 et un facteur d'intégrité de l'ARN (RIN) supérieur à 7.

100ng d'ARN total de chaque échantillon ont été hybridés sur des **puces Human miR® (G4471A v3.0 - Agilent Technologies)**, présentant les sondes **de 851 microARN humains et 88 microARN viraux matures**. En bref, les ARN totaux ont été déphosphorylés puis marqués à la cyanine 3 grâce à une ligase. Ils ont par la suite été hybridés sur les lames pendant 20 heures à 55°C. Toutes ces étapes ont été réalisées dans un environnement sans ozone, limitant l'extinction de fluorescence du marqueur. Les lames ont ensuite subi un lavage pour éviter toute fluorescence non spécifique, puis elles ont été numérisées à l'aide d'un

scanner G2505B (Agilent Technologies). Les données obtenues ont été extraites grâce au logiciel Agilent Feature Extraction® (Agilent Technologies). Toutes les puces ont subi un contrôle qualité permettant de vérifier l'absence de biais inter- et intra-lames. Les intensités de signaux ont été normalisées et la médiane des sondes pour chaque microARN a été calculée. Pour la suite de l'analyse, nous n'avons retenu que les microARN présents dans au moins la moitié des échantillons.

Les échantillons ont ensuite été classés en fonction de leurs analogies d'expression. Cette classification hiérarchique a été réalisée en fonction des moyennes d'expression de chacun des microARN et les distances inter-échantillons ont été calculées selon la corrélation de Pearson (logiciel MultiExperiment Viewer v.4.8.1 – TM4 Microarray Software Suite). La mise en évidence de microARN différentiellement exprimés en fonction des groupes de tumeurs a été réalisée grâce au logiciel SAM (Université de Stanford), en utilisant le test de Wilcoxon et en définissant un taux de faux-positifs (FDR) inférieur à 5%. Seuls les microARN présentant un facteur différentiel de plus de 1,5 ont été retenus.

❖ DEFINITION ET VALIDATION DE MICROARN D'INTERET

Quatre microARN d'intérêt fortement exprimés dans les CMT et permettant de distinguer les tumeurs en fonction de leur invasivité ont été définis pour validation ultérieure.

Dans un premier temps, les niveaux d'expression de ces microARN ont été vérifiés sur la **même cohorte d'échantillons tumoraux congelés** (localisations primaires uniquement), à l'aide d'une **méthode ciblée de quantification**.

Une rétro-transcription a été effectuée sur 400 ng d'ARN total, à l'aide d'un pool d'amorces spécifiques (Megaplex microRNA RT primers® - Applied Biosystems), puis la proportion en microARN mature a été évaluée par PCR quantitative utilisant la technologie TaqMan® (TaqMan® MicroRNA Assay ID#000397, 002304, 002278 et 000590 - Applied Biosystems). Les mesures ont été réalisées en duplicats techniques (même extraction d'ARN totaux). La **moyenne des résultats obtenus pour les échantillons** correspondant aux tumeurs localisées a été utilisée en **référence** (valeur d'expression arbitraire = 1) et le **miR-26b-5p**, défini de manière empirique pour sa stabilité entre les groupes d'intérêt, a été utilisé comme **contrôle endogène normalisateur**. Les quantités relatives de microARN ont été définies par la méthode de la seconde dérivée :

$$\text{Quantité relative du microARN} = RQ_{\text{miR}} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

avec $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{échantillon}} - \Delta Ct_{\text{référence}}$ et $\Delta Ct = Ct_{\text{miR}} - Ct_{\text{miR-26b}}$

Les corrélations entre les résultats obtenus avec les 2 méthodes ont été appréciées grâce au coefficient de Spearman et les différences d'expression entre les différents groupes ont été évaluées à l'aide d'un test de Mann Whitney.

❖ EVALUATION DE MARQUEURS PRONOSTIQUES TISSULAIRES DE CMT

Les **courbes ROC** (reflétant la performance de l'utilisation d'un seuil d'expression de nos microARN d'intérêt au regard de la donnée binaire d'invasivité tumorale) ont été réalisées en utilisant les valeurs RQ obtenues précédemment. Les patients ont été divisés en 2 groupes d'expression pour chacun des microARN, le seuil de dichotomie étant choisi selon les meilleurs critères de sensibilité et de spécificité présentés par les courbes ROC. Les différences de **survie globale** (intervalle de temps, en mois, entre la date du diagnostic et la date du décès ou de dernière consultation du patient) entre les groupes ont été estimées par le test du log-rank.

Dans le but d'améliorer les critères de discrimination des tumeurs en fonction de leur pronostic, nous avons établi un score (**indice pronostique IP**) reprenant les valeurs de quantification relative obtenues pour les 4 microARN d'intérêt. Ce score a été évalué de manière similaire aux microARN considérés isolément (courbes ROC et survie).

Enfin, les effets spécifiques de différentes co-variables susceptibles d'influencer significativement le pronostic du CMT ont été étudiés, par **analyse multivariée** selon le modèle de Cox.

Nous avons par la suite cherché à valider les différences d'expression observées sur une **cohorte indépendante d'échantillons**, avec les mêmes modalités de quantification que celles décrites ci-dessus (en PCR quantitative). Cette collection est composée de **50 tissus FFPE**, dont 21 redondances avec la cohorte précédente (permettant une évaluation de la reproductibilité des résultats obtenus). La corrélation inter-cohorte a été évaluée par le coefficient de Spearman et les différences inter-groupes ont été évaluées comme énoncé précédemment.

❖ EVALUATION DE MARQUEURS DIAGNOSTIQUES CIRCULANTS DE CMT

Un total de **51 échantillons sériques et plasmatiques** prélevés sur 31 patients (avant ou après thyroïdectomie) et 20 individus sains (reliquats provenant de l'Etablissement Français du Sang) ont été étudiés.

Premièrement, 4 prélèvements provenant de donneurs sains ont été utilisés afin de valider le type d'échantillon à utiliser (sérum ou plasma, matériel frais ou congelé) et la méthode

d'extraction adéquate (TRIzol® Reagent – Life Technologies ou mirVana PARIS kit® - protocole sans enrichissement des petits ARN - Ambion). Une prise d'essai de **200 µL de sérum ou de plasma** et un **volume d'éluat de 80 µL** ont été utilisés pour les 2 méthodes. L'efficacité d'extraction a été mesurée grâce à l'ajout d'une quantité exacte de microARN exogène non humain (25 fmol de cel-miR-39 – soit une concentration optimale dans l'éluat de 0,3 fmol/µL) avant la première étape de chaque méthode, puis quantification absolue ultérieure par PCR quantitative (Taqman Small RNA Assay® - Applied Biosystems). La gamme de calibration a été établie par dilution du microARN synthétique (mirVana® miRNA mimic - Ambion) dans une **matrice sérique** (sérum d'un individu sain). La qualité des ARN extraits a été vérifiée par spectrophotométrie (Nanodrop® ND2100 – ThermoScientific).

Le kit **mirVana PARIS®** - bien que présentant une capacité réduite d'extraction des ARN totaux - montre le meilleur rendement d'extraction de cel-mir-39 (Table 8). Ce rendement est comparable pour les échantillons de type sérique ou plasmatique, mais pour des raisons de disponibilité d'échantillons, nous avons choisi de poursuivre le travail sur des **échantillons sériques congelés**.

		TRIzol			mirVana PARIS		
		[ARNtotal]	Ct cel-miR-39	Ct hsa-miR-26b	[ARNtotal]	Ct cel-miR-39	Ct hsa-miR-26b
Prélèvement FRAIS	SERUM	15,4 ng/µL	-	-	12,3 ng/µL	-	-
	PLASMA	16,4 ng/µL	-	-	11,2 ng/µL	-	-
Prélèvement CONGELE	SERUM	21,9 ng/µL	27,7	35,4	6,2 ng/µL	18,5	25,4
	PLASMA	32,3 ng/µL	33,6	38,2	8,0 ng/µL	18,5	25,2

TABLE 8 : EVALUATION DE LA METHODE D'EXTRACTION DES MICROARN CIRCULANTS

Par la suite, la totalité des échantillons a été extraite à l'aide du kit mirVana PARIS®, avec ajout préalable de 25 fmol de cel-miR-39. La quantification des microARN d'intérêt a été réalisée par PCR quantitative. Des gammes de calibration, permettant la vérification des rendements de PCR, ont été établies pour tous les microARN pareillement à celle de cel-miR-39. Les efficacités de PCR paraissant différentes en fonction de la matrice de départ (perte de proportionalité dans l'eau exempte de nucléases) et du type de microARN recherché, nous avons choisi d'établir une quantification relative par la méthode des droites standard, avec :

$$\text{Quantité relative du microARN} = RQ_{\text{miR}} = Q_{\text{miR}}/Q_{\text{miR-26b}}$$

avec Q_{miR} et $Q_{\text{miR-26b}}$ = quantité absolue définie à partir d'une courbe de calibration

La comparaison des résultats obtenus pour les groupes d'intérêt a ensuite été réalisée à l'aide du test de Mann-Whitney.

Enfin, nous avons initié un travail de caractérisation d'**exosomes** (microvésicules lipidiques possiblement libérées par les cellules et contenant des structure nucléo-protéiques dont des microARN), afin d'en analyser – à terme – le contenu en microARN. Cette étude préliminaire, réalisée en collaboration avec le Centre d'Investigation Clinique 'Biothérapies en Oncologie' de l'Institut Gustave Roussy, consistait à:

- ✓ **Vérifier la possibilité d'extraction de microARN à partir de suspensions d'exosomes**, sans interférence d'éventuelles particules en surface des vésicules (transport non spécifique).

Pour cela, nous avons testé l'action de la RNase A (0,4 µg/µL) sur des microARN synthétiques (cel-miR-39) ajoutés avant ou après les étapes de lyse de l'extraction (mirVana PARIS® kit – protocole sans enrichissement des petits ARN - Ambion). Cette extraction a été menée sur 50 µL (correspondant à 12,2 µg d'équivalent protéique) d'une suspension d'exosomes de cellules dendritiques (Dex). Les cel-miR39, miR-21-5p et miR-145 ont ensuite été dosés par quantification absolue, à l'aide de gammes de microARN synthétiques.

- ✓ **Vérifier la sécrétion effective d'exosomes par les cellules de CMT.** Pour cela, nous avons purifié par ultracentrifugation le surnageant de culture la lignée TT (laissé au contact des cellules pendant 48h et non additionné de sérum). Ce produit de purification a été fixé sur des billes latex puis marqué à l'aide d'anticorps dirigés contre les tétraspanines CD9, CD63, CD81 et CD82, le récepteur membranaire RET et la calcitonine. Le marquage secondaire a été réalisé à l'aide d'anticorps anti-lapin ou anti-souris couplés au fluorophore Alexa® 488. La lecture a été réalisée sur un cytomètre de flux à lecture de fluorescence (FACS – C6 Accury® – BD Biosciences).
- ✓ **Vérifier la possibilité d'extraction d'exosomes totaux à partir de sérum humain**, par ultracentrifugation ou utilisation du kit de purification ExoQuick® (System Biosciences). Ces 2 méthodes ont été testées en parallèle et en duplicats sur 2 prélèvements de donneurs sains (1 mL) ayant subi une double centrifugation préalable (3000 rpm pendant 15 minutes puis 10000 rpm pendant 30 minutes). Une analyse par FACS de l'expression des tétraspanines a ensuite été réalisée, selon les mêmes modalités que précédemment.

Les étapes ultérieures - non réalisées au jour de la rédaction - consisteront en la mise au point d'une technique de purification sélective des exosomes d'origine tumorale (Tex) à partir d'échantillons sanguins, puis en la vérification de leur contenu exact en microARN (par système de PCR quantitative en carte microfluidique Taqman® miRNA Array – Applied Biosystems).

4.2.2.3. Résultats

❖ LES CMT PRESENTENT UN PROFIL D'EXPRESSION HOMOGÈNE DES MICROARN

L'expression de 939 microARN a été évaluée dans les CMT par une approche à haut débit de type biopuce, à partir d'une collection de 49 tissus congelés. Après normalisation des signaux et élimination des microARN non exprimés, 465 microARN humains ont été retenus.

La **classification hiérarchique non supervisée** des profils d'expression tissulaires permet une distinction nette des tissus non tumoraux (distance de Pearson = 0,715), avec une expression différentielle de 165 microARN comparativement aux tissus tumoraux (p-value <0.05). Cette classification globale ne montre pas de différence entre les localisations primaires et secondaires, ni de séparation évidente de groupes de tumeurs phénotypiquement comparables (au regard de critères clinico-pathologiques tels que le mode de transmission ou le caractère invasif de la tumeur) (Figure 32).

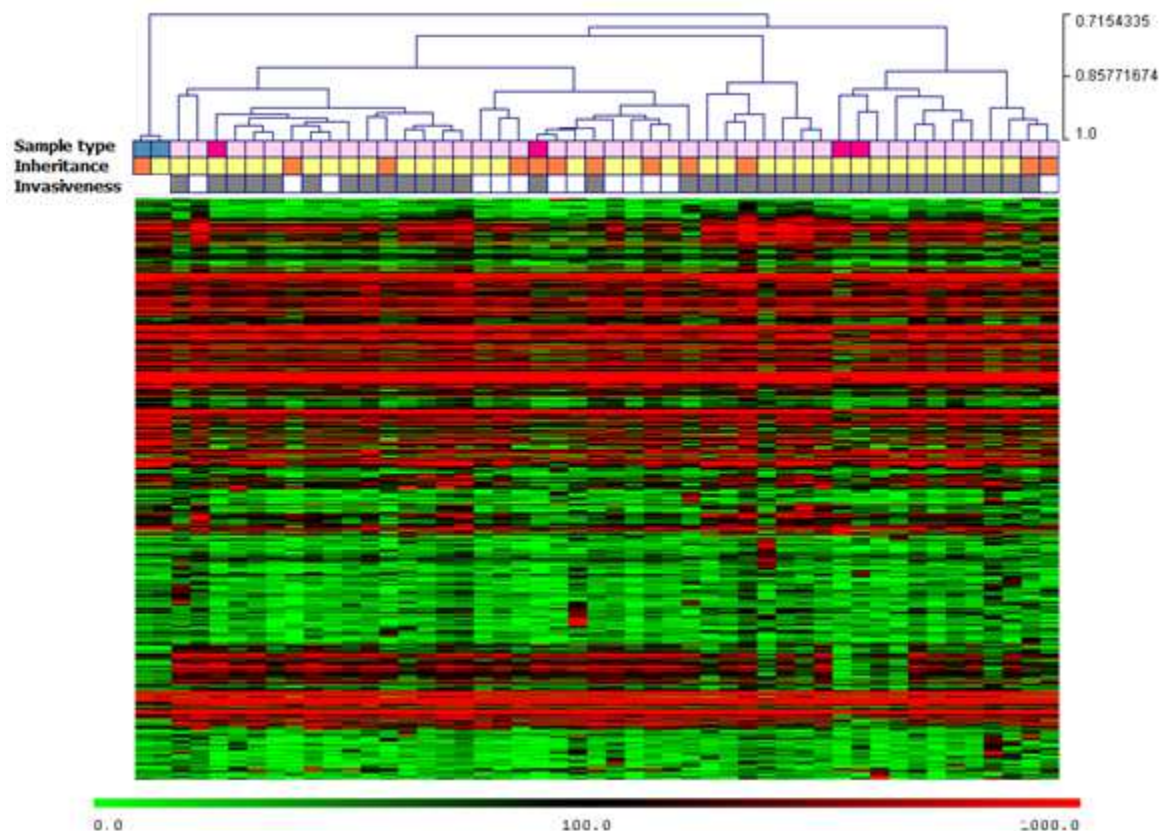


FIGURE 32 : CLASSIFICATION HIÉRARCHIQUE DES CMT EN FONCTION DE LEUR PROFIL D'EXPRESSION MICROARN

Le tissu, la forme et l'invasivité des tumeurs sont indiqués sous le dendrogramme
 bleu: tissu normal, rose: tumeur primitive, rouge : métastase
 orange: CMT familial, jaune: CMT sporadique
 blanc: CMT localisé, gris: CMT localement avancé

Nous avons par la suite appliqué la méthode de permutations du logiciel SAM, permettant une **comparaison groupe-à-groupe** de l'expression de chacun des microARN étudiés.

La comparaison des profils d'expression des cas sporadiques et familiaux distingue 3 microARN différentiellement exprimés : **miR-142-3p**, **miR-301a** et **miR-34a** (Table 9). En revanche, aucun microARN ne paraît significativement relié au type de mutation dominante présenté par l'échantillon tumoral (*RET* ou *RAS*).

La comparaison des tumeurs localisées et des tumeurs invasives (localement invasives ou métastatiques) permet de distinguer 18 microARN. Les miR-98, miR-129-5p/3p et miR-154* ont une expression plus élevée dans les tumeurs *in situ* et, à l'inverse, 14 microARN sont surexprimés dans les tumeurs métastatiques (Table 9).

Nous avons choisi pour validation ultérieure, les microARN présentant un ratio d'expression différentielle d'au moins 2 et les intensités de signal de fluorescence les plus élevées, soient les **miR-199a-3p**, **miR-21**, **miR-129-5p** et **miR-129-3p**.

microARN	Famille	Locus du gène	Intensité médiane CMT familiaux	Intensité médiane CMT sporadiques	Ratio
hsa-miR-34a	miR-34	1p36.22	3248	1980	-1,64
hsa-miR-301a	miR-130	17q22	777	317	-2,45
hsa-miR-142-3p	miR-142	17q22	479	182	-2,63

microARN	Famille	Locus du gène	Intensité médiane CMT localisés	Intensité médiane CMT invasifs	Ratio
hsa-miR-199a-3p	miR-199	19p13.2 / 1q24.3	1690	4768	2,82
hsa-miR-214	miR-214	1q24.3	245	687	2,80
hsa-miR-124	miR-124	8p23.1 / 8p12.3 / 20q13.33	126	338	2,68
hsa-miR-199b-5p	miR-199	9q34.11	175	468	2,67
hsa-miR-199a-5p	miR-199	19p13.2 / 1q24.3	485	1250	2,58
hsa-miR-21	miR-21	17q23.1	22617	49386	2,18
hsa-miR-21*	miR-21	17q23.1	95	189	1,99
hsa-miR-145	miR-145	5q32	1057	1983	1,88
hsa-miR-28-5p	miR-28	3q28	169	312	1,85
hsa-miR-34a	miR-34	1p36.22	2057	3603	1,75
hsa-miR-135b	miR-135	1q32.1	510	867	1,70
hsa-miR-143	miR-143	5q32	399	674	1,69
hsa-miR-140-3p	miR-140	16q22.1	385	608	1,58
hsa-miR-365	miR-365	16p13.12 / 17q11.2	325	514	1,58
hsa-miR-98	let-7	Xp11.22	849	436	-1,95
hsa-miR-154*	miR-154	14q32.31	84	49	-1,71
hsa-miR-129-3p	miR-129	11p11.2	9462	2296	-4,12
hsa-miR-129-5p	miR-129	7q32.1 / 11p11.2	1449	263	-5,51

TABLE 9 : MICROARN DIFFÉRENTIELLEMENT EXPRIMÉS EN FONCTION DE LA FORME CLINIQUE ET DE L'INVASIVITÉ DU CMT
(q-values_{SAM} <0.05)

❖ LES miR-129 et miR-199 SONT DES MARQUEURS TISSULAIRES PRONOSTIQUES DU CMT

La comparaison des tumeurs en fonction de leur agressivité semblant être la plus intéressante, nous avons cherché à confirmer les résultats obtenus pour certains des microARN, par une technique ciblée plus sensible (PCR quantitative) sur les mêmes échantillons puis sur une collection de validation indépendante constituée d'échantillons de type FFPE. Pour éviter une étape de pré-amplification des microARN (étape susceptible de créer des biais de mesure), nous avons sélectionné les microARN les plus fortement exprimés et présentant un facteur d'expression différentielle supérieur à 2 ; soient les microARN **miR-21**, **miR-129-3p**, **miR-129-5p** et **miR-199a-3p**.

Les données obtenues par technique à haut débit et les résultats de **PCR quantitative** sur les mêmes échantillons présentent une forte corrélation, comme le montrent les coefficients de Spearman obtenus pour chacun des microARN étudiés ($r > 0,71$ - p-value $< 0,0001$ - Annexe 7). Ainsi, de manière attendue, les quantifications spécifiques des 4 microARN d'intérêt confirment les conclusions de l'analyse à haut débit : leur expression est reliée au **degré d'invasivité de la tumeur** (p-value $< 0,001$ – Figure 33).

L'évaluation du potentiel d'utilisation de ces 4 microARN en tant que biomarqueurs tissulaires pronostiques du CMT nécessite au préalable la définition de valeurs seuils d'expression. Ces valeurs ont été arbitrairement choisies après réalisation des **courbes ROC**, à partir des données quantitatives obtenues par PCR et des caractéristiques d'invasivité des tumeurs. Les valeurs d'aires sous les courbes (AUC), toutes significatives, confirment l'intérêt de ces microARN comme marqueurs d'invasivité (p-value $< 0,0012$). Pour miR-21, la valeur seuil d'expression relative de **1,17** permet de classer les tumeurs invasives et non invasives avec une sensibilité de 83% et une spécificité de 77%. En se basant sur les mêmes critères (sensibilité et spécificité $> 75\%$), nous avons sélectionné les valeurs **2,165** ; **0,680** et **0,495** pour les microARN miR-199a-3p, miR-129-5p et miR-129-3p respectivement (Figure 33).

Les données de survie globale étaient disponibles pour 42 patients. En prenant une date de point au 8 juin 2012 (suivi de 6 à 225 mois – 10 décès) et en établissant une dichotomie des patients en fonction de leurs niveaux respectifs de microARN, nous obtenons une **différence significative du pronostic (en terme de survie) en fonction du niveau d'expression des microARN miR-199a-3p et miR-129-5p** (p-value = 0,0045 et 0,0499 respectivement - Figure 33).

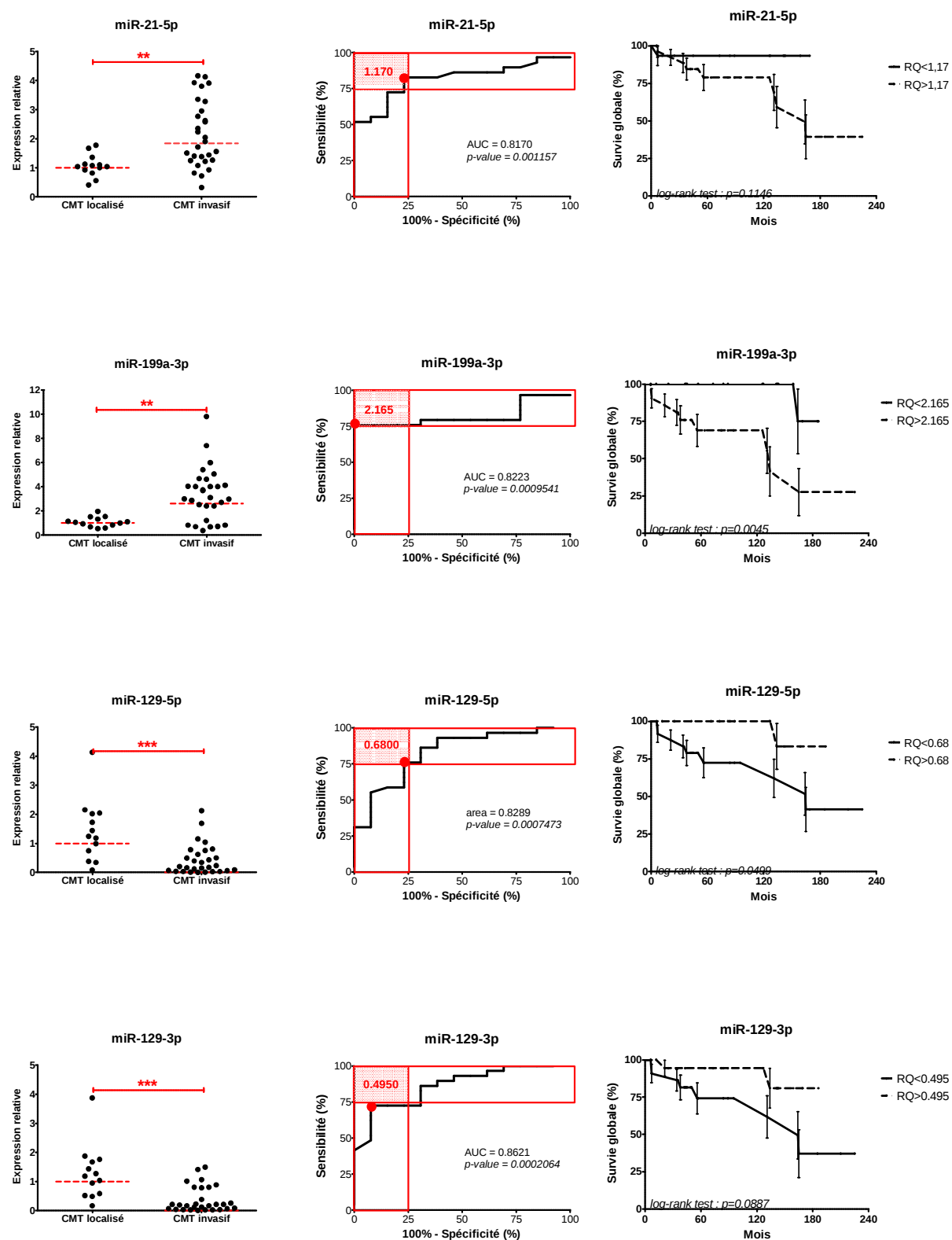


FIGURE 33 : EXPRESSION DES MIR-21, MIR-199 ET MIR-129 ET RELATION AU PRONOSTIC DU CMT

* p-value <0,05 ** <0.01 *** <0,001

Afin d'améliorer la spécificité et la sensibilité de détection des tumeurs invasives, nous avons déterminé un score prédictif (indice pronostique IP), prenant en compte les données obtenues pour les 4 microARN d'intérêt simultanément. Celui-ci est calculé selon l'équation :

$$IP = (RQ_{miR-21-5p} + RQ_{miR-199a-3p}) / (RQ_{miR-129-3p} + RQ_{miR-129-5p})$$

La courbe ROC de cet indice indique que le seuil 2,302 (unités arbitraires) permet de séparer les tumeurs avec une spécificité de 85% et une sensibilité de 83%. Cette indice conserve la corrélation à la **survie globale des patients** (p-value=0,0359) (Figure 34).

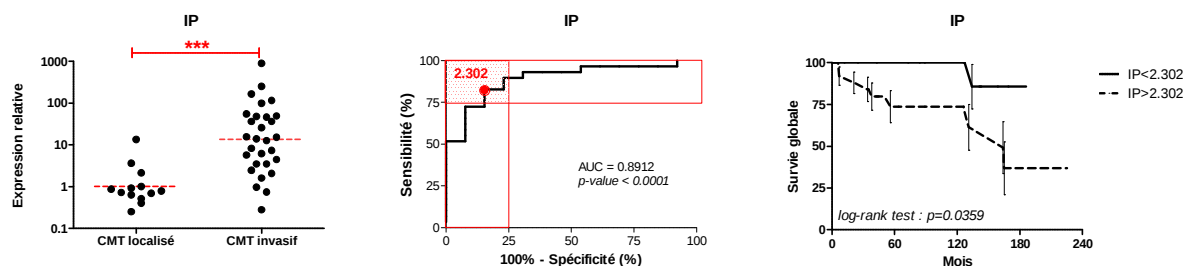


FIGURE 34 : EVALUATION DU SCORE PRONOSTIQUE IP

Nous avons par la suite réalisé une analyse multivariée, permettant de mesurer l'impact spécifique de l'expression des 4 microARN d'intérêt et de l'indice IP sur la survie globale des patient, comparativement aux autres critères relevant dans notre cohorte, à savoir :

- Le sexe du patient (pronostic péjoratif pour les hommes – p-value_{logrank}=0,001) ;
- L'âge au diagnostic (pronostic péjoratif pour les patients les plus jeunes - p-value = 0,048) ;
- L'extension de la tumeur, déterminée selon la classification histologique TNM (pronostic péjoratif pour les tissus localement invasifs ou métastatiques - p-value = 0,015) ;
- Le temps de doublement de la calcitoninémie après chirurgie initiale (pronostic péjoratif en cas de doublement observé en moins de 24 mois - p-value < 0,0001).

Cette analyse révèle que **seuls l'âge au diagnostic** (hazard ratio = 0,039 - p-value = 0,041) **et le temps de doublement de la calcitonine** (HR = 0,029 – p-value = 0,018) sont des critères **indépendants** de pronostic du CMT.

Enfin, nous avons souhaité valider ces résultats sur une **cohorte indépendante**, composée de **50 tissus FFPE, dont 21 redondances avec la collection congelée précédente** et reflétant le type d'échantillons majoritairement utilisés en pratique courante. La conservation des ARN dans ce type d'échantillons n'étant pas optimale, nous avons

observé une grande hétérogénéité de résultats entre les tissus congelés et les tissus FFPE appariés ($n=21$ - $r < 0,59$, $p\text{-value} < 0,0001$ – Annexe 7). Cependant, la comparaison des tumeurs localisées et des tumeurs invasives au regard de l'expression de miR-21 reste significative et comparable à celle observée dans les tissus congelés ($n=50$ - facteur différentiel = 1,8 - $p\text{-value}=0,0065$ - Figure 35). Aucun résultat significatif n'a été observé avec les autres microARN.

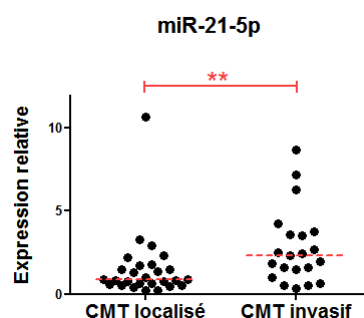


FIGURE 35 : EXPRESSION DE miR-21 ÉVALUÉE À PARTIR DE TISSUS FFPE

- ❖ *LES miR-21 et miR-199 SONT DES MARQUEURS CIRCULANTS DIAGNOSTIQUES DU CMT*
 - *Etude des microARN circulants totaux*

La quantification des 4 microARN d'intérêt et d'éventuels normalisateurs (miR-26b et RNU44) a été réalisée par PCR quantitative, après extraction des microARN à partir de 200 μL de sérum congelé et auxquels 25 fmol de contrôle d'extraction (cel-miR-39) ont été ajoutés.

Les miR-129-5p et le petit ARN RNU44 n'ont pas été détectés (cycle-seuil > 40). Le miR-129-3p est détecté dans un grand nombre d'échantillons, mais les signaux obtenus – tous supérieurs à 33 cycles – ne permettent pas une quantification optimale (Annexe 8).

Les cel-miR-39, miR-26b, miR-199a-3p et miR-21 sont positifs et aisément quantifiables dans tous les échantillons (patients et individus sains), sans nécessité de pré-amplification initiale. En revanche, l'établissement de courbes de calibration (réalisées dans de l'eau exempte de nucléases et du sérum d'individu sain) nous montre qu'il existe un effet matrice non négligeable, impactant fortement la reproductibilité des résultats et induisant de fortes disparités d'efficacité de PCR (Annexe 8). De ce fait, nous avons opté pour une quantification relative des microARN d'intérêt par rapport au miR-26b, après évaluation des quantités absolues par la méthode des droites standards. Les échantillons présentant une quantité trop faible de cel-miR-39 après extraction ont été éliminés des analyses ultérieures.

Parmi la cohorte de départ, 36 échantillons (27 cas et 9 témoins) ont montré une concentration en cel-miR-39 proche de la quantité introduite avant extraction.

La comparaison de leur teneur en miR-21-5p et miR-199a-3p permet de distinguer les patients CMT des individus sains (p -value=0,0017 et 0,0061 respectivement), les microARN d'intérêt semblant plus fortement exprimés chez les patients. Les résultats obtenus ne sont pas significativement différents en fonction du moment de prélèvement (avant ou après thyroïdectomie), ni au regard de l'agressivité de la maladie (effectifs des sous-groupes compris entre 3 et 8 échantillons). Aucune corrélation ne peut être établie avec la concentration en calcitonine de l'échantillon. En revanche, il existe une relation nette entre les niveaux de miR-21 et de miR-199a-3p ainsi quantifiés ($r = 0,85$ – p -value<0,0001).

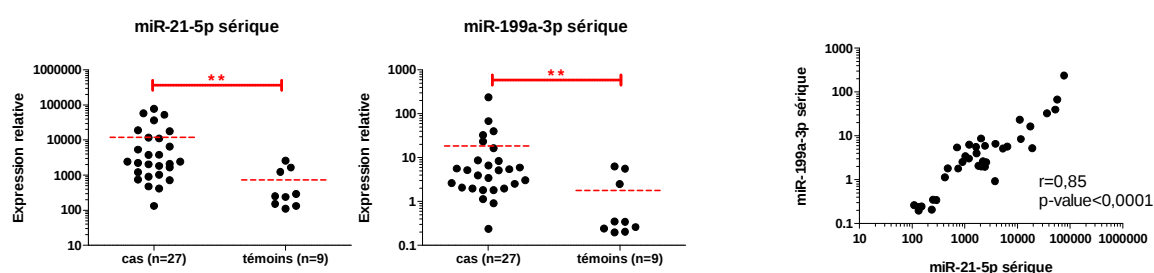


FIGURE 36 : EVALUATION DES miR-21 ET miR-199a-3p SÉRIQUES CHEZ LES PATIENTS CMT

- *Etude de la fraction exosomale des microARN circulants*

Pour poursuivre ce travail, nous avons souhaité évaluer la fraction des microARN circulants inclus dans d'éventuelles particules exosomales d'origine tumorale (Tex).

Dans un premier temps, 2 méthodes d'extraction des fractions exosomales totales à partir d'échantillons sériques ont été testées. Deux prélèvements de donneurs sains (1 mL) ayant subi une double centrifugation préalable (3000 rpm pendant 15 minutes puis 10000 rpm pendant 30 minutes) ont été utilisés. Les méthodes par ultra-centrifugation et solution commerciale ExoQuick® ont ensuite été testées en parallèle et en duplicats. Les dosages protéiques réalisés sur les extraits obtenus par ultra-centrifugation étaient de 5286 et 4964 µg/mL. Les quantités d'équivalents protéiques n'ont pas pu être évaluées après utilisation de la technique commerciale. L'analyse par détection de fluorescence en cytométrie de flux (FACS) après marquage des tétraspanines des fractions obtenues a montré, pour les 2 techniques, un fort marquage CD63, CD81 et CD82 (ratio de fluorescence par rapport à l'isotype = $2,3 \pm 0,2$) mais une absence de marquage CD9 (ratio de fluorescence = $1,1 \pm 0,1$) (données non présentées).

Par la suite, nous avons mis au point une technique d'extraction adéquate des microARN réellement inclus dans ce type de vésicules, à partir d'une fraction parfaitement caractérisée d'exosomes issus de cellules dendritiques (Dex). Nous avons observé qu'un traitement par la RNase A conduit à la destruction des microARN exogènes ajoutés avant l'étape de lyse, mais conserve les microARN ajoutés immédiatement après. Ainsi, le traitement à la RNase A met en lumière 2 populations de microARN, intra- et extra-exosomales (Table 10). La quantification absolue des miR-21 et miR-145 confirme leur présence dans ce type d'exosomes.

	+ Rnase A	- Rnase A
miR-21-5p	$[0,7-2,1] \times 10^{-3}$ fmol/ μ L	$[2,9-5,5] \times 10^{-3}$ fmol/ μ L
	$[3,1-9,1] \times 10^{-3}$ fmol/ μ g	$[10,4-27,4] \times 10^{-3}$ fmol/ μ g
miR-145-5p	$[0,8-3,6] \times 10^{-6}$ fmol/ μ L	$[20,0-32,0] \times 10^{-6}$ fmol/ μ L
	$[4,0-16,0] \times 10^{-6}$ fmol/ μ g	$[70,0-170,0] \times 10^{-6}$ fmol/ μ g

TABLE 10 : QUANTITÉ DE MICROARN RETROUVÉE DANS LES DEX

Quantités exprimées en fmol par μ L d'extrait et par μ g d'équivalent protéique initial
Résultats obtenus sur des dilutions en série (1, $\frac{1}{2}$ et $\frac{1}{4}$) de duplicats biologiques

Enfin, nous avons vérifié la capacité des cellules de CMT à libérer des particules exosomales. Nous avons obtenu, à partir de 5 mL de surnageant de culture de cellules TT, 140 μ L (correspondant à 32 μ g d'équivalent protéique) d'exosomes. L'analyse par détection de fluorescence en cytométrie en flux de ces microvésicules (préalablement fixées sur billes de latex) a montré un marquage net de la calcitonine, définissant 2 populations de vésicules distinctes. Un signal positif est observé pour le récepteur RET (également retrouvé dans les Dex). Les tétraspanines CD9 et CD63 sont fortement exprimées, mais les CD81 et CD82 ne sont pas retrouvées (Figure 37).

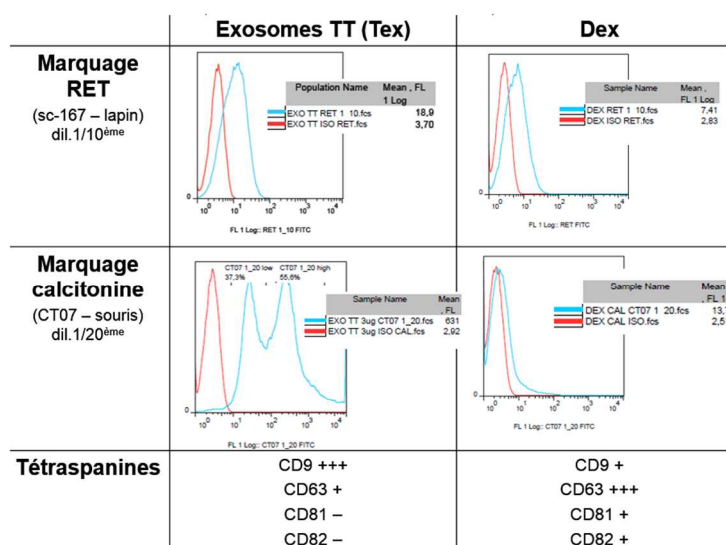


FIGURE 37 : CARACTÉRISATION DES EXOSOMES ISSUS DE CELLULES TT

4.2.3. Discussion

Nous avons établi le profil d'expression microARN d'une collection de 49 CMT congelés. Celui-ci est **homogène** pour l'ensemble des tumeurs et semble très différent des 2 tissus normaux adjacents ajoutés à l'expérimentation à titre comparatif (essentiellement constitués de thyrocytes).

Cette observation reflète la **spécificité d'expression de chaque type cellulaire** et ne permet pas la définition de dérégulations propres à nos cellules d'intérêt. Aussi, et contrairement à ce qui a été réalisé par d'autres équipes antérieurement, nous avons choisi de nous orienter vers des comparaisons de groupes de tumeurs. Cette démarche explique la non-redondance des résultats avec les travaux déjà publiés.

Méthode	Echantillons		Résultats	Référence
RT-PCR (158 miRNAs)	2	CMT	miR-323, miR-370, miR-129, miR-137, miR-10a, miR-124a, miR-224, miR-127, miR-9, miR-154.	Nikiforova, 2008
Puce pan-miRNA (1084 miRNAs)	19	spo	miR-182, miR-183, miR-375, miR-551b.	Abraham, 2011
		fam	miR-199b-5p, miR-9, miR-9*, miR-223, let-7i, miR-23a.	
RT-PCR (4 miRNAs)	19 + 26 FFPE	spo	miR-183, miR-375.	
		fam	miR-9*.	Boichard (non publié, 2014)
		spo	miR-34a, miR-142-3p, miR-310a	
Puce pan-miRNA (1000 miRNAs)	49	M+	miR-199a-3-, miR-199a-5p, miR-214, miR-124, miR-199ab-5p, miR-21	
RT-PCR (9 miRNAs)	40	CMT	miR-9*, miR-183, miR-375, miR-323, miR-370, miR-224*, miR-1270, miR-154, miR-21.	Mian, 2012
RT-PCR (3 miRNAs)	7 métastases	M+	miR-9*, miR-183, miR-375.	Gundara, 2012
		M+	miR-373, miR-637, miR-130, miR-138, miR-193a-3p, miR-498, miR-658	Santarpia, 2013
Puce pan-miRNA (1200 miRNAs)	6 métastases	N0	miR-10a, miR-7, miR-29c, miR-200b, miR-200c	

FIGURE 38 : EXPRESSION DES MICROARN DANS LES CMT : REVUE DE LA LITTÉRATURE

- *Comparaison des tumeurs en fonction de la forme clinique du CMT*

Les tumeurs sporadiques présentent une **sous-expression des miR-34a, miR-142-3p et miR-301a** par rapport aux tumeurs d'origine familiales.

Bien qu'ubiquitaire, **miR-34a** semble jouer un rôle prépondérant dans les cellules de type neural. Sa sous-expression a été observée dans les gliomes (Yu et al., 2012), et plus particulièrement dans les formes péjoratives de ces tumeurs (Gao et al., 2013). Son expression, **dépendante de p53** (Chang et al., 2007), serait corrélée à celle des récepteurs EGFR (Yin et al., 2013), PDGFRA (Silber et al., 2012), MET (Li et al., 2009), à Notch1 (Yu et al., 2012) et à de nombreux autres oncogènes (MYC, JAG1, CD44, CDK4, CDK6, CCND1,

SIRT1). Son rôle de **suppresseur de tumeurs** et sa **multipotence** lui confère une place de choix dans les essais thérapeutiques en oncologie et un analogue de miR-34 est actuellement en cours d'évaluation pour une application dans les cancers bronchiques et prostatiques (*Bader, 2012*).

Les **miR-301a** et **miR-142-3p** ont la particularité d'être codés à proximité sur le génome humain (en 17q22), mais sont transcrits indépendamment l'un de l'autre. Les cibles validées expérimentalement pour miR-301a sont NKRF (facteur inhibiteur de NF κ B), RUNX3, MEOX2, SERPINE1 et SMAD4. Le miR-142-3p inhibe quant à lui l'interleukine 6 et ARNTL, modulateur du rythme circadien moléculaire et partenaire de la déacétylase SIRT1 (*Nakahata et al., 2009*) (*Chang and Guarente, 2013*) (*Zhou et al., 2014*).

- **Comparaison des tumeurs en fonction de l'invasivité du CMT**

La comparaison des tumeurs en fonction de leur invasivité permet la définition d'une signature plus conséquente de microARN. Les dérégulations de quatre d'entre eux (miR-21, miR-199a-3p, miR-129-5p et miR-129-3p) ont été validées dans des tissus congelés par une seconde méthode. Le miR-21 est significativement élevé en cas d'invasivité, quelque soit la méthode et quelque soit le type d'échantillon utilisé. Les miR-199a-3p et miR-129-5p apparaissent comme significativement corrélés au pronostic de la maladie.

L'analyse de cette signature par une approche systémique nous révèle des **motifs de co-expression transcriptomique**, correspondant à 3 grandes fonctions cellulaires. Effectivement, des microARN, même encodés dans des régions très diverses du génome peuvent, par des jeux d'interactions chromatinienne, réguler de concert certaines fonctions (*Chen et al., 2013*). Ainsi, l'analyse simultanée des 18 microARN dérégulés met en lumière – pour les tumeurs invasives - une **capacité accrue à la signalisation membranaire**, une **dérégulation du cycle cellulaire**, et un possible **phénomène de différenciation de progéniteurs embryonnaires**.

1. La famille des miR-199 et les dynamines

Parmi les microARN sur-exprimés dans les tumeurs agressives, nous observons :

- ✓ les **miR-199a-3p** et **miR-199a-5p**, dérivés du même précurseur mir-199a, dont les gènes MIR199A1 et MIR199A2 sont des mirtrons inclus dans les gènes-hôtes *DNM3* (1q24.3) et *DNM2* (19p13.2).
- ✓ Le **miR-199b-5p**, produit du gène MIR199B situé dans un intron **de *DNM1*** (9q34.11).

Les microARN miR-199a et b ciblent – entre autres – les transcrits de *CD44*, *SMAD1*, *MET*, *HES1*, *DDR1*, *ERBB2*, *IKBKB*, *SIRT1*, *HIF1A* et *EDN1* (endothéline 1).

- ✓ Le **miR-124**, qui est issu du même polycistron que MIR199A1 et est également localisé dans *DNM3*. Le mir-124 est impliqué dans la régulation du cycle cellulaire par inhibition de CDK2, CDK6 et CDK4, mais cible également ITGB1, la vimentine et le récepteur à l'IL-6.

Cette association non fortuite argumente une **sur-expression des gènes codant pour les dynamines** (Figure 39), molécules permettant la formation des vésicules d'**endocytose** par interaction avec les **cavéolines** (Yao *et al.*, 2005).

La dynamine 2 est particulièrement impliquée dans l'oncogenèse des glioblastomes, dans lesquels elle permet la médiation du signal PDGFRA/SHP2 (Feng *et al.*, 2012). Sa sur-expression est également liée aux carcinomes pancréatiques et prostatiques (Xu *et al.*, 2013) et sa diminution a été corrélée à l'invasivité des carcinomes épidermoïdes du col utérin (Lee *et al.*, 2010).

Ainsi, cette observation suggère une **augmentation du trafic membranaire** dans les tumeurs les plus agressives, et possiblement une **augmentation de la médiation des signaux des récepteurs aux facteurs de croissance**.

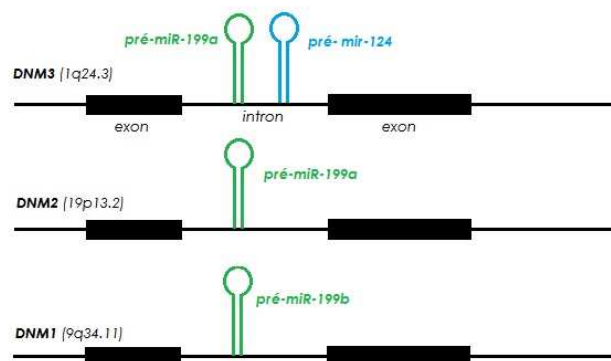
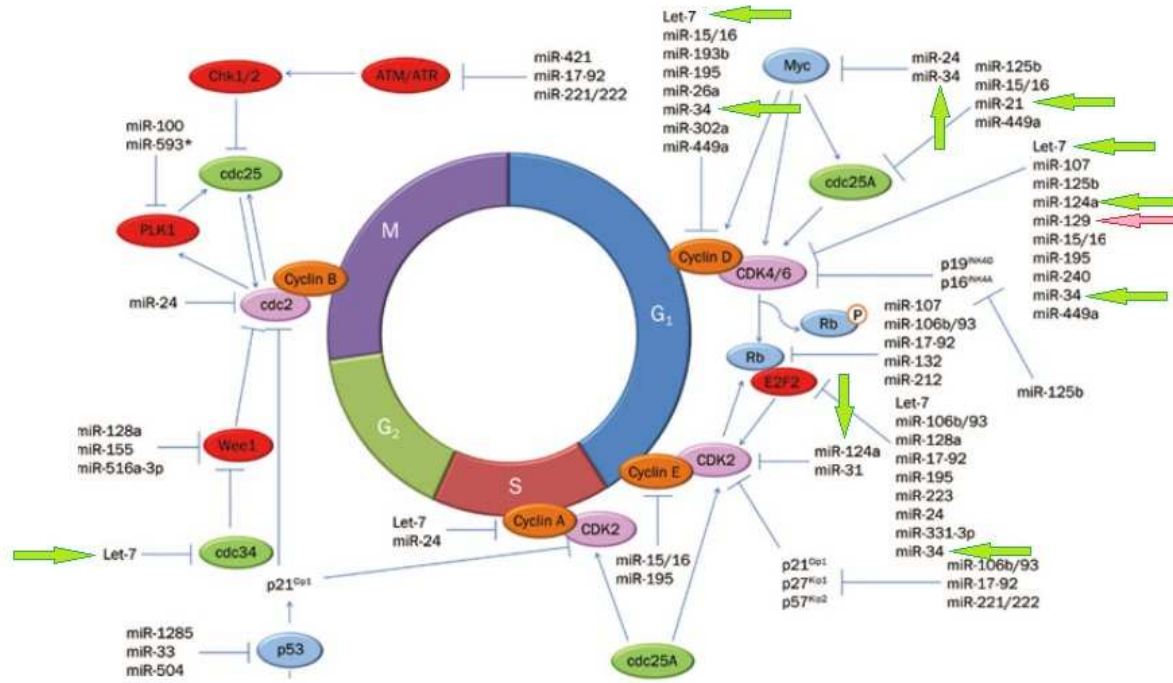


FIGURE 39 : ORGANISATION GÉNOMIQUE DE *MIR199* ET *MIR124*



Modifié de (Liang and He, 2011)

és dans les CMT invasifs sont indic

Les microARN sous-exprimés sont indiqués par une flèche rouge..

3. La différenciation des cellules souches embryonnaires

Enfin, nous distinguons, dans cette signature d'invasivité, une sur-expression des miR-34a, miR-143 et miR-145, suppresseurs de tumeurs habituellement sous-exprimés dans les tumeurs primaires et leurs localisations secondaires.

Ici encore, l'expression concomitante de plusieurs microARN semble indiquer une spécificité des tumeurs de type CMT. En effet :

- ✓ Les **miR-34a, miR-21, miR-301a et miR-124** sont fortement exprimés dans les cellules-souches embryonnaires, dont ils médient les processus de différenciation (*Aranha et al., 2011*).
- ✓ Le **miR-145** (co-exprimé avec **miR-143** car situés sur le même cistron) inhibe MYC après activation transcriptionnelle médiée par JAG1 (*Boucher et al., 2011*) et p53 (*Sachdeva et al., 2009*). Il est lui-même réprimé par les protéines RAS oncogéniques, par le biais d'un élément de réponse RREB1 (RAS-related Element Binding 1) (*Kent et al., 2010*). Et à l'instar des microARN précédemment cités, celui-ci joue un rôle primordial dans l'inhibition de la pluripotence et l'activation des cascades moléculaires de différenciation des cellules souches embryonnaires humaines, notamment via son action sur OCT4, SOX2 et Nanog (*Xu et al., 2009*) (*Tiscornia and Belmonte, n.d.*) (*Jain et al., 2012*).
- ✓ Le **miR-154*** joue quant à lui un rôle antagoniste, par favorisation de l'auto-renouvellement de ces mêmes cellules.

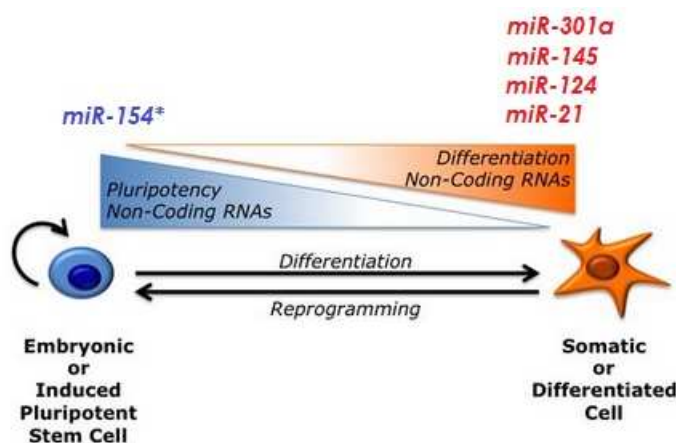


FIGURE 41 : MICROARN ET DIFFÉRENCIATION NEURALE

Ce panel de microARN semble confirmer la **présence de cellules souches embryonnaires** dans les tumeurs de type CMT. Cette observation est corroborée par la description récente d'une population de cellules CD133+ (pentaspanine à la surface de nombreux

progéniteurs embryonnaires) dans la lignée cellulaire TT (Zhu et al., 2010). (Kucerova et al., 2013). A ce jour, aucune donnée concernant l'évaluation de cette population de la lignée MZ-CRC1 n'est disponible.

Ainsi, les tumeurs invasives, de part leur profil d'expression microARN, semblent être majoritairement constituées de **cellules en cours de différenciation**.

❖ IMPLICATIONS CLINIQUES POTENTIELLES DES MICROARN VALIDES

Les microARN constituent une classe de biomarqueurs prometteuse, et notamment par le fait qu'ils soient retrouvés dans les liquides biologiques, permettant une exploration non invasive des états pathologiques.

Nous avons confirmé la présence de microARN au niveau sérique, et nous sommes parvenus à quantifier de façon adéquate deux de nos marqueurs tissulaires, à savoir **miR-21-5p et miR-199a-3p**. Ces deux microARN semblent **hyper-représentés dans le sérum de patients porteurs de CMT** comparativement à des individus sains.

L'**augmentation de miR-21 au niveau circulant** – d'un facteur 100 comparativement aux témoins - a également été relatée chez des patients porteurs de **glioblastomes** non opérés (n=10). Les concentrations observées n'étaient pas corrélées au volume tumoral, mais les taux sériques de miR-21 se sont normalisés après chirurgie dans 9/10 cas. Dans un cas, la concentration n'a pas été modifiée par le traitement, et une récurrence de la pathologie a été observée quelques semaines plus tard (Ilhan-Mutlu et al., 2012).

Une augmentation de miR-21 au niveau sérique est également observée en cas de **tumeur pancréatique** (P. Wang et al., 2013), **oesophagienne**, mais également dans les **ostéosarcomes** (Ouyang et al., 2013), les **carcinomes mammaires** (Wang et al., 2010) (Si et al., 2013) et les **cancers bronchiques** (Wang et al., 2011) (Sanfiorenzo et al., 2013). Contrairement à ce que nous avons observé dans le CMT, l'augmentation du miR-21 semble corrélée à une diminution de miR-199a dans ces derniers types tumoraux. Ces études mentionnent également une relation à la survie globale des patients, critères que nous n'avons pu étudier ici par manque d'effectif.

De telles modifications ne sont pas spécifiques aux pathologies tumorales : une augmentation conjointe de miR-21 et de miR-199a est observée dans les situations d'**hypoxie** (anomalie cardiovasculaire, infarctus du myocarde, hypoxie foetale) et diverses **réactions inflammatoires**.

Une **augmentation isolée de miR-199 sérique** est observée en cas d'endométriose (W.-T. Wang *et al.*, 2013) et de syndrome aigü de maladie du greffon contre l'hôte (Xiao *et al.*, 2013).

De nombreux articles font état de l'utilisation de la quantification du miR-21 en tant que marqueur circulant des tumeurs, mais la grande **hétérogénéité des résultats obtenus**, y compris dans les mêmes sous-types tumoraux démontre une nécessité d'amélioration des procédures pré-analytiques et analytiques, et notamment une meilleure prise en charge du prélèvement à analyser (conditions de centrifugation, d'acheminement, de délai de traitement), et une définition optimisée des normalisateurs à utiliser.

De plus, la biologie des microARN n'étant pas entièrement élucidée, nous ne connaissons pas les sources possibles de ces acides nucléiques circulants. Pour exemple, les cellules sanguines (érythrocytes ou leucocytes), en cas de lyse, pourraient expliquer les différences observées (Pritchard *et al.*, 2012). Aussi, il convient de rester prudent sur les conclusions portées devant des tels résultats.

Nous savons maintenant que les microARN sont abondants et aisément quantifiables dans le sang. Ils semblent protégés de l'action des nucléases, soit par **encombrement stérique** en raison d'un attachement à une protéine chaperonne (possiblement Ago), soit par isolation dans des **microvésicules, exosomes ou corps apoptotiques** (Figure 42).

Si le relargage de vésicules ou d'acides nucléiques libres par les cellules en apoptose ou en nécrose semble aléatoire, il est maintenant établi que les exosomes libérés par les cellules sécrétrices présentent un **contenu spécifique**, non dépendant de l'expression cellulaire en microARN (Mittelbrunn *et al.*, 2011). De plus, les particules libérées sont capable, par un mécanisme d'endocytose, de **transférer** leur contenu à des cellules réceptrices (Montecalvo *et al.*, 2012), et plus particulièrement des protéines et des petits ARN (Stoorvogel, 2012). Ce mécanisme est utilisé, entre autres, par certains virus (Pegtel *et al.*, 2010). Cette spécificité de chargement constitue un nouveau modèle de communication inter-cellulaire, et confère aux microARN un rôle de signaux de régulation systémiques importants.

Les cellules cancéreuses seraient également capables de libérer de telles vésicules, expliquant les mécanismes paracrines, le dialogue avec le système immunitaire ou encore les effets *by-stander* observés dans certaines tumeurs (Kahlert and Kalluri, 2013).

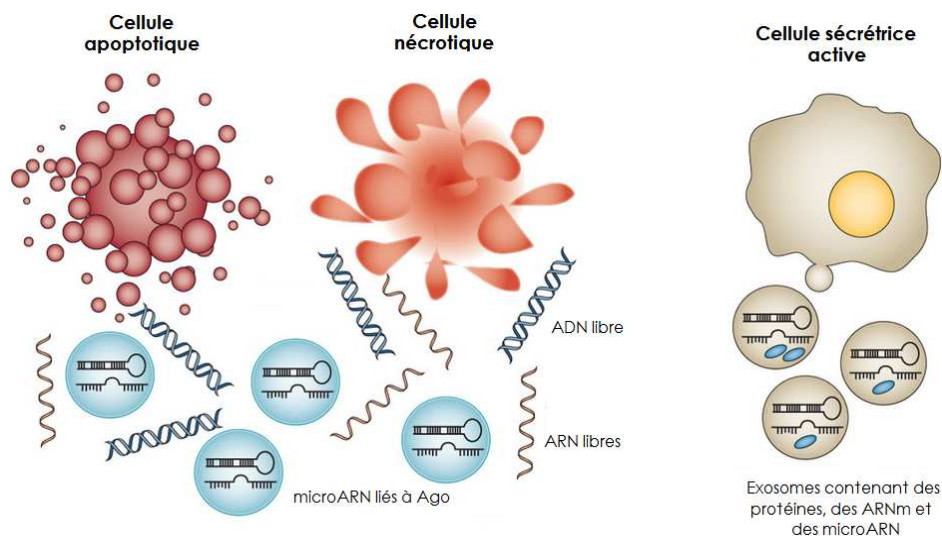


FIGURE 42 : ORIGINE DES MICROARN CIRCULANTS

Les cellules parafolliculaires sont des cellules sécrétrices d'un grand nombre d'hormones, et cette spécificité nous laisse penser qu'elles puissent être aptes à sécréter des exosomes. Nous l'avons vérifié par ultracentrifugation du surnageant de culture de lignée TT et avons retrouvé une quantité non négligeable de telles vésicules. Ces particules expriment à leur surface les tétraspanines CD9 et CD63, ainsi que le récepteur RET et la calcitonine. Ces arguments seront utilisés par la suite pour isoler les exosomes issus de tumeur CMT à partir de sérum de patient, afin d'en évaluer le contenu en microARN.

En conclusion, l'analyse de l'expression des microARN dans les tumeurs de type CMT nous montre, une fois encore, la relative homogénéité moléculaire de ce type tumoral. Très peu de microARN semblent dérégulés en fonction des critères cliniques, et bien que l'étude ait été menée sur 49 tissus, seule la comparaison relative à l'invasivité des tumeurs s'est révélée significative. Celle-ci nous permet tout de même de définir des marqueurs tissulaires, mais aussi et surtout circulants (plus facile d'accès et permettant des mesures répétées) d'invasivité et de pronostic du CMT, quantifiables à l'aide de méthodes sensibles et spécifiques.

Nous chercherons, dans la partie suivante, quels sont les fonctions particulières de deux de ces marqueurs : le miR-21, sur-exprimé dans les tissus invasifs et dans le sérum de patients ; et le miR-129, suivant la régulation inverse.

4.3. ETUDE FONCTIONNELLE DES MIR-21 ET MIR-129 DANS LES LIGNÉES TT ET MZ-CRC1

4.3.1. Objectifs

Nous avons tenté d'élucider le rôle spécifique tenu par les microARN miR-21 et miR-129 dans l'oncogenèse du CMT et essayé d'établir un possible lien avec les modifications transcriptomiques précédemment observées, par transfection dans nos modèles cellulaires TT et MZ-CRC1.

4.3.2. Matériel et méthodes

Dans l'objectif de mieux comprendre les implications fonctionnelles des microARN révélés par les expérimentations précédentes, nous avons réalisé une **transfection transitoire des formes précurseurs mir-21 et mir-129** (Pre-miR™ miRNA Precursors – Ambion), ainsi que d'un **antagoniste du miR-21-5p** (LNA Anti-miR™ miRNA Inhibitor - Ambion), dans nos modèles d'étude cellulaires TT et MZ-CRC1.

Toutes les analyses ont été réalisées parallèlement avec les contrôles synthétiques pré-mir-NEG (Pre-miR™ miRNA Precursor Negative Control #1 – Ambion), et anti-miR-NEG (Anti-miR™ miRNA Inhibitor Negative Control #1 – Ambion), en respectant strictement les conditions d'expérimentations.

- *Mise au point de la transfection*

Ce type de transfection n'ayant jamais été réalisée dans les modèles cellulaires TT et MZ-CRC1, nous avons dû, dans un premier temps, en définir les modalités.

Les premières étapes de cette mise au point ont été réalisées à l'aide du précurseur mir-1, transformé après transfection en miR-1 mature par l'enzyme Dicer endogène, et inhibant par dégradation l'ARNm ubiquitaire PTK9 (Twifilin 1).

Nous avons établi que la transfection devait être réalisée sur des cellules adhérentes présentant une confluence d'environ 80%, en présence de sérum. Les agents transfectant de type lipidique siPORT™ NeoFX™ (transfectant en phase liquide recommandé pour une application aux microARN - Life Technologies) et Lipofectamine® 2000 (Invitrogen) ont montré des efficacités de transfection similaires dans les 2 lignées. Nous avons privilégié

par la suite le réactif Lipofectamine® 2000, plus adapté aux cellules adhérentes, permettant une incubation longue sans cytotoxicité (24h dans notre cas) et régulièrement utilisé dans notre laboratoire. Les concentrations d'ARN synthétique à introduire ont été fixées empiriquement à **20 nmol/L pour les précurseurs** et à **100 nmol/L pour l'antagoniste**.

- *Validation de la méthode de transfection*

L'effet des microARN miR-21 et miR-129 dans nos modèles cellulaires TT et MZ-CRC1 a été observé après incorporation transitoire de précurseurs de forme tige-boucle, clivés au niveau cellulaire en formes matures, reproduisant l'action des microARN endogènes par inhibition ou dégradation de cibles ARNm. Ce plan expérimental a nécessité des étapes de validation de méthode à plusieurs niveaux.

Premièrement, nous devons contrôler la **quantification spécifique des formes matures**, dont la séquence nucléotidique est également présente dans les formes précurseurs. Une PCR quantitative dessinée pour quantifier la forme miR-21-5p, dont le principe est exposé en Annexe 6 (TaqMan® MicroRNA Assay ID#000397 - Applied Biosystems), a été réalisée dans des conditions semblables à celles utilisées ultérieurement, sur différentes solutions aqueuses de nucléotides de synthèse (à 20 nM). Celle-ci se révèle fortement positive pour la solution de particules mirVana® miRNA mimic (Ambion). Ces nucléotides double brin, utilisés précédemment pour la constitution des gammes de calibration et assimilés à des formes matures, servaient de contrôles positifs.

Aucun signal n'a été détecté (après 40 cycles d'amplification) pour les contrôles négatifs H₂O et pré-mir-NEG. Un signal tardif, considéré comme aspécifique, est observé pour la solution de précurseur mir-21 (Table 11).

Espèce	Concentration	Ct miR-21-5p
miR-21 "mature" (mirVana mimic)	20nM	8,6
pré-mir-21 (miRNA precursor)	20nM	38,3
pré-mir-NEG (miRNA precursor)	20nM	> 40
H ₂ O	-	> 40
cellules TT	-	23,7

TABLE 11 : CONTRÔLE DES INTERFÉRENCES DE DÉTECTION DE LA MÉTHODE DE QUANTIFICATION UTILISÉE

Deuxièmement, nous devons nous assurer du **clivage strictement intracellulaire des précurseurs**. Pour ce faire, nous avons réalisé la quantification de miR-21-5p sur des échantillons de cellules traitées différemment avec l'agent transfectant et/ou le précurseur (Figure 43). La quantification réalisée sur les cellules au contact du précurseur

mais sans agent transfectant montre des valeurs similaires aux cellules cultivées de manière ordinaire. Nous noterons tout de même que la mise en contact des cellules TT avec l'agent transfectant seul induit une modification d'expression de miR-21 (RQ=5).

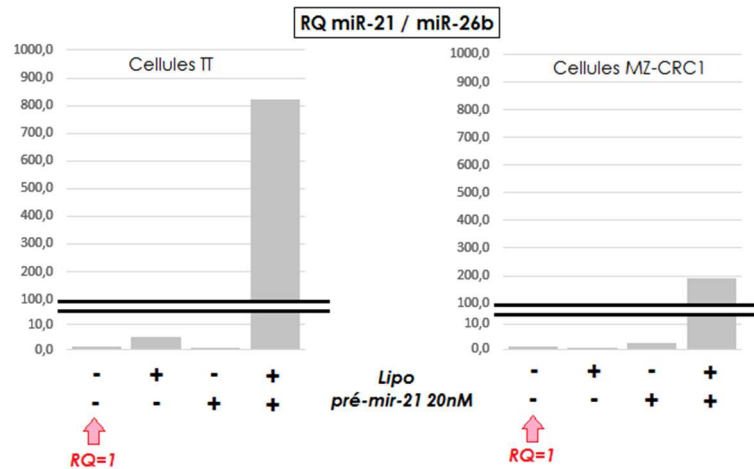


FIGURE 43 : QUANTIFICATION DE MI R-21 APRES TRANSFECTION DE SON PRECURSEUR

Troisièmement, nous devons évaluer la **durée de sur-expression effectivement induite par une transfection unique et transitoire de précurseur**. La transfection du précurseur miR-21 induit une sur-expression de la forme mature miR-21-5p de manière stable, pendant au moins 6 jours (144h) dans nos 2 modèles d'études (Figure 44). Pour rappel, le temps de doublement de nos populations cellulaires a été évalué à plus de 90h pour chacun de nos modèles.

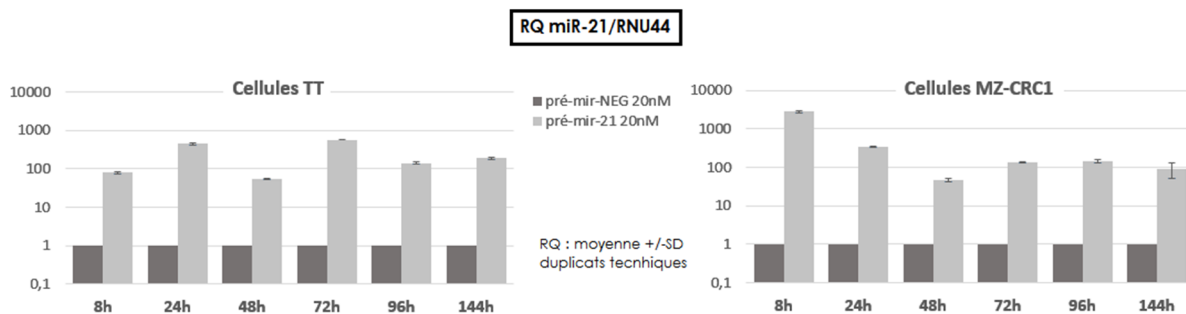


FIGURE 44 : SUR-EXPRESSION DE MI R-21 APRES TRANSFECTION TRANSITOIRE DANS LES CELLULES TT ET MZ-CRC1

Enfin, nous devons vérifier la possibilité d'observer **l'effet biologique d'un microARN exogène sur les niveaux d'expression de transcrits endogènes**, cette notion étant pour le moment controversée. En effet, si chez l'Homme la déstabilisation sans dégradation de la cible est le mécanisme théorique d'action des microARN endogènes, certaines publications ont montré qu'en pratique et dans la majorité des cas, le niveau d'expression

ARNm est également impacté par l'apport exogène de ces particules (*Hendrickson et al., 2009*) (*Guo et al., 2010*) (*Rooij, 2011*). L'utilisation du pré-miR-1 dans les conditions de transfection similaires à celles employées par la suite induit, dans nos 2 modèles cellulaires, une diminution de sa cible directe PTK9 (ARNm) de plus de 80% à 96h (Figure 45).

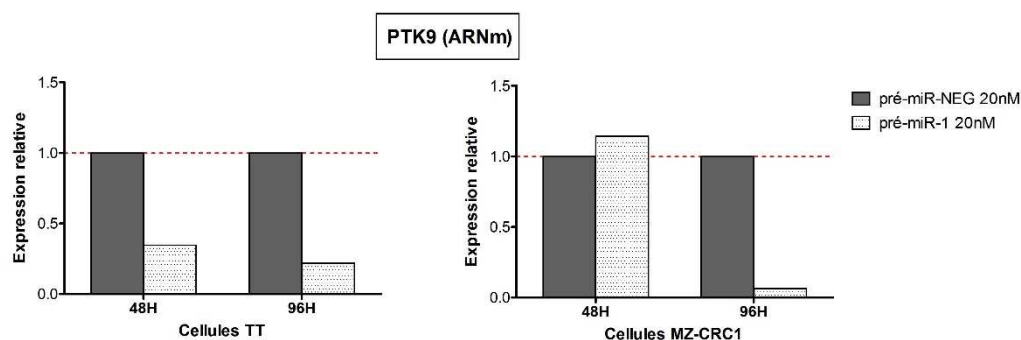


FIGURE 45 : RÉGULATION DE PTK9 INDUITE PAR L'APPORT DE MIR-1 EXOGÈNE

- *Etude des fonctions impactées par miR-21 et miR-129 dans le CMT*

Enfin, plusieurs types d'études fonctionnelles après transfection efficace de pré-mir-21, pré-mir-129 et anti-miR-21 sur les cellules TT et MZ-CRC1 ont été établies :

- ✓ Les **niveaux d'expression** des **miR-21-5p** et **miR-129-5p** ont été vérifiés par PCR quantitative, en utilisant le contrôle endogène miR-26b, sur des triplicats biologiques et des duplicats techniques.
- ✓ Les **niveaux d'expression** de **cibles potentielles** précédemment décrites de miR-21 ont été évalués par PCR quantitative (PTEN, PDCD4 – contrôle endogène ARN ribosomique 18S) et western-blot (PTEN, AKT/pAKT, STAT3/pSTAT3 – contrôle de charge vinculine), à partir des mêmes échantillons que précédemment.
- ✓ **L'ensemble des régulations transcriptionnelles** induites par les conditions de transfections (à 48h et 96h post-transfection) ont été étudiées par technique transcriptomique utilisant les puces SurePrint® G3 Human Gene Expression 8x60K v2 Microarray (G4858A-039494 - Agilent Technologies). Cette expérimentation a été réalisée sur des triplicats biologiques, hybridés de manière comparative (protocole *dual color* sans *dye-swap*) au pool des triplicats références correspondants (pré-mir-NEG ou anti-mir-NEG). Après lecture des lames, la qualité des données a été analysée avant et après normalisation grâce au logiciel arrayQualityMetrics (www.bioconductor.org), permettant d'éliminer 3 lames présentant des résultats aberrants (correspondant à 3 conditions différentes de transfection pré-mir-129). Les valeurs manquantes ont été remplacées par la méthode des plus proches

voisins (KNN) et les données ont été réduites par établissement de la médiane des signaux obtenus pour toutes les sondes d'un même transcript. Les résultats des réplicats ont ensuite été moyennés. L'analyse des voies et gènes régulés a ensuite été établie à l'aide du logiciel Ingenuity Pathway Analysis (<http://www.ingenuity.com/>).

- ✓ La **viabilité** et la **prolifération cellulaires** ont été estimées par test colorimétrique au sel de tétrazolium (WST-1 – Roche).
- ✓ La répartition des cellules dans les différentes phases du **cycle cellulaire** et l'évaluation du nombre de cellules en **apoptose** ont été étudiées par cytométrie de flux après marquage à l'iodure de propidium (Invitrogen) et comarquage iodure de propidium/annexine V (FITC Annexin V Apoptosis Detection kit II – BD Plasmingen) respectivement.
- ✓ La **production d'espèces réactives de l'oxygène** a été vérifiée à l'aide de la sonde H2-DCF (Molecular Probe) puis lecture microscopique.

4.3.3. Résultats

❖ FONCTIONS DU miR-21 DANS LES CELLULES DE CMT

L'analyse fonctionnelle des miR-21 et miR-129 a été réalisée dans les modèles cellulaires TT et MZ-CRC1, présentant tous deux une mutation de l'oncogène *RET*. Pour rappel, la lignée **TT** porte une **mutation p.Cys634Arg**, entrant dans le groupe à risque intermédiaire ATA-C, et la lignée **MZ-CRC1** porte une mutation **p.Met918Thr** représentative des tumeurs à haut risque ATA-D.

Nous pouvons, grâce aux données obtenues précédemment en transcriptomique et en PCR quantitative, évaluer le niveau d'expression basal de miR-21-5p dans ces lignées cellulaires. Celui-ci semble faible comparativement aux échantillons tumoraux pour la lignée TT (résultats obtenus sur différents extraits nucléiques), et près de **10 fois supérieur** dans la lignée MZ-CRC1 (évaluation en PCR quantitative - Figure 46). De ce fait, nous avons par la suite évalué l'impact fonctionnel d'une sur-expression de miR-21 dans la lignée TT et celui d'une dérégulation, sur- ou sous-expression, dans la lignée MZ-CRC1.

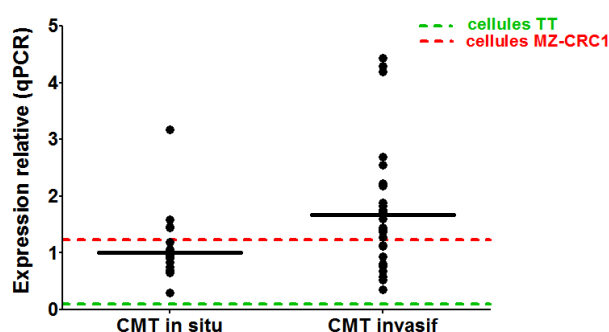


FIGURE 46 : EXPRESSION BASALE DE miR-21 DANS NOS MODÈLES D'ÉTUDE

Le miR-21 est un oncomir activement étudié, et il a été rendu responsable de la régulation de très nombreuses cibles, entrant dans divers mécanismes oncogéniques. Les plus connues d'entre elles étant **PTEN** (*Phosphatase and Tensin homolog*, antagoniste de la PI3 kinase ; et **PDCD4** (*Programmed Cell Death 4*), modulateur de l'apoptose.

Dans un premier temps, nous avons évalué l'impact global de la sur-expression de miR-21 sur le transcriptome cellulaire, afin d'en définir les cibles directes ou indirectes. Par la suite, nous avons analysé la régulation de PTEN (ARNm et protéine) et de PDCD4 (ARNm) dans nos modèles cellulaires très spécifiques. Enfin, nous avons vérifié les conséquences fonctionnelles de cette dérégulation, au niveau de la prolifération, du cycle cellulaire et de l'apoptose des cellules TT et MZ-CRC1.

- *Effets de la sur-expression de miR-21 dans les cellules TT*

La transfection du précurseur mir-21 induit, au niveau cellulaire, une augmentation de la forme mature miR-21-5p d'un facteur supérieur à 1000, à 48h et 96h après transfection (Figure 47).

Rappelons que ce niveau d'expression, situé bien au-delà des niveaux observés pour la plupart des microARN endogènes, ne reflète pas la quantité de particules liées aux protéines Ago. La fraction de ces molécules fonctionnelles a été évaluée – par un travail réalisé sur des cellules de cancer mammaire MDA-MB-231 transfectées par le pré-miR-200a – à moins de 10% (Thomson *et al.*, 2013).

L'analyse transcriptomique globale révèle peu de transcrits impactés par cette sur-expression : 105 et 70 ARNm présentent un facteur d'expression différentielle de 1,5 (p-value ajustée <0,05) à 48h et 96h respectivement.

A 48 heures post-transfection, les fonctions de motilité, de croissance et de prolifération cellulaires semblent activées. En revanche, la mort cellulaire et l'apoptose seraient inhibées. **Au niveau moléculaire, la voie PI3K/Akt est activée, avec une sur-expression de l'intégrine $\beta 1$, de la protéine HSP90, du polypeptide 14-3-3 et une diminution transcriptionnelle de la protéine chaperonne TSC1 (Hamartine)** (Annexe 9).

A 96 heures, les effets sur les fonctions cellulaires semblent atténués, à l'exception des mécanismes de communication cellule-à-cellule et de recrutement et d'activation du système immunitaire. **Les principales voies moléculaires activées correspondent à celles du signal $TGF\beta$ et à la présentation de l'antigène aux cellules leucocytaires, avec en particulier une augmentation des ARNm du $TGF\beta 2$, de la calréticuline et des molécules du CMH de classe I alpha.** La voie de réponse au stimulus de la vitamine D est également impactée, avec une augmentation de l'expression de l'**ostéopontine**, ainsi que la voie Notch, avec une augmentation de **HES4** d'un facteur 2 (Annexe 9).

Les gènes les plus amplement dérégulés dans cette condition de transfection sont indiqués en Annexe 10.

L'analyse des niveaux d'expression spécifiques de PTEN et de PDCD4 montre une faible modification de leur expression en terme de transcrits. En revanche, **PTEN est sous-exprimé** au niveau protéique et la sur-expression de miR-21 entraîne une **phosphorylation de l'effecteur AKT et du facteur de transcription STAT3** (Figure 47).

Enfin, au niveau fonctionnel, nous observons une **augmentation de la prolifération**, sans modification de répartition des cellules dans le cycle cellulaire (Figure 47).

L'étude de l'apoptose par marquage des phosphatidylsérines s'est révélée impossible à réalisée ici : les cellules TT présentent une positivité à l'annexine V, quelques soient leurs conditions de culture ou de traitement (données non présentées).

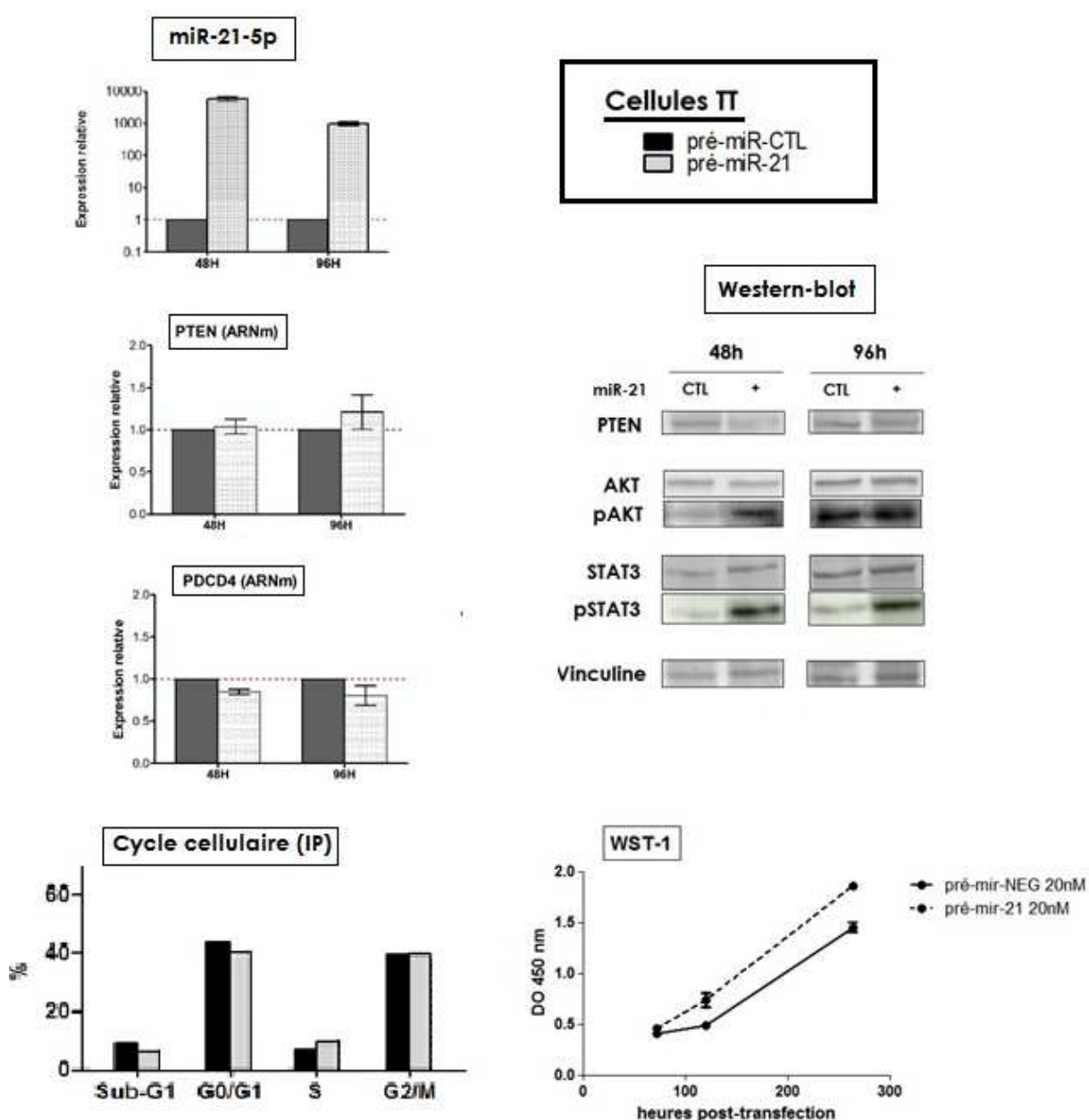


FIGURE 47 : RÉGULATION DE PTEN ET PDCD4 PAR miR-21 DANS LES CELLULES TT

- *Effets de la dérégulation de miR-21 dans les cellules MZ-CRC1*

Nous avons obtenu, en fonction des conditions de transfection, une sur-expression de miR-21 de plus de 100X et une inhibition de celui-ci de plus de 50% (Figure 49). À titre indicatif, le niveau d'expression de miR-21-5p obtenu à 96h après transfection de son inhibiteur dans les cellules MZ-CRC1 est comparable à celui de la lignée TT non transfectée.

En conditions de sur-expression, l'analyse transcriptomique globale révèle 63 transcrits significativement dérégulés, à 48h après transfection. **La motilité, le développement cellulaire et les communications cellule-à-cellules** semblent significativement dérégulées (Figure 48). **Les transcrits notables sous-exprimés étant les histones 1H (HIST1H -4A, -1B, -2AA, -1D et -1E), le récepteur à l'éphrine B1, la catalase, la NADH co-enzyme Q réductase et les protéines MRE11 et SMC1 de la voie de signalisation ATM.**

A 96h en revanche, aucune modification significative du transcriptome global des cellules ne peut être définie (seuls 2 transcrits présentant un facteur différentiel supérieur à 1,5), malgré une très bonne qualité d'analyse des biopuces.

L'analyse des niveaux d'expression de PTEN et de PDCD4 montre une diminution discrète de leurs transcrits, à 48h post-transfection. Comme pour les cellules TT, nous notons dans cette condition de transfection une **activation d'AKT et de STAT3** (Figure 49).

Au niveau fonctionnel, l'étude de la répartition des cellules dans les phases du cycle cellulaire nous révèle que la majorité des cellules se trouvent en phase G₀/G₁, élément possiblement indicateur de **cellules en quiescence**.

La détection des **espèces réactives de l'oxygène (ROS)** par marquage au DCF montre une **augmentation de leur production**, dans toutes les cellules au niveau cytoplasmique, très marquée pour quelques unes d'entre elles au niveau périnucléaire à 140 heures post-transfection (Figure 50).

En conditions de sous-expression, l'analyse transcriptomique globale ne révèle aucun transcrit significativement dérégulé. Si l'ARN messager PTEN semble sous-exprimé en PCR quantitative, aucune conclusion ne peut être portée au niveau protéique au sujet de l'état d'activation d'AKT et de STAT3 (Figure 49). Enfin, au niveau fonctionnel, nous observons une **majoration des cellules apoptotiques** induisant une **diminution de la prolifération cellulaire** 140 heures après transfection (Figure 49).

Molecular and Cellular Functions	p-value	# Molecules	Top canonical pathways	p-value	Ratio
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	8,93E-05 - 2,93E-02	9	Granzyme A Signaling	1,34E-05	3/20 (0,15)
Cellular Assembly and Organization	8,93E-05 - 3,04E-02	15	Mitochondrial Dysfunction	8,01E-03	3/215 (0,014)
Cellular Movement	8,93E-05 - 2,93E-02	10	ATM Signaling	9,68E-03	2/66 (0,03)
DNA Replication, Recombination, and Repair	8,93E-05 - 3,08E-02	6	Mitotic Roles of Polo-Like Kinase	1,2E-02	2/74 (0,027)
Cellular Development	5,35E-04 - 2,93E-02	18	Protein Kinase A Signaling	1,45E-02	4/409 (0,01)

FIGURE 48 : PRINCIPALES OBSERVATIONS TRANSCRIPTOMIQUES OBSERVÉES APRÈS SUR-EXPRESSION DE MIR-21 DANS LES CELLULES MZ-CRC1

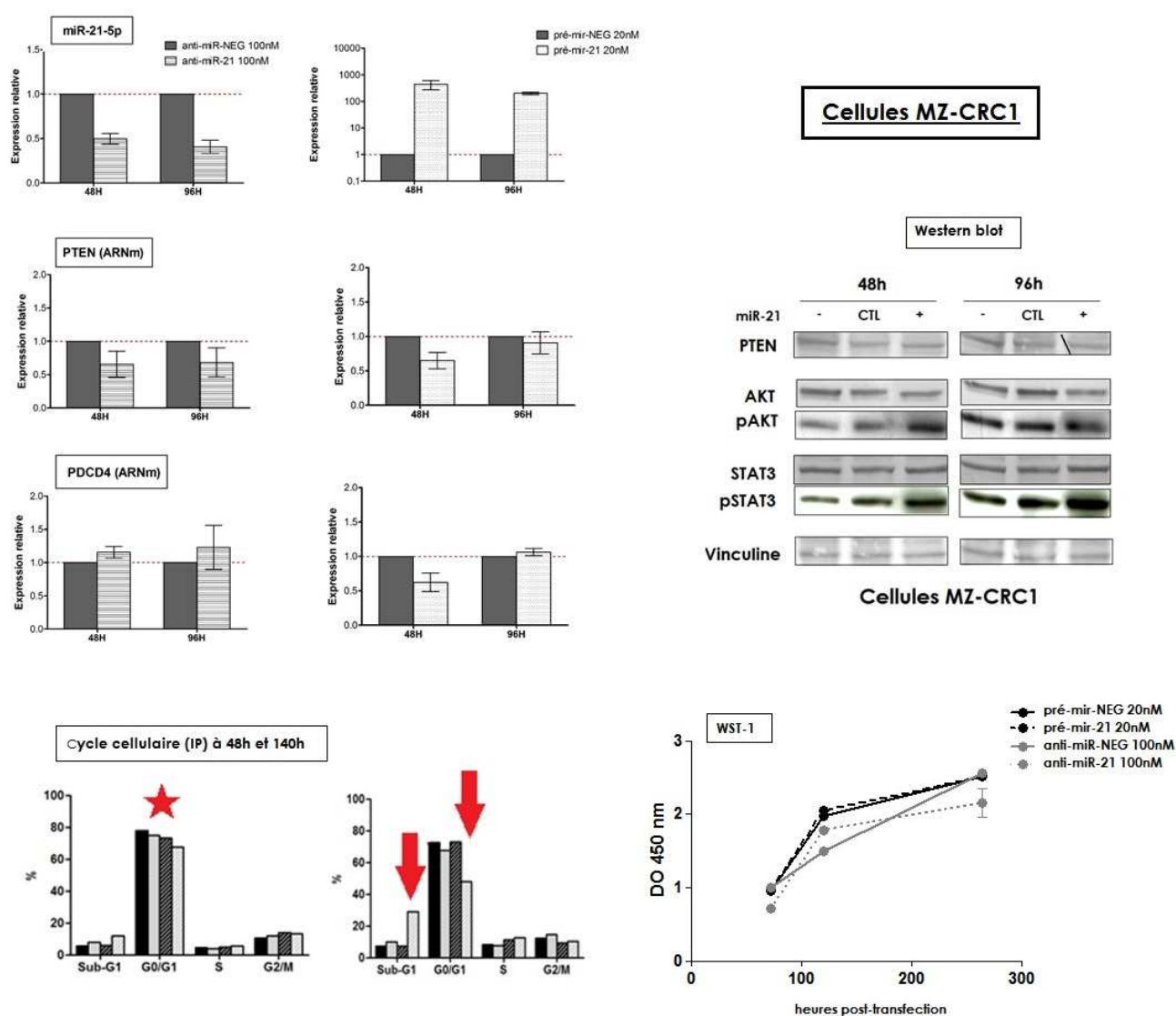


FIGURE 49 : RÉGULATION DE PTEN ET DE PDCD4 PAR MIR-21 DANS LES CELLULES MZ-CRC1

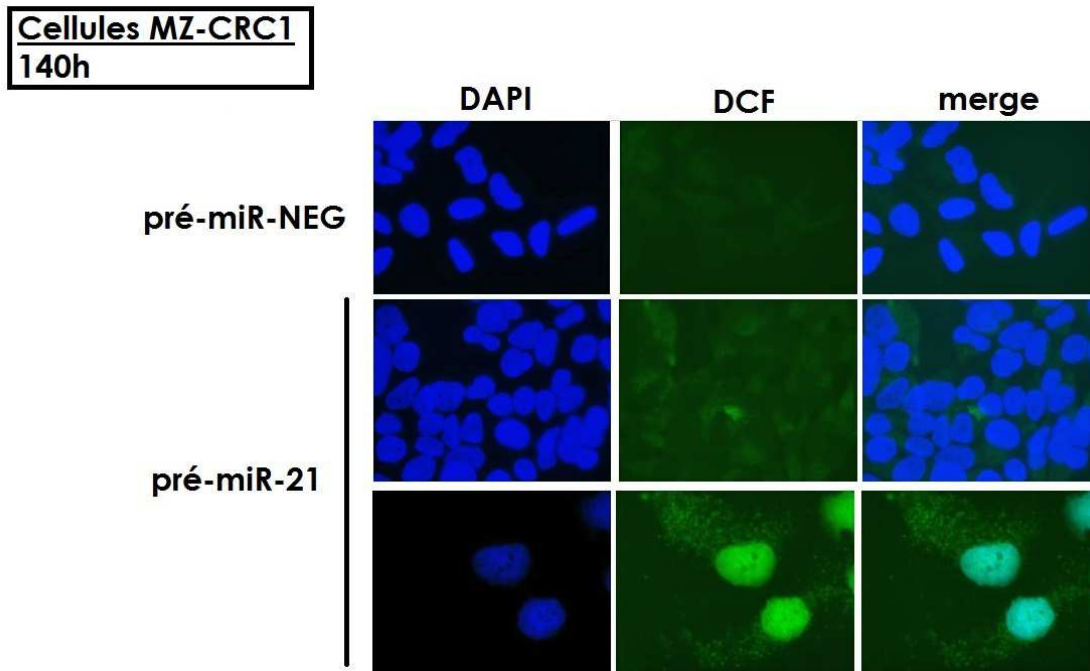


FIGURE 50 : EVALUATION DE LA PRODUCTION DE ROS INTRACELLULAIRES APRÈS SUR-EXPRESSION MIR-21 DANS LES CELLULES MZ-CRC1

❖ FONCTIONS DU miR-129 DANS LES CELLULES DE CMT

Le niveau d'expression basal de miR-129-5p dans les lignées cellulaires TT et MZ-CRC1 est faible, considéré comme **négatif** en technique transcriptomique pour les cellules TT et **4 fois plus faible** en PCR quantitative pour les cellules MZ-CRC1 (Figure 51).

Nous présenteront ici l'impact fonctionnel de la **sur-expression de mir-129** sur le transcriptome global des cellules.

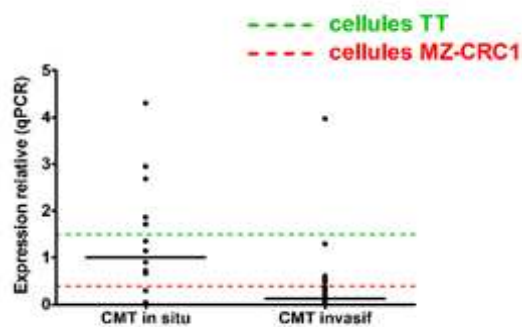


FIGURE 51 : EXPRESSION BASALE DE MIR-129 DANS NOS MODÈLES D'ÉTUDE

- *Effets de la sur-expression de miR-129 dans les cellules TT*

La transfection du précurseur pré-miR-129 permet une sur-expression nette de miR-129-5p dans les cellules TT, à 48h et 96h après transfection (données non présentées). 206 et 189 transcrits sont régulés suite à cette modification.

A 48h, **la croissance et la prolifération cellulaires sont inhibées**, et **les voies de mort cellulaire sont activées**. Les systèmes de transcription du génome sont globalement moins fonctionnels.

Au niveau moléculaire, les contrôleurs du cycle cellulaire **CHK1**, **MCM7**, **RAD17** ainsi que **MYC** et l'effecteur de p53 **PERP** sont sous-exprimés. Le **cluster d'histones 1H4**, le facteur de sortie de cycle et de différenciation neuronal **CEND1** et le modulateur de l'autophagie **DRAM1** sont sur-exprimés.

Nous remarquons une augmentation nette des signaux de **mort des cellules embryonnaires** (Figure 52).

Les récepteurs **PDGFRA** et le calcium-sensor **CaSR** sont sous-exprimés, alors que le récepteur neurotrophique **NTKR3**, le récepteur à la leptine **LEPR** et le récepteur dopaminergique **DRD5** sont sur-exprimés.

A 96h, nous observons, en sus d'une diminution de la motilité cellulaire, un fort impact sur les **voies de régulation métaboliques**, avec des indices suggérant un fort catabolisme : diminution des lipides, du glucose et des hormones stéroïdiennes intra-cellulaires, augmentation de l'import du glucose, de la glucokinase et de l'AMP cyclique et augmentation du transport moléculaire.

Les transcrits notables dérégulés par cette condition de transfection à 48h et 96h sont indiqués en Annexe 11.

- *Effets de la sur-expression de miR-129 dans les cellules MZ-CRC1*

Aucune variation du transcriptome des cellules MZ-CRC1 secondaire à la transfection efficace du miR-129 n'a pu être observée dans nos conditions expérimentales. Seuls les transcrits de la somatostatine SST (sur-exprimé) et du petit ARN nucléaire 7SK (sous-exprimé) présentent un facteur différentiel d'expression significatif et supérieur à 1.5.

Cellules TT pré-miR-129 48h

Molecular and Cellular Functions	p-value	# Molecules	Name	p-value	Ratio
Cellular Development	2,19E-06 - 1,64E-02	53	Role of BRCA1 in DNA Damage Response	1,34E-02	3/71 (0,042)
Cellular Growth and Proliferation	2,45E-05 - 1,64E-02	57	UDP-D-xylose and UDP-D-glucuronate Biosynthesis	1,64E-02	1/7 (0,143)
Cell Cycle	4,46E-05 - 1,64E-02	29	Formaldehyde Oxidation II (Glutathione-dependent)	1,64E-02	1/10 (0,1)
Cell Death and Survival	6,22E-05 - 1,64E-02	60	STAT3 Pathway	2,25E-02	3/80 (0,038)
DNA Replication, Recombination, and Repair	6,76E-05 - 1,64E-02	22	Trehalose Degradation II (Trehalase)	2,46E-02	1/8 (0,125)

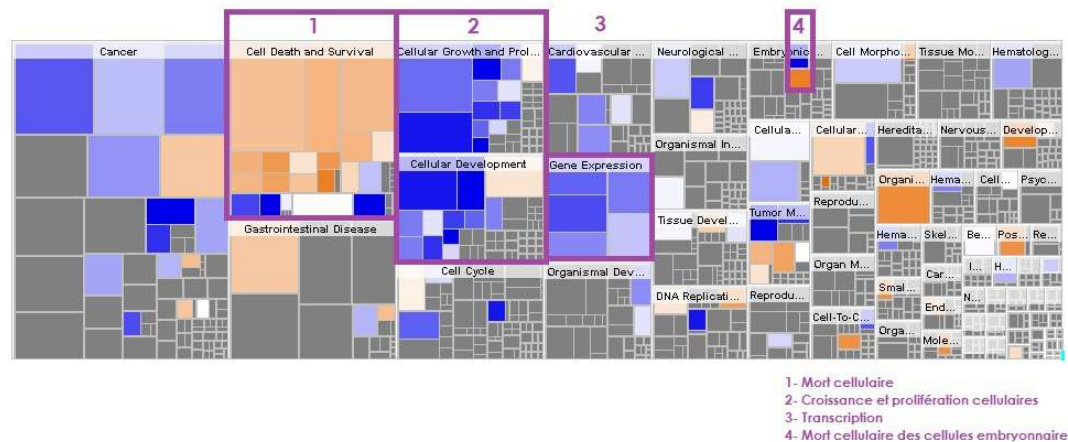


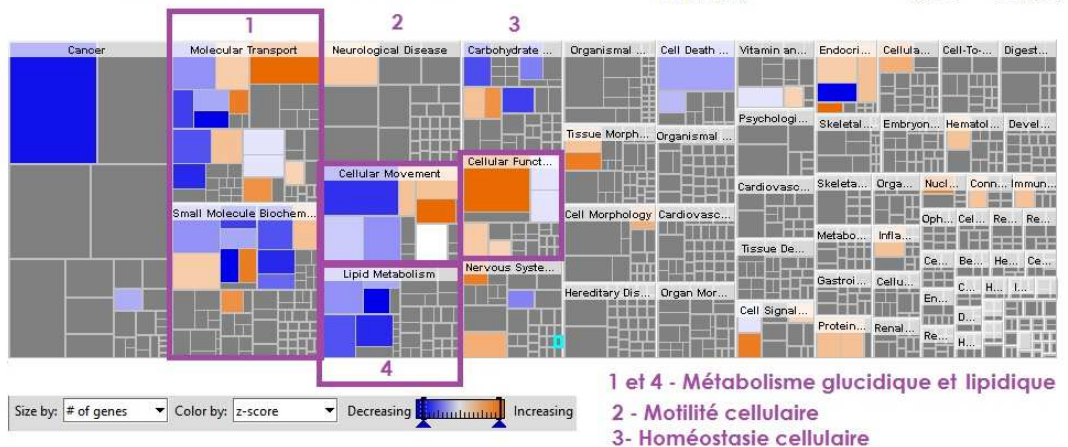
FIGURE 52 : EFFETS DE LA SUR-EXPRESSION DE MIR-129 SUR LE TRANSCRIPTOME DE CELLULES TT

Les fonctions impactées sont représentées proportionnellement au nombre de gènes significativement régulés. Les fonctions activées (z-score positif) sont représentées en orange, celles inhibées en bleu (z-score négatif).

La coloration grise correspond aux fonctions pour lesquelles la régulation n'est pas prévisible.

Cellules TT pré-miR-129 96h

Molecular and Cellular Functions	p-value	# Molecules	Name	p-value	Ratio
Carbohydrate Metabolism	5,95E-05 - 2,70E-02	17	PAK Signaling	3,09E-03	4/110 (0,036)
Molecular Transport	8,21E-05 - 2,70E-02	38	The Visual Cycle	4,57E-03	2/28 (0,071)
Protein Synthesis	8,21E-05 - 2,58E-02	12	Integrin Signaling	1,13E-02	5/208 (0,024)
Small Molecule Biochemistry	8,21E-05 - 2,70E-02	33	Cellular Effects of Sildenafil (Viagra)	1,18E-02	4/155 (0,026)
Cellular Development	2,74E-04 - 2,70E-02	12	STAT3 Pathway	1,36E-02	3/80 (0,038)



4.3.4. Discussion

Le microARN **miR-21** est un oncomir très étudié, et un grand nombre de ses cibles ont été validées au niveau expérimental. Il régule, dans une même cellule, plusieurs dizaines de transcrits intervenants à tous les niveaux du métabolisme cellulaire et est, de cette façon, **impliqué dans toutes les caractéristiques du cancer**. Sa sur-expression est observée dans un grand nombre d'états tumoraux (cancer du sein, de la prostate, cancer bronchique non à petites cellules, cancer gastrique ou encore adénocarcinome pancréatique), et notamment dans les **glioblastomes** (Buscaglia and Li, 2011) (Ma et al., 2012). Il est également retrouvé sur-exprimé dans des situations non-cancéreuses (par exemple en cas de maladies cardiovasculaires) ou encore en situation physiologique.

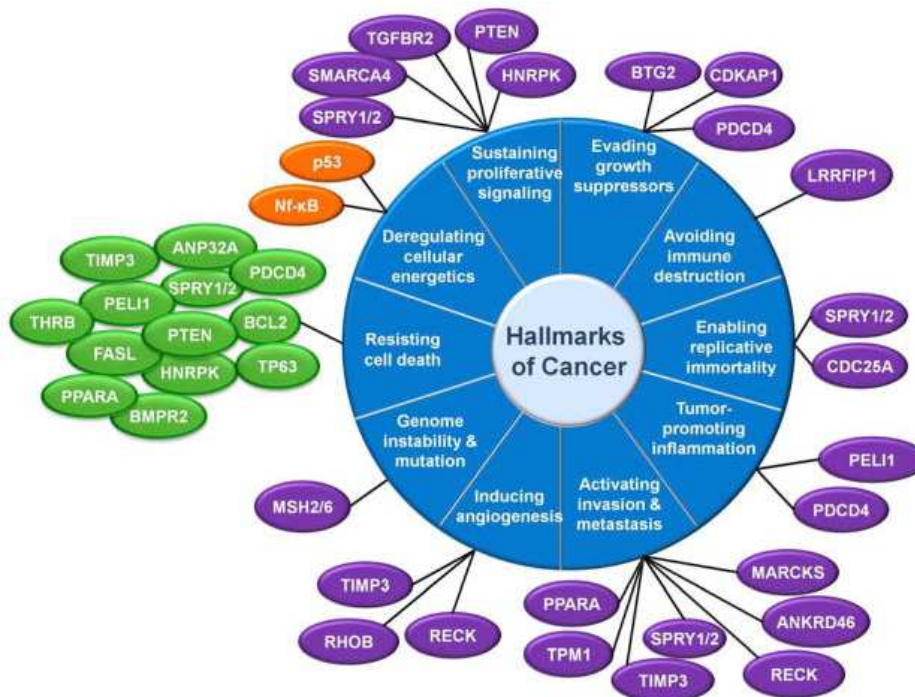


FIGURE 53 : CIBLES DE MIR-21 EXPÉRIMENTALEMENT VALIDÉES.

D'après (Buscaglia and Li, 2011).

Dans notre collection de tumeurs, l'expression de miR-21 est corrélée au degré d'invasivité histologique des CMT. Cette distinction est conservée quelque soit le type de tissu étudié, et nous avons retrouvé ce microARN au niveau circulant en forte quantité, aisément quantifiable. Son niveau d'expression est en revanche assez faible dans nos lignées cellulaires.

La sur-expression de miR-21 dans la lignée TT induit dans un premier temps **l'activation de la voie PIK3/Akt**, possiblement par le biais de PTEN. Cette observation a été confirmée au niveau protéique et transcriptomique. La **voie du TGF β** est ensuite activée, et les systèmes de communication inter-cellules, de recrutement et **d'activation des leucocytes** avec présentation d'antigènes semblent (d'un point de vue transcriptomique) augmentés. Au niveau fonctionnel, nous observons une augmentation de la **prolifération cellulaire**, sans modification du cycle cellulaire. Nous observons également une **activation de STAT3**, régulateur transcriptionnel de MIR21, suggérant, dans notre modèle cellulaire, l'existence d'une boucle d'activation par miR-21.

Les effets observés dans les cellules MZ-CRC1 sont les mêmes au niveau protéique, à savoir une **activation nette d'AKT**. Au niveau transcriptomique, nous observons une diminution du système de détoxification des espèces réactives de l'oxygène, confirmée par l'observation d'une **augmentation des ROS** à 140 heures post-transfection. Les **histones 1H et la voie ATM** (système de contrôle des cassures double-brin faisant suite à un choc ionisant, par exemple) sont sous-exprimées. Aucune augmentation de la prolifération n'a été observée sur ces cellules apparemment dans un état quiescent. Mais en revanche, **l'inhibition de miR-21 semble induire l'apoptose** de ces mêmes cellules.

Ainsi, nous confirmons l'effet pro-prolifératif, pro-inflammatoire et anti-apoptotique du miR-21 dans notre système d'étude.

Contrairement à miR-21, peu de cibles ont été expérimentalement validées pour le microARN miR-129, à l'exception de SOX4 et de CDK6.

Le mir-129 est retrouvé diminué dans les CMT, et non quantifiable dans les formes invasives. L'induction de son expression dans les cellules TT provoque une diminution des signaux de croissance et de développement cellulaire, et favorise la sortie du cycle cellulaire. Dans un second temps, une augmentation notable du métabolisme cellulaire est observée.

L'unique modification observée dans les cellules MZ-CRC1 suite à la transfection de pré-mir-129 est l'augmentation de la transcription du gène codant pour la somatostatine.

D'après ces résultats préliminaires, miR-129 semble provoquer l'arrêt du cycle cellulaire, pour conduire les cellules vers un état différencié, avec un catabolisme et une activité sécrétoire très augmentés.

Par cette validation fonctionnelle, nous confirmons le rôle de miR-21 (sur-exprimé dans les tumeurs invasives) et miR-129 (sous-exprimé dans les tumeurs invasives) dans les

mécanismes oncogéniques et le développement métastatique du CMT, à l'instar de ce qui a déjà été décrit dans d'autres modèles :

- Ces 2 microARN agissent de manière antagoniste sur le **cycle cellulaire**, par inhibition respective de CDC25A (*Wang et al., 2009*) et de CDK6 (*Wu et al., 2010*) ;
- En sus de son action intracellulaire, miR-21 médie une **réponse immunitaire pro-métastatique**, après relargage sous forme exosomale par la cellule tumorale, puis internalisation et fixation aux récepteurs TLR (*Toll Like Receptors*) des cellules immunitaires (*Fabbri et al., 2012*).
- Enfin, si aucune donnée n'est actuellement disponible au sujet d'un éventuel lien entre miR-129 et la différenciation neurale, celui-ci a déjà été impliqué dans les processus de plasticité et de réparation neuronale (*Strickland et al., 2011*).

Notons également que CDK5, une cycline-dépendante kinase homologue de CDK6, nécessaire au développement neuronal et uniquement active dans les cellules précurseurs pluripotentes, a été récemment décrite comme étant très fortement exprimée dans les CMT (*Lin et al., 2007*) (*Pozo et al., 2013*). Cet événement serait lié au processus de développement métastatique des CMT. Nous ne pouvons pas exclure que CDK5, de structure nucléotidique et amino-acide très proche de CDK6, ne soit pas également une cible de miR-129.

CONCLUSIONS et PERSPECTIVES

Le processus d'oncogenèse et de progression tumorale repose sur l'accumulation progressive d'anomalies génétiques et épigénétiques, qui confèrent aux cellules pré-cancéreuses puis cancéreuses des capacités anormales de prolifération et de survie.

Les avancées technologiques récentes, en particulier le développement des approches de puces à ADN, de CGH et des techniques de séquençage à haut débit, permettent aujourd'hui de définir le profil génétique d'une tumeur, de manière précise et rapide.

Cet essor favorise les travaux de caractérisation moléculaire des tumeurs ayant pour objectifs d'améliorer leur classification, de développer de nouvelles approches thérapeutiques et d'identifier des biomarqueurs permettant d'optimiser la prise en charge des patients.

Dans ce contexte, le travail réalisé ici vise à compléter la caractérisation moléculaire des CMT, tumeurs rares et peu souvent décrites, dans l'objectif d'en améliorer la prise en charge par des stratégies thérapeutiques stratifiées.

Dans la première partie de ce travail, nous avons confirmé la **prévalence des mutations *HRAS* et *KRAS* dans les CMT non mutés au niveau du gène *RET***.

Plus de 96% des tumeurs présentent l'un de ces 2 variants et ceux-ci ne sont jamais retrouvés conjointement dans un même tissu. Aucune autre mutation oncogénique dominante (en terme de fréquence de variant), à l'exception d'un potentiel variant *AKT2* dans une tumeur non mutée *RET* ou *RAS*, n'a été détectée. Il existe très peu d'évènements mutationnels ponctuels additionnels. L'ensemble de ces observations suggère une **faible hétérogénéité moléculaire inter- et intra-tumorale des CMT**.

Les mutations activatrices des oncogènes *RAS* (retrouvées dans près d'un tiers des tumeurs sporadiques) démontrent que l'**hyperactivation des petites protéines *RAS* constitue l'élément initiateur commun à la quasi-totalité des tumeurs**, par auto-activation ou par médiation d'un signal provenant du récepteur à activité tyrosine-kinase *RET* non régulé.

Nous avons évalué l'impact phénotypique des variants *RET* et *RAS* dans le CMT.

Nos données confirment la stratification pronostique établie par l'ATA (*American Thyroid Association*) en fonction du statut mutationnel de *RET*, distinguant les groupes à risques extrêmes ATA-A (âge au diagnostic avancé et dissémination métastatique limitée) et ATA-D (âge au diagnostic précoce et dissémination d'emblée systématique).

Nous montrons que les patients porteurs d'une tumeur du groupe **ATA-D**, bien que de pronostic péjoratif, présentent **un meilleur taux de réponse aux traitements ITK** tels que le vandétanib.

Les patients porteurs d'**une mutation oncogénique RAS** présentent quant à eux les **mêmes caractéristiques (sinon meilleures) en terme d'âge au diagnostic, de progression tumorale, de rechute métastatique et de réponse au traitement** que les patients porteurs d'une mutation classée à risque ATA-A.

- ✦ Dans notre importante cohorte constituée de plus de 100 tumeurs, seuls 4 CMT n'ont pas présenté de mutation dominante RET ou RAS. Un projet de séquençage de l'exome complet de ces 4 tissus, réalisé à partir de prélèvements FFPE sur une plateforme similaire à celle utilisée pour les lignées TT et MZ-CRC1 (Hiseq™ Illumina®) est en cours. De plus, une collection constituée de 29 tumeurs est actuellement en cours de séquençage selon les mêmes modalités, dans le cadre d'une collaboration internationale.
- ✦ A plus long terme, des études complémentaires d'association du statut mutationnel des tumeurs aux réponses à différentes drogues devraient être menées. Celles-ci exigent la constitution de protocoles *a priori*, permettant une homogénéisation de la prise en charge des patients et une collecte prospective des échantillons.

Dans la seconde partie de ce travail, nous avons défini des anomalies chromosomiques précoces et récurrentes, possiblement causales du CMT.

La délétion des chromosomes 1, 4 et 22 semblent être très spécifiques à ce type tumoral, ou du moins aux tumeurs d'origine neurale.

Par analyse des pertes redondantes observées dans les modèles murins et dans les tumeurs, nous avons établi la cartographie du plus petit locus délété au niveau du chromosome 1 humain. Il s'agit d'une région codant, entre autres, pour les gènes *HDAC1*, *EYA3*, *FGR*, *PAX7*, *EPHA8*, *EPHB2* et *CDC42*.

La perte de matériel génomique est importante et définit un **très grand nombre de gènes suppresseurs de tumeurs potentiellement incriminés dans le développement du CMT**.

A l'heure actuelle, ces observations ne peuvent être reliées à des événements secondaires expliquant l'inactivation d'un second allèle de ces gènes-candidats. Le profil de **méthylation globale** des CMT et de la lignée TT a été décrit récemment par [\(Rodriguez-Rodero et al., 2013\)](#). Celui-ci a été établi comparativement à des tissus thyroïdiens sains, et met en avant une hypométhylation des gènes *DPPA2* et *INS4* (situés au niveau du chromosome 3 et 9), dans 30% et 60% des tumeurs respectivement. Une hyperméthylation du gène *RASSF1A* (chromosome 3) est observée dans 40% des cas.

L'implication du **mécanisme d'empreinte parentale** dans les tumeurs de type CMT a été évoquée précédemment par (Carlson et al., 1994) (Peretz et al., 1997) : les mutations germinales de novo de l'oncogène *RET* impliquent toujours le brin parental d'origine paternelle. En revanche, aucune donnée concernant d'autres gènes soumis au mécanisme d'empreinte dans ce type cellulaire n'est disponible au moment de la rédaction de ce mémoire.

Un travail récent portant sur des tumeurs proches des CMT, les paragangliomes, a montré une liaison de tels mécanismes à la régulation transcriptionnelle du gène *SDHB*. Ce gène est localisé en 1p36.13, à proximité immédiate de notre locus d'intérêt, et est impliqué dans la prédisposition au développement de telles tumeurs (Baysal et al., 2013).

✚ Le travail présenté dans cette partie a été réalisé en collaboration avec les équipes du NCI et de l'Université de Milan. Celui-ci aboutira à une publication, actuellement en cours de rédaction.

✚ A l'instar de ce qui a été montré dans d'autres types tumoraux, il semblerait intéressant de corréler les pertes de matériel génomiques observées à des événements secondaires, tels que des régulations épigénétiques (méthylation, empreinte parentale, régulations post-transcriptionnelles et post-translationnelles...) dans les tumeurs de type CMT.

Enfin, dans la troisième partie de ce travail, nous avons analysé les modalités d'expression des microARN dans ce type de tumeurs. Nous avons identifié une **signature d'invasivité**, indicatrice d'une **dérégulation du cycle cellulaire dans sa phase G₀/G₁**, d'une **augmentation du trafic aux membranes possiblement liée au mécanisme de migration cellulaire**, et de la présence éventuelle de **précurseurs embryonnaires**.

L'analyse fonctionnelle de 2 microARN particuliers, le miR-21 et le miR-129, révèle une **implication forte de la voie PI3K/AKT dans le pouvoir métastatique**, ainsi qu'une capacité accrue à la communication entre les cellules.

✚ Les observations établies dans cette dernière partie ouvrent la voie à de nombreux axes de recherche. Il serait effectivement intéressant de vérifier la présence de cellules précurseurs embryonnaires dans nos modèles d'étude ainsi que dans les tumeurs humaines et d'en vérifier la corrélation au phénotype de la maladie. Enfin, la mise en évidence d'une implication forte de la voie PI3K/AKT dans le processus métastatique suggère une possibilité de stratégie thérapeutique additionnelle aux ITK, qui devrait être étudiée prochainement.

Ainsi, l'ensemble des observations établies permettent de compléter le diagramme du modèle hypothétique de développement tumoral des cellules C de la thyroïde, proposé antérieurement par (Ameur, 2008) (Figure 54).

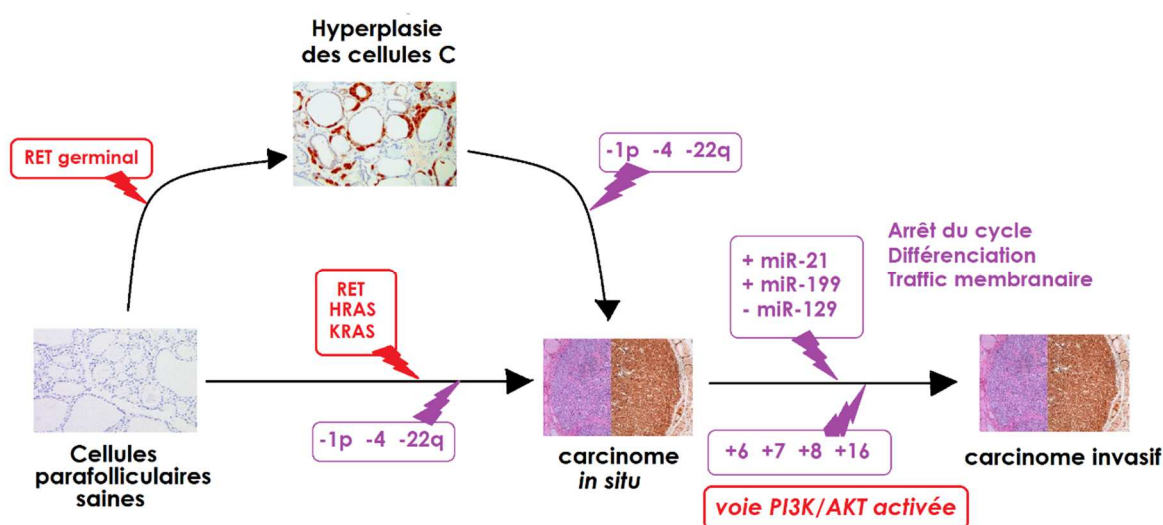


FIGURE 54 : MODÈLE HYPOTHÉTIQUE DE L'ONCOGÉNÈSE MOLÉCULAIRE DES CMT

Jusqu'à récemment, aucune anomalie moléculaire n'était prise en compte pour initier un traitement de type inhibiteur de tyrosine kinase chez un patient porteur de CMT. Or, nous montrons que les mutations oncogéniques RET ATA-A/B/C, RET ATA-D et RAS confèrent des phénotypes et des activations de signaux intracellulaires très différents. Notamment, les tumeurs présentant un génotype ATA-D semblent répondre le mieux aux ITK, alors que les mutations des gènes *HRAS* et *KRAS* - découvertes il y a peu - confèrent une résistance primaire à ces drogues et doivent maintenant être appréhendées.

Ce travail a donc permis de distinguer 3 cas de figure pour la mise en place d'une thérapie 'stratifiée' du CMT (Figure 55) :

- Les mutations situées au niveau du domaine extramembranaire de RET induisent une phosphorylation constitutive du récepteur, conduisant à une activation canonique de l'ensemble des voies en aval (JAK/STAT, PI3K/AKT et RAS/MAPK). Les tumeurs présentant ce génotype ne répondent pas totalement aux ITK, et il conviendrait d'envisager une alternative thérapeutique permettant l'inhibition concomitante de ces 3 voies pour ce type de CMT.
- Les mutations RAS activent les mêmes voies, à l'exception de la voie JAK/STAT. Dans ces cas, nous pourrions envisager d'inhiber les voies PI3K/AKT et RAS/MAPK par une combinaison de drogues ciblant MEK et mTOR par exemple. Notons que

des inhibiteurs de RAS sont en cours de criblage et pourraient être développés dans les années à venir.

- Enfin, les mutations de type ATA-D (RET codons 918 ou 883) provoquent une hyperphosphorylation au niveau de la tyrosine 1062, ainsi qu'une perte de spécificité au substrat. Dans ces cas, la voie PI3K/AKT semble jouer un rôle majeur et pourrait être considérée comme une cible additionnelle aux ITK, auxquels ce type de génotype semble sensible.

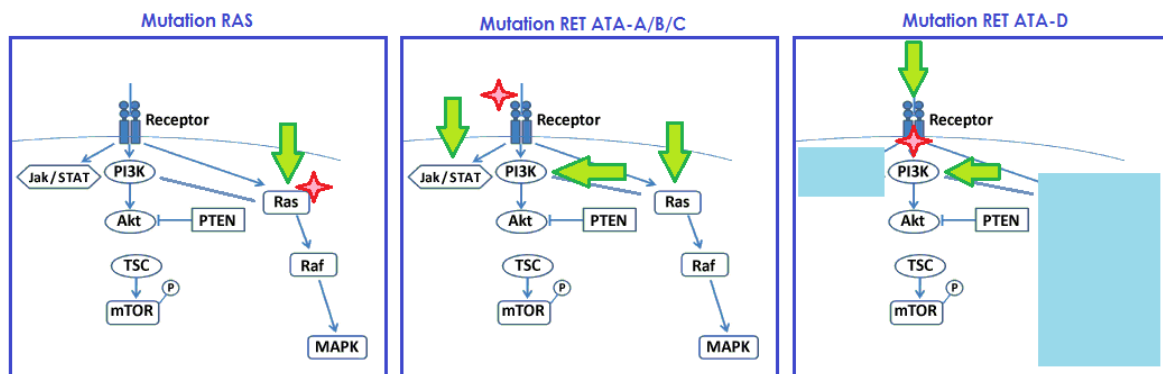


FIGURE 55 : MODALITÉS DE TRAITEMENT EN FONCTION DE LA MUTATION ONCOGÉNIQUE DOMINANTE DU CMT

Enfin, il est aisé d'imaginer d'autres voies de recherche pour le traitement des formes métastatiques, à savoir l'inhibition des dynamines (semblant être dérégulées dans les tumeurs agressives) ou encore l'inhibition de miR-21 par un antagoniste (provoquant l'apoptose des cellules de CMT).

En conclusion, notre objectif était de caractériser les anomalies moléculaires présentées par les tumeurs de type CMT, afin d'en distinguer des marqueurs pronostiques *a priori* de développement métastatique.

Sur un plan biologique et dans ce but, nous avons montré que les microARN étaient d'excellents candidats, mais que les techniques pour les quantifier au mieux nécessitent une adaptation pour leur usage ultérieur en clinique.

Sur un plan clinique, nous avons complété la description des anomalies causales des tumeurs non mutées pour *RET* et avons distingué les génotypes en fonction de leur agressivité et de leur impact sur la réponse aux traitements de type ITK.

Enfin, sur le plan cognitif, notre travail met en lumière l'importance de l'intégration des données de génomique dans un contexte systémique, tous les systèmes étant interconnectés entre eux : expression génique, expression des microARN, anomalies structurales ponctuelles, pertes chromosomique, structure chromatinienne.

ANNEXES

Molécule active	Nature	Cible	Applications reconnues
Trastuzumab (Herceptin®, Roche)	anticorps monoclonal	HER2	carcinome mammaire associé à une amplification HER2
Bevacizumab (Avastin®, Roche)	anticorps monoclonal	VEGF	carcinome mammaire, colorectal, rénal, ovarien
Cetuximab (Erbix®, Merck Serono)	anticorps monoclonal	EGFR	cancer de la tête et du cou carcinome colorectal métastatique exprimant EGFR sans variant KRAS
Panitumumab (Vectibix®, Amgen)	anticorps monoclonal	EGFR	carcinome colorectal métastatique exprimant EGFR sans variant RAS
Erlotinib (Tarceva®, Roche)	inhibiteur de tyrosine-kinase	EGFR	carcinome pancréatique cancer bronchique non à petites cellules associé à une mutation activatrice EGFR
Gefitinib (Iressa®, AstraZeneca-Teva)	inhibiteur de tyrosine-kinase	EGFR	cancer bronchique non à petites cellules associé à une mutation activatrice EGFR
Crizotinib (Xalkori®, Pfizer)	inhibiteur de tyrosine-kinase	ALK MET ROS1	cancer bronchique non à petites cellules associé à un réarrangement ALK
Imatinib (Glivec®, Novartis)	inhibiteur de tyrosine-kinase	BCR-ABL c-KIT PDGFR	leucémie myéloïde chronique associée au chromosome Philadelphie tumeur stromale gastro-intestinale exprimant c-KIT syndromes myélo-dysplasiques/prolifératifs associés à un réarrangement PDGFRa
Sorafenib (Nexavar®, Bayer-Onyx)	inhibiteur de tyrosine-kinase	VEGFR PDGFR BRAF	carcinome rénal hépatocarcinome métastatique
Vemurafenib (Zelboraf®, Roche-Plexxikon)	inhibiteur de sérine- thréonine- kinase	BRAF	mélanome métastatique associé à une mutation BRAF
Olaparib (AZD2281, AstraZeneca)	inhibiteur de PARP	PARP-1	cancer mammaire et/ou ovarien associé à une mutation BRCA

ANNEXE 1 : PRINCIPALES THÉRAPIES PERSONNALISÉES UTILISÉES EN ONCOLOGIE EN FRANCE

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Current Opinion in
Genetics
& Development

Genomes in the clinic: the Gustave Roussy Cancer Center experience

Ludovic Lacroix^{1,2,3}, Amelie Boichard^{1,3}, Fabrice André^{2,4} and Jean-Charles Soria^{2,5}

The extensive molecular characterization of tumors with high throughput technologies has led to the segmentation of different tumors into very small molecularly defined subgroups. Many ongoing clinical trials are conducted only when specific molecular alterations are identified in tumor samples. In this review, we will describe the implementation of genome analysis in the clinical setting as it has expanded over the last four years in our Precision Medicine Program. This manuscript will also highlight the main limitations and challenges related to the development of broader and deeper genome analysis.

Addresses

¹Gustave Roussy, Translational Research Laboratory and Biobank, Villejuif F-94805, France

²Gustave Roussy, Inserm U981, Villejuif F-94805, France

³Gustave Roussy, Department of Medical Biology and Pathology, Villejuif F-94805, France

⁴Gustave Roussy, Department of Medical Oncology, Villejuif F-94805, France

⁵Gustave Roussy, Drug Development Department, Villejuif F-94805, France

Corresponding author: Lacroix, Ludovic
(LACROIX.Ludovic@gustaveroussy.fr)

Current Opinion in Genetics & Development 2014, 24:99–106

This review comes from a themed issue on Cancer genomics

Edited by David J Adams and Ulán McDermott

0959-437X/\$ – see front matter, © 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.gde.2013.11.013>

Introduction

The extensive molecular characterization of tumors with high throughput technologies has led to the segmentation of different tumors into very small molecularly defined subgroups [1]. For example, lung adenocarcinomas are now classified based on the presence of *EGFR* mutations, *MLL4-ALK* translocations, as well as other alterations such as *KRAS* mutations, *HER2* amplification/mutation [2]. Several new agents have been approved for use in limited subgroups of tumors with specific molecular abnormalities. This evolution has led to the concept of personalized medicine (also termed precision medicine) [3]. Many ongoing clinical trials are conducted only when

specific molecular alterations are identified in tumor samples. We previously argued that conducting several consecutive single-marker companion tests would not be compatible with clinical practice because of the limited amount of biological material available, the intrinsic delays in each analysis, the overall cost and high screening failure [4]. Several authors have advocated the need for large multiplex approaches and clinical implementation of next generation sequencing (NGS) for screening of human tumor samples. Examples of such programs are reported in Table 1. Gustave Roussy (GR), the largest French comprehensive cancer center, has implemented several molecular screening programs since 2009 to enrich clinical trials with patients carrying specific molecular abnormalities in order to accelerate the process of drug development for their benefit [5]. Such programs are conducted at GR in parallel with the French National Cancer Institute (INCa) initiative for the analysis of emerging biomarkers [6,7]. In this review, we will describe the implementation of genome analysis in the clinical setting as it has expanded over the last four years in our Precision Medicine Program. This manuscript will also highlight the main limitations and challenges related to the development of broader and deeper genome analysis.

Development of genomic analysis through a personalized medicine program at Gustave Roussy

The GR comprehensive molecular screening program is being developed to complement our hospital's clinical trials strategy. The main molecular triage trials are shown in Table 1. This whole initiative is supported by a variety of funding sources including: specific state grants, collaborative programs with biotech or pharmaceutical companies as well as philanthropic funding. The MSN (Melanoma, Small cell and Non-small cell lung cancer) trial was launched in 2009. It is a mono-centric molecular screening trial for tumor samples (either archived or newly collected) from patients with lung cancer and melanomas [8]. The SAFIR01 trial, which was launched in 2011 for patients with metastatic breast cancer and is now closed to recruitment, required dedicated frozen tumor biopsy samples. SAFIR01 was sponsored by UNICANCER, the former French Federation of Cancer Centers and funded by INCa [9]. The upcoming

Table 1

Examples of trials or initiatives based on genome analysis in the clinical setting

Trial or program name and origin	Genomics analysis techniques	Genes and mutations	Cancer types	Tumor sample analyzed	Failure	Comprehensive approach	Clinical trial reference	Refs
Stratified Medicine Program Cancer Research UK, London, UK	Targeted – HotSpot (PCR-based and FISH)	12 genes (mutations + translocations)	Melanoma, NSCLC, CRC and breast, prostate and ovarian cancer	FFPE clinical Archive	60% successful report (within 15 days)	Screening multicentric	NA	Walker <i>et al.</i> , ASCO, 2013 [20]
PRORIE Dana-Farber Cancer Institute, Boston, US	Targeted – HotSpot (Sequenom)	41 genes	All solid tumors	FFPE clinical Archive	30% of clinical samples: adequate quality yield analysis	Screening monocentric	NA	Rollins <i>et al.</i> , ASCO, 2013 [34]
Emerging Biomarkers INCA, France (National)	Targeted – HotSpot (PCR-based and FISH)	10 genes (mutations + translocations)	Melanoma, NSCLC, CRC	All solid tumors	2.5–25% failed according to biomarker and tissues	Screening national (48 labs)	NA	Nowak <i>et al.</i> , 2012 [7] www-cancer.fr
SHIVA Curie Institute, Paris, France	IonTorrent/PGM (junction sequencing) + CytoScanHD	48 genes (Sequence) 29 genes (Copy Nt)	Solid tumors	Fresh dedicated biopsy samples	64% successful report (first 53 biopsy samples)	Screening + treatment multicentric	NCT01771458	Leiberman <i>et al.</i> , ESMO, 2013 [35,36]
MOSCATO Gustave Roussy, Villejuif, France	IonTorrent/PGM (Amplicon sequencing) CGHs (WG)	70 genes (Sequenced) Pangenomic (Copy Nt)	Solid tumors eligible for Phase I trials	Fresh dedicated biopsy samples	80.5% successful report (first 53 biopsy samples)	Screening monocentric	NCT01568019	Holtebaek <i>et al.</i> , ASCO, 2013 [13]
SARR01 Unicancer	Hotspot (PCR-based) CGHs (WG)	2 genes Pangenomic (Copy Nt)	Metastatic breast cancer	Fresh dedicated biopsy samples	71% successful report (104 biopsy samples)	Screening multicentric	NCT01414035	Andre <i>et al.</i> , ASCO, 2013 [3]
MSN Gustave Roussy, Villejuif, France	Hotspot (PCR-based and FISH) IonTorrent/PGM (Amplicon sequencing)	5 genes or 50 genes (Sequence)	Lung cancer and melanoma	FFPE clinical archive (primary or metastatic)	50% successful report from a large panel (280 lung biopsy samples)	Screening monocentric	NA	Pierard <i>et al.</i> , ESMO, 2012 [6]
SARR02 Unicancer	IonTorrent/PGM (Amplicon sequencing) + CGHs (WG)	70 genes Pangenomic (Copy Nt)	Metastatic breast cancer or lung cancer	Fresh dedicated biopsy samples	NA	Screening treatment multicentric	Under review	NA
NS Massachusetts General Hospital, Boston, US	Targeted – Hotspot (SNAPshot) and FBH	15 genes	NSCLC, CRC, melanoma and breast cancer	FFPE clinical archive	95% successful report	Screening monocentric	NA	Sequist <i>et al.</i> , 2011 [37]
T9 Program MD Anderson Cancer Center, Houston, US	Targeted – Hotspot (Sequenom)	40 genes	Solid tumors	FFPE clinical archive	NA	Screening monocentric	NA	Mandilovich <i>et al.</i> , 2013 [38]
IMPACT MD Anderson Cancer Center, Houston, US	Targeted – Hotspot (PCR-based and FBH)	11 genes	Solid tumors	FFPE clinical archive	89.2% successful report	Screening monocentric	NCT00851032	Tamborini <i>et al.</i> , 2012 [39]
Cleaving House protocol MD Anderson Cancer Center, Houston, US	Several approaches from PCR-based to large-scale sequencing	110 genes to WGS	Solid tumors	FFPE clinical archive	NA	Screening monocentric	NA	Mandilovich <i>et al.</i> , 2013 [38]
Norwegian Cancer Genomics Consortium	HiSeq	WES	Solid tumors	Clinical archive	NA	Screening monocentric	NA	Callaway 2012, http://www.gate2.helix.fr/ftp/ftp/ftp.do?org=10.1058/nature.2012.20940 (2 February, 2012)
IMPACT Princess Margaret Cancer Centre, Toronto, Canada	Targeted – Hotspot (Sequenom) – MBSq (sequence)	23 genes (hotspots) 48 genes (Sequence)	Selected solid tumors	FFPE clinical archive	7% failure	Screening monocentric	NCT01505409	Bedard <i>et al.</i> , 2013 [21]

Table 1 (Continued)

Trial or program name and origin	Genomics analysis technique	Genes and mutations	Cancer type	Tumor sample analyzed	Failure	Comprehensive approach	Clinical trial reference	Refs
MS Vanderbilt Institute of Oncology, Nashville, TN	Targeted - Hotspot (Sequencing or PCR based)	19 genes (HotSpot)	Solid tumors Phase I trials	Clinical archive	NA	Screening monocentric	NA	Quadrant et al., 2012 [41]
WINTHER International Baylor-2 MD Anderson Cancer Center, Houston, US IMAGE Study Johns Hopkins, Baltimore, US	Foundation One - CGH - Whole Transcriptome Targeted - Hotspot (PCR-based and FISH) NGS (Foundation One [10])	450 genes Perigeneomic Copy Nb and translocation 11 genes 82 genes + 37 translocated genes	Solid tumors NSCLC, PD on chemotherapy Metastatic breast cancer	Fresh dedicated biopsy samples Dedicated biopsy samples Dedicated biopsy samples	NA	Screening - multicentric International Screening + treatment multicentric Screening monocentric	NCT01523266 NA NCT01452417 NA NCT01523847 NA	NA

NS: not specified; NA: not available; Hotspot: analysis focusing on hotspots; sequence: sequencing analysis; Copy Nb: copy number analysis; FFPE: formalin fixed paraffin embedded samples;

CGH: comparative genomic hybridization array covering whole genome.

* The trials start with 50 amplicons using Sanger sequencing, then switch to Ion Torrent Technology.

^b In MSN trial, samples are screened with genes from the INCa panel (emerging biomarkers) and a gene panel if enough material is available.

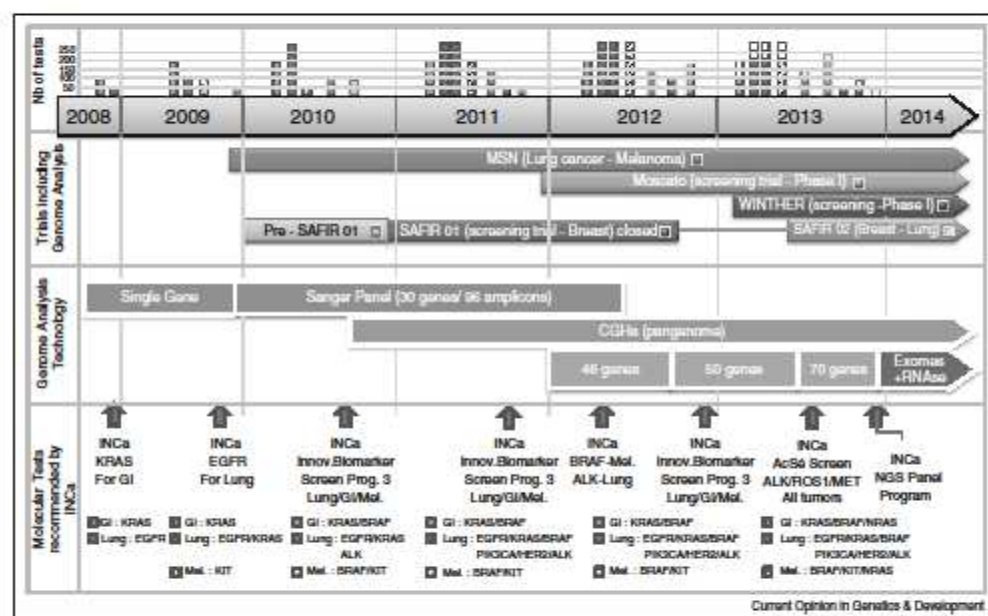
SAFIR02 trials will use NGS (70 genes), CGH and treatment arms according to molecular screening results for patients with metastatic breast and non-small cell lung cancer. MOSCATO (MOlecular Screening for Cancer Treatment Optimization), was launched in 2012. It is a mono-centric molecular triage trial for early phase I candidates and combines CGH array and sequencing of a gene panel performed on frozen tumor biopsy samples [10]. The WINTHER Trial was launched in 2013. It is an international non-randomized molecular triage study undertaken by the WIN consortium, requiring dedicated frozen tumor biopsy samples and normal matched tissue used to screen for mutations, translocations and copy number variations (CNV) by NGS, completed with RNA and microRNA exploration for tumors without actionable drug targets (R Kurzrock *et al.*, Communication, WIN Consortium, www.winconsortium.org).

Evolution of sequencing approaches in the GR personalized medicine program

Since 2010, over 1300 gene panel sequencing analyses have been performed in the setting of the above-mentioned trials allowing us to acquire a wealth of experience. Those analyses were performed in parallel with standard gene testing done in the Molecular Pathology Department under the auspices of the INCa initiative on emerging biomarkers [7] which included over 3300 patients (data on colorectal cancer, lung cancer and melanoma). The timelines and related activities of those molecular tests performed at GR are summarized in Figure 1.

The initial approach for multiplex gene mutation screening was based on techniques described by Sanger in 1977 [11]. It has been the gold standard for gene sequencing for the last decades. The Sanger approach was used as the reference from 2010 to 2012. The initial protocol was optimized to simultaneously sequence 96 amplicons covering hot-spot regions in 30 cancer genes, now using 500 ng of DNA extracted from frozen as well as FFPE specimens with an *ad hoc* protocol developed in the lab [12]. The standard analysis turnover time was two weeks, from the arrival of samples to the final clinical report discussed by multidisciplinary molecular tumor boards, (this included an independent control of each mutation identified). This approach requires specimens with more than 30% of tumor cells according to the Sanger detection limit. The use of FFPE specimens, the amount of DNA and the sensitivity of the analysis appear to be major limitations of this approach. For example, in the case of the MSN protocol, among the first 280 lung cancer patients, half of them did not have enough material for a complete analysis. In those cases, the analysis was limited to the standard biomarkers recommended by INCa. Nevertheless, the approach was satisfactory for the eligible specimens. For samples submitted to multiplex gene mutation screening, 50% of the tumors harbored oncogenic mutations and half of them received

Figure 1



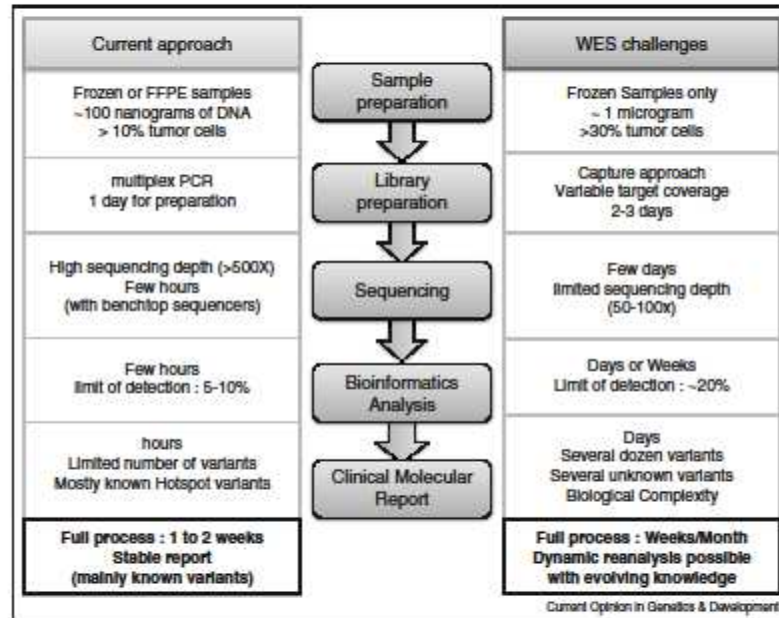
Development of genomic analysis and Personalized Medicine Program at Gustave Roussy (number of tests are represented by one square for 50 cases; square colors correspond to the color of trials including genome analysis reported below, empty square correspond to planned activities in 2013).

mutation-related targeted therapy [8]. The Sanger screen approach has other major drawbacks beyond sensitivity: a low gene throughput leading to suboptimal portraits, as well as a low weekly patient throughput analysis. Several other protocols (Table 1) report similar pitfalls when using archived clinical samples.

To circumvent Sanger-related limitations, we decided to implement NGS for multiplex gene mutation screening in April 2012. We opted for the Ion Torrent Personal Genome Machine (PGMTM), a bench-top device (Life Technologies, Saint-Aubin, France) offering rapid multiplex-PCR library preparation which allows us to deliver the results requested by the clinicians in a few days. This choice was also based on the versatility of library preparation making it possible to change the multiplex-PCR panel easily and to develop standard operating procedures (SOP) that are compatible with *ad hoc* certifications. In order to validate this new approach, we ran both Sanger and NGS techniques in parallel over 4 months corresponding to 106 analyses conducted with both approaches. After implementing NGS approaches for

6 months, 206 mutations were identified and controlled by independent single gene testing. Among them, only fifteen results were discordant but no discordance was reported in a hotspot mutation. Five were considered as sequencing errors, four variants had a frequency of less than 10%, four were associated with low DNA quality (for Sanger) and two remained unexplained discordances. With the PGM technology, the detection limit was established at 5% for hotspots, with an average depth of 1000× using multiplex reference DNA mutated at 25% to 1% frequency (Horizon Diagnostics, Cambridge, UK). In the MOSCATO trial [10], the analysis turnaround time, from DNA extraction to the final report, was 12 days in 2012, eight days in 2013 (minimum six and three days respectively). This led to a median of 21 days and 14 days in 2012 and 2013 respectively, from performing biopsies to the discussion of the case in a multidisciplinary molecular tumor board. Besides the gain in the analysis turnaround time, NGS makes it possible to double, and could even triple the weekly throughput analysis, with stable human resources (two full-time equivalent technicians). Another obvious advantage is the number of targets screened. The

Figure 2



Different steps of genome analysis using next generation sequencing compared to WES.

initial commercial panel used covered hotspot regions in 46 cancer genes then a 50 cancer genes. We now use a 70-genes home-designed panel including the full coding sequence of tumor suppressor genes. The evolution of sequencing technologies and the major declines in costs offer affordable solutions for a clinical genetics laboratory. This is why we plan to switch to whole exome sequencing (WES) approaches in 2014.

Switching to whole exome analysis: limitations and challenges

Tumor WES analysis offers an unbiased approach for screening multiple mutations and gene copy number abnormalities. Several publications have reported tumor WES analysis in research projects, in small pilot studies [13] or the clinical use of WES for constitutional genetics [14**]. However, implementing tumor WES to identify somatic molecular abnormalities in the clinic is still challenging for a variety of reasons summarized in Figure 2.

The major challenges in the workflow is the combination of all bioinformatics processes including base calling, variant calling, variant annotation then variant filtering

and the selection for the final clinical report [15], completed by data management and storage. The bioinformatics timeline can last from days to weeks and improvements are required to better meet clinical expectations. The bioinformatics process should include several quality checks to control the signal used, coverage and depth, in order to ensure low error rate issues arising from a poor quality signal, poor capture efficiency, a low amount of data, and ineffective coverage, among others. NGS platforms have approximately 10-fold higher error rates (1/1000 at a depth of 20x) versus Sanger sequencing (1/10 000) [16]. This error rate should be integrated into variant selection to avoid false positive calls. The variant calls are dependent on bioinformatics alignment and variant-calling algorithms, with figures as low as 57.4% of concordant calls between five pipelines [17**,18]. Moreover, enrichment approaches provide uneven results for some genomic regions. It is also important to report coverage/depth for hotspot regions in order to differentiate wild-type (WT) genes from non-covered genes. Indeed, the WT status is as important as the mutation status in the clinic, especially for genes associated with resistance to specific drugs [19]. Besides sample limitations in terms of quality (FFPE versus frozen, DNA or

RNA quality) or quantity (micrograms for WES), a great majority of specimens are typically heterogeneous because of the mixture of several cellular types (e.g. stromal cells, lymphocytes, endothelial cells, etc.). As microdissection is generally not applicable in routine practice, the tumor DNA extracted is 'diluted' in DNA from all the non-tumor cells. In general, WES analysis provides an average sequencing depth of 30–100× which is inadequate for specimens containing less than 30% of tumor cells. In our experience, 19.5% of dedicated biopsy samples were not suitable for a large-scale analysis (CGHa+ NGS) because of the amount of DNA (>500 ng) or the percentage of tumor cells (>30%) in monocentric trials (MOSCATO) [10] and 28.5% in a multicentric protocol (SAFIR01) [9]. A similar rate of failure was observed in protocols using other high throughput methods, even with dedicated biopsy samples (Table 1). Moreover, even if it is possible to use FFPE samples for limited gene panel protocols [20–22], WES library preparation protocols are longer and have not been validated for use with FFPE samples.

It is important to remember that normal WES yields about 20 000 single nucleotide variants (SNV) [23]. A comparison with normal tissue is recommended to separate somatic variants from their constitutional counterparts. Besides tumor testing, this point raises some ethical questions linked to the identification of constitutional genome alterations [24]. Such additional information will have a further impact on patient management compared to the current gene by gene approaches used in the clinic. Several algorithms have been developed over the last years to enhance the accuracy of SNV filtering with a large polymorphism database and with functional annotations, but several dozen variants still await interpretation [25]. Recent WES tumor analysis reveals that mutation frequency is correlated with DNA replication timing and also with transcriptional activity. For example, olfactory gene replication timing is late and these genes display higher rates of mutation as do large genes [26^{**}]. Furthermore, tumor cell intrinsic heterogeneity and clonal evolution participate in the complexity of the genome landscape. Subpopulations of cancer cells with various genomes may coexist in different regions of the primary tumor and at different metastatic sites in the same patient [27^{*},28^{**}]. The treatment itself is also responsible for the evolution of the genome over time with, for example, the development of undetectable secondary resistance mutations in the primary tumor (i.e. for EGFR (p.T790M) or MEK1 (p.C121S)) [29–31]. Thus, molecular biologists who are in charge of validation should integrate several parameters which affect the relevance of the analysis including the quality of the initial samples, the clinical context, tissue composition, the quality of the analysis, the depth and coverage across key genes, knowledge about reported variants, *et cetera* in order to select relevant events that constitute targets of interest rather

than highlighting 'passenger' events considered as non-significant for clinical use [32^{*}]. An alternative approach to WES is to perform '*in silico*' a selection of target genes known to be clinically relevant in order to limit the amount of information requiring processing. The entire series of data could be re-analyzed later with the latest knowledge. The development of expert bioinformatics systems to facilitate knowledge/data mining, the clinical classification of variants and to enable us to obtain dynamic and understandable (for clinicians) molecular analysis reports are huge challenges that need to be overcome before the use of WES can be extended in the clinic [33]. Currently, genome analyses performed in our trials are discussed in dedicated tumor boards comprising experts in clinical therapeutics, pathology and cancer genetics.

Another obstacle to implementing large-scale analyses in the clinic is the cost of sequencing. Compared to constitutional genetics analyses performed with an average sequencing depth of 30×, whole-genome sequencing of tumor tissue requires a sequencing depth of 100× to 1000× in order to analyze samples of variable composition and with tumor heterogeneity. This implies the need for a sequencing capacity that is 3–15-fold greater and increased related costs. It is obvious that major cost reductions are still needed so that WES tumor analysis will become compatible with standard daily practice. Transferring genome analysis to the clinic also requires laboratory certification such as Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA) for North America or International Organization for Standardization Norms (ISO-15189) for France. Compliance with CLIA or ISO implies the establishment of standardized workflows and procedures throughout the sequencing process starting from sample preparation and ending with the clinical report, and ensuring a high accuracy procedure with a low rate of false positive and false negative results.

Conclusions

Implementing genome analysis in clinical practice is currently under development in several cancer centers worldwide and is based on target sequencing of dozens or hundreds of genes. Target approaches offer acceptable solutions covering the most actionable genes with costs and timing that are compatible with clinical initiatives. The upcoming challenge for the next few years is the implementation of tumor WES and associated analyses such as RNAseq or CGHa. Tumor complexity combined with the huge amount of data to be dealt with in a short time frame remain a major challenge before useful and readily useable reports can be delivered to physicians for their patients.

Acknowledgements

The authors wish to thank the donors from the Revolution Cancer philanthropic initiative, Fondation Philantropia (Lombard Odier), Brest.

Cancer Research Foundation, Odyssea and Péronie pour l'Oncothérapie, Programme Hospitalier de Recherche Clinique 2007 and 2010 and French National Cancer Institute (INCa). They also thank Lorna Saint Ange for editing.

References and recommended reading

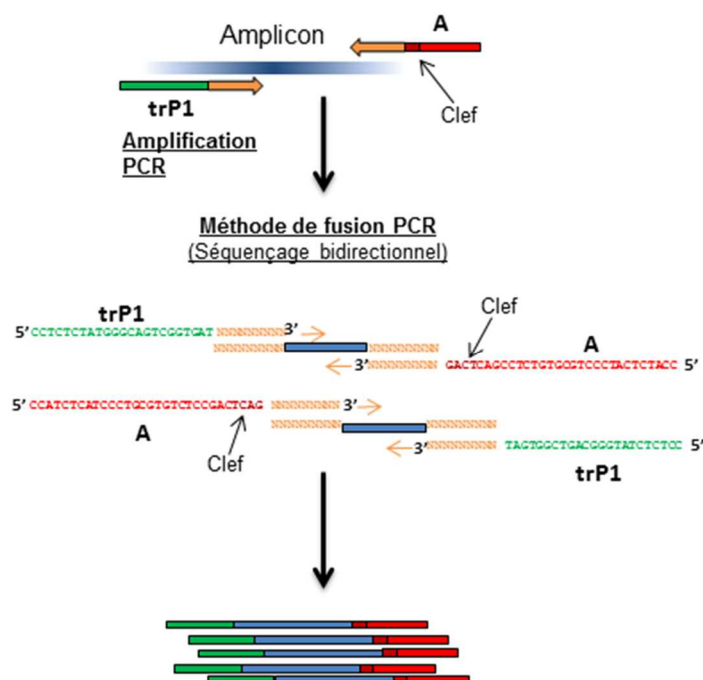
Papers of particular interest, published within the period of review, have been highlighted as:

- of special interest
 - of outstanding interest
1. Foré C, André F, Soris J-C: **Molecular circuits of solid tumors: prognostic and predictive tools for bedside use.** *Nat Rev Clin Oncol* 2010, 7:367-380 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20551944> (accessed 27.10.13).
 2. Ronel R, Blvons TG, Karachaliou N: **Genetics and biomarkers in personalisation of lung cancer treatment.** *Lancet* 2013, 382:720-731 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23972815> (accessed 22.10.13).
 3. Garraway L, Venne J, Ballman KV: **Precision oncology: an overview.** *J Clin Oncol* 2013, 31:1803-1805 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23589545>.
 4. Andre F, Delalogue S, Soris J, National LI, Santé D, Médicale R: **Biology-driven phase II trials: what is the optimal model for molecular selection? Introduction: disease segmentation in rare early drug development in rare molecular segments.** *J Clin Oncol* 2011, 29:1236-1238.
 5. Arnedos M, André F, Fasce F et al.: **The challenge to bring personalized cancer medicine from clinical trials into routine clinical practice: the case of the Institut Gustave Roussy.** *Mol Oncol* 2012, 6:204-210 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22483534> (accessed 10.11.12).
 6. Andre F, Nowak F, Arnedos M, Lacroix L, Vans P, Calvo F: **Biomarker discovery, development, and implementation in France: a report from the French National Cancer Institute and cooperative groups.** *Clin Cancer Res* 2012, 18:1555-1560 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22423408> (accessed 7.10.13).
 7. Nowak F, Soris J-C, Calvo F: **Tumour molecular profiling for deciding therapy – the French initiative.** *Nat Rev Clin Oncol* 2012, 9:479-486 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22777058> (accessed 27.10.13).
 8. Panchard D, Lueza B, Rahal A et al.: **Upfront genomic testing for patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) receiving first-line platinum-based regimens: preliminary result of the MSN study.** *Ann Oncol* 2012, 23(Suppl. 6):v12-v22 Available at: <http://annonc.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/annonc/mds161> (accessed 27.10.13).
 9. Andre F, Bachelot TD, Campone M et al.: **Array CGH and DNA sequencing to personalize targeted treatment of metastatic breast cancer (MBC) patients (pts): a prospective multicentric trial (SAFR01).** *ASCO Annual Meeting Abstracts*, June 17, 2013:311.
 10. Hollebecque A, Massard C, Baer T: **Molecular screening for cancer treatment optimization (MOSCATO 01): a prospective molecular triage trial – interim results.** *ASCO Annual Meeting Abstracts*, 2013:156019.
 11. Sanger F, Nicklen S: **DNA sequencing with chain-terminating.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977, 74:5463-5467.
 12. Boichard A, Croux L, Al Ghuzlan A et al.: **Somatic RAS and mutations occur in a large proportion of sporadic RET-negative medullary thyroid carcinomas and extend to a previously unidentified exon.** *J Clin Endocrinol Metab* 2012, 97:E2031-E2035 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22865907> (accessed 23.10.12).
 13. Roychowdhury S, Iyer MK, Robinson DR et al.: **Personalized oncology through integrative high-throughput sequencing: a pilot study.** *Sci Transl Med* 2011, 3:111m12 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22133722> (accessed 10.03.12).
 14. Yang Y, Muzny DM, Reid JG et al.: **Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders.** *N Engl J Med* 2013, 131:00214003.1007. Available at: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1306555> (accessed 3.10.13).
 15. Cordero P, Ashley EA: **Whole-genome sequencing in personalized therapeutics.** *Clin Pharmacol Ther* 2012, 91:1001-1009 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22549284> (accessed 26.09.13).
 16. Gullapalli RR, Lyons-Weller M, Petrosio P, Dhir R, Bacich MJ, LaFramboise WA: **Clinical integration of next-generation sequencing technology.** *Clin Lab Med* 2013, 32:585-599 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23078661> (accessed 22.10.13).
 17. O'Rawe J, Jiang T, Sun G et al.: **Low concordance of multiple variant-calling pipelines: practical implications for some and genome sequencing.** *Genome Med* 2013, 5:28 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3706896&to=ol-pm-centrals&rendertype=abstract> (accessed 17.10.13).
 18. Wang Q, Jia P, Li F et al.: **Detecting somatic point mutations in cancer genome sequencing data: a comparison of mutation callers.** *Genome Med* 2013, 5 Available at: <http://genomemedicine.com/content/5/10/91>.
 19. Shackelford RE, Whitting N, McNab P, Japa S, Coppola D: **Testing KRAS: A tool for the implementation of personalized medicine.** *Genes Cancer* 2012, 3:459-466 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3527988&to=ol-pm-centrals&rendertype=abstract> (accessed 27.10.13).
 20. Miller V, Rom J, Wang K et al.: **Use of next-generation sequencing (NGS) to identify actionable genomic alterations (GA) in diverse solid tumor types: The Foundation Medicine (FM) experience with 2,200+ clinical samples.** *ASCO Annual Meeting Abstracts*, June 17, vol. 1102, 2013:11020.
 21. Bedard PL, Oza AM, Tsao M et al.: **Princess Margaret Cancer Centre (PMCC) Integrated Molecular Profiling in Advanced Cancers Trial (IMPACT) using genotyping and targeted next-generation sequencing (NGS).** *ASCO Annual Meeting Abstracts*, vol. 137, 2013:1505400.
 22. Walker I et al.: **Utilizing a collaborative working model to optimize molecular analysis of solid tumors in the Cancer Research UK's Stratified Medicine Programme.** *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 2013. Available at: <http://abstracts.asco.org/AbstractView.aspx?AbstractID=117263.html>.
 23. Rickert WO, Rees MI, Chung S-K: **Next Generation Sequencing Methodologies – An Overview.** edn 1. Elsevier Inc.; 2012: 1-26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23046880> (accessed 22.11.13).
 24. Lolkema MP, Gadelas-van Hooijdonk CG, Bredenoord AL et al.: **Ethical, legal, and counseling challenges surrounding the return of genetic results in oncology.** *J Clin Oncol* 2013, 31:1842-1848 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23589552> (accessed 27.10.13).
 25. Vazquez M, de la Torre V, Valencia A: **Chapter 14: cancer genome analysis.** *PLoS Comput Biol* 2012, 8:e1002824 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3531315&to=ol-pm-centrals&rendertype=abstract> (accessed 22.09.13).
 26. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P et al.: **Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes.** *Nature* 2013, 499:214-218 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23770567> (accessed 21.09.13).

This study describing in details putative artefactual findings identified by WES in gene and concluding that true mutation identification requires accurate accounting of mutational processes.

27. Gerlinger M, Futreal PA, Ptasinski L, Swanton C, Yap TA: Intratumor heterogeneity: seeing the wood for the trees. *Sci Transl Med* 2012, 4:127ps10.
This study describes tumor intratumor heterogeneity as well as variation of genome between primary tumor and metastasis. Those variations in genome constitute one of difficulty for interpretation of result for clinic.
28. Bedard PL, Hansen AR, Ratain MJ, Su LL: Tumour heterogeneity in the clinic. *Nature* 2013, 501:355-364 Available at: <http://www.nature.com/doi/full/10.1038/nature12627> (accessed 18.09.13).
Comprehensive review about heterogeneity observed in tumor by genomic analysis. This review also proposed nice compilation of several clinical study using genome analysis in clinical setting and program evaluating tumor heterogeneity in retrospective or prospective setting.
29. Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T et al.: EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2005, 352:786-792 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3208321&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
30. Su K-Y, Chen H-Y, Li K-C et al.: Pretreatment epidermal growth factor receptor (EGFR) T790M mutation predicts shorter EGFR tyrosine kinase inhibitor response duration in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2012, 30:433-440 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22215752> (accessed 27.10.13).
31. Wagie N, Emery C, Berger MF et al.: Dissecting therapeutic resistance to RAF inhibition in melanoma by tumor genomic profiling. *J Clin Oncol* 2011, 29:3085-3096 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3157968&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (accessed 2.03.12).
32. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz L, Kinzler KW: Cancer genome landscapes. *Science* 2013, 339:1546-1558 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3749880&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (accessed 17.09.13).
This review reported main genomic variation involved in cancer development including description of drivers' event versus passenger events. This two type of events have to be considered for genome analysis reports in clinics
33. Levy MA, Lovly CM, Pao W: Translating genomic information into clinical medicine: lung cancer as a paradigm. *Genome Res* 2012, 22:2101-2108 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3483539&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (accessed 22.09.13).
34. Pollins BJ, MacConaill LE, Wagie N et al.: PROFILE: broadly based genomic testing for all patients at a major cancer center. *ASCO Meeting Abstracts*, June 17, 2013:1531.
35. Le Toumeau C: Randomised phase II trial comparing therapy based on tumour molecular profiling versus conventional therapy in patients with refractory cancer: results of the feasibility part of the SHIVA trial. *ESMO Annual Meeting Abstract 950*, 2013. Available at: <http://eoca.msterdam2013.esco.org.au/Scientific-Programme/Abstracts/abstract.aspx>.
36. Le Toumeau C, Kamal M, Tréden O et al.: Designs and challenges for personalized medicine studies in oncology: focus on the SHIVA trial. *Target Oncol* 2012, 7:253-265 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23161020>.
37. Sequist LV, Hest RS, Shaw AT et al.: Implementing multiplexed genotyping of non-small-cell lung cancers into routine clinical practice. *Ann Oncol* 2011, 22:2616-2624 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3493130&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
38. Mendelsohn J: Personalizing oncology: perspectives and prospects. *J Clin Oncol* 2013, 31:1904-1911 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23589547> (accessed 21.10.13).
39. Tsimberidou A-M, Iskander NG, Hong DS et al.: Personalized medicine in a phase I clinical trials program: the MD Anderson Cancer Center initiative. *Clin Cancer Res* 2012, 18:6373-6383 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22966018> (accessed 27.10.13).
40. Dienstmann R: Molecular profiling of patients (pts) with colorectal cancer (CRC) and matched targeted therapy (MTA) in phase I clinical trials. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2012. Abstract No: 3014. Available at: http://www.asco.org/ASCOv2/MultiMedia/Virtual-Meeting?&view=vm_session_presentations_view&confID=114&trackID=3&sessionID=4859&nhttp://www.asco.org/ASCOv2/Meetings/Abstracts?&view=abst_detail_view&confID=114&abstractID=95856.

ANNEXE 3 : MODALITÉS DE RÉALISATION DE LA LIBRAIRIE CIBLÉE RET ET RAS EN NGS



Principe de l'amplification de type fusion-PCR et séquences nucléotidiques des amorces :

- d'amplification des régions d'intérêt de *RET*, *KRAS* et *HRAS*. (la taille des amplicons indiquée ne tient pas compte des séquences de ligation)

- de ligation permettant un séquençage bidirectionnel et l'attribution des résultats obtenus à chacun des échantillons par un système de code-barre.

GENE	Exon	Codons	AMORCES SENS et ANTISENS	AMPLICON
RET	10	618-620	5'-ACCGTTAGTTAGCGATTGGGATTAAGCTGGCYATGGC-3' 5'-CGGATAGCAAGCTCGTTCACCTGATGCTCTCYG-3'	47pb
	11	634	5'-ACCGTTAGTTAGCGATTTCACACCACCMCCACCC-3' 5'-CGGATAGCAAGCTCGTAGAYRATGAAGGAGAAGAGGACA-3'	51pb
	14	804-813	5'-ACCGTTAGTTAGCGATTAGGCCCGCTCCTCCTCA-3' 5'-CGGATAGCAAGCTCGTCCACYGCCAGGTAGCC-3'	64pb
	16	918	5'-ACCGTTAGTTAGCGATTGTCTTTATCCATCTTCTTTAGGG-3' 5'-CGGATAGCAAGCTCGTACTTTGCGTGGTGTAGATATGATCA-3'	55pb
HRAS	2	12-13	5'-ACCGTTAGTTAGCGATTGGAGCGATGACGGAATATAAGC-3' 5'-CGGATAGCAAGCTCGTCCACAAARTGGTCTGGATCAG-3'	58pb
	3	61	5'-ACCGTTAGTTAGCGATTCTCTGCAGGATTCCTACCGG-3' 5'-CGGATAGCAAGCTCGTGTCCCGCATGGCGCT-3'	67pb
	4	117	5'-ACCGTTAGTTAGCGATTGCCYATGGTGGTGGTG-3' 5'-CGGATAGCAAGCTCGTCTCTGAGCCTGCCGAGATT-3'	34pb
		146	5'-ACCGTTAGTTAGCGATTACGYACTGTGGAATCTCGG-3' 5'-CGGATAGCAAGCTCGTGTCTGCCTCACCTGCCG-3'	59pb
KRAS	2	12-13	5'-ACCGTTAGTTAGCGATTGGCCTGCTGAAAATGACTGAATA-3' 5'-CGGATAGCAAGCTCGTCCACAAAATGATCTGAATTAGCTKTA-3'	64pb
	3	61	5'-ACCGTTAGTTAGCGATTAAACCTGTCTTGGATATTCTCGA-3' 5'-CGGATAGCAAGCTCGTCAAAGAAAGCCCTCCCCAG-3'	58pb
	4	117	5'-ACCGTTAGTTAGCGATTCTGAAGATGTACCTATGGTCTAGTAGG-3' 5'-CGGATAGCAAGCTCGTTGAGCCTGTTTGTGTCTACTGTCTA-3'	40pb
		146	5'-ACCGTTAGTTAGCGATTAAACACAGGCTCAGGACTTAGCAA-3' 5'-CGGATAGCAAGCTCGTTTCAGTGTACTACCTGTCTTGTCTT-3'	50pb

Adaptateur (A)	Clé	Code barre	Cible (F)	Adaptateur trP1	Cible (R)
5'-CCA...GAC	TCAG	XXXXXXXXXX	ACCGTTAGTTAGCGATT -3'	5'-CCT...GAT	CGGATAGCAAGCTCGT -3'
5'-CCA...GAC	TCAG	XXXXXXXXXX	CGGATAGCAAGCTCGT -3'	5'-CCT...GAT	ACCGTTAGTTAGCGATT -3'

Position génomique		Gène	Changement ADNc	Changement protéine	RefSeq	Fréquence (%)
chr1	16460052	EPHA2 (ephrin receptor EphA2 precursor)	c.1788C>G	p.D596E	NM_004431	100,0
chr1	214815298	CENPF (centromere protein F)	c.3617A>G	p.Y1206C	NM_016343	39,0
chr2	116510830	DPP10 (dipeptidyl peptidase 10 isoform long)	c.1031C>T	p.S344F	NM_020868	28,3
chr2	197183891	HECW2 (HECT, C2 and WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2)	c.1723C>A	p.Q575K	NM_020760	53,3
chr2	210560776	MAP2 (microtubule-associated protein 2 isoform 1)	c.3882_3886delAGTGC	p.V1294fs	NM_002374	NA
chr3	121238838	POLQ (DNA polymerase theta)	c.1348G>T	p.V450L	NM_199420	38,8
chr5	90059213	GPR98 (G protein-coupled receptor 98 precursor)	c.12212G>A	p.R4071Q	NM_032119	46,7
chr6	38841024	DNAH8 (dynein, axonemal, heavy polypeptide 8)	c.6841delA	p.K2281fs	NM_001371	NA
chr7	43484956	HECW1 (NEDD4-like ubiquitin-protein ligase 1) PRKDC (protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptid)	c.2185G>C	p.E729Q	NM_015052	46,7
chr8	48805817		c.3730_splice	p.L1244_splice	NM_006904	NA
chr8	121222046	COL14A1 (collagen, type XIV, alpha 1 precursor)	c.1373G>A	p.S458N	NM_021110	69,7
chr10	43609950	RET (ret proto-oncogene isoform a)	c.1902C>G	p.C634W	NM_020975	66,1
chr14	80130261	NRXN3 (neurexin 3 isoform 1 precursor)	c.2466C>A	p.D822E	NM_004796	32,1
chr19	9086550	MUC16 (mucin 16)	c.5263_5265delCCT	p.P1755del	NM_024690	NA
chr19	57325698	PEG3/ZIM2 (paternally expressed 3 isoform 1 / Zinc finger, imprinted 2)	c.4098_4112delTGCAGCAGCAGCAGC	p.1366_1371AAAAAA>A	NM_001146186	NA
chr21	32595823	TIAM1 (T-cell lymphoma invasion and metastasis 1)	c.1894G>A	p.E632K	NM_003253	31,7
chr21	39755688	ERG (ets-related isoform 4)	c.1098C>A	p.N366K	NM_001136155	53,8

ANNEXE 4 : PRINCIPALES MUTATIONS RETROUVÉES DANS LA LIGNÉE CELLULAIRE TT

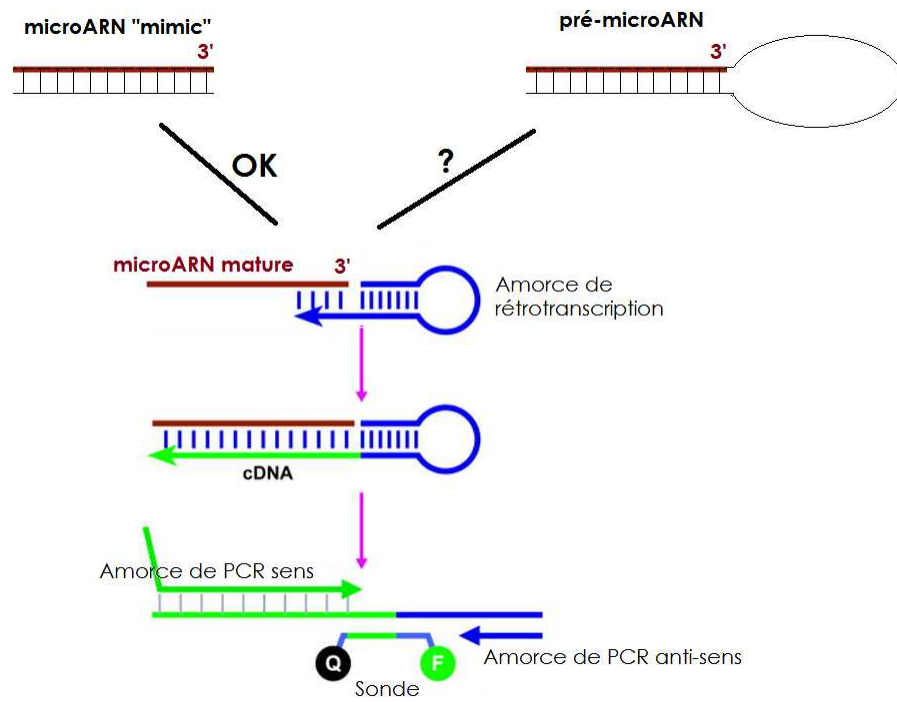
Classe Polyphen 2 délétère, gènes retrouvés mutés dans au moins 10 échantillons tumoraux COSMIC, tous cancers confondus.
En gras apparaissent les variants également décrits par le projet CCLE Broad Institute/Novartis.

Position génomique		Gène	Changement ADNc	Changement protéique	Identification RefSeq	Fréquence (%)
chr1	228461986	OBSCN (obscurin, cytoskeletal calmodulin and titin-interacting RhoGEF)	c.5524C>T	p.R1842C	NM_001098623	45,7
chr2	109380158	RANBP2 (RAN binding protein 2)	c.3163C>T	p.P1055S	NM_006267	40,2
chr2	179544686	TTN (titin isoform N2-A)	c.29782_29783insAGA	p.9928_9929insK	NM_133378	NA
chr2	179437499	TTN (titin isoform N2-A)	c.65656G>A	p.G21886R	NM_133378	50,8
chr2	209220013	PIKFYVE (phosphatidylinositol-3-phosphate 5-kinase type III)	c.6281T>A	p.L2094*	NM_015040	51,9
chr3	52651496	PBRM1 (polybromo 1 isoform 4)	c.1600C>T	p.R534*	NM_181042	100,0
chr3	151165532	IGSF10 (immunoglobulin superfamily, member 10 precursor)	c.2237C>G	p.P746R	NM_178822	100,0
chr7	21775409	DNAH11 (dynein, axonemal, heavy chain 11)	c.7613A>G	p.Y2538C	NM_003777	50,5
chr7	48337984	ABCA13 (ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 13)	c.9221T>A	p.M3074K	NM_152701	49,2
chr7	48378029	ABCA13 (ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 13)	c.10181T>A	p.L3394H	NM_152701	50,6
chr7	151860230	MLL3 (myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 3)	c.10432C>G	p.Q3478E	NM_170606	45,4
chr8	48805817	PRKDC (protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptid)	c.3730_splice	p.L1244_splice	NM_006904	NA
chr8	110451306	PKHD1L1 (fibrocystin L precursor)	c.3941G>T	p.G1314V	NM_177531	46,0
chr8	125052176	FER1L6 (fer-1-like 6)	c.2518G>A	p.A840T	NM_001039112	56,3
chr8	133905940	TG (thyroglobulin precursor)	c.2767G>C	p.G923R	NM_003235	48,4
chr10	43617416	RET (ret proto-oncogene isoform a)	c.2753T>C	p.M918T	NM_020975	58,4
chr14	64653146	SYNE2 (spectrin repeat containing, nuclear envelope 2)	c.17561T>C	p.L5854P	NM_015180	100,0

ANNEXE 5 : PRINCIPALES MUTATIONS RETROUVÉES DANS LA LIGNÉE CELLULAIRE MZ-CRC1

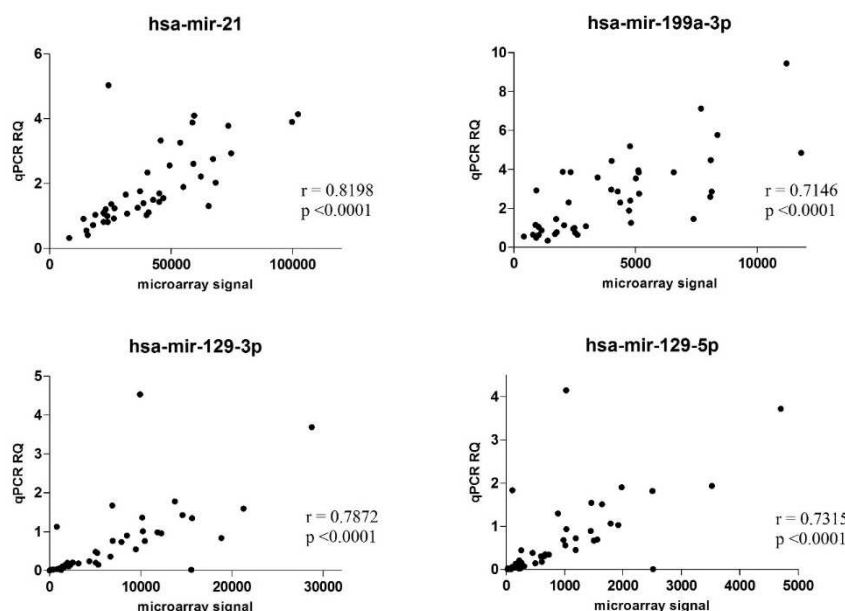
Classe Polyphen 2 délétère, gènes retrouvés mutés dans au moins 10 échantillons tumoraux COSMIC, tous cancers confondus.

ANNEXE 6 : PRINCIPE DE QUANTIFICATION DES MICROARN MATURES PAR PCR QUANTITATIVE (SYSTÈME D'AMORCES STEM-LOOP)

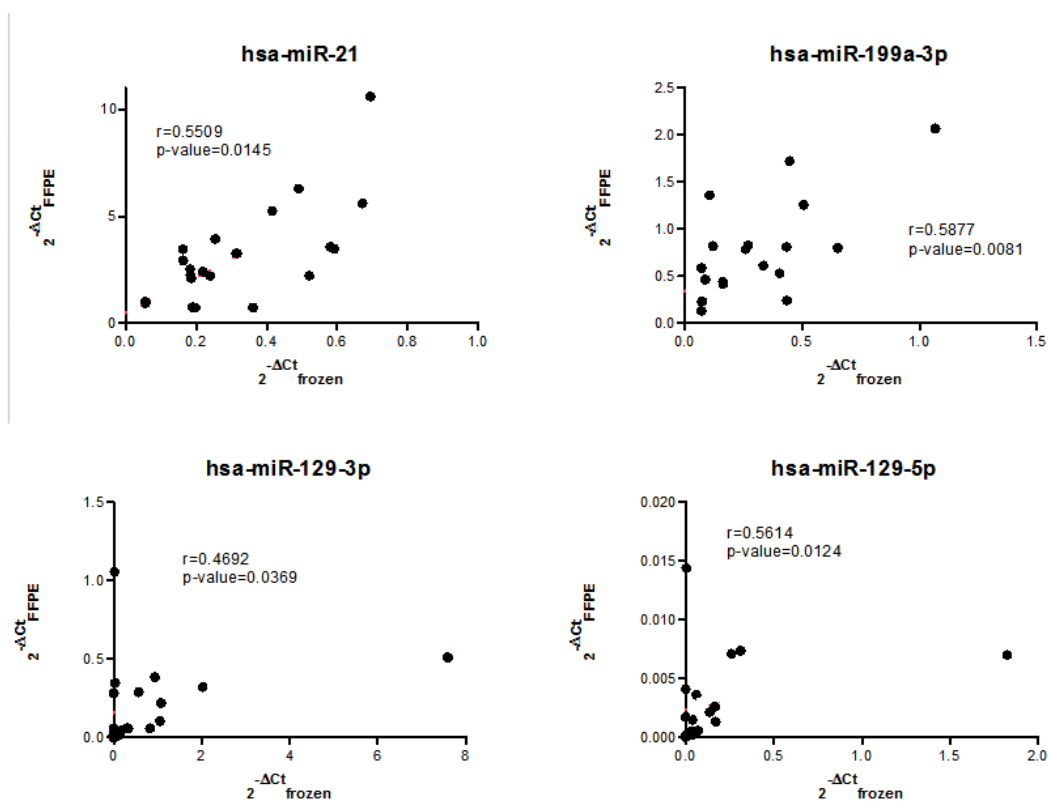


ANNEXE 7 : CORRELATION INTER-MÉTHODE ET INTER-COLLECTION DES RÉSULTATS DE QUANTIFICATION DES MICROARN

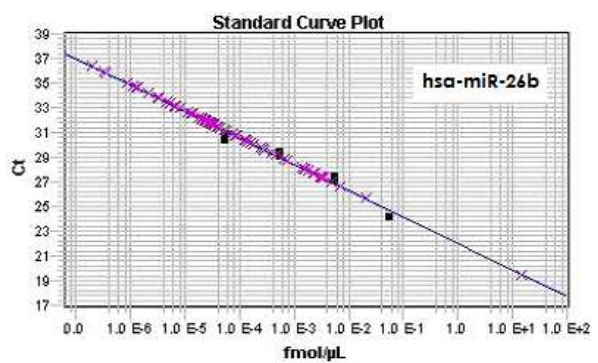
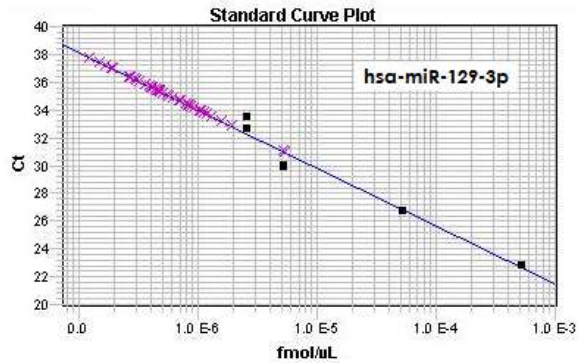
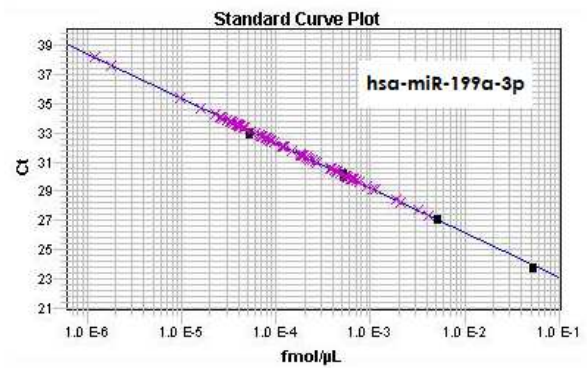
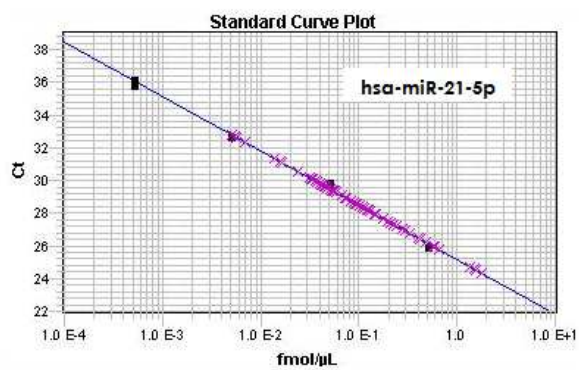
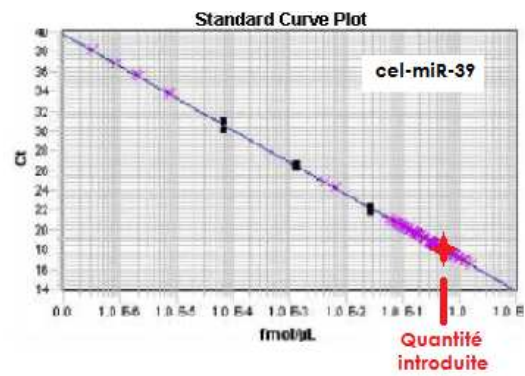
Technique de type biopuce versus PCR quantitative



Echantillons congelés versus échantillons FFPE



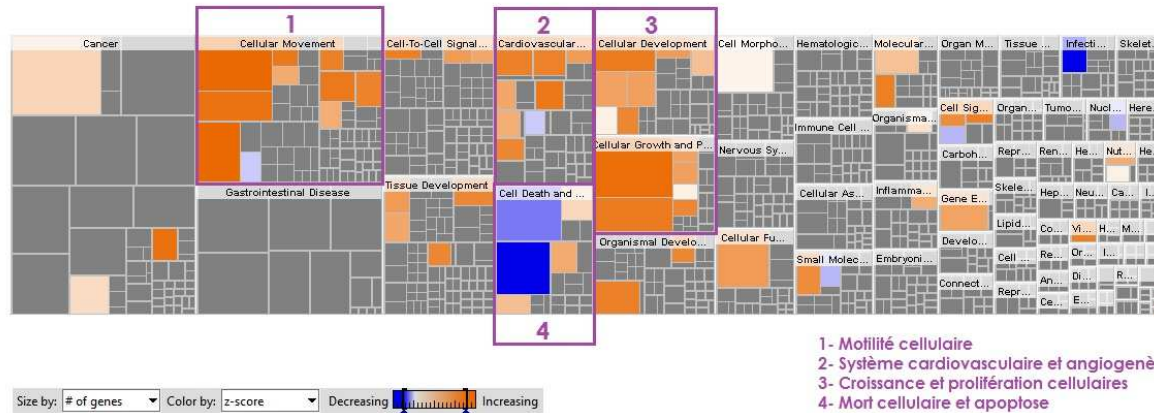
ANNEXE 8 : QUANTIFICATION ABSOLUE DES MICROARN CIRCULANTS



Cellules TT pré-miR-21 48h

Molecular and Cellular Functions	p-value	# Molecules
Cellular Movement	2,00E-06 - 1,91E-02	20
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	4,37E-05 - 1,91E-02	18
Cellular Development	4,84E-05 - 1,91E-02	21
Cellular Growth and Proliferation	4,84E-05 - 1,84E-02	28
Molecular Transport	1,45E-04 - 1,53E-02	21

Top canonical pathways	p-value	Ratio
PI3K/AKT Signaling	1,3E-03	4/152 (0,026)
Interferon Signaling	7,57E-03	2/36 (0,056)
Neuroprotective Role of THOP1 in Alzheimer's Disease	1,04E-02	2/55 (0,036)
Activation of IRF by Cytosolic Pattern Recognition Receptors	2,45E-02	2/74 (0,027)
Hypoxia Signaling in the Cardiovascular System	2,68E-02	2/68 (0,029)



- 1- Motilité cellulaire
- 2- Système cardiovasculaire et angiogenèse
- 3- Croissance et prolifération cellulaires
- 4- Mort cellulaire et apoptose

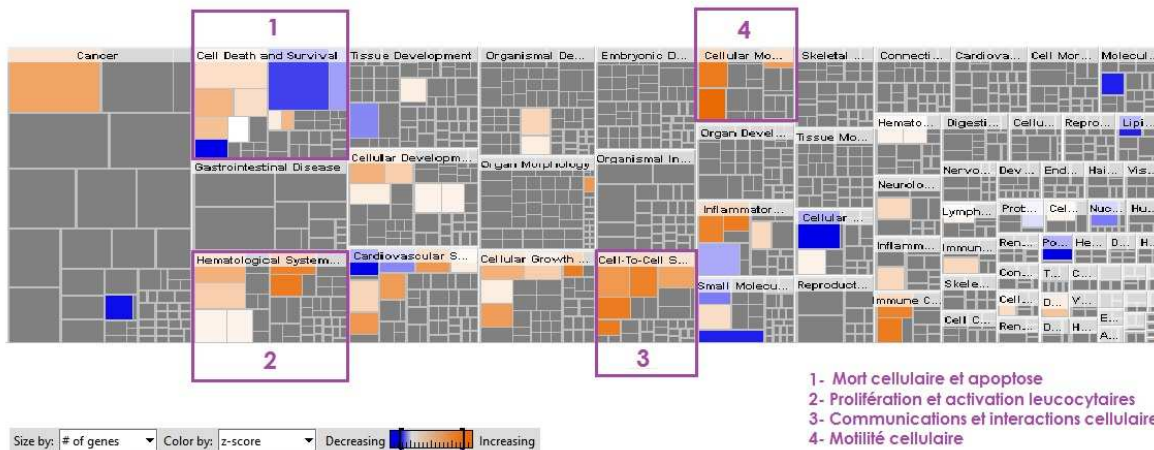
ANNEXE 9 : EFFETS DE LA SUR-EXPRESSION DE MIR-21 SUR LE TRANSCRIPTOME DE CELLULES TT

Les fonctions impactées sont représentées proportionnellement au nombre de gènes significativement régulés. Les fonctions activées (z-score positif) sont représentées en orange, celles inhibées en bleu (z-score négatif). La coloration grise correspond aux fonctions pour lesquelles la régulation n'est pas prévisible.

Cellules TT pré-miR-21 96h

Molecular and Cellular Functions	p-value	# Molecules
Cellular Movement	5,18E-05 - 3,37E-02	11
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	2,78E-04 - 3,22E-02	15
Cell Death and Survival	6,61E-04 - 2,93E-02	20
Cellular Development	7,16E-04 - 3,23E-02	13
Cellular Growth and Proliferation	7,16E-04 - 3,22E-02	12

Top canonical pathways	p-value	Ratio
Antigen Presentation Pathway	5,4E-03	2/42 (0,048)
VDR/RXR Activation	2,25E-02	2/88 (0,023)
TGF- β Signaling	2,76E-02	2/94 (0,021)
PAK Signaling	2,82E-02	2/110 (0,018)
Gai Signaling	5,1E-02	2/135 (0,015)



- 1- Mort cellulaire et apoptose
- 2- Prolifération et activation leucocytaires
- 3- Communications et interactions cellulaires
- 4- Motilité cellulaire

ANNEXE 10 : PRINCIPAUX GÈNES DÉRÉGULÉS PAR MIR-21 DANS LES CELLULES TT ET MZ-CRC1

Cellules TT				
GENE		Fold Change	p-value	Inhibiteurs
MX1	myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein	2,19	3,26E-02	
HES4	hairy and enhancer of split 4 (Drosophila)	2,02	3,04E-02	
HIST1H4A	histone cluster 1, H4a	1,93	3,26E-02	
NPTX1	neuronal pentraxin I	1,93	3,26E-02	
LOXL2	lysyl oxidase-like 2	1,85	3,04E-02	
C2CD4A	C2 calcium-dependent domain containing 4A	1,83	3,29E-02	
CCDC64B	coiled-coil domain containing 64B	1,81	3,30E-02	
PHGR1	proline/histidine/glycine-rich 1	1,80	3,04E-02	
SLC18A1	solute carrier family 18 (vesicular monoamine transporter), member	1,79	3,34E-02	*
SCN3A	sodium channel, voltage-gated, type III, alpha subunit	1,79	3,26E-02	*
CXCR4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	1,79	3,26E-02	*
CEACAM5	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5	1,77	4,52E-02	
SHISA2	shisa family member 2	1,77	3,26E-02	
MFSD9	major facilitator superfamily domain containing 9	1,76	3,26E-02	
FAM65C	family with sequence similarity 65, member C	1,75	3,34E-02	
SPP1	secreted phosphoprotein 1	1,72	4,92E-02	
CDCP1	CUB domain containing protein 1	1,71	3,26E-02	
TEK	TEK tyrosine kinase, endothelial	1,71	3,26E-02	* (cabozantinib, vandetanib)
IL17C	interleukin 17C	1,71	3,26E-02	
SSPN	sarcospan	-1,70	3,26E-02	
AQP12A/AQP12B	aquaporin 12A	-1,72	3,26E-02	
LRRC66	leucine rich repeat containing 66	-1,73	3,26E-02	
ARHGEF7	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 7	-1,75	3,34E-02	
PPAP2B	phosphatidic acid phosphatase type 2B	-1,83	3,26E-02	
SLC8A3	solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 3	-1,89	3,04E-02	

Cellules MZ-CRC1				
GENE		Fold Change	p-value	Inhibiteurs existants
KITLG	KIT ligand	1,60	1,98E-02	
CDK11A/CDK11B	cyclin-dependent kinase 11B	-1,72	1,98E-02	
NBPF8	neuroblastoma breakpoint family, member 8	-1,73	2,76E-02	
UGGT1	UDP-glucose glycoprotein glucosyltransferase 1	-1,75	3,18E-02	
HECTD3	HECT domain containing E3 ubiquitin protein ligase 3	-1,75	1,98E-02	
SRRT	serrate RNA effector molecule homolog (Arabidopsis)	-1,78	1,46E-02	
HIST1H1E	histone cluster 1, H1e	-1,78	1,46E-02	
MRPL1	mitochondrial ribosomal protein L1	-1,78	1,87E-02	
MARK2	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 2	-1,84	2,48E-02	
HIST1H1D	histone cluster 1, H1d	-1,84	1,38E-02	
IMMT	inner membrane protein, mitochondrial	-1,86	1,33E-02	
HMGB1	high mobility group box 1	-1,87	1,98E-02	
HEBP2	heme binding protein 2	-1,92	1,13E-02	
ZKSCAN1	zinc finger with KRAB and SCAN domains 1	-1,95	8,01E-03	
HIST1H2AA	histone cluster 1, H2aa	-2,28	4,01E-03	
HIST1H1B	histone cluster 1, H1b	-2,28	2,59E-02	
RRP7B	ribosomal RNA processing 7 homolog B (S. cerevisiae)	-2,32	3,78E-03	
EPHB1	EPH receptor B1	-2,35	3,71E-03	
RN7SK	RNA, 7SK small nuclear	-2,71	8,21E-03	
HIST1H4A	histone cluster 1, H4a	-3,83	6,72E-04	

ANNEXE 11 : PRINCIPAUX GÈNES DÉRÉGULÉS PAR MIR-129 DANS LES CELLULES TT ET MZ-CRC1

Cellules TT		Fold Change	p-value	Inhibiteurs
GENE				
SST	somatostatin	3,46	1,68E-03	
ADTRP	androgen-dependent TFPI-regulating protein	3,40	1,41E-03	
RN7SL1	RNA, 7SL, cytoplasmic 1	2,61	1,41E-02	
ATP6V1B1	ATPase, H+ transporting, lysosomal 56/58kDa, V1 subunit B1	2,42	4,08E-03	
DRD5	dopamine receptor D5	2,37	1,61E-02	*
C12orf76	chromosome 12 open reading frame 76	2,15	1,61E-02	
ST7-AS1	ST7 antisense RNA 1	2,12	1,39E-02	
PARM1	prostate androgen-regulated mucin-like protein 1	2,11	8,62E-03	
RDH12	retinol dehydrogenase 12 (all-trans/9-cis/11-cis)	2,08	1,85E-02	
P2RY14	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 14	2,07	1,61E-02	
MAFB	v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B	2,05	1,61E-02	
SPRR2E	small proline-rich protein 2E	2,01	8,62E-03	
GCK	glucokinase (hexokinase 4)	2,01	1,85E-02	
HIST1H4A (+others)	histone cluster 1, H4a	2,00	1,61E-02	
GPBAR1	G protein-coupled bile acid receptor 1	1,99	8,62E-03	
MFSD9	major facilitator superfamily domain containing 9	1,96	1,61E-02	
ZIM2	zinc finger, imprinted 2	1,94	1,85E-02	
SLC51B	solute carrier family 51, beta subunit	1,90	1,10E-02	
CEND1	cell cycle exit and neuronal differentiation 1	1,89	1,85E-02	
RELL1	RELT-like 1	1,88	1,85E-02	
P2RX6	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 6	1,87	1,57E-02	
TCIRG1	T-cell, immune regulator 1, ATPase, H+ transporting, lysosomal V0 subunit A3	1,87	1,15E-02	
RSPH1	radial spoke head 1 homolog (Chlamydomonas)	1,86	1,16E-02	
KLHL11	kelch-like family member 11	1,84	1,85E-02	
MPZL3	myelin protein zero-like 3	1,84	1,85E-02	
SPRR2A	small proline-rich protein 2A	1,84	1,29E-02	
ALDH1L2	aldehyde dehydrogenase 1 family, member L2	1,83	2,35E-02	
HOPX	HOP homeobox	1,82	1,39E-02	
RAB36	RAB36, member RAS oncogene family	1,81	1,85E-02	
RASL10A	RAS-like, family 10, member A	1,80	1,35E-02	
USH2A	Usher syndrome 2A (autosomal recessive, mild)	1,79	1,73E-02	
AZU1	azurocidin 1	1,78	1,42E-02	
NTRK3	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 3	1,78	1,85E-02	
CORO2A	coronin, actin binding protein, 2A	1,77	1,85E-02	
DRAM1	DNA-damage regulated autophagy modulator 1	1,76	2,05E-02	
LEPR	leptin receptor	1,75	1,49E-02	
SLC26A9	solute carrier family 26 (anion exchanger), member 9	1,75	1,59E-02	
C5AR1	complement component 5a receptor 1	1,75	1,85E-02	
MYLK	myosin light chain kinase	1,75	1,41E-02	
PGRMC1	progesterone receptor membrane component 1	-1,75	1,85E-02	
AQP12A/AQP12B	aquaporin 12A	-1,75	1,77E-02	
MT1G	metallothionein 1G	-1,75	1,85E-02	
YIPF5	Yip1 domain family, member 5	-1,76	1,85E-02	
UXS1	UDP-glucuronate decarboxylase 1	-1,77	1,85E-02	
GNAO1	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha activating activity poly	-1,78	1,41E-02	
AKR1C3	aldo-keto reductase family 1, member C3	-1,79	1,85E-02	
TRIP13	thyroid hormone receptor interactor 13	-1,79	1,85E-02	
LANCL1	LanC lantibiotic synthetase component C-like 1 (bacterial)	-1,79	1,85E-02	
PDK1	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1	-1,79	2,28E-02	*
DTL	denticleless E3 ubiquitin protein ligase homolog (Drosophila)	-1,80	1,85E-02	
ERAP1	endoplasmic reticulum aminopeptidase 1	-1,80	1,85E-02	
KIF26A	kinesin family member 26A	-1,84	1,85E-02	
RMDN1	regulator of microtubule dynamics 1	-1,85	1,61E-02	
PERP	PERP, TP53 apoptosis effector	-1,87	1,73E-02	
LRRC66	leucine rich repeat containing 66	-1,91	1,85E-02	
SLC8A3	solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 3	-2,00	1,85E-02	

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aarts, M., Dannenberg, H., deLeeuw, R.J., van Nederveen, F.H., Verhofstad, A.A., Lenders, J.W., Dinjens, W.N.M., Speel, E.J.M., Lam, W.L., de Krijger, R.R., 2006. Microarray-based CGH of sporadic and syndrome-related pheochromocytomas using a 0.1-0.2 Mb bacterial artificial chromosome array spanning chromosome arm 1p. *Genes. Chromosomes Cancer* 45, 83–93. doi:10.1002/gcc.20268
- Abraham, D., Jackson, N., Gundara, J.S., Zhao, J., Gill, A.J., Delbridge, L., Robinson, B.G., Sidhu, S.B., 2011. MicroRNA profiling of sporadic and hereditary medullary thyroid cancer identifies predictors of nodal metastasis, prognosis, and potential therapeutic targets. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 17, 4772–4781. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0242
- Agnusdei, D., Civitelli, R., Camporeale, A., Gennari, C., 1990. Calcitonin and estrogens. *J. Endocrinol. Invest.* 13, 625–630.
- Agrawal, N., Jiao, Y., Sausen, M., Leary, R., Bettgowda, C., Roberts, N.J., Bhan, S., Ho, A.S., Khan, Z., Bishop, J., Westra, W.H., Wood, L.D., Hruban, R.H., Tufano, R.P., Robinson, B., Dralle, H., Toledo, S.P.A., Toledo, R.A., Morris, L.G.T., Ghossein, R.A., Fagin, J.A., Chan, T.A., Velculescu, V.E., Vogelstein, B., Kinzler, K.W., Papadopoulos, N., Nelkin, B.D., Ball, D.W., 2013. Exomic sequencing of medullary thyroid cancer reveals dominant and mutually exclusive oncogenic mutations in RET and RAS. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98, E364–369. doi:10.1210/jc.2012-2703
- Ahrén, B., 1991. Regulatory peptides in the thyroid gland—a review on their localization and function. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* 124, 225–232.
- Albores-Saavedra, J.A., Krueger, J.E., 2001. C-cell hyperplasia and medullary thyroid microcarcinoma. *Endocr. Pathol.* 12, 365–377.
- Algeciras-Schimmich, A., Preissner, C.M., Theobald, J.P., Finseth, M.S., Grebe, S.K.G., 2009. Procalcitonin: a marker for the diagnosis and follow-up of patients with medullary thyroid carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94, 861–868. doi:10.1210/jc.2008-1862
- Álvarez-Rodríguez, R., Pons, S., 2009. Expression of the proneural gene encoding Mash1 suppresses MYCN mitotic activity. *J. Cell Sci.* 122, 595–599. doi:10.1242/jcs.037556
- Amara, S.G., Jonas, V., Rosenfeld, M.G., Ong, E.S., Evans, R.M., 1982. Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature* 298, 240–244.
- Amary, M.F., Bacsi, K., Maggiani, F., Damato, S., Halai, D., Berisha, F., Pollock, R., O'Donnell, P., Grigoriadis, A., Diss, T., Eskandarpour, M., Presneau, N., Hogendoorn, P.C., Futreal, A., Tirabosco, R., Flanagan, A.M., 2011. IDH1 and IDH2 mutations are frequent events in central chondrosarcoma and central and periosteal chondromas but not in other mesenchymal tumours. *J. Pathol.* 224, 334–343. doi:10.1002/path.2913
- Ambros, V., 1989. A hierarchy of regulatory genes controls a larva-to-adult developmental switch in *C. elegans*. *Cell* 57, 49–57.
- Ambros, V., Bartel, B., Bartel, D.P., Burge, C.B., Carrington, J.C., Chen, X., Dreyfuss, G., Eddy, S.R., Griffiths-Jones, S., Marshall, M., Matzke, M., Ruvkun, G., Tuschl, T., 2003. A uniform system for microRNA annotation. *RNA N. Y. N* 9, 277–279.
- Ameur, N., 2008. Analyse génomique des cancers médullaires de la thyroïde appliquée à l'étude comparative de l'oncogenèse humaine et murine. Paris Descartes.
- Ameur, N., Lacroix, L., Motte, N., Baudin, E., Caillou, B., Ducreux, M., Elias, D., Chanson, P., Schlumberger, M., Bidart, J.M., 2009a. Mutational status of EGFR, BRAF, PI3KCA and JAK2 genes in endocrine tumors. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 124, 751–753. doi:10.1002/ijc.23999
- Ameur, N., Lacroix, L., Roucan, S., Roux, V., Broutin, S., Talbot, M., Dupuy, C., Caillou, B., Schlumberger, M., Bidart, J.-M., 2009b. Aggressive inherited and sporadic medullary thyroid carcinomas display similar oncogenic pathways. *Endocr. Relat. Cancer* 16, 1261–1272. doi:10.1677/ERC-08-0289
- Andersson, L., Westerlund, J., Liang, S., Carlsson, T., Amendola, E., Fagman, H., Nilsson, M., 2011. Role of EphA4 receptor signaling in thyroid development: regulation of folliculogenesis and propagation of the C-cell lineage. *Endocrinology* 152, 1154–1164. doi:10.1210/en.2010-0232
- Aparicio, S.A., Caldas, C., Ponder, B., 2000. Does massively parallel transcriptome analysis signify the end of cancer histopathology as we know it? *Genome Biol.* 1, REVIEWS1021. doi:10.1186/gb-2000-1-3-reviews1021
- Aranha, M.M., Santos, D.M., Solá, S., Steer, C.J., Rodrigues, C.M.P., 2011. miR-34a Regulates Mouse Neural Stem Cell Differentiation. *PLoS ONE* 6, e21396. doi:10.1371/journal.pone.0021396
- Arlt, D.H., Baur, B., Wagner, B., Höppner, W., 2000. A novel type of mutation in the cysteine rich domain of the RET receptor causes ligand independent activation. *Oncogene* 19, 3445–3448. doi:10.1038/sj.onc.1203688
- Armitage, P., Doll, R., 1954. The age distribution of cancer and a multi-stage theory of carcinogenesis. *Br. J. Cancer* 8, 1–12.
- Asai, N., Iwashita, T., Matsuyama, M., Takahashi, M., 1995. Mechanism of activation of the ret proto-oncogene by multiple endocrine neoplasia 2A mutations. *Mol. Cell. Biol.* 15, 1613–1619.
- Ashworth, M., 2004. The pathology of preclinical medullary thyroid carcinoma. *Endocr. Pathol.* 15, 227–231.
- Baber, E., 1876. Contributions to the Minute Anatomy of the Thyroid Gland of the Dog., in: *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Royal Society of London*, pp. 557–568.
- Bader, A.G., 2012. miR-34 - a microRNA replacement therapy is headed to the clinic. *Front. Genet.* 3. doi:10.3389/fgene.2012.00120
- Baetscher, M., Schmidt, E., Shimizu, A., Leder, P., Fishman, M.C., 1991. SV40 T antigen transforms calcitonin cells of the thyroid but not CGRP-containing neurons in transgenic mice. *Oncogene* 6, 1133–1138.

- Bagchi, A., Mills, A.A., 2008. The quest for the 1p36 tumor suppressor. *Cancer Res.* 68, 2551–2556. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2095
- Barbet, J., Campion, L., Kraeber-Bodéré, F., Chatal, J.-F., GTE Study Group, 2005. Prognostic impact of serum calcitonin and carcinoembryonic antigen doubling-times in patients with medullary thyroid carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 6077–6084. doi:10.1210/jc.2005-0044
- Bardelli, A., Siena, S., 2010. Molecular Mechanisms of Resistance to Cetuximab and Panitumumab in Colorectal Cancer. *J. Clin. Oncol.* 28, 1254–1261. doi:10.1200/JCO.2009.24.6116
- Batista, M.F., Lewis, K.E., 2008. Pax2/8 act redundantly to specify glycinergic and GABAergic fates of multiple spinal interneurons. *Dev. Biol.* 323, 88–97. doi:10.1016/j.ydbio.2008.08.009
- Benn, D.E., Dwight, T., Richardson, A.L., Delbridge, L., Bambach, C.P., Stowasser, M., Gordon, R.D., Marsh, D.J., Robinson, B.G., 2000. Sporadic and familial pheochromocytomas are associated with loss of at least two discrete intervals on chromosome 1p. *Cancer Res.* 60, 7048–7051.
- Berndt, N., Hamilton, A.D., Sebti, S.M., 2011. Targeting protein prenylation for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 11, 775–791. doi:10.1038/nrc3151
- Bijlsma, E.K., Brouwer-Mladin, R., Bosch, D.A., Westerveld, A., Hulsebos, T.J., 1992. Molecular characterization of chromosome 22 deletions in schwannomas. *Genes. Chromosomes Cancer* 5, 201–205.
- Blair, B.G., Bardelli, A., Park, B.H., 2013. Somatic alterations as the basis for resistance to targeted therapies. *J. Pathol.* doi:10.1002/path.4278
- Borrello, M.G., Smith, D.P., Pasini, B., Bongarzone, I., Greco, A., Lorenzo, M.J., Arighi, E., Miranda, C., Eng, C., Alberti, L., 1995. RET activation by germline MEN2A and MEN2B mutations. *Oncogene* 11, 2419–2427.
- Bossi, D., Carlomagno, F., Pallavicini, I., Pruneri, G., Trubia, M., Raviele, P.R., Marinelli, A., Anaganti, S., Cox, M.C., Viale, G., Santoro, M., Di Fiore, P.P., Minucci, S., 2013. Functional characterization of a novel FGFR1OP-RET rearrangement in hematopoietic malignancies. *Mol. Oncol.* doi:10.1016/j.molonc.2013.11.004
- Bouchard, M., de Caprona, D., Busslinger, M., Xu, P., Fritsch, B., 2010. Pax2 and Pax8 cooperate in mouse inner ear morphogenesis and innervation. *BMC Dev. Biol.* 10, 89. doi:10.1186/1471-213X-10-89
- Boucher, J.M., Peterson, S.M., Urs, S., Zhang, C., Liaw, L., 2011. The miR-143/145 Cluster Is a Novel Transcriptional Target of Jagged-1/Notch Signaling in Vascular Smooth Muscle Cells. *J. Biol. Chem.* 286, 28312–28321. doi:10.1074/jbc.M111.221945
- Bozic, I., Antal, T., Ohtsuki, H., Carter, H., Kim, D., Chen, S., Karchin, R., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Nowak, M.A., 2010. Accumulation of driver and passenger mutations during tumor progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 18545–18550. doi:10.1073/pnas.1010978107
- Brandi, M.L., Gagel, R.F., Angeli, A., Bilezikian, J.P., Beck-Peccoz, P., Bordin, C., Conte-Devolx, B., Falchetti, A., Gheri, R.G., Libroia, A., Lips, C.J., Lombardi, G., Mannelli, M., Pacini, F., Ponder, B.A., Raue, F., Skogseid, B., Tamburrano, G., Thakker, R.V., Thompson, N.W., Tomassetti, P., Tonelli, F., Wells, S.A., Jr, Marx, S.J., 2001. Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 5658–5671. doi:10.1210/jcem.86.12.8070
- Braunstein, H., Stephens, C.L., 1968. Parafollicular cells of human thyroid. *Arch. Pathol.* 86, 659–666.
- Broderick, J., Zamore, P., 2011. microRNA Therapeutics. *Gene Ther.* 18, 1104–1110. doi:10.1038/gt.2011.50
- Broderick, J.A., Salomon, W.E., Ryder, S.P., Aronin, N., Zamore, P.D., 2011. Argonaute protein identity and pairing geometry determine cooperativity in mammalian RNA silencing. *RNA* 17, 1858–1869. doi:10.1261/rna.2778911
- Broutin, S., 2011. Pharmacologie moléculaire du sunitinib et du vandétanib, deux inhibiteurs d'activité kinase, dans le cancer médullaire de la thyroïde. Paris Sud.
- Broutin, S., Ameur, N., Lacroix, L., Robert, T., Petit, B., Oumata, N., Talbot, M., Caillou, B., Schlumberger, M., Dupuy, C., Bidart, J.-M., 2011. Identification of soluble candidate biomarkers of therapeutic response to sunitinib in medullary thyroid carcinoma in preclinical models. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 17, 2044–2054. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2041
- Broutin, S., Commo, F., De Koning, L., Marty-Prouvost, B., Lacroix, L., Talbot, M., Caillou, B., Dubois, T., Ryan, A.J., Dupuy, C., Schlumberger, M., Bidart, J.-M., 2014. Changes in signaling pathways induced by vandetanib in a human medullary thyroid carcinoma model, as analyzed by reverse phase protein array. *Thyroid Off. J. Am. Thyroid Assoc.* 24, 43–51. doi:10.1089/thy.2013.0514
- Buj-Bello, A., Adu, J., Piñón, L.G., Horton, A., Thompson, J., Rosenthal, A., Chinchetru, M., Buchman, V.L., Davies, A.M., 1997. Neurturin responsiveness requires a GPI-linked receptor and the Ret receptor tyrosine kinase. *Nature* 387, 721–724. doi:10.1038/42729
- Burns, D.M., Birnbaum, R.S., Roos, B.A., 1989. A neuroendocrine peptide derived from the amino-terminal half of rat procalcitonin. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 3, 140–147. doi:10.1210/mend-3-1-140
- Burrell, R.A., McGranahan, N., Bartek, J., Swanton, C., 2013. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature* 501, 338–345. doi:10.1038/nature12625
- Buscaglia, L.E.B., Li, Y., 2011. Apoptosis and the target genes of microRNA-21. *Chin. J. Cancer* 30, 371–380.
- Butler, M.G., Rames, L.J., Joseph, G.M., 1987. Cytogenetic studies of individuals from four kindreds with multiple endocrine neoplasia type II syndrome. *Cancer Genet. Cytogenet.* 28, 253–260.
- Caldas, C., Brenton, J.D., 2005. Sizing up miRNAs as cancer genes. *Nat. Med.* 11, 712–714. doi:10.1038/nm0705-712
- Califano, D., Rizzo, C., D'Alessio, A., Colucci-D'Amato, G.L., Cali, G., Bartoli, P.C., Santelli, G., Vecchio, G., de Franciscis, V., 2000. Signaling through Ras is essential for ret oncogene-induced cell differentiation in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 275, 19297–19305. doi:10.1074/jbc.M905866199

- Calin, G.A., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F., Croce, C.M., 2002. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 15524–15529. doi:10.1073/pnas.242606799
- Cameselle-Teijeiro, J., Varela-Durán, J., Sambade, C., Villanueva, J.P., Varela-Núñez, R., Sobrinho-Simoes, M., 1994. Solid cell nests of the thyroid: light microscopy and immunohistochemical profile. *Hum. Pathol.* 25, 684–693.
- Carlomagno, F., Guida, T., Anaganti, S., Provitera, L., Kjaer, S., McDonald, N.Q., Ryan, A.J., Santoro, M., 2009. Identification of tyrosine 806 as a molecular determinant of RET kinase sensitivity to ZD6474. *Endocr. Relat. Cancer* 16, 233–241. doi:10.1677/ERC-08-0213
- Carlomagno, F., Guida, T., Anaganti, S., Vecchio, G., Fusco, A., Ryan, A.J., Billaud, M., Santoro, M., 2004. Disease associated mutations at valine 804 in the RET receptor tyrosine kinase confer resistance to selective kinase inhibitors. *Oncogene* 23, 6056–6063. doi:10.1038/sj.onc.1207810
- Carlomagno, F., Salvatore, D., Santoro, M., de Franciscis, V., Quadro, L., Panariello, L., Colantuoni, V., Fusco, A., 1995. Point mutation of the RET proto-oncogene in the TT human medullary thyroid carcinoma cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 207, 1022–1028.
- Carre, A., Rachdi, L., Tron, E., Richard, B., Castanet, M., Schlumberger, M., Bidart, J.-M., Szinnai, G., Polak, M., 2011. Hes1 Is Required for Appropriate Morphogenesis and Differentiation during Mouse Thyroid Gland Development. *PLoS ONE* 6, e16752. doi:10.1371/journal.pone.0016752
- Carver, E.A., Stubbs, L., 1997. Zooming in on the human-mouse comparative map: genome conservation re-examined on a high-resolution scale. *Genome Res.* 7, 1123–1137.
- Castells, A., Gusella, J.F., Ramesh, V., Rustgi, A.K., 2000. A region of deletion on chromosome 22q13 is common to human breast and colorectal cancers. *Cancer Res.* 60, 2836–2839.
- Ceccherini, I., Bocciardi, R., Luo, Y., Pasini, B., Hofstra, R., Takahashi, M., Romeo, G., 1993. Exon structure and flanking intronic sequences of the human RET proto-oncogene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196, 1288–1295. doi:10.1006/bbrc.1993.2392
- Ceccherini, I., Pasini, B., Pacini, F., Gullo, M., Bongarzone, I., Romei, C., Santamaria, G., Matera, I., Mondellini, P., Scopsi, L., Pinchera, A., Pierotti, M.A., Romeo, G., 1997. Somatic in frame deletions not involving juxtamembranous cysteine residues strongly activate the RET proto-oncogene. *Oncogene* 14, 2609–2612. doi:10.1038/sj.onc.1201079
- Chang, H.-C., Guarente, L., 2013. SIRT1 mediates central circadian control in the SCN by a mechanism that decays with aging. *Cell* 153, 1448–1460. doi:10.1016/j.cell.2013.05.027
- Chang, T.-C., Wentzel, E.A., Kent, O.A., Ramachandran, K., Mullendore, M., Lee, K.H., Feldmann, G., Yamakuchi, M., Ferlito, M., Lowenstein, C.J., Arking, D.E., Beer, M.A., Maitra, A., Mendell, J.T., 2007. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol. Cell* 26, 745–752. doi:10.1016/j.molcel.2007.05.010
- Chantoux, F., Francon, J., 2002. Thyroid hormone regulates the expression of NeuroD/BHF1 during the development of rat cerebellum. *Mol. Cell. Endocrinol.* 194, 157–163.
- Chappuis-Flament, S., Pasini, A., De Vita, G., Séguuffin-Cariou, C., Fusco, A., Attié, T., Lenoir, G.M., Santoro, M., Billaud, M., 1998. Dual effect on the RET receptor of MEN 2 mutations affecting specific extracytoplasmic cysteines. *Oncogene* 17, 2851–2861. doi:10.1038/sj.onc.1202202
- Charoy, C., Castellani, V., 2013. [The neurotrophic factor GDNF, a novel modulator of the semaphorin signaling pathway during axon guidance]. *Médecine Sci.* MS 29, 127–130. doi:10.1051/medsci/2013292004
- Chen, D., Fu, L.-Y., Zhang, Z., Li, G., Zhang, H., Jiang, L., Harrison, A.P., Shanahan, H.P., Klukas, C., Zhang, H.-Y., Ruan, Y., Chen, L.-L., Chen, M., 2013. Dissecting the chromatin interactome of microRNA genes. *Nucleic Acids Res.* gkt1294. doi:10.1093/nar/gkt1294
- Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., Guo, J., Zhang, Y., Chen, J., Guo, X., Li, Q., Li, X., Wang, W., Zhang, Y., Wang, J., Jiang, X., Xiang, Y., Xu, C., Zheng, P., Zhang, J., Li, R., Zhang, H., Shang, X., Gong, T., Ning, G., Wang, J., Zen, K., Zhang, J., Zhang, C.-Y., 2008. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.* 18, 997–1006. doi:10.1038/cr.2008.282
- Chendrimada, T.P., Finn, K.J., Ji, X., Baillat, D., Gregory, R.I., Liebhaber, S.A., Pasquinelli, A.E., Shiekhattar, R., 2007. MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature* 447, 823–828. doi:10.1038/nature05841
- Cheng, H., Zhang, L., Cogdell, D.E., Zheng, H., Schetter, A.J., Nykter, M., Harris, C.C., Chen, K., Hamilton, S.R., Zhang, W., 2011. Circulating plasma MiR-141 is a novel biomarker for metastatic colon cancer and predicts poor prognosis. *PLoS One* 6, e17745. doi:10.1371/journal.pone.0017745
- Chiappetta, G., Toti, P., Cetta, F., Giuliano, A., Pentimalli, F., Amendola, I., Lazzi, S., Monaco, M., Mazzuchelli, L., Tosi, P., Santoro, M., Fusco, A., 2002. The RET/PTC oncogene is frequently activated in oncocytic thyroid tumors (Hurthle cell adenomas and carcinomas), but not in oncocytic hyperplastic lesions. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 364–369.
- Chin, L., Andersen, J.N., Futreal, P.A., 2011a. Cancer genomics: from discovery science to personalized medicine. *Nat. Med.* 17, 297–303. doi:10.1038/nm.2323
- Chin, L., Hahn, W.C., Getz, G., Meyerson, M., 2011b. Making sense of cancer genomic data. *Genes Dev.* 25, 534–555. doi:10.1101/gad.2017311
- Ciampi, R., Romei, C., Cosci, B., Vivaldi, A., Bottici, V., Renzini, G., Ugolini, C., Tacito, A., Basolo, F., Pinchera, A., Elisei, R., 2012. Chromosome 10 and RET gene copy number alterations in hereditary and sporadic Medullary Thyroid Carcinoma. *Mol. Cell. Endocrinol.* 348, 176–182. doi:10.1016/j.mce.2011.08.004

- Cimmino, A., Calin, G.A., Fabbri, M., Iorio, M.V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Aqeilan, R.I., Zupo, S., Dono, M., Rassenti, L., Alder, H., Volinia, S., Liu, C.-G., Kipps, T.J., Negrini, M., Croce, C.M., 2005. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 13944–13949. doi:10.1073/pnas.0506654102
- Ciriello, G., Miller, M.L., Aksoy, B.A., Senbabaoglu, Y., Schultz, N., Sander, C., 2013. Emerging landscape of oncogenic signatures across human cancers. *Nat. Genet.* 45, 1127–1133. doi:10.1038/ng.2762
- Cohen, A., Rovelli, A., Merlo, D.F., Lint, M.T. van, Lanino, E., Bresters, D., Ceppi, M., Bocchini, V., Tichelli, A., Socié, G., 2007. Risk for Secondary Thyroid Carcinoma After Hematopoietic Stem-Cell Transplantation: An EBMT Late Effects Working Party Study. *J. Clin. Oncol.* 25, 2449–2454. doi:10.1200/JCO.2006.08.9276
- Cohen, R., Campos, J.M., Salaün, C., Heshmati, H.M., Kraimps, J.L., Proye, C., Sarfati, E., Henry, J.F., Niccoli-Sire, P., Modigliani, E., 2000. Preoperative calcitonin levels are predictive of tumor size and postoperative calcitonin normalization in medullary thyroid carcinoma. Groupe d'Etudes des Tumeurs a Calcitonine (GETC). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 919–922. doi:10.1210/jcem.85.2.6556
- Colonna, M., Bossard, N., Guizard, A.-V., Remontet, L., Grosclaude, P., le réseau FRANCIM, 2010. Descriptive epidemiology of thyroid cancer in France: incidence, mortality and survival. *Ann. Endocrinol.* 71, 95–101. doi:10.1016/j.ando.2009.11.006
- Colonna, M., Guizard, A.V., Schvartz, C., Velten, M., Raverdy, N., Molinie, F., Delafosse, P., Franc, B., Grosclaude, P., 2007. A time trend analysis of papillary and follicular cancers as a function of tumour size: a study of data from six cancer registries in France (1983-2000). *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 43, 891–900. doi:10.1016/j.ejca.2006.11.024
- Consortium, I.H.G.S., 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431, 931–945. doi:10.1038/nature03001
- Cooley, L.D., Elder, F.F., Knuth, A., Gagel, R.F., 1995. Cytogenetic characterization of three human and three rat medullary thyroid carcinoma cell lines. *Cancer Genet. Cytogenet.* 80, 138–149.
- Copp, D.H., Cameron, E.C., 1961. Demonstration of a hypocalcemic factor (calcitonin) in commercial parathyroid extract. *Science* 134, 2038.
- Copp, D.H., Cheney, B., 1962. Calcitonin—a hormone from the parathyroid which lowers the calcium-level of the blood. *Nature* 193, 381–382.
- Corominas, M., Sloan, S.R., Leon, J., Kamino, H., Newcomb, E.W., Pellicer, A., 1991. ras activation in human tumors and in animal model systems. *Environ. Health Perspect.* 93, 19–25.
- Costa, A., Arisio, R., Benedetto, C., Bertino, E., Fabris, C., Giraudi, G., Marozio, L., Maulà, V., Pagliano, M., Testori, O., 1991. Thyroid hormones in tissues from human embryos and fetuses. *J. Endocrinol. Invest.* 14, 559–568.
- Cranston, A., Carniti, C., Martin, S., Mondellini, P., Hooks, Y., Leyland, J., Hodgson, S., Clarke, S., Pierotti, M., Ponder, B.A.J., Bongarzone, I., 2006. A Novel Activating Mutation in the RET Tyrosine Kinase Domain Mediates Neoplastic Transformation. *Mol. Endocrinol.* 20, 1633–1643. doi:10.1210/me.2004-0447
- Cutler, G.B., Jr, Habener, J.F., Potts, J.T., Jr, 1977. Biosynthesis and secretion of calcitonin by avian ultimobranchial glands. *Endocrinology* 100, 537–548. doi:10.1210/endo-100-2-537
- Dadon, T., Ball, D., Nelkin, B.D., 2013. Misidentification of Putative Medullary Thyroid Cancer Cell Lines RO-H85-1 and RO-D81-1. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98, 954–955. doi:10.1210/jc.2012-4181
- Das, D.K., Mallik, M.K., George, S.S., Sheikh, Z.A., Pathan, S.K., Haji, B.E., Al-Quaddomi, S.A., Mirza, K., Ajrawi, M.T., Amir, T., Dey, P., Francis, I.M., 2007. Secretory activity in medullary thyroid carcinoma: a cytomorphological and immunocytochemical study. *Diagn. Cytopathol.* 35, 329–337. doi:10.1002/dc.20637
- Davey, R.A., Findlay, D.M., 2013. Calcitonin: physiology or fantasy? *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 28, 973–979. doi:10.1002/jbmr.1869
- Davidson, E.H., Klein, W.H., Britten, R.J., 1977. Sequence organization in animal DNA and a speculation on hnRNA as a coordinate regulatory transcript. *Dev. Biol.* 55, 69–84.
- Davies, L., Welch, H.G., 2006. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 295, 2164–2167. doi:10.1001/jama.295.18.2164
- De Groot, J.W.B., Plukker, J.T.M., Wolffenbuttel, B.H.R., Wiggers, T., Sluiter, W.J., Links, T.P., 2006. Determinants of life expectancy in medullary thyroid cancer: age does not matter. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 65, 729–736. doi:10.1111/j.1365-2265.2006.02659.x
- Degl'Innocenti, D., Arighi, E., Popsueva, A., Sangregorio, R., Alberti, L., Rizzetti, M.G., Ferrario, C., Sariola, H., Pierotti, M.A., Borrello, M.G., 2004. Differential requirement of Tyr1062 multidocking site by RET isoforms to promote neural cell scattering and epithelial cell branching. *Oncogene* 23, 7297–7309. doi:10.1038/sj.onc.1207862
- DeLellis, R., 2010. Medullary thyroid carcinoma, in: *Molecular Pathology of Endocrine Diseases*. Jennifer L.Hunt, Boston, pp. 103–122.
- Denayer, E., Parret, A., Chmara, M., Schubbert, S., Vogels, A., Devriendt, K., Frijns, J.-P., Rybin, V., de Ravel, T.J., Shannon, K., Cools, J., Scheffzek, K., Legius, E., 2008. Mutation analysis in Costello syndrome: functional and structural characterization of the HRAS p.Lys117Arg mutation. *Hum. Mutat.* 29, 232–239. doi:10.1002/humu.20616
- Der, C.J., Krontiris, T.G., Cooper, G.M., 1982. Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 3637–3640.

- Derrien, T., Johnson, R., Busotti, G., Tanzer, A., Djebali, S., Tilgner, H., Guernec, G., Martin, D., Merkel, A., Knowles, D.G., Lagarde, J., Veeravalli, L., Ruan, X., Ruan, Y., Lassmann, T., Carninci, P., Brown, J.B., Lipovich, L., Gonzalez, J.M., Thomas, M., Davis, C.A., Shiekhathar, R., Gingeras, T.R., Hubbard, T.J., Notredame, C., Harrow, J., Guigó, R., 2012. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res.* 22, 1775–1789. doi:10.1101/gr.132159.111
- Dietrich, D., Uhl, B., Sailer, V., Holmes, E.E., Jung, M., Meller, S., Kristiansen, G., 2013. Improved PCR Performance Using Template DNA from Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tissues by Overcoming PCR Inhibition. *PLoS ONE* 8. doi:10.1371/journal.pone.0077771
- Donis-Keller, H., Dou, S., Chi, D., Carlson, K.M., Toshima, K., Lairmore, T.C., Howe, J.R., Moley, J.F., Goodfellow, P., Wells, S.A., Jr, 1993. Mutations in the RET proto-oncogene are associated with MEN 2A and FMTC. *Hum. Mol. Genet.* 2, 851–856.
- Douillard, J.-Y., Oliner, K.S., Siena, S., Tabernero, J., Burkes, R., Barugel, M., Humblet, Y., Bodoky, G., Cunningham, D., Jassem, J., Rivera, F., Kocáková, I., Ruff, P., Błasińska-Morawiec, M., Šmakal, M., Canon, J.L., Rother, M., Williams, R., Rong, A., Wietorek, J., Sidhu, R., Patterson, S.D., 2013. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 369, 1023–1034. doi:10.1056/NEJMoa1305275
- Drilon, A., Wang, L., Hasanovic, A., Suehara, Y., Lipson, D., Stephens, P., Ross, J., Miller, V., Ginsberg, M., Zakowski, M.F., Kris, M.G., Ladanyi, M., Rizvi, N., 2013. Response to Cabozantinib in patients with RET fusion-positive lung adenocarcinomas. *Cancer Discov.* 3, 630–635. doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0035
- Durbec, P., Marcos-Gutierrez, C.V., Kilkenny, C., Grigoriou, M., Wartiwaara, K., Suvanto, P., Smith, D., Ponder, B., Costantini, F., Saarma, M., 1996. GDNF signalling through the Ret receptor tyrosine kinase. *Nature* 381, 789–793. doi:10.1038/381789a0
- Edge, S.B., American Joint Committee on Cancer, 2010. *AJCC cancer staging manual*. Springer, New York.
- Edkins, S., O'Meara, S., Parker, A., Stevens, C., Reis, M., Jones, S., Greenman, C., Davies, H., Dalgliesh, G., Forbes, S., Hunter, C., Smith, R., Stephens, P., Goldstraw, P., Nicholson, A., Chan, T.L., Velculescu, V.E., Yuen, S.T., Leung, S.Y., Stratton, M.R., Futreal, P.A., 2006. Recurrent KRAS codon 146 mutations in human colorectal cancer. *Cancer Biol. Ther.* 5, 928–932.
- Elisei, R., Bottici, V., Luchetti, F., Di Coscio, G., Romei, C., Grasso, L., Miccoli, P., Iacconi, P., Basolo, F., Pinchera, A., Pacini, F., 2004. Impact of routine measurement of serum calcitonin on the diagnosis and outcome of medullary thyroid cancer: experience in 10,864 patients with nodular thyroid disorders. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 163–168. doi:10.1210/jc.2003-030550
- Emeson, R.B., Yeakley, J.M., Hedjran, F., Merillat, N., Lenz, H.J., Rosenfeld, M.G., 1992. Posttranscriptional regulation of calcitonin/CGRP gene expression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 657, 18–35.
- ENCODE Project Consortium, Birney, E., Stamatoyannopoulos, J.A., Dutta, A., Guigó, R., Gingeras, T.R., Margulies, E.H., Weng, Z., Snyder, M., Dermitzakis, E.T., Thurman, R.E., Kuehn, M.S., Taylor, C.M., Neph, S., Koch, C.M., Asthana, S., Malhotra, A., Adzhubei, I., Greenbaum, J.A., Andrews, R.M., Flicek, P., Boyle, P.J., Cao, H., Carter, N.P., Clelland, G.K., Davis, S., Day, N., Dhami, P., Dillon, S.C., Dorschner, M.O., Fiegler, H., Giresi, P.G., Goldy, J., Hawrylycz, M., Haydock, A., Humbert, R., James, K.D., Johnson, B.E., Johnson, E.M., Frum, T.T., Rosenzweig, E.R., Kamani, N., Lee, K., Lefebvre, G.C., Navas, P.A., Neri, F., Parker, S.C.J., Sabo, P.J., Sandstrom, R., Shafer, A., Vetrie, D., Weaver, M., Wilcox, S., Yu, M., Collins, F.S., Dekker, J., Lieb, J.D., Tullius, T.D., Crawford, G.E., Sunyaev, S., Noble, W.S., Dunham, I., Denoeud, F., Reymond, A., Kapranov, P., Rozowsky, J., Zheng, D., Castelo, R., Frankish, A., Harrow, J., Ghosh, S., Sandelin, A., Hofacker, I.L., Baertsch, R., Keefe, D., Dike, S., Cheng, J., Hirsch, H.A., Sekinger, E.A., Lagarde, J., Abril, J.F., Shahab, A., Flamm, C., Fried, C., Hackermüller, J., Hertel, J., Lindemeyer, M., Missal, K., Tanzer, A., Washietl, S., Korbel, J., Emanuelsson, O., Pedersen, J.S., Holroyd, N., Taylor, R., Swarbreck, D., Matthews, N., Dickson, M.C., Thomas, D.J., Weirauch, M.T., Gilbert, J., Drenkow, J., Bell, I., Zhao, X., Srinivasan, K.G., Sung, W.-K., Ooi, H.S., Chiu, K.P., Foissac, S., Alioto, T., Brent, M., Pachter, L., Tress, M.L., Valencia, A., Choo, S.W., Choo, C.Y., Ucla, C., Manzano, C., Wyss, C., Cheung, E., Clark, T.G., Brown, J.B., Ganesh, M., Patel, S., Tammanna, H., Chrast, J., Henriksen, C.N., Kai, C., Kawai, J., Nagalakshmi, U., Wu, J., Lian, Z., Lian, J., Newburger, P., Zhang, X., Bickel, P., Mattick, J.S., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Weissman, S., Hubbard, T., Myers, R.M., Rogers, J., Stadler, P.F., Lowe, T.M., Wei, C.-L., Ruan, Y., Struhl, K., Gerstein, M., Antonarakis, S.E., Fu, Y., Green, E.D., Karaöz, U., Siepel, A., Taylor, J., Liefer, L.A., Wetterstrand, K.A., Good, P.J., Feingold, E.A., Guyer, M.S., Cooper, G.M., Asimenos, G., Dewey, C.N., Hou, M., Nikolaev, S., Montoya-Burgos, J.I., Löytynoja, A., Whelan, S., Pardi, F., Massingham, T., Huang, H., Zhang, N.R., Holmes, I., Mullikin, J.C., Ureta-Vidal, A., Paten, B., Seringhaus, M., Church, D., Rosenbloom, K., Kent, W.J., Stone, E.A., NISC Comparative Sequencing Program, Baylor College of Medicine Human Genome Sequencing Center, Washington University Genome Sequencing Center, Broad Institute, Children's Hospital Oakland Research Institute, Batzoglou, S., Goldman, N., Hardison, R.C., Haussler, D., Miller, W., Sidow, A., Trinklein, N.D., Zhang, Z.D., Barrera, L., Stuart, R., King, D.C., Ameur, A., Enroth, S., Bieda, M.C., Kim, J., Bhinge, A.A., Jiang, N., Liu, J., Yao, F., Vega, V.B., Lee, C.W.H., Ng, P., Shahab, A., Yang, A., Moqtaderi, Z., Zhu, Z., Xu, X., Squazzo, S., Oberley, M.J., Inman, D., Singer, M.A., Richmond, T.A., Munn, K.J., Rada-Iglesias, A., Wallerstein, O., Komorowski, J., Fowler, J.C., Couttet, P., Bruce, A.W., Dovey, O.M., Ellis, P.D., Langford, C.F., Nix, D.A., Euskirchen, G., Hartman, S., Urban, A.E., Kraus, P., Van Calcar, S., Heintzman, N., Kim, T.H., Wang, K., Qu, C., Hon, G., Luna, R., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G., Aldred, S.F., Cooper, S.J., Halees, A., Lin, J.M., Shulha, H.P., Zhang, X., Xu, M., Haidar, J.N.S., Yu, Y., Ruan, Y., Iyer, V.R., Green, R.D., Wadelius, C., Farnham, P.J., Ren, B., Harte, R.A., Hinrichs, A.S., Trumbower, H., Clawson, H., Hillman-Jackson, J., Zweig, A.S., Smith, K., Thakapallayil, A., Barber, G., Kuhn, R.M., Karolchik, D., Armengol, L., Bird, C.P., de Bakker, P.I.W., Kern, A.D., Lopez-Bigas, N., Martin, J.D., Stranger,

- B.E., Woodroffe, A., Davydov, E., Dimas, A., Eyra, E., Hallgrímsdóttir, I.B., Huppert, J., Zody, M.C., Abecasis, G.R., Estivill, X., Bouffard, G.G., Guan, X., Hansen, N.F., Idol, J.R., Maduro, V.V.B., Maskeri, B., McDowell, J.C., Park, M., Thomas, P.J., Young, A.C., Blakesley, R.W., Muzny, D.M., Sodergren, E., Wheeler, D.A., Worley, K.C., Jiang, H., Weinstock, G.M., Gibbs, R.A., Graves, T., Fulton, R., Mardis, E.R., Wilson, R.K., Clamp, M., Cuff, J., Gnerre, S., Jaffe, D.B., Chang, J.L., Lindblad-Toh, K., Lander, E.S., Koriabine, M., Nefedov, M., Osoegawa, K., Yoshinaga, Y., Zhu, B., de Jong, P.J., 2007. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* 447, 799–816. doi:10.1038/nature05874
- Endo, T., Saito, T., Uchida, T., Onaya, T., 1988. Effects of somatostatin and serotonin on calcitonin secretion from cultured rat parafollicular cells. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* 117, 214–218.
- Eng, C., Smith, D.P., Mulligan, L.M., Nagai, M.A., Healey, C.S., Ponder, M.A., Gardner, E., Scheumann, G.F., Jackson, C.E., Tunnacliffe, A., 1994. Point mutation within the tyrosine kinase domain of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2B and related sporadic tumours. *Hum. Mol. Genet.* 3, 237–241.
- Ercolino, T., Lombardi, A., Becherini, L., Piscitelli, E., Cantini, G., Gaglianò, M.S., Serio, M., Luconi, M., Mannelli, M., 2008. The Y606C RET mutation causes a receptor gain of function. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 69, 253–258. doi:10.1111/j.1365-2265.2008.03197.x
- Fabbri, M., Paone, A., Calore, F., Galli, R., Gaudio, E., Santhanam, R., Lovat, F., Fadda, P., Mao, C., Nuovo, G.J., Zanesi, N., Crawford, M., Ozer, G.H., Wernicke, D., Alder, H., Caligiuri, M.A., Nana-Sinkam, P., Perrotti, D., Croce, C.M., 2012. MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 12278–12279. doi:10.1073/pnas.1209414109
- Faggiano, A., Talbot, M., Baudin, E., Bidart, J.M., Schlumberger, M., Caillou, B., 2003. Differential expression of galectin 3 in solid cell nests and C cells of human thyroid. *J. Clin. Pathol.* 56, 142–143.
- Fagman, H., Andersson, L., Nilsson, M., 2006. The developing mouse thyroid: embryonic vessel contacts and parenchymal growth pattern during specification, budding, migration, and lobulation. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 235, 444–455. doi:10.1002/dvdy.20653
- Farndon, J.R., Leight, G.S., Dilley, W.G., Baylin, S.B., Smallridge, R.C., Harrison, T.S., Wells, S.A., Jr, 1986. Familial medullary thyroid carcinoma without associated endocrinopathies: a distinct clinical entity. *Br. J. Surg.* 73, 278–281.
- Felici, A., Giorgio, M., Krauzewicz, N., Della Rocca, C., Santoro, M., Rovere, P., Manni, I., Amati, P., Pozzi, L., 1999. Medullary thyroid carcinomas in transgenic mice expressing a Polyoma carboxyl-terminal truncated middle-T and wild type small-T antigens. *Oncogene* 18, 2387–2395. doi:10.1038/sj.onc.1202578
- Feng, H., Liu, K.W., Guo, P., Zhang, P., Cheng, T., McNiven, M.A., Johnson, G.R., Hu, B., Cheng, S.Y., 2012. Dynamin 2 mediates PDGFRα-SHP-2-promoted glioblastoma growth and invasion. *Oncogene* 31, 2691–2702. doi:10.1038/onc.2011.436
- Fernandez-Medarde, A., Santos, E., 2011. Ras in Cancer and Developmental Diseases. *Genes Cancer* 2, 344–358. doi:10.1177/1947601911411084
- Figge, J.J., 2006. Epidemiology of Thyroid Cancer, in: MACP, L.W.M., MPH, FACNP, D.V.N.M., FACP (Eds.), *Thyroid Cancer*. Humana Press, pp. 9–13.
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N., Sonenberg, N., 2008. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet.* 2008, 102–114. doi:10.1038/nrg2290
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811. doi:10.1038/35888
- Flicker, K., Ulz, P., Höger, H., Zeithofer, P., Haas, O.A., Behmel, A., Buchinger, W., Scheuba, C., Niederle, B., Pfragner, R., Speicher, M.R., 2012. High-resolution analysis of alterations in medullary thyroid carcinoma genomes. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 131, E66–73. doi:10.1002/ijc.26494
- Fong, C.T., Dracopoli, N.C., White, P.S., Merrill, P.T., Griffith, R.C., Housman, D.E., Brodeur, G.M., 1989. Loss of heterozygosity for the short arm of chromosome 1 in human neuroblastomas: correlation with N-myc amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 3753–3757.
- Foster, G.V., Baghdiantz, A., Kumar, M.A., Slack, E., Soliman, H.A., Macintyre, I., 1964. Thyroid origine of calcitonin. *Nature* 202, 1303–1305.
- Franc, B., Modigliani, E., 1998. [Medullary thyroid carcinoma: evolution of concepts]. *Arch. Anat. Cytol. Pathol.* 46, 100–111.
- Frisk, T., Zedenius, J., Lundberg, J., Wallin, G., Kytölä, S., Larsson, C., 2001. CGH alterations in medullary thyroid carcinomas in relation to the RET M918T mutation and clinical outcome. *Int. J. Oncol.* 18, 1219–1225.
- Fujita, T., Igarashi, J., Okawa, E.R., Gotoh, T., Manne, J., Kolla, V., Kim, J., Zhao, H., Pawel, B.R., London, W.B., Maris, J.M., White, P.S., Brodeur, G.M., 2008. CHD5, a tumor suppressor gene deleted from 1p36.31 in neuroblastomas. *J. Natl. Cancer Inst.* 100, 940–949. doi:10.1093/jnci/djn176
- Gaedcke, J., Grade, M., Jung, K., Schirmer, M., Jo, P., Obermeyer, C., Wolff, H.A., Herrmann, M.K., Beissbarth, T., Becker, H., Ried, T., Ghadimi, M., 2010. KRAS and BRAF mutations in patients with rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* 94, 76–81. doi:10.1016/j.radonc.2009.10.001
- Gagel, R.F., Palmer, W.N., Leonhart, K., Chan, L., Leong, S.S., 1986. Somatostatin production by a human medullary thyroid carcinoma cell line. *Endocrinology* 118, 1643–1651. doi:10.1210/endo-118-4-1643
- Gao, H., Zhao, H., Xiang, W., 2013. Expression level of human miR-34a correlates with glioma grade and prognosis. *J. Neurooncol.* 113, 221–228. doi:10.1007/s11060-013-1119-1

- Garrett, J.E., Tamir, H., Kifor, O., Simin, R.T., Rogers, K.V., Mithal, A., Gagel, R.F., Brown, E.M., 1995. Calcitonin-secreting cells of the thyroid express an extracellular calcium receptor gene. *Endocrinology* 136, 5202–5211. doi:10.1210/endo.136.11.7588259
- Gawlik, T., d' Amico, A., Szpak-Ulczo, S., Skoczylas, A., Gubała, E., Choraży, A., Gorczewski, K., Włoch, J., Jarzqb, B., 2010. The prognostic value of tumor markers doubling times in medullary thyroid carcinoma - preliminary report. *Thyroid Res.* 3, 10. doi:10.1186/1756-6614-3-10
- Gelsi-Boyer, V., Trouplin, V., Adélaïde, J., Aceto, N., Remy, V., Pinson, S., Houdayer, C., Arnoulet, C., Sainty, D., Bentires-Alj, M., Olschwang, S., Vey, N., Mozziconacci, M.-J., Birnbaum, D., Chaffanet, M., 2008. Genome profiling of chronic myelomonocytic leukemia: frequent alterations of RAS and RUNX1 genes. *BMC Cancer* 8, 299. doi:10.1186/1471-2407-8-299
- George Priya Doss, C., Rajith, B., Chakraborty, C., Balaji, V., Magesh, R., Gowthami, B., Menon, S., Swati, M., Trivedi, M., Paul, J., Vasan, R., Das, M., 2014. In silico profiling and structural insights of missense mutations in RET protein kinase domain by molecular dynamics and docking approach. *Mol. Biosyst.* 10, 421–436. doi:10.1039/c3mb70427k
- Gerlinger, M., Rowan, A.J., Horswell, S., Larkin, J., Endesfelder, D., Gronroos, E., Martinez, P., Matthews, N., Stewart, A., Tarpey, P., Varela, I., Phillimore, B., Begum, S., McDonald, N.Q., Butler, A., Jones, D., Raine, K., Latimer, C., Santos, C.R., Nohadani, M., Eklund, A.C., Spencer-Dene, B., Clark, G., Pickering, L., Stamp, G., Gore, M., Szallasi, Z., Downward, J., Futreal, P.A., Swanton, C., 2012. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N. Engl. J. Med.* 366, 883–892. doi:10.1056/NEJMoa1113205
- Gibelin, H., Essique, D., Jones, C., Levillain, P., Maréchaud, R., Kraimps, J.-L., 2005. Increased calcitonin level in thyroid nodules without medullary carcinoma. *Br. J. Surg.* 92, 574–578. doi:10.1002/bjs.4875
- Gilad, S., Meiri, E., Yagev, Y., Benjamin, S., Lebanony, D., Yerushalmi, N., Benjamin, H., Kushnir, M., Cholak, H., Melamed, N., Bentwich, Z., Hod, M., Goren, Y., Chajut, A., 2008. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PloS One* 3, e3148. doi:10.1371/journal.pone.0003148
- Gimm, O., Ukkat, J., Niederle, B.E., Weber, T., Thanh, P.N., Brauckhoff, M., Niederle, B., Dralle, H., 2004. Timing and extent of surgery in patients with familial medullary thyroid carcinoma/multiple endocrine neoplasia 2A-related RET mutations not affecting codon 634. *World J. Surg.* 28, 1312–1316. doi:10.1007/s00268-004-7640-9
- Girard, A., Sachidanandam, R., Hannon, G.J., Carmell, M.A., 2006. A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature* 442, 199–202. doi:10.1038/nature04917
- Goldschmidt, R., 1916. THEODOR BOVERI. *Science* 43, 263–270. doi:10.1126/science.43.1104.263
- Goodfellow, P.J., White, B.N., Holden, J.J., Duncan, A.M., Sears, E.V., Wang, H.S., Berlin, L., Kidd, K.K., Simpson, N.E., 1985. Linkage analysis of a DNA marker localized to 20p12 and multiple endocrine neoplasia type 2A. *Am. J. Hum. Genet.* 37, 890–897.
- Gorlin, R.J., Sedano, H.O., Vickers, R.A., Cervenka, J., 1968. Multiple mucosal neuromas, pheochromocytoma and medullary carcinoma of the thyroid—a syndrome. *Cancer* 22, 293–299 passim.
- Goutas, N., Vlachodimitropoulos, D., Bouka, M., Lazaris, A.C., Nasioulas, G., Gazouli, M., 2008. BRAF and K-RAS Mutation in a Greek Papillary and Medullary Thyroid Carcinoma Cohort. *Anticancer Res.* 28, 305–308.
- Green, A., Beer, P., 2010. Somatic mutations of IDH1 and IDH2 in the leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms. *N. Engl. J. Med.* 362, 369–370. doi:10.1056/NEJMc0910063
- Greenberg, E., Besser, M.J., Ben-Ami, E., Shapira-Frommer, R., Itzhaki, O., Zikich, D., Levy, D., Kubi, A., Eyal, E., Onn, A., Cohen, Y., Barshack, I., Schachter, J., Markel, G., 2013. A comparative analysis of total serum miRNA profiles identifies novel signature that is highly indicative of metastatic melanoma: a pilot study. *Biomark. Biochem. Indic. Expo. Response Susceptibility Chem.* 18, 502–508. doi:10.3109/1354750X.2013.816777
- Grieco, M., Santoro, M., Berlingieri, M.T., Melillo, R.M., Donghi, R., Bongarzone, I., Pierotti, M.A., Della Porta, G., Fusco, A., Vecchio, G., 1990. PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and is frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas. *Cell* 60, 557–563.
- Griffiths-Jones, S., Grocock, R.J., van Dongen, S., Bateman, A., Enright, A.J., 2006. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res.* 34, D140–144. doi:10.1093/nar/gkj112
- Grimson, A., Farh, K.K.-H., Johnston, W.K., Garrett-Engel, P., Lim, L.P., Bartel, D.P., 2007. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol. Cell* 27, 91–105. doi:10.1016/j.molcel.2007.06.017
- Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N., Altman, S., 1983. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* 35, 849–857.
- Gundara, J.S., Zhao, J.T., Gill, A.J., Clifton-Bligh, R., Robinson, B.G., Delbridge, L., Sidhu, S.B., 2012. Nodal metastasis microRNA expression correlates with the primary tumour in MTC. *ANZ J. Surg.* doi:10.1111/j.1445-2197.2012.06291.x
- Guo, H., Ingolia, N.T., Weissman, J.S., Bartel, D.P., 2010. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 466, 835–840. doi:10.1038/nature09267
- Guyétant, S., Bléchet, C., Saint-André, J.-P., 2006. C-cell hyperplasia. *Ann. Endocrinol.* 67, 190–197.
- Guyétant, S., Josselin, N., Savagner, F., Rohmer, V., Michalak, S., Saint-André, J.-P., 2003. C-cell hyperplasia and medullary thyroid carcinoma: clinicopathological and genetic correlations in 66 consecutive patients. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* 16, 756–763. doi:10.1097/01.MP.0000081727.75778.0C
- Hahm, J.R., Lee, M.S., Min, Y.K., Lee, M.K., Kim, K.W., Nam, S.J., Yang, J.H., Chung, J.H., 2001. Routine measurement of serum calcitonin is useful for early detection of medullary thyroid carcinoma in

- patients with nodular thyroid diseases. *Thyroid Off. J. Am. Thyroid Assoc.* 11, 73–80. doi:10.1089/10507250150500694
- Hall, A., Marshall, C.J., Spurr, N.K., Weiss, R.A., 1983. Identification of transforming gene in two human sarcoma cell lines as a new member of the ras gene family located on chromosome 1. *Nature* 303, 396–400.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Harach, H.R., 1985. Histological markers of solid cell nests of the thyroid. With some emphasis on their expression in thyroid ultimobranchial-related tumors. *Acta Anat. (Basel)* 124, 111–116.
- Harach, H.R., Vujančić, G.M., Jasani, B., 1993. Ultimobranchial body nests in human fetal thyroid: an autopsy, histological, and immunohistochemical study in relation to solid cell nests and mucoepidermoid carcinoma of the thyroid. *J. Pathol.* 169, 465–469. doi:10.1002/path.1711690413
- Harach, H.R., Wasenius, V.M., 1987. Expression of “visceral” cytokeratin and ultrastructural findings in solid cell nests of the thyroid. *Acta Anat. (Basel)* 129, 289–292.
- Hartmann, C., Nümann, A., Mueller, W., Holtkamp, N., Simon, M., von Deimling, A., 2004. Fine mapping of chromosome 22q tumor suppressor gene candidate regions in astrocytoma. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 108, 839–844. doi:10.1002/ijc.11638
- Harvey, J.J., 1964. An unidentified virus which causes the rapid production of tumours in mice. *Nature* 204, 1104–1105.
- Hazard, J.B., 1977. The C cells (parafollicular cells) of the thyroid gland and medullary thyroid carcinoma. A review. *Am. J. Pathol.* 88, 213–250.
- Hazard, J.B., Hawk, W.A., Crile, G., 1959. MEDULLARY (SOLID) CARCINOMA OF THE THYROID--A CLINICOPATHOLOGIC ENTITY. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 19, 152–161. doi:10.1210/jcem-19-1-152
- He, L., Hannon, G.J., 2004. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.* 5, 522–531. doi:10.1038/nrg1379
- Hedinger, C., Dillwyn Williams, E., Sobin, L.H., 1989. The WHO histological classification of thyroid tumors: A commentary on the second edition. *Cancer* 63, 908–911. doi:10.1002/1097-0142(19890301)63:5<908::AID-CNCR2820630520>3.0.CO;2-I
- Hendrickson, D.G., Hogan, D.J., McCullough, H.L., Myers, J.W., Herschlag, D., Ferrell, J.E., Brown, P.O., 2009. Concordant regulation of translation and mRNA abundance for hundreds of targets of a human microRNA. *PLoS Biol.* 7, e1000238. doi:10.1371/journal.pbio.1000238
- Hennige, A.M., Lammers, R., Höppner, W., Art, D., Strack, V., Teichmann, R., Machicao, F., Ullrich, A., Häring, H.U., Kellerer, M., 2001. Inhibition of Ret oncogene activity by the protein tyrosine phosphatase SHP1. *Endocrinology* 142, 4441–4447.
- Herbst, R.S., Heymach, J.V., O'Reilly, M.S., Onn, A., Ryan, A.J., 2007. Vandetanib (ZD6474): an orally available receptor tyrosine kinase inhibitor that selectively targets pathways critical for tumor growth and angiogenesis. *Expert Opin. Investig. Drugs* 16, 239–249. doi:10.1517/13543784.16.2.239
- Herfarth, K.K., Wick, M.R., Marshall, H.N., Gartner, E., Lum, S., Moley, J.F., 1997. Absence of TP53 alterations in pheochromocytomas and medullary thyroid carcinomas. *Genes. Chromosomes Cancer* 20, 24–29.
- Hillyard, C.J., Myers, C., Abeyasekera, G., Stevvensenson, J.C., Craig, R.K., MacIntyre, I., 1983. Katalcacin: a new plasma calcium-lowering hormone. *Lancet* 1, 846–848.
- Hogarty, M.D., Winter, C.L., Liu, X., Guo, C., White, P.S., Look, A.T., Brodeur, G.M., Maris, J.M., 2002. No evidence for the presence of an imprinted neuroblastoma suppressor gene within chromosome sub-band 1p36.3. *Cancer Res.* 62, 6481–6484.
- Holley, R.W., Apgar, J., Everett, G.A., Madison, J.T., Marquisee, M., Merrill, S.H., Penswick, J.R., Zamir, A., 1965. STRUCTURE OF A RIBONUCLEIC ACID. *Science* 147, 1462–1465.
- Hoovers, J.M., Redeker, E., Speleman, F., Höppner, J.W., Bhola, S., Bliet, J., van Roy, N., Leschot, N.J., Westerveld, A., Mannens, M., 1993. High-resolution chromosomal localization of the human calcitonin/CGRP/IAPP gene family members. *Genomics* 15, 525–529. doi:10.1006/geno.1993.1104
- Höppner, W., Dralle, H., Brabant, G., 1998. Duplication of 9 base pairs in the critical cysteine-rich domain of the RET proto-oncogene causes multiple endocrine neoplasia type 2A. *Hum. Mutat. Suppl.* 1, S128–130.
- Höppner, W., Ritter, M.M., 1997. A duplication of 12 bp in the critical cysteine rich domain of the RET proto-oncogene results in a distinct phenotype of multiple endocrine neoplasia type 2A. *Hum. Mol. Genet.* 6, 587–590.
- Hsu, T.C., Pathak, S., Samaan, N., Hickey, R.C., 1981. Chromosome instability in patients with medullary carcinoma of the thyroid. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 246, 2046–2048.
- Huang, S.C., Koch, C.A., Vortmeyer, A.O., Pack, S.D., Lichtenauer, U.D., Mannan, P., Lubensky, I.A., Chrousos, G.P., Gagel, R.F., Pacak, K., Zhuang, Z., 2000. Duplication of the mutant RET allele in trisomy 10 or loss of the wild-type allele in multiple endocrine neoplasia type 2-associated pheochromocytomas. *Cancer Res.* 60, 6223–6226.
- Huang, S.C., Torres-Cruz, J., Pack, S.D., Koch, C.A., Vortmeyer, A.O., Mannan, P., Lubensky, I.A., Gagel, R.F., Zhuang, Z., 2003. Amplification and overexpression of mutant RET in multiple endocrine neoplasia type 2-associated medullary thyroid carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 459–463.
- Huebner, A.K., Keller, J., Catala-Lehnen, P., Perkovic, S., Streichert, T., Emeson, R.B., Amling, M., Schinke, T., 2008. The role of calcitonin and alpha-calcitonin gene-related peptide in bone formation. *Arch. Biochem. Biophys.* 473, 210–217. doi:10.1016/j.abb.2008.02.013
- Huebner, R.J., Todaro, G.J., 1969. Oncogenes of RNA tumor viruses as determinants of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 64, 1087–1094.

- Hunt, P., Gulisano, M., Cook, M., Sham, M.H., Faiella, A., Wilkinson, D., Boncinelli, E., Krumlauf, R., 1991. A distinct Hox code for the branchial region of the vertebrate head. *Nature* 353, 861–864. doi:10.1038/353861a0
- Hurst, D.R., Edmonds, M.D., Welch, D.R., 2009. Metastamir: the field of metastasis-regulatory microRNA is spreading. *Cancer Res.* 69, 7495–7498. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2111
- Hyer, S.L., Vini, L., Aylmer, R., Harmer, C., 2000. Medullary thyroid cancer: multivariate analysis of prognostic factors influencing survival. *Eur. J. Surg. Oncol. EJSO* 26, 686–690. doi:10.1053/ejso.2000.0981
- Iacobone, M., Niccoli-Sire, P., Sebag, F., De Micco, C., Henry, J.-F., 2002. Can sporadic medullary thyroid carcinoma be biochemically predicted? Prospective analysis of 66 operated patients with elevated serum calcitonin levels. *World J. Surg.* 26, 886–890. doi:10.1007/s00268-002-6613-0
- Ilhan-Mutlu, A., Wagner, L., Wöhrer, A., Furtner, J., Widhalm, G., Marosi, C., Preusser, M., 2012. Plasma MicroRNA-21 concentration may be a useful biomarker in glioblastoma patients. *Cancer Invest.* 30, 615–621. doi:10.3109/07357907.2012.708071
- Illingworth, C.J.R., Mustonen, V., 2011. Distinguishing Driver and Passenger Mutations in an Evolutionary History Categorized by Interference. *Genetics* 189, 989–1000. doi:10.1534/genetics.111.133975
- INCa, 2011. Conservation et utilisation des échantillons tumoraux en cancérologie.
- Ino, Y., Silver, J.S., Blazejewski, L., Nishikawa, R., Matsutani, M., von Deimling, A., Louis, D.N., 1999. Common regions of deletion on chromosome 22q12.3-q13.1 and 22q13.2 in human astrocytomas appear related to malignancy grade. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58, 881–885.
- Ito, S., Iwashita, T., Asai, N., Murakami, H., Iwata, Y., Sobue, G., Takahashi, M., 1997. Biological properties of Ret with cysteine mutations correlate with multiple endocrine neoplasia type 2A, familial medullary thyroid carcinoma, and Hirschsprung's disease phenotype. *Cancer Res.* 57, 2870–2872.
- Jacobs, J.W., Lund, P.K., Potts, J.T., Jr, Bell, N.H., Habener, J.F., 1981. Procalcitonin is a glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 256, 2803–2807.
- Jain, A.K., Allton, K., Iacovino, M., Mahen, E., Milczarek, R.J., Zwaka, T.P., Kyba, M., Barton, M.C., 2012. p53 regulates cell cycle and microRNAs to promote differentiation of human embryonic stem cells. *PLoS Biol.* 10, e1001268. doi:10.1371/journal.pbio.1001268
- Janga, S.C., Vallabhaneni, S., 2011. MicroRNAs as post-transcriptional machines and their interplay with cellular networks. *Adv. Exp. Med. Biol.* 722, 59–74. doi:10.1007/978-1-4614-0332-6_4
- Jänne, P.A., Engelman, J.A., Johnson, B.E., 2005. Epidermal growth factor receptor mutations in non-small-cell lung cancer: implications for treatment and tumor biology. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 23, 3227–3234. doi:10.1200/JCO.2005.09.985
- Janoueix-Lerosey, I., Lequin, D., Brugières, L., Ribeiro, A., de Pontual, L., Combaret, V., Raynal, V., Puisieux, A., Schleiermacher, G., Pierron, G., Valteau-Couanet, D., Frebourg, T., Michon, J., Lyonnet, S., Amiel, J., Delattre, O., 2008. Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma. *Nature* 455, 967–970. doi:10.1038/nature07398
- Johnston, D., Hatzis, D., Sunday, M.E., 1998. Expression of v-Ha-ras driven by the calcitonin/calcitonin gene-related peptide promoter: a novel transgenic murine model for medullary thyroid carcinoma. *Oncogene* 16, 167–177. doi:10.1038/sj.onc.1201478
- Jonas, V., Lin, C.R., Kawashima, E., Semon, D., Swanson, L.W., Mermod, J.J., Evans, R.M., Rosenfeld, M.G., 1985. Alternative RNA processing events in human calcitonin/calcitonin gene-related peptide gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 1994–1998.
- Ju, Y.S., Lee, W.-C., Shin, J.-Y., Lee, S., Bleazard, T., Won, J.-K., Kim, Y.T., Kim, J.-I., Kang, J.-H., Seo, J.-S., 2012. A transforming KIF5B and RET gene fusion in lung adenocarcinoma revealed from whole-genome and transcriptome sequencing. *Genome Res.* 22, 436–445. doi:10.1101/gr.133645.111
- Kahlert, C., Kalluri, R., 2013. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 91, 431–437. doi:10.1007/s00109-013-1020-6
- Kaiser, J., 2013. The downside of diversity. *Science* 339, 1543–1545. doi:10.1126/science.339.6127.1543
- Kameda, Y., 1991. Immunocytochemical localization and development of multiple kinds of neuropeptides and neuroendocrine proteins in the chick ultimobranchial gland. *J. Comp. Neurol.* 304, 373–386. doi:10.1002/cne.903040304
- Kameda, Y., Ito, M., Nishimaki, T., Gotoh, N., 2009. FRS2alpha is required for the separation, migration, and survival of pharyngeal-endoderm derived organs including thyroid, ultimobranchial body, parathyroid, and thymus. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 238, 503–513. doi:10.1002/dvdy.21867
- Kameda, Y., Nishimaki, T., Chisaka, O., Iseki, S., Sucov, H.M., 2007a. Expression of the epithelial marker E-cadherin by thyroid C cells and their precursors during murine development. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 55, 1075–1088. doi:10.1369/jhc.7A7179.2007
- Kameda, Y., Nishimaki, T., Miura, M., Jiang, S.-X., Guillemot, F., 2007b. Mash1 regulates the development of C cells in mouse thyroid glands. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 236, 262–270. doi:10.1002/dvdy.21018
- Kameda, Y., Saitoh, T., Nemoto, N., Katoh, T., Iseki, S., Fujimura, T., 2013. Hes1 is required for the development of pharyngeal organs and survival of neural crest-derived mesenchymal cells in pharyngeal arches. *Cell Tissue Res.* 353, 9–25. doi:10.1007/s00441-013-1649-z
- Kan, Z., Jaiswal, B.S., Stinson, J., Janakiraman, V., Bhatt, D., Stern, H.M., Yue, P., Haverly, P.M., Bourgon, R., Zheng, J., Moorhead, M., Chaudhuri, S., Tomsho, L.P., Peters, B.A., Pujara, K., Cordes, S., Davis, D.P., Carlton, V.E.H., Yuan, W., Li, L., Wang, W., Eigenbrot, C., Kaminker, J.S., Eberhard, D.A., Waring, P., Schuster, S.C., Modrusan, Z., Zhang, Z., Stokoe, D., de Sauvage, F.J., Faham, M., Seshagiri, S., 2010. Diverse somatic

- mutation patterns and pathway alterations in human cancers. *Nature* 466, 869–873. doi:10.1038/nature09208
- Kandoth, C., McLellan, M.D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., Lu, C., Xie, M., Zhang, Q., McMichael, J.F., Wyczalkowski, M.A., Leiserson, M.D.M., Miller, C.A., Welch, J.S., Walter, M.J., Wendl, M.C., Ley, T.J., Wilson, R.K., Raphael, B.J., Ding, L., 2013. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* 502, 333–339. doi:10.1038/nature12634
- Karanikas, G., Moameni, A., Poetzi, C., Zettinig, G., Kaserer, K., Bieglmayer, C., Niederle, B., Dudczak, R., Pirich, C., 2004. Frequency and relevance of elevated calcitonin levels in patients with neoplastic and nonneoplastic thyroid disease and in healthy subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 515–519. doi:10.1210/jc.2003-030709
- Karapetis, C.S., Khambata-Ford, S., Jonker, D.J., O'Callaghan, C.J., Tu, D., Tebbutt, N.C., Simes, R.J., Chalchal, H., Shapiro, J.D., Robitaille, S., Price, T.J., Shepherd, L., Au, H.-J., Langer, C., Moore, M.J., Zalcborg, J.R., 2008. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 359, 1757–1765. doi:10.1056/NEJMoa0804385
- Karlsson, T., Kullander, K., Welsh, M., 1998. The Src homology 2 domain protein Shb transmits basic fibroblast growth factor- and nerve growth factor-dependent differentiation signals in PC12 cells. *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 9, 757–766.
- Kaserer, K., Scheuba, C., Neuhold, N., Weinhäusel, A., Haas, O.A., Vierhapper, H., Niederle, B., 2001. Sporadic versus familial medullary thyroid microcarcinoma: a histopathologic study of 50 consecutive patients. *Am. J. Surg. Pathol.* 25, 1245–1251.
- Kaserer, K., Scheuba, C., Neuhold, N., Weinhäusel, A., Vierhapper, H., Haas, O.A., Niederle, B., 1998. C-cell hyperplasia and medullary thyroid carcinoma in patients routinely screened for serum calcitonin. *Am. J. Surg. Pathol.* 22, 722–728.
- Kedzia, C., Lacroix, L., Ameer, N., Ragot, T., Kelly, P.A., Caillou, B., Binart, N., 2005. Medullary thyroid carcinoma arises in the absence of prolactin signaling. *Cancer Res.* 65, 8497–8503. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3937
- Kent, O.A., Chivukula, R.R., Mullendore, M., Wentzel, E.A., Feldmann, G., Lee, K.H., Liu, S., Leach, S.D., Maitra, A., Mendell, J.T., 2010. Repression of the miR-143/145 cluster by oncogenic Ras initiates a tumor-promoting feed-forward pathway. *Genes Dev.* 24, 2754–2759. doi:10.1101/gad.1950610
- Khosla, S., Patel, V.M., Hay, I.D., Schaid, D.J., Grant, C.S., van Heerden, J.A., Thibodeau, S.N., 1991. Loss of heterozygosity suggests multiple genetic alterations in pheochromocytomas and medullary thyroid carcinomas. *J. Clin. Invest.* 87, 1691–1699. doi:10.1172/JCI115186
- Kilfoy, B.A., Zheng, T., Holford, T.R., Han, X., Ward, M.H., Sjoedin, A., Zhang, Y., Bai, Y., Zhu, C., Guo, G.L., Rothman, N., Zhang, Y., 2009. International patterns and trends in thyroid cancer incidence, 1973–2002. *Cancer Causes Control CCC* 20, 525–531. doi:10.1007/s10552-008-9260-4
- Kim, Y.-K., Kim, V.N., 2007. Processing of intronic microRNAs. *EMBO J.* 26, 775–783. doi:10.1038/sj.emboj.7601512
- Kinbara, K., Goldfinger, L.E., Hansen, M., Chou, F.-L., Ginsberg, M.H., 2003. Ras GTPases: integrins' friends or foes? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 767–776. doi:10.1038/nrm1229
- Kiriakidou, M., Tan, G.S., Lamprinak, S., De Planell-Saguer, M., Nelson, P.T., Mourelatos, Z., 2007. An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell* 129, 1141–1151. doi:10.1016/j.cell.2007.05.016
- Kiss, T., 2002. Small nucleolar RNAs: an abundant group of noncoding RNAs with diverse cellular functions. *Cell* 109, 145–148.
- Kloos, R.T., Eng, C., Evans, D.B., Francis, G.L., Gagel, R.F., Gharib, H., Moley, J.F., Pacini, F., Ringel, M.D., Schlumberger, M., Wells, S.A., 2009. Medullary Thyroid Cancer: Management Guidelines of the American Thyroid Association. *Thyroid* 19, 565–612. doi:10.1089/thy.2008.0403
- Knowles, P.P., Murray-Rust, J., Kjaer, S., Scott, R.P., Hanrahan, S., Santoro, M., Ibáñez, C.F., McDonald, N.Q., 2006. Structure and chemical inhibition of the RET tyrosine kinase domain. *J. Biol. Chem.* 281, 33577–33587. doi:10.1074/jbc.M605604200
- Knudson, A.G., 1971. Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 68, 820–823.
- Koch, C.A., Brouwers, F.M., Vortmeyer, A.O., Tannapfel, A., Libutti, S.K., Zhuang, Z., Pacak, K., Neumann, H.P.H., Paschke, R., 2006. Somatic VHL gene alterations in MEN2-associated medullary thyroid carcinoma. *BMC Cancer* 6, 131. doi:10.1186/1471-2407-6-131
- Koch, C.A., Huang, S.C., Moley, J.F., Azumi, N., Chrousos, G.P., Gagel, R.F., Zhuang, Z., Pacak, K., Vortmeyer, A.O., 2001. Allelic imbalance of the mutant and wild-type RET allele in MEN 2A-associated medullary thyroid carcinoma. *Oncogene* 20, 7809–7811. doi:10.1038/sj.onc.1204991
- Kohno, T., Ichikawa, H., Totoki, Y., Yasuda, K., Hiramoto, M., Nammo, T., Sakamoto, H., Tsuta, K., Furuta, K., Shimada, Y., Iwakawa, R., Ogiwara, H., Oike, T., Enari, M., Schetter, A.J., Okayama, H., Haugen, A., Skaug, V., Chiku, S., Yamanaka, I., Arai, Y., Watanabe, S.-I., Sekine, I., Ogawa, S., Harris, C.C., Tsuda, H., Yoshida, T., Yokota, J., Shibata, T., 2012. KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. *Nat. Med.* 18, 375–377. doi:10.1038/nm.2644
- Komminoth, P., Muletta-Feurer, S., Saremaslani, P., Kunz, E.K., Matias-Guiu, X., Hiort, O., Schroder, S., Seelentag, W.K.F., Roth, J., Heitz, P.U., 1995. Molecular Diagnosis of Multiple Endocrine Neoplasia (MEN) in Paraffin-Embedded Specimens. *Endocr. Pathol.* 6, 267–278.

- Koyama, H., Zhuang, T., Light, J.E., Kolla, V., Higashi, M., McGrady, P.W., London, W.B., Brodeur, G.M., 2012. Mechanisms of CHD5 Inactivation in neuroblastomas. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 18, 1588–1597. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-2644
- Krontiris, T.G., Cooper, G.M., 1981. Transforming activity of human tumor DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 1181–1184.
- Kruger, K., Grabowski, P.J., Zaug, A.J., Sands, J., Gottschling, D.E., Cech, T.R., 1982. Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell* 31, 147–157.
- Kubo, K., Yoshimoto, K., Yokogoshi, Y., Tsuyuguchi, M., Saito, S., 1991. Loss of heterozygosity on chromosome 1p in thyroid adenoma and medullary carcinoma, but not in papillary carcinoma. *Jpn. J. Cancer Res. Gann* 82, 1097–1103.
- Kucerova, L., Feketeova, L., Kozovska, Z., Poturnajova, M., Matuskova, M., Nencka, R., Babal, P., 2013. In Vivo 5FU-Exposed Human Medullary Thyroid Carcinoma Cells Contain a Chemoresistant CD133+ Tumor-Initiating Cell Subset. *Thyroid Off. J. Am. Thyroid Assoc.* doi:10.1089/thy.2013.0277
- Kurokawa, K., Kawai, K., Hashimoto, M., Ito, Y., Takahashi, M., 2003. Cell signalling and gene expression mediated by RET tyrosine kinase. *J. Intern. Med.* 253, 627–633.
- Kurzrock, R., Sherman, S.I., Ball, D.W., Forastiere, A.A., Cohen, R.B., Mehra, R., Pfister, D.G., Cohen, E.E.W., Janisch, L., Nauling, F., Hong, D.S., Ng, C.S., Ye, L., Gagel, R.F., Frye, J., Müller, T., Ratain, M.J., Salgia, R., 2011. Activity of XL184 (Cabozantinib), an oral tyrosine kinase inhibitor, in patients with medullary thyroid cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 29, 2660–2666. doi:10.1200/JCO.2010.32.4145
- Kusakabe, T., Hoshi, N., Kimura, S., 2006. Origin of the ultimobranchial body cyst: T/ebp/Nkx2.1 expression is required for development and fusion of the ultimobranchial body to the thyroid. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 235, 1300–1309. doi:10.1002/dvdy.20655
- Küstners-Vandeveld, H.V.N., Klaasen, A., Küsters, B., Groenen, P.J.T.A., van Engen-van Grunsven, I.A.C.H., van Dijk, M.R.C.F., Reifemberger, G., Wesseling, P., Blokk, W.A.M., 2010. Activating mutations of the GNAQ gene: a frequent event in primary melanocytic neoplasms of the central nervous system. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 119, 317–323. doi:10.1007/s00401-009-0611-3
- Landgraf, P., Rusu, M., Sheridan, R., Sewer, A., Iovino, N., Aravin, A., Pfeffer, S., Rice, A., Kamphorst, A.O., Landthaler, M., Lin, C., Socci, N.D., Hermida, L., Fulci, V., Chiaretti, S., Foà, R., Schliwka, J., Fuchs, U., Novosel, A., Müller, R.-U., Schermer, B., Bissels, U., Inman, J., Phan, Q., Chien, M., Weir, D.B., Choksi, R., De Vita, G., Frezzetti, D., Trompeter, H.-I., Hornung, V., Teng, G., Hartmann, G., Palkovits, M., Di Lauro, R., Wernet, P., Macino, G., Rogler, C.E., Nagle, J.W., Ju, J., Papavasiliou, F.N., Benzing, T., Lichter, P., Tam, W., Brownstein, M.J., Bosio, A., Borkhardt, A., Russo, J.J., Sander, C., Zavolan, M., Tuschl, T., 2007. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* 129, 1401–1414. doi:10.1016/j.cell.2007.04.040
- Langmuir, P.B., Yver, A., 2012. Vandetanib for the treatment of thyroid cancer. *Clin. Pharmacol. Ther.* 91, 71–80. doi:10.1038/clpt.2011.272
- Lau, K.S., Haigis, K.M., 2009. Non-redundancy within the RAS oncogene family: insights into mutational disparities in cancer. *Mol. Cells* 28, 315–320. doi:10.1007/s10059-009-0143-7
- Laure Giraudet, A., Al Ghulzan, A., Aupérin, A., Leboulleux, S., Chehboun, A., Troalen, F., Dromain, C., Lumbroso, J., Baudin, E., Schlumberger, M., 2008. Progression of medullary thyroid carcinoma: assessment with calcitonin and carcinoembryonic antigen doubling times. *Eur. J. Endocrinol. Eur. Fed. Endocr. Soc.* 158, 239–246. doi:10.1530/EJE-07-0667
- Lawrence, M.S., Stojanov, P., Mermel, C.H., Robinson, J.T., Garraway, L.A., Golub, T.R., Meyerson, M., Gabriel, S.B., Lander, E.S., Getz, G., 2014. Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature* 505, 495–501. doi:10.1038/nature12912
- Lawrence, M.S., Stojanov, P., Polak, P., Kryukov, G.V., Cibulskis, K., Sivachenko, A., Carter, S.L., Stewart, C., Mermel, C.H., Roberts, S.A., Kiezun, A., Hammerman, P.S., McKenna, A., Drier, Y., Zou, L., Ramos, A.H., Pugh, T.J., Stransky, N., Helman, E., Kim, J., Sougnez, C., Ambrogio, L., Nickerson, E., Shefler, E., Cortés, M.L., Auclair, D., Saksena, G., Voet, D., Noble, M., DiCara, D., Lin, P., Lichtenstein, L., Heiman, D.I., Fennell, T., Imielinski, M., Hernandez, B., Hodis, E., Baca, S., Dulak, A.M., Lohr, J., Landau, D.-A., Wu, C.J., Melendez-Zajgla, J., Hidalgo-Miranda, A., Koren, A., McCarroll, S.A., Mora, J., Lee, R.S., Crompton, B., Onofrio, R., Parkin, M., Winckler, W., Ardlie, K., Gabriel, S.B., Roberts, C.W.M., Biegel, J.A., Stegmaier, K., Bass, A.J., Garraway, L.A., Meyerson, M., Golub, T.R., Gordenin, D.A., Sunyaev, S., Lander, E.S., Getz, G., 2013. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature* 499, 214–218. doi:10.1038/nature12213
- Le Coniat, M., Vecchione, D., Pacot, A., Bernheim, A., Berger, R., Gardet, P., Parmentier, C., 1987. Cytogenetic studies on patients with medullary carcinoma of the thyroid. *Cancer Genet. Cytogenet.* 25, 303–307.
- Leboulleux, S., Baudin, E., Travagli, J.-P., Schlumberger, M., 2004. Medullary thyroid carcinoma. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 61, 299–310. doi:10.1111/j.1365-2265.2004.02037.x
- Leclère, J., Orgiazzi, J., Rousset, B., Schlienger, J.-L., 2001. La thyroïde: des concepts à la pratique clinique, 2ème édition. ed. Elsevier Masson.
- Lee, R.C., Ambros, V., 2001. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 862–864. doi:10.1126/science.1065329
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., Ambros, V., 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843–854.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S.H., Kim, V.N., 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 23, 4051–4060. doi:10.1038/sj.emboj.7600385

- Lee, Y.-Y., Do, I.-G., Park, Y.A., Choi, J.-J., Song, S.Y., Kim, C.J., Kim, M.K., Song, T.J., Park, H.S., Choi, C.H., Kim, T.-J., Kim, B.-G., Lee, J.-W., Bae, D.-S., 2010. Low dynamin 2 expression is associated with tumor invasion and metastasis in invasive squamous cell carcinoma of cervix. *Cancer Biol. Ther.* 10, 329–335. doi:10.4161/cbt.10.4.12275
- Leong, S.S., Horoszewicz, J.S., Shimaoka, K., Friedman, M., Kawinski, E., Song, M., Zeigel, R., Chu, T., Baylin, S., Mirand, E., 1981. A new cell line for study of human medullary carcinoma., in: *Advances in Thyroid Neoplasia*. Roma, pp. 95–108.
- Lesueur, F., Cebrian, A., Cranston, A., Leyland, J., Faïd, T.M., Clements, M.R., Robledo, M., Whittaker, J., Ponder, B.A.J., 2005. Germline homozygous mutations at codon 804 in the RET protooncogene in medullary thyroid carcinoma/multiple endocrine neoplasia type 2A patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 3454–3457. doi:10.1210/jc.2004-1622
- Leung, A.K.L., Calabrese, J.M., Sharp, P.A., 2006. Quantitative analysis of Argonaute protein reveals microRNA-dependent localization to stress granules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 18125–18130. doi:10.1073/pnas.0608845103
- Lewis, B.P., Burge, C.B., Bartel, D.P., 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120, 15–20. doi:10.1016/j.cell.2004.12.035
- Li, Y., Guessous, F., Zhang, Y., Dipierro, C., Kefas, B., Johnson, E., Marcinkiewicz, L., Jiang, J., Yang, Y., Schmittgen, T.D., Lopes, B., Schiff, D., Purow, B., Abounader, R., 2009. MicroRNA-34a inhibits glioblastoma growth by targeting multiple oncogenes. *Cancer Res.* 69, 7569–7576. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-0529
- Liang, L., He, X., 2011. Macro-management of microRNAs in cell cycle progression of tumor cells and its implications in anti-cancer therapy. *Acta Pharmacol. Sin.* 32, 1311–1320. doi:10.1038/aps.2011.103
- Lin, H., Chen, M.-C., Chiu, C.-Y., Song, Y.-M., Lin, S.-Y., 2007. Cdk5 regulates STAT3 activation and cell proliferation in medullary thyroid carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 282, 2776–2784. doi:10.1074/jbc.M607234200
- Lipson, D., Capelletti, M., Yelensky, R., Otto, G., Parker, A., Jarosz, M., Curran, J.A., Balasubramanian, S., Bloom, T., Brennan, K.W., Donahue, A., Downing, S.R., Frampton, G.M., Garcia, L., Juhn, F., Mitchell, K.C., White, E., White, J., Zwirko, Z., Peretz, T., Nechushtan, H., Soussan-Gutman, L., Kim, J., Sasaki, H., Kim, H.R., Park, S., Ercan, D., Sheehan, C.E., Ross, J.S., Cronin, M.T., Jänne, P.A., Stephens, P.J., 2012. Identification of new ALK and RET gene fusions from colorectal and lung cancer biopsies. *Nat. Med.* 18, 382–384. doi:10.1038/nm.2673
- Liu, K., Russo, A.F., Hsiung, S., Adlersberg, M., Franke, T.F., Gershon, M.D., Tamir, H., 2003. Calcium receptor-induced serotonin secretion by parafollicular cells: role of phosphatidylinositol 3-kinase-dependent signal transduction pathways. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 2049–2057.
- Lombardo, F., Baudin, E., Chieffari, E., Arturi, F., Bardet, S., Caillou, B., Conte, C., Dallapiccola, B., Giuffrida, D., Bidart, J.-M., Schlumberger, M., Filetti, S., 2002. Familial medullary thyroid carcinoma: clinical variability and low aggressiveness associated with RET mutation at codon 804. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 1674–1680.
- Luo, Y., Ceccherini, I., Pasini, B., Matera, I., Bicocchi, M.P., Barone, V., Bocciardi, R., Kääriäinen, H., Weber, D., Devoto, M., 1993. Close linkage with the RET protooncogene and boundaries of deletion mutations in autosomal dominant Hirschsprung disease. *Hum. Mol. Genet.* 2, 1803–1808.
- Ma, X., Choudhury, S.N., Buscaglia, L.B., Li, Y., 2012. Abstract 205: The three-throng role of miR-21 in cancer. *Cancer Res.* 72, 205–205. doi:10.1158/1538-7445.AM2012-205
- Machens, A., Lorenz, K., Dralle, H., 2013. Progression of Medullary Thyroid Cancer in RET Carriers of ATA Class A and C Mutations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* jc20133343. doi:10.1210/jc.2013-3343
- Majdic, G., Vaillant, C., Pogacnik, A., Bavdek, S.V., 1993. Calcitonin- and somatostatin-positive cells in thyroid gland of pigs at different ages. *Histochemistry* 100, 481–484.
- Majewski, I.J., Bernards, R., 2011. Taming the dragon: genomic biomarkers to individualize the treatment of cancer. *Nat. Med.* 304–312. doi:10.1038/nm.2311
- Manié, S., Santoro, M., Fusco, A., Billaud, M., 2001. The RET receptor: function in development and dysfunction in congenital malformation. *Trends Genet. TIG* 17, 580–589.
- Maroney, P.A., Yu, Y., Fisher, J., Nilsen, T.W., 2006. Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 1102–1107. doi:10.1038/nsmb1174
- Marsh, D.J., Theodosopoulos, G., Martin-Schulte, K., Richardson, A.-L., Philips, J., Röher, H.-D., Delbridge, L., Robinson, B.G., 2003. Genome-wide copy number imbalances identified in familial and sporadic medullary thyroid carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 1866–1872. doi:10.1210/jc.2002-021155
- Marshall, H., Morrison, A., Studer, M., Pöpperl, H., Krumlauf, R., 1996. Retinoids and Hox genes. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 10, 969–978.
- Marusyk, A., Almendro, V., Polyak, K., 2012. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nat. Rev. Cancer* 12, 323–334. doi:10.1038/nrc3261
- Massarelli, E., Varella-Garcia, M., Tang, X., Xavier, A.C., Ozburn, N.C., Liu, D.D., Bekele, B.N., Herbst, R.S., Wistuba, I.I., 2007. KRAS mutation is an important predictor of resistance to therapy with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 13, 2890–2896. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-3043
- Matera, A.G., Terns, R.M., Terns, M.P., 2007. Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 209–220. doi:10.1038/nrm2124
- Mathew, C.G.P., Chin, K.S., Easton, D.F., Thorpe, K., Carter, C., Liou, G.I., Fong, S.-L., Bridges, C.D.B., Haak, H., Kruseman, A.C.N., Schiffer, S., Hansen, H.H., Telenius, H., Telenius-Berg, M., Ponder, B. a. J., 1987. A linked

- genetic marker for multiple endocrine neoplasia type 2A on chromosome 10. *Publ. Online* 06 August 1987 [Doi10.1038/328527a0](#) 328, 527–528. doi:10.1038/328527a0
- Mattick, J.S., 2001. Non-coding RNAs: the architects of eukaryotic complexity. *EMBO Rep.* 2, 986–991. doi:10.1093/embo-reports/kve230
- Mattingly, R.R., 2013. Activated Ras as a Therapeutic Target: Constraints on Directly Targeting Ras Isoforms and Wild-Type versus Mutated Proteins. *ISRN Oncol.* 2013, 536529. doi:10.1155/2013/536529
- McCarthy, B.J., Aronson, A.I., 1961. The Kinetics of the Synthesis of Ribosomal RNA in *E. coli*. *Biophys. J.* 1, 227.
- McFarland, C.D., Korolev, K.S., Kryukov, G.V., Sunyaev, S.R., Mirny, L.A., 2013. Impact of deleterious passenger mutations on cancer progression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 2910–2915. doi:10.1073/pnas.1213968110
- Medina-Franco, H., Herrera, M.F., López, G., Tielve-Campillo, M., Sierra, M., Lozano-Salazar, R.R., González, O., 2001. Persistent hypercalcitoninemia in patients with medullary thyroid cancer: a therapeutic approach based on selective venous sampling for calcitonin. *Rev. Investig. Clínica Organo Hosp. Enfermedades Nutr.* 53, 212–217.
- Meijer, J.A.A., le Cessie, S., van den Hout, W.B., Kievit, J., Schoones, J.W., Romijn, J.A., Smit, J.W.A., 2010. Calcitonin and carcinoembryonic antigen doubling times as prognostic factors in medullary thyroid carcinoma: a structured meta-analysis. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 72, 534–542. doi:10.1111/j.1365-2265.2009.03666.x
- Meister, G., 2013. Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nat. Rev. Genet.* 14, 447–459. doi:10.1038/nrg3462
- Mian, C., Pennelli, G., Fassan, M., Balistreri, M., Barollo, S., Cavedon, E., Galuppini, F., Pizzi, M., Vianello, F., Pelizzo, M.R., Girelli, M.E., Rugge, M., Opocher, G., 2012. MicroRNA profiles in familial and sporadic medullary thyroid carcinoma: preliminary relationships with RET status and outcome. *Thyroid Off. J. Am. Thyroid Assoc.* 22, 890–896. doi:10.1089/thy.2012.0045
- Michiels, F.M., Chappuis, S., Caillou, B., Pasini, A., Talbot, M., Monier, R., Lenoir, G.M., Feunteun, J., Billaud, M., 1997. Development of medullary thyroid carcinoma in transgenic mice expressing the RET protooncogene altered by a multiple endocrine neoplasia type 2A mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 3330–3335.
- Mitchell, P.S., Parkin, R.K., Kroh, E.M., Fritz, B.R., Wyman, S.K., Pogosova-Agadjanyan, E.L., Peterson, A., Noteboom, J., O'Brian, K.C., Allen, A., Lin, D.W., Urban, N., Drescher, C.W., Knudsen, B.S., Stirewalt, D.L., Gentleman, R., Vessella, R.L., Nelson, P.S., Martin, D.B., Tewari, M., 2008. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 10513–10518. doi:10.1073/pnas.0804549105
- Mitsudomi, T., Suda, K., Yatabe, Y., 2013. Surgery for NSCLC in the era of personalized medicine. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 10, 235–244. doi:10.1038/nrclinonc.2013.22
- Mittelbrunn, M., Gutiérrez-Vázquez, C., Villarroya-Beltrí, C., González, S., Sánchez-Cabo, F., González, M.Á., Bernad, A., Sánchez-Madrid, F., 2011. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat. Commun.* 2, 282. doi:10.1038/ncomms1285
- Miyauchi, A., Onishi, T., Morimoto, S., Takai, S., Matsuzuka, F., Kuma, K., Maeda, M., Kumahara, Y., 1984. Relation of doubling time of plasma calcitonin levels to prognosis and recurrence of medullary thyroid carcinoma. *Ann. Surg.* 199, 461–466.
- Modigliani, E., Cohen, R., Campos, J.M., Conte-Devolx, B., Maes, B., Boneu, A., Schlumberger, M., Bigorgne, J.C., Dumontier, P., Leclerc, L., Corcuff, B., Guilhem, I., 1998. Prognostic factors for survival and for biochemical cure in medullary thyroid carcinoma: results in 899 patients. The GETC Study Group. Groupe d'étude des tumeurs à calcitonine. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 48, 265–273.
- Moley, J.F., Brother, M.B., Fong, C.T., White, P.S., Baylin, S.B., Nelkin, B., Wells, S.A., Brodeur, G.M., 1992. Consistent association of 1p loss of heterozygosity with pheochromocytomas from patients with multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes. *Cancer Res.* 52, 770–774.
- Moley, J.F., DeBenedetti, M.K., 1999. Patterns of nodal metastases in palpable medullary thyroid carcinoma: recommendations for extent of node dissection. *Ann. Surg.* 229, 880–887; discussion 887–888.
- Mologni, L., Sala, E., Cazzaniga, S., Rostagno, R., Kuoni, T., Puttini, M., Bain, J., Cleris, L., Redaelli, S., Riva, B., Formelli, F., Scapozza, L., Gambacorti-Passerini, C., 2006. Inhibition of RET tyrosine kinase by SU5416. *J. Mol. Endocrinol.* 37, 199–212. doi:10.1677/jme.1.01999
- Montecalvo, A., Larregina, A.T., Shufesky, W.J., Stolz, D.B., Sullivan, M.L.G., Karlsson, J.M., Baty, C.J., Gibson, G.A., Erdos, G., Wang, Z., Milosevic, J., Tkacheva, O.A., Divito, S.J., Jordan, R., Lyons-Weiler, J., Watkins, S.C., Morelli, A.E., 2012. Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood* 119, 756–766. doi:10.1182/blood-2011-02-338004
- Moura, M.M., Cavaco, B.M., Pinto, A.E., Leite, V., 2011. High prevalence of RAS mutations in RET-negative sporadic medullary thyroid carcinomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96, E863–868. doi:10.1210/jc.2010-1921
- Mukherjee, S., Zakalik, D., 2011. RET codon 804 mutations in multiple endocrine neoplasia 2: genotype-phenotype correlations and implications in clinical management. *Clin. Genet.* 79, 1–16. doi:10.1111/j.1399-0004.2010.01453.x
- Mulligan, L.M., 2014. RET revisited: expanding the oncogenic portfolio. *Nat. Rev. Cancer* 14, 173–186. doi:10.1038/nrc3680
- Mulligan, L.M., Gardner, E., Smith, B.A., Mathew, C.G., Ponder, B.A., 1993a. Genetic events in tumour initiation and progression in multiple endocrine neoplasia type 2. *Genes. Chromosomes Cancer* 6, 166–177.

- Mulligan, L.M., Kwok, J.B., Healey, C.S., Elsdon, M.J., Eng, C., Gardner, E., Love, D.R., Mole, S.E., Moore, J.K., Papi, L., 1993b. Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature* 363, 458–460. doi:10.1038/363458a0
- Myers, S.M., Eng, C., Ponder, B.A., Mulligan, L.M., 1995. Characterization of RET proto-oncogene 3' splicing variants and polyadenylation sites: a novel C-terminus for RET. *Oncogene* 11, 2039–2045.
- Nakahata, Y., Sahar, S., Astarita, G., Kaluzova, M., Sassone-Corsi, P., 2009. Circadian control of the NAD⁺ salvage pathway by CLOCK-SIRT1. *Science* 324, 654–657. doi:10.1126/science.1170803
- Namba, H., Rubin, S.A., Fagin, J.A., 1990. Point mutations of ras oncogenes are an early event in thyroid tumorigenesis. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 4, 1474–1479.
- Naot, D., Cornish, J., 2008. The role of peptides and receptors of the calcitonin family in the regulation of bone metabolism. *Bone* 43, 813–818. doi:10.1016/j.bone.2008.07.003
- Narayan, G., Scotto, L., Neelakantan, V., Kottloor, S.H., Wong, A.H.Y., Loke, S.-L., Mansukhani, M., Pothuri, B., Wright, J.D., Kaufmann, A.M., Schneider, A., Arias-Pulido, H., Tao, Q., Murty, V.V., 2009. Protocadherin PCDH10, involved in tumor progression, is a frequent and early target of promoter hypermethylation in cervical cancer. *Genes. Chromosomes Cancer* 48, 983–992. doi:10.1002/gcc.20703
- Nelms, B.L., Labosky, P.A., 2010. Hox Genes [WWW Document]. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53149/> (accessed 1.8.14).
- Niccoli, P., Wion-Barbot, N., Caron, P., Henry, J.F., de Micco, C., Saint Andre, J.P., Bigorgne, J.C., Modigliani, E., Conte-Devolx, B., 1997. Interest of routine measurement of serum calcitonin: study in a large series of thyroidectomized patients. The French Medullary Study Group. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 338–341. doi:10.1210/jcem.82.2.3737
- Nikiforov, Y.E., 2002. RET/PTC rearrangement in thyroid tumors. *Endocr. Pathol.* 13, 3–16.
- Nikiforov, Y.E., Biddinger, P.W., Thompson, L.D.R., 2012. Diagnostic Pathology and Molecular Genetics of the Thyroid: A Comprehensive Guide for Practicing Thyroid Pathology. Lippincott Williams & Wilkins.
- Nikiforov, Y.E., Nikiforova, M.N., 2011. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. *Nat. Rev. Endocrinol.* 7, 569–580. doi:10.1038/nrendo.2011.142
- Nikiforova, M.N., Tseng, G.C., Steward, D., Diorio, D., Nikiforov, Y.E., 2008. MicroRNA Expression Profiling of Thyroid Tumors: Biological Significance and Diagnostic Utility. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93, 1600–1608. doi:10.1210/jc.2007-2696
- Nishiyama, I., Ogiso, M., Oota, T., Kimura, T., Seki, T., 1996. Developmental change in expression of highly polysialylated neural cell adhesion molecule in C-cells in rat thyroid gland. *Anat. Embryol. (Berl.)* 194, 419–426.
- Nocera, M., Baudin, E., Pellegriti, G., Cailleux, A.F., Mechelany-Corone, C., Schlumberger, M., 2000. Treatment of advanced medullary thyroid cancer with an alternating combination of doxorubicin-streptozocin and 5 FU-dacarbazine. Groupe d'Etude des Tumeurs à Calcitonine (GETC). *Br. J. Cancer* 83, 715–718. doi:10.1054/bjoc.2000.1314
- Nordling, C.O., 1953. A New Theory on the Cancer-inducing Mechanism. *Br. J. Cancer* 7, 68.
- Nozaki, C., Asai, N., Murakami, H., Iwashita, T., Iwata, Y., Horibe, K., Klein, R.D., Rosenthal, A., Takahashi, M., 1998. Calcium-dependent Ret activation by GDNF and neurturin. *Oncogene* 16, 293–299. doi:10.1038/sj.onc.1201548
- Nussey, S., Whitehead, S., 2001. The parathyroid glands and vitamin D [WWW Document]. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK24/> (accessed 1.6.14).
- Oberhoffer, M., Vogelsang, H., Jäger, L., Reinhart, K., 1999. Katalcalcin and calcitonin immunoreactivity in different types of leukocytes indicate intracellular procalcitonin content. *J. Crit. Care* 14, 29–33.
- Ohno, S., 1972. So much "junk" DNA in our genome. *Brookhaven Symp. Biol.* 23, 366–370.
- Okamura, K., Ishizuka, A., Siomi, H., Siomi, M.C., 2004. Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. *Genes Dev.* 18, 1655–1666. doi:10.1101/gad.1210204
- Orlandi, F., Caraci, P., Berruti, A., Puligheddu, B., Pivano, G., Dogliotti, L., Angeli, A., 1994. Chemotherapy with dacarbazine and 5-fluorouracil in advanced medullary thyroid cancer. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* 5, 763–765.
- Ostrem, J.M., Peters, U., Sos, M.L., Wells, J.A., Shokat, K.M., 2013. K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions. *Nature* 503, 548–551. doi:10.1038/nature12796
- Ouyang, L., Liu, P., Yang, S., Ye, S., Xu, W., Liu, X., 2013. A three-plasma miRNA signature serves as novel biomarkers for osteosarcoma. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* 30, 340. doi:10.1007/s12032-012-0340-7
- Pacini, F., Castagna, M.G., Cipri, C., Schlumberger, M., 2010. Medullary thyroid carcinoma. *Clin. Oncol. R. Coll. Radiol. G. B.* 22, 475–485. doi:10.1016/j.clon.2010.05.002
- Parada, L.F., Tabin, C.J., Shih, C., Weinberg, R.A., 1982. Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. *Nature* 297, 474–478.
- Parsons, D.W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J.C.-H., Leary, R.J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I.-M., Gallia, G.L., Olivi, A., McLendon, R., Rasheed, B.A., Keir, S., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Busam, D.A., Tekleab, H., Diaz, L.A., Jr, Hartigan, J., Smith, D.R., Strausberg, R.L., Marie, S.K.N., Shinjo, S.M.O., Yan, H., Riggins, G.J., Bigner, D.D., Karchin, R., Papadopoulos, N., Parmigiani, G., Vogelstein, B., Velculescu, V.E., Kinzler, K.W., 2008. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 321, 1807–1812. doi:10.1126/science.1164382

- Pasini, B., Hofstra, R.M., Yin, L., Boccardi, R., Santamaria, G., Grootsholten, P.M., Ceccherini, I., Patrone, G., Priolo, M., Buys, C.H., 1995. The physical map of the human RET proto-oncogene. *Oncogene* 11, 1737–1743.
- Pearse, A.G., 1966. The cytochemistry of the thyroid C cells and their relationship to calcitonin. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B Contain. Pap. Biol. Character R. Soc. G. B.* 164, 478–487.
- Pearse, A.G., 1969. The calcitonin secreting C cells and their relationship to the APUD cell series. *J. Endocrinol.* 45, Suppl:13–14.
- Pearse, A.G., Carvalheira, A.F., 1967. Cytochemical evidence for an ultimobranchial origin of rodent thyroid C cells. *Nature* 214, 929–930.
- Pegtél, D.M., Cosmopoulos, K., Thorley-Lawson, D.A., van Eijndhoven, M.A.J., Hopmans, E.S., Lindenberg, J.L., de Grujil, T.D., Würdinger, T., Middeldorp, J.M., 2010. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 6328–6333. doi:10.1073/pnas.0914843107
- Pellegriti, G., Leboulleux, S., Baudin, E., Bellon, N., Scollo, C., Travagli, J.P., Schlumberger, M., 2003. Long-term outcome of medullary thyroid carcinoma in patients with normal postoperative medical imaging. *Br. J. Cancer* 88, 1537–1542. doi:10.1038/sj.bjc.6600930
- Perrinjaquet, M., Vilar, M., Ibáñez, C.F., 2010. Protein-tyrosine phosphatase SHP2 contributes to GDNF neurotrophic activity through direct binding to phospho-Tyr687 in the RET receptor tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 285, 31867–31875. doi:10.1074/jbc.M110.144923
- Perry, A., Fuller, C.E., Banerjee, R., Brat, D.J., Scheithauer, B.W., 2003. Ancillary FISH analysis for 1p and 19q status: preliminary observations in 287 gliomas and oligodendroglioma mimics. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 8, a1–9.
- Perry, A., Molberg, K., Albores-Saavedra, J., 1996. Physiologic versus neoplastic C-cell hyperplasia of the thyroid: separation of distinct histologic and biologic entities. *Cancer* 77, 750–756.
- Peters, H., Neubuser, A., Kratochwil, K., Balling, R., 1998. Pax9-deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities. *Genes Dev.* 12, 2735–2747.
- Pfragner, R., Höfler, H., Behmel, A., Ingolic, E., Walser, V., 1990. Establishment and characterization of continuous cell line MTC-SK derived from a human medullary thyroid carcinoma. *Cancer Res.* 50, 4160–4166.
- Pinto, A., Nôse, V., 2013. Localized amyloid in thyroid: are we missing it? *Adv. Anat. Pathol.* 20, 61–67. doi:10.1097/PAP.0b013e31827b6519
- Plaza-Menacho, I., Burzynski, G.M., de Groot, J.W., Eggen, B.J.L., Hofstra, R.M.W., 2006. Current concepts in RET-related genetics, signaling and therapeutics. *Trends Genet. TIG* 22, 627–636. doi:10.1016/j.tig.2006.09.005
- Plaza-Menacho, I., van der Sluis, T., Hollema, H., Gimm, O., Buys, C.H.C.M., Magee, A.I., Isacke, C.M., Hofstra, R.M.W., Eggen, B.J.L., 2007. Ras/ERK1/2-mediated STAT3 Ser727 phosphorylation by familial medullary thyroid carcinoma-associated RET mutants induces full activation of STAT3 and is required for c-fos promoter activation, cell mitogenicity, and transformation. *J. Biol. Chem.* 282, 6415–6424. doi:10.1074/jbc.M608952200
- Polak, J.M., Pearse, A.G., Le Lièvre, C., Fontaine, J., Le Douarin, N.M., 1974. Immunocytochemical confirmation of the neural crest origin of avian calcitonin-producing cells. *Histochemistry* 40, 209–214.
- Poleev, A., Fickenscher, H., Mundlos, S., Winterpacht, A., Zabel, B., Fidler, A., Gruss, P., Plachov, D., 1992. PAX8, a human paired box gene: isolation and expression in developing thyroid, kidney and Wilms' tumors. *Dev. Camb. Engl.* 116, 611–623.
- Pozo, K., Castro-Rivera, E., Tan, C., Plattner, F., Schwach, G., Siegl, V., Meyer, D., Guo, A., Gundara, J., Mettlach, G., Richer, E., Guevara, J.A., Ning, L., Gupta, A., Hao, G., Tsai, L.-H., Sun, X., Antich, P., Sidhu, S., Robinson, B.G., Chen, H., Nwariaku, F.E., Pfragner, R., Richardson, J.A., Bibb, J.A., 2013. The role of Cdk5 in neuroendocrine thyroid cancer. *Cancer Cell* 24, 499–511. doi:10.1016/j.ccr.2013.08.027
- Prakash, P., Gorfe, A.A., 2013. Lessons from computer simulations of Ras proteins in solution and in membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 5211–5218. doi:10.1016/j.bbagen.2013.07.024
- Prazeres, H., Couto, J.P., Rodrigues, F., Vinagre, J., Torres, J., Trovisco, V., Martins, T.C., Sobrinho-Simões, M., Soares, P., 2011. In vitro transforming potential, intracellular signaling properties, and sensitivity to a kinase inhibitor (sorafenib) of RET proto-oncogene variants Glu511Lys, Ser649Leu, and Arg886Trp. *Endocr. Relat. Cancer* 18, 401–412. doi:10.1530/ERC-10-0258
- Prior, I.A., Lewis, P.D., Mattos, C., 2012. A Comprehensive Survey of Ras Mutations in Cancer. *Cancer Res.* 72, 2457–2467. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-2612
- Pritchard, C.C., Kroh, E., Wood, B., Arroyo, J.D., Dougherty, K.J., Miyaji, M.M., Tait, J.F., Tewari, M., 2012. Blood Cell Origin of Circulating MicroRNAs: A Cautionary Note for Cancer Biomarker Studies. *Cancer Prev. Res. (Phila. Pa.)* 5, 492–497. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-11-0370
- Pylayeva-Gupta, Y., Grabocka, E., Bar-Sagi, D., 2011. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat. Rev. Cancer* 11, 761–774. doi:10.1038/nrc3106
- Raue, F., Zink, A., Scherübl, H., 1992. Regulation of calcitonin secretion and calcitonin gene expression. *Recent Results Cancer Res. Fortschritte Krebsforsch. Prog. Dans Rech. Sur Cancer* 125, 1–18.
- Reddy, E.P., Reynolds, R.K., Santos, E., Barbacid, M., 1982. A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature* 300, 149–152.
- Reiners, C., Biko, J., Haenscheid, H., Hebestreit, H., Kirinjak, S., Baranowski, O., Marlowe, R.J., Demidchik, E., Drozd, V., Demidchik, Y., 2013. Twenty-five years after Chernobyl: outcome of radioiodine treatment in children and adolescents with very high-risk radiation-induced differentiated thyroid carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98, 3039–3048. doi:10.1210/jc.2013-1059

- Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R., Ruvkun, G., 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403, 901–906. doi:10.1038/35002607
- Reis-Filho, J.S., Preto, A., Soares, P., Ricardo, S., Cameselle-Teijeiro, J., Sobrinho-Simões, M., 2003. p63 expression in solid cell nests of the thyroid: further evidence for a stem cell origin. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* 16, 43–48. doi:10.1097/01.MP.0000047306.72278.39
- Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., Weissman, I.L., 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105–111. doi:10.1038/35102167
- Richards, M.L., 2010. Familial syndromes associated with thyroid cancer in the era of personalized medicine. *Thyroid Off. J. Am. Thyroid Assoc.* 20, 707–713. doi:10.1089/thy.2010.1641
- Richardson, D.S., Rodrigues, D.M., Hyndman, B.D., Crupi, M.J.F., Nicolescu, A.C., Mulligan, L.M., 2012. Alternative splicing results in RET isoforms with distinct trafficking properties. *Mol. Biol. Cell* 23, 3838–3850. doi:10.1091/mbc.E12-02-0114
- Rieu, M., Lame, M.C., Richard, A., Lissak, B., Sambort, B., Vuong-Ngoc, P., Berrod, J.L., Fombeur, J.P., 1995. Prevalence of sporadic medullary thyroid carcinoma: the importance of routine measurement of serum calcitonin in the diagnostic evaluation of thyroid nodules. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 42, 453–460.
- Ríos Moreno, M.J., Galera-Ruiz, H., De Miguel, M., López, M.I.C., Illanes, M., Galera-Davidson, H., 2011. Immunohistochemical profile of solid cell nest of thyroid gland. *Endocr. Pathol.* 22, 35–39. doi:10.1007/s12022-010-9145-4
- Ro, S., Park, C., Young, D., Sanders, K.M., Yan, W., 2007. Tissue-dependent paired expression of miRNAs. *Nucleic Acids Res.* 35, 5944–5953. doi:10.1093/nar/gkm641
- Rodríguez-Antona, C., Muñoz-Repeto, I., Inglada-Pérez, L., de Cubas, A.A., Mancikova, V., Cañamero, M., Maliszewska, A., Gómez, A., Letón, R., Leandro-García, L.J., Comino-Méndez, I., Sanchez, L., Alvarez-Escolá, C., Aller, J., Cascón, A., Robledo, M., 2013. Influence of RET mutations on the expression of tyrosine kinases in medullary thyroid carcinoma. *Endocr. Relat. Cancer* 20, 611–619. doi:10.1530/ERC-12-0316
- Rodríguez-Antona, C., Pallares, J., Montero-Conde, C., Inglada-Pérez, L., Castelblanco, E., Landa, I., Leskelä, S., Leandro-García, L.J., López-Jiménez, E., Letón, R., Cascón, A., Lerma, E., Martín, M.C., Carralero, M.C., Mauricio, D., Cigudosa, J.C., Matias-Guiu, X., Robledo, M., 2010. Overexpression and activation of EGFR and VEGFR2 in medullary thyroid carcinomas is related to metastasis. *Endocr. Relat. Cancer* 17, 7–16. doi:10.1677/ERC-08-0304
- Roman, S., Lin, R., Sosa, J.A., 2006. Prognosis of medullary thyroid carcinoma: demographic, clinical, and pathologic predictors of survival in 1252 cases. *Cancer* 107, 2134–2142. doi:10.1002/cncr.22244
- Romeo, G., Ronchetto, P., Luo, Y., Barone, V., Seri, M., Ceccherini, I., Pasini, B., Bocciardi, R., Lerone, M., Kääriäinen, H., 1994. Point mutations affecting the tyrosine kinase domain of the RET proto-oncogene in Hirschsprung's disease. *Nature* 367, 377–378. doi:10.1038/367377a0
- Rooij, E. van, 2011. The Art of MicroRNA Research. *Circ. Res.* 108, 219–234. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.227496
- Rosenfeld, M.G., Amara, S.G., Evans, R.M., 1984. Alternative RNA processing events as a critical developmental regulatory strategy in neuroendocrine gene expression. *Biochem. Soc. Symp.* 49, 27–44.
- Rosenfeld, M.G., Mermoud, J.J., Amara, S.G., Swanson, L.W., Sawchenko, P.E., Rivier, J., Vale, W.W., Evans, R.M., 1983. Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature* 304, 129–135.
- Rowley, J.D., 1973. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243, 290–293.
- Ruggeri, R.M., Santarpia, L., Curtò, L., Torre, M.L., Galatioto, M., Galatioto, S., Trimarchi, F., Cannavò, S., 2008. Non-functioning pituitary adenomas infrequently harbor G-protein gene mutations. *J. Endocrinol. Invest.* 31, 946–949.
- Ryu, I., Park, J.H., An, S., Kwon, O.S., Jang, S.K., 2013. eIF4GI facilitates the MicroRNA-mediated gene silencing. *PLoS One* 8, e55725. doi:10.1371/journal.pone.0055725
- Sachdeva, M., Zhu, S., Wu, F., Wu, H., Walia, V., Kumar, S., Elble, R., Watabe, K., Mo, Y.-Y., 2009. p53 represses c-Myc through induction of the tumor suppressor miR-145. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 3207–3212. doi:10.1073/pnas.0808042106
- Sanfiorenzo, C., Ilie, M.I., Beldad, A., Barlési, F., Mouroux, J., Marquette, C.-H., Brest, P., Hofman, P., 2013. Two panels of plasma microRNAs as non-invasive biomarkers for prediction of recurrence in resectable NSCLC. *PLoS One* 8, e54596. doi:10.1371/journal.pone.0054596
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 5463–5467.
- Santarpia, L., Colín, G.A., Adam, L., Ye, L., Fusco, A., Giunti, S., Thaller, C., Paladini, L., Zhang, X., Jimenez, C., Trimarchi, F., El-Naggar, A.K., Gagel, R.F., 2013. A miRNA signature associated with human metastatic medullary thyroid carcinoma. *Endocr. Relat. Cancer* 20, 809–823. doi:10.1530/ERC-13-0357
- Santoro, M., Carlomagno, F., Melillo, R.M., Billaud, M., Vecchio, G., Fusco, A., 1999. Molecular mechanisms of RET activation in human neoplasia. *J. Endocrinol. Invest.* 22, 811–819.
- Santoro, M., Carlomagno, F., Romano, A., Bottaro, D.P., Dathan, N.A., Grieco, M., Fusco, A., Vecchio, G., Matoskova, B., Kraus, M.H., 1995. Activation of RET as a dominant transforming gene by germline mutations of MEN2A and MEN2B. *Science* 267, 381–383.

- Santoro, M., Rosati, R., Grieco, M., Berlingieri, M.T., D'Amato, G.L., de Franciscis, V., Fusco, A., 1990. The ret proto-oncogene is consistently expressed in human pheochromocytomas and thyroid medullary carcinomas. *Oncogene* 5, 1595–1598.
- Santos, E., Tronick, S.R., Aaronson, S.A., Pulciani, S., Barbacid, M., 1982. T24 human bladder carcinoma oncogene is an activated form of the normal human homologue of BALB- and Harvey-MSV transforming genes. *Nature* 298, 343–347.
- Sapio, M.R., Posca, D., Raggioli, A., Guerra, A., Marotta, V., Deandrea, M., Motta, M., Limone, P.P., Troncone, G., Caleo, A., Rossi, G., Fenzi, G., Vitale, M., 2007. Detection of RET/PTC, TRK and BRAF mutations in preoperative diagnosis of thyroid nodules with indeterminate cytological findings. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 66, 678–683. doi:10.1111/j.1365-2265.2007.02800.x
- Sariola, H., Saarma, M., 2003. Novel functions and signalling pathways for GDNF. *J. Cell Sci.* 116, 3855–3862. doi:10.1242/jcs.00786
- Sawicki, B., 1995. Evaluation of the role of mammalian thyroid parafollicular cells. *Acta Histochem.* 97, 389–399. doi:10.1016/S0065-1281(11)80064-4
- Scappaticci, S., Arrigoni, G., Capra, E., Maraschio, P., Fraccaro, M., 1992. Cytogenetics of multiple endocrine neoplasia syndromes. I. Two different, unique clonal chromosome changes in a medullary thyroid carcinoma and in a C-cell thyroid hyperplasia. *Cancer Genet. Cytogenet.* 59, 51–53.
- Scheffzek, K., Ahmadian, M.R., Kabsch, W., Wiesmüller, L., Lautwein, A., Schmitz, F., Wittinghofer, A., 1997. The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* 277, 333–338.
- Schlumberger, M., Carlomagno, F., Baudin, E., Bidart, J.M., Santoro, M., 2008. New therapeutic approaches to treat medullary thyroid carcinoma. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* 4, 22–32. doi:10.1038/ncpendmet0717
- Schlumberger, M., Pacini, F., 2012. Thyroid tumors, Nucléon. ed.
- Schubbert, S., Shannon, K., Bollag, G., 2007. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 7, 295–308. doi:10.1038/nrc2109
- Schuchardt, A., D'Agati, V., Larsson-Blomberg, L., Costantini, F., Pachnis, V., 1994. Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. *Nature* 367, 380–383. doi:10.1038/367380a0
- Schulten, H.-J., Al-Maghrabi, J., Al-Ghamdi, K., Salama, S., Al-Muhayawi, S., Chaudhary, A., Hamour, O., Abuzenadah, A., Gari, M., Al-Qahtani, M., 2011. Mutational screening of RET, HRAS, KRAS, NRAS, BRAF, AKT1, and CTNNB1 in medullary thyroid carcinoma. *Anticancer Res.* 31, 4179–4183.
- Schulz, N., Propst, F., Rosenberg, M.P., Linnoila, R.I., Paules, R.S., Kovatch, R., Ogiso, Y., Vande Woude, G., 1992. Pheochromocytomas and C-cell thyroid neoplasms in transgenic c-mos mice: a model for the human multiple endocrine neoplasia type 2 syndrome. *Cancer Res.* 52, 450–455.
- Scollo, C., 2003. Rationale for Central and Bilateral Lymph Node Dissection in Sporadic and Hereditary Medullary Thyroid Cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 2070–2075. doi:10.1210/jc.2002-021713
- Seidel, J., Zabel, M., Kasprzak, A., Spachacz, R., 2003. The expression of calcitonin, calcitonin gene-related peptide and somatostatin in the thyroids of rats of different ages. *Folia Morphol.* 62, 485–487.
- Seizinger, B.R., de la Monte, S., Atkins, L., Gusella, J.F., Martuza, R.L., 1987. Molecular genetic approach to human meningioma: loss of genes on chromosome 22. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 5419–5423.
- Seizinger, B.R., Martuza, R.L., Gusella, J.F., 1986. Loss of genes on chromosome 22 in tumorigenesis of human acoustic neuroma. *Nature* 322, 644–647. doi:10.1038/322644a0
- Sethi, R., Kukreja, S.C., Bowser, E.N., Hargis, G.K., Williams, G.A., 1981. Effect of secretin on parathyroid hormone and calcitonin secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 53, 153–157. doi:10.1210/jcem-53-1-153
- Sheikh, H.A., Tometsko, M., Niehouse, L., Aldeeb, D., Swalsky, P., Finkelstein, S., Barnes, E.L., Hunt, J.L., 2004. Molecular genotyping of medullary thyroid carcinoma can predict tumor recurrence. *Am. J. Surg. Pathol.* 28, 101–106.
- Sheu, S.-Y., Görges, R., Schmid, K.W., 2003. [Hyperplasia of the thyroid gland]. *Pathol.* 24, 348–356. doi:10.1007/s00292-003-0627-8
- Shimizu, K., Goldfarb, M., Suard, Y., Perucho, M., Li, Y., Kamata, T., Feramisco, J., Stavnezer, E., Fogh, J., Wigler, M.H., 1983. Three human transforming genes are related to the viral ras oncogenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 2112–2116.
- Shin, E., Fujita, S., Takami, K., Kurahashi, H., Kurita, Y., Kobayashi, T., Mori, T., Nishisho, I., Takai, S., 1993. Deletion Mapping of Chromosome 1p and 22q in Pheochromocytoma. *Cancer Sci.* 84, 402–408. doi:10.1111/j.1349-7006.1993.tb00150.x
- Si, H., Sun, X., Chen, Y., Cao, Y., Chen, S., Wang, H., Hu, C., 2013. Circulating microRNA-92a and microRNA-21 as novel minimally invasive biomarkers for primary breast cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 139, 223–229. doi:10.1007/s00432-012-1315-y
- Silber, J., Jacobsen, A., Ozawa, T., Harinath, G., Pedraza, A., Sander, C., Holland, E.C., Huse, J.T., 2012. miR-34a repression in proneural malignant gliomas upregulates expression of its target PDGFRA and promotes tumorigenesis. *PloS One* 7, e33844. doi:10.1371/journal.pone.0033844
- Sipple, J.H., 1961. The association of pheochromocytoma with carcinoma of the thyroid gland. *Am. J. Med.* 31, 163–166. doi:10.1016/0002-9343(61)90234-0
- Smith, A., Robinson, V., Patel, K., Wilkinson, D.G., 1997. The EphA4 and EphB1 receptor tyrosine kinases and ephrin-B2 ligand regulate targeted migration of branchial neural crest cells. *Curr. Biol.* 7, 561–570. doi:10.1016/S0960-9822(06)00255-7

- Soo, K., O'Rourke, M.P., Khoo, P.-L., Steiner, K.A., Wong, N., Behringer, R.R., Tam, P.P.L., 2002. Twist function is required for the morphogenesis of the cephalic neural tube and the differentiation of the cranial neural crest cells in the mouse embryo. *Dev. Biol.* 247, 251–270.
- Srinivasan, M., Sedmak, D., Jewell, S., 2002. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am. J. Pathol.* 161, 1961–1971. doi:10.1016/S0002-9440(10)64472-0
- Stehelin, D., Varmus, H.E., Bishop, J.M., Vogt, P.K., 1976. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* 260, 170–173.
- Stein, R., Chen, S., Reed, L., Richel, H., Goldenberg, D.M., 2002. Combining radioimmunotherapy and chemotherapy for treatment of medullary thyroid carcinoma: effectiveness of dacarbazine. *Cancer* 94, 51–61.
- Stenvang, J., Petri, A., Lindow, M., Obad, S., Kauppinen, S., 2012. Inhibition of microRNA function by anti-miR oligonucleotides. *Silence* 3, 1. doi:10.1186/1758-907X-3-1
- Stephen, A.G., Esposito, D., Bagni, R.K., McCormick, F., 2014. Dragging Ras Back in the Ring. *Cancer Cell* 25, 272–281. doi:10.1016/j.ccr.2014.02.017
- Stoetzel, C., Weber, B., Bourgeois, P., Bolcato-Bellemin, A.L., Perrin-Schmitt, F., 1995. Dorso-ventral and rostro-caudal sequential expression of M-twist in the postimplantation murine embryo. *Mech. Dev.* 51, 251–263.
- Stoorvogel, W., 2012. Functional transfer of microRNA by exosomes. *Blood* 119, 646–648. doi:10.1182/blood-2011-11-389478
- Stratton, M.R., 2013. Journeys into the genome of cancer cells. *EMBO Mol. Med.* 5, 169–172. doi:10.1002/emmm.201202388
- Stratton, M.R., Campbell, P.J., Futreal, P.A., 2009. The cancer genome. *Nature* 458, 719–724. doi:10.1038/nature07943
- Strickland, E.R., Hook, M.A., Balaraman, S., Huie, J.R., Grau, J.W., Miranda, R.C., 2011. MicroRNA dysregulation following spinal cord contusion: implications for neural plasticity and repair. *Neuroscience* 186, 146–160. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.03.063
- Suárez, H.G., Du Villard, J.A., Caillou, B., Schlumberger, M., Tubiana, M., Parmentier, C., Monier, R., 1988. Detection of activated ras oncogenes in human thyroid carcinomas. *Oncogene* 2, 403–406.
- Suarez, H.G., du Villard, J.A., Severino, M., Caillou, B., Schlumberger, M., Tubiana, M., Parmentier, C., Monier, R., 1990. Presence of mutations in all three ras genes in human thyroid tumors. *Oncogene* 5, 565–570.
- Sun, G., Li, H., Rossi, J.J., 2010. Sequence context outside the target region influences the effectiveness of miR-223 target sites in the RhoB 3'UTR. *Nucleic Acids Res.* 38, 239–252. doi:10.1093/nar/gkp870
- Suzuki, H., Mohr, U., Kimmerle, G., 1979. Spontaneous endocrine tumors in Sprague-Dawley rats. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 95, 187–196.
- Suzuki, K., Kobayashi, Y., Katoh, R., Kohn, L.D., Kawaoi, A., 1998. Identification of thyroid transcription factor-1 in C cells and parathyroid cells. *Endocrinology* 139, 3014–3017. doi:10.1210/endo.139.6.6126
- Tabin, C.J., Bradley, S.M., Bargmann, C.I., Weinberg, R.A., Papageorge, A.G., Scolnick, E.M., Dhar, R., Lowy, D.R., Chang, E.H., 1982. Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature* 300, 143–149.
- Takahashi, C., Contreras, B., Iwanaga, T., Takegami, Y., Bakker, A., Bronson, R.T., Noda, M., Loda, M., Hunt, J.L., Ewen, M.E., 2006. Nras loss induces metastatic conversion of Rb1-deficient neuroendocrine thyroid tumor. *Nat. Genet.* 38, 118–123. doi:10.1038/ng1703
- Takahashi, C., Ewen, M.E., 2006. Genetic interaction between Rb and N-ras: differentiation control and metastasis. *Cancer Res.* 66, 9345–9348. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1250
- Takahashi, M., 1988. Structure and expression of the ret transforming gene. *IARC Sci. Publ.* 189–197.
- Takahashi, M., 2001. The GDNF/RET signaling pathway and human diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 12, 361–373.
- Takahashi, M., Ritz, J., Cooper, G.M., 1985. Activation of a novel human transforming gene, ret, by DNA rearrangement. *Cell* 42, 581–588.
- Takeuchi, K., Soda, M., Togashi, Y., Suzuki, R., Sakata, S., Hatano, S., Asaka, R., Hamaoka, W., Ninomiya, H., Uehara, H., Lim Choi, Y., Satoh, Y., Okumura, S., Nakagawa, K., Mano, H., Ishikawa, Y., 2012. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nat. Med.* 18, 378–381. doi:10.1038/nm.2658
- Tamagnini, P., Iacobone, M., Sebag, F., Marcy, M., De Micco, C., Henry, J.F., 2005. Lymph node involvement in macroscopic medullary thyroid carcinoma. *Br. J. Surg.* 92, 449–453. doi:10.1002/bjs.4860
- Tamborero, D., Gonzalez-Perez, A., Perez-Llamas, C., Deu-Pons, J., Kandoth, C., Reimand, J., Lawrence, M.S., Getz, G., Bader, G.D., Ding, L., Lopez-Bigas, N., 2013. Comprehensive identification of mutational cancer driver genes across 12 tumor types. *Sci. Rep.* 3. doi:10.1038/srep02650
- Tanaka, N., Nishisho, I., Yamamoto, M., Miya, A., Shin, E., Karakawa, K., Fujita, S., Kobayashi, T., Rouleau, G.A., Mori, T., 1992. Loss of heterozygosity on the long arm of chromosome 22 in pheochromocytoma. *Genes. Chromosomes Cancer* 5, 399–403.
- Tanner, M.M., Karhu, R.A., Nupponen, N.N., Borg, A., Baldetorp, B., Pejovic, T., Fernö, M., Killander, D., Isola, J.J., 1998. Genetic aberrations in hypodiploid breast cancer: frequent loss of chromosome 4 and amplification of cyclin D1 oncogene. *Am. J. Pathol.* 153, 191–199. doi:10.1016/S0002-9440(10)65560-5
- Taparowsky, E., Suard, Y., Fasano, O., Shimizu, K., Goldfarb, M., Wigler, M., 1982. Activation of the T24 bladder carcinoma transforming gene is linked to a single amino acid change. *Nature* 300, 762–765.
- Taylor, A.J., Croft, A.P., Palace, A.M., Winter, D.L., Reulen, R.C., Stiller, C.A., Stevens, M.C.G., Hawkins, M.M., 2009. Risk of thyroid cancer in survivors of childhood cancer: results from the British Childhood Cancer Survivor Study. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 125, 2400–2405. doi:10.1002/ijc.24581

- Thliveris, J.A., Dubé, W.J., Banerjee, R., 1976. Comparative ultrastructure of thyroid, tongue and eyelid lesions in the neuroma phenotype of medullary carcinoma of the thyroid: association of amyloid with fibroblasts in thyroid tumor and in mucosal neuromas. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histol.* 369, 249–258.
- Thompson, P.M., Gotoh, T., Kok, M., White, P.S., Brodeur, G.M., 2003. CHD5, a new member of the chromodomain gene family, is preferentially expressed in the nervous system. *Oncogene* 22, 1002–1011. doi:10.1038/sj.onc.1206211
- Thomson, D.W., Bracken, C.P., Szubert, J.M., Goodall, G.J., 2013. On Measuring miRNAs after Transient Transfection of Mimics or Antisense Inhibitors. *PLoS ONE* 8, e55214. doi:10.1371/journal.pone.0055214
- Tiscornia, G., Belmonte, J.C.I., n.d. MicroRNAs in embryonic stem cell function and fate [WWW Document]. URL <http://genesdev.cshlp.org> (accessed 2.20.14).
- Torti, D., Trusolino, L., 2011. Oncogene addiction as a foundational rationale for targeted anti-cancer therapy: promises and perils: Oncogene addiction and targeted anti-cancer therapy. *EMBO Mol. Med.* 3, 623–636. doi:10.1002/emmm.201100176
- Trainor, P.A., Krumlauf, R., 2000. Patterning the cranial neural crest: Hindbrain segmentation and hox gene plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* 1, 116–124. doi:10.1038/35039056
- Trainor, P.A., Krumlauf, R., 2001. Hox genes, neural crest cells and branchial arch patterning. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 698–705.
- Trueba, S.S., Augé, J., Mattei, G., Etchevers, H., Martinovic, J., Czernichow, P., Vekemans, M., Polak, M., Attié-Bitach, T., 2005. PAX8, TTF1, and FOXE1 gene expression patterns during human development: new insights into human thyroid development and thyroid dysgenesis-associated malformations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 455–462. doi:10.1210/jc.2004-1358
- Tu, K., Yu, H., Hua, Y.-J., Li, Y.-Y., Liu, L., Xie, L., Li, Y.-X., 2009. Combinatorial network of primary and secondary microRNA-driven regulatory mechanisms. *Nucleic Acids Res.* 37, 5969–5980. doi:10.1093/nar/gkp638
- Tubiana, M., Milhaud, G., Coutris, G., Lacour, J., Parmentier, C., Bok, B., 1968. Medullary carcinoma and thyrocalcitonin. *Br. Med. J.* 4, 87–89.
- Van Raamsdonk, C.D., Bezrookove, V., Green, G., Bauer, J., Gaugler, L., O'Brien, J.M., Simpson, E.M., Barsh, G.S., Bastian, B.C., 2009. Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi. *Nature* 457, 599–602. doi:10.1038/nature07586
- Vandepoele, K., Van Roy, N., Staes, K., Speleman, F., van Roy, F., 2005. A novel gene family NBPF: intricate structure generated by gene duplications during primate evolution. *Mol. Biol. Evol.* 22, 2265–2274. doi:10.1093/molbev/msi222
- Vasudevan, S., Tong, Y., Steitz, J.A., 2007. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 318, 1931–1934. doi:10.1126/science.1149460
- Vaughn, C.P., Zobel, S.D., Furtado, L.V., Baker, C.L., Samowitz, W.S., 2011. Frequency of KRAS, BRAF, and NRAS mutations in colorectal cancer. *Genes. Chromosomes Cancer* 50, 307–312. doi:10.1002/gcc.20854
- Veiga, L.H.S., Lubin, J.H., Anderson, H., de Vathaire, F., Tucker, M., Bhatti, P., Schneider, A., Johansson, R., Inskip, P., Kleinerman, R., Shore, R., Pottern, L., Holmberg, E., Hawkins, M.M., Adams, M.J., Sadetzki, S., Lundell, M., Sakata, R., Damber, L., Neta, G., Ron, E., 2012. A pooled analysis of thyroid cancer incidence following radiotherapy for childhood cancer. *Radiat. Res.* 178, 365–376.
- Villanueva, S., Glavic, A., Ruiz, P., Mayor, R., 2002. Posteriorization by FGF, Wnt, and Retinoic Acid Is Required for Neural Crest Induction. *Dev. Biol.* 241, 289–301. doi:10.1006/dbio.2001.0485
- Virtanen, V.B., Pukkala, E., Kivisaari, R., Salo, P.P., Koivusalo, A., Arola, J., Miettinen, P.J., Rintala, R.J., Perola, M., Pakarinen, M.P., 2013. Thyroid cancer and co-occurring RET mutations in Hirschsprung disease. *Endocr. Relat. Cancer* 20, 595–602. doi:10.1530/ERC-13-0082
- Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V.E., Zhou, S., Diaz, L.A., Jr, Kinzler, K.W., 2013. Cancer genome landscapes. *Science* 339, 1546–1558. doi:10.1126/science.1235122
- Wang, F., Zheng, Z., Guo, J., Ding, X., 2010. Correlation and quantitation of microRNA aberrant expression in tissues and sera from patients with breast tumor. *Gynecol. Oncol.* 119, 586–593. doi:10.1016/j.ygyno.2010.07.021
- Wang, P., Zhuang, L., Zhang, J., Fan, J., Luo, J., Chen, H., Wang, K., Liu, L., Chen, Z., Meng, Z., 2013. The serum miR-21 level serves as a predictor for the chemosensitivity of advanced pancreatic cancer, and miR-21 expression confers chemoresistance by targeting FasL. *Mol. Oncol.* 7, 334–345. doi:10.1016/j.molonc.2012.10.011
- Wang, P., Zou, F., Zhang, X., Li, H., Dulak, A., Tomko, R.J., Jr, Lazo, J.S., Wang, Z., Zhang, L., Yu, J., 2009. microRNA-21 negatively regulates Cdc25A and cell cycle progression in colon cancer cells. *Cancer Res.* 69, 8157–8165. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1996
- Wang, R., Hu, H., Pan, Y., Li, Y., Ye, T., Li, C., Luo, X., Wang, L., Li, H., Zhang, Y., Li, F., Lu, Y., Lu, Q., Xu, J., Garfield, D., Shen, L., Ji, H., Pao, W., Sun, Y., Chen, H., 2012. RET fusions define a unique molecular and clinicopathologic subtype of non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 30, 4352–4359. doi:10.1200/JCO.2012.44.1477
- Wang, W.-T., Zhao, Y.-N., Han, B.-W., Hong, S.-J., Chen, Y.-Q., 2013. Circulating microRNAs identified in a genome-wide serum microRNA expression analysis as noninvasive biomarkers for endometriosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98, 281–289. doi:10.1210/jc.2012-2415
- Wang, Z.-X., Bian, H.-B., Wang, J.-R., Cheng, Z.-X., Wang, K.-M., De, W., 2011. Prognostic significance of serum miRNA-21 expression in human non-small cell lung cancer. *J. Surg. Oncol.* 104, 847–851. doi:10.1002/jso.22008

- Watanabe, T., Ichihara, M., Hashimoto, M., Shimono, K., Shimoyama, Y., Nagasaka, T., Murakumo, Y., Murakami, H., Sugiyama, H., Iwata, H., Ishiguro, N., Takahashi, M., 2002. Characterization of gene expression induced by RET with MEN2A or MEN2B mutation. *Am. J. Pathol.* 161, 249–256. doi:10.1016/S0002-9440(10)64176-4
- Weinstein, I.B., 2002. Cancer. Addiction to oncogenes—the Achilles heel of cancer. *Science* 297, 63–64. doi:10.1126/science.1073096
- Weinstein, I.B., Joe, A.K., 2006. Mechanisms of Disease: oncogene addiction—a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 3, 448–457. doi:10.1038/ncponc0558
- Weinstein, J.N., Mills, G.B., Shaw, K.R.M., Ozenberger, B.A., Ellrott, K., Shmulevich, I., Sander, C., Stuart, J.M., 2013. The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. *Nat. Genet.* 45, 1113–1120. doi:10.1038/ng.2764
- Weller, M., Berger, H., Hartmann, C., Schramm, J., Westphal, M., Simon, M., Goldbrunner, R., Krex, D., Steinbach, J.P., Ostertag, C.B., Loeffler, M., Pietsch, T., von Deimling, A., German Glioma Network, 2007. Combined 1p/19q loss in oligodendroglial tumors: predictive or prognostic biomarker? *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 13, 6933–6937. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-0573
- Wells, S.A., Santoro, M., 2009. Targeting the RET Pathway in Thyroid Cancer. *Clin. Cancer Res.* 15, 7119–7123. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-2742
- Wendling, O., Dennefeld, C., Chambon, P., Mark, M., 2000. Retinoid signaling is essential for patterning the endoderm of the third and fourth pharyngeal arches. *Development* 127, 1553–1562.
- White, P.S., Thompson, P.M., Gotoh, T., Okawa, E.R., Igarashi, J., Kok, M., Winter, C., Gregory, S.G., Hogarty, M.D., Maris, J.M., Brodeur, G.M., 2005. Definition and characterization of a region of 1p36.3 consistently deleted in neuroblastoma. *Oncogene* 24, 2684–2694. doi:10.1038/sj.onc.1208306
- Williams, B.O., Remington, L., Albert, D.M., Mukai, S., Bronson, R.T., Jacks, T., 1994. Cooperative tumorigenic effects of germline mutations in Rb and p53. *Nat. Genet.* 7, 480–484. doi:10.1038/ng0894-480
- Wójcik, P., Kulig, J., Okoń, K., Zazula, M., Moździoch, I., Niepsuj, A., Stachura, J., 2008. KRAS mutation profile in colorectal carcinoma and novel mutation—internal tandem duplication in KRAS. *Pol. J. Pathol. Off. J. Pol. Soc. Pathol.* 59, 93–96.
- Wright, F.A., Lemon, W.J., Zhao, W.D., Sears, R., Zhuo, D., Wang, J.P., Yang, H.Y., Baer, T., Stredney, D., Spitzner, J., Stutz, A., Krahe, R., Yuan, B., 2001. A draft annotation and overview of the human genome. *Genome Biol.* 2, RESEARCH0025.
- Wu, J., Qian, J., Li, C., Kwok, L., Cheng, F., Liu, P., Perdomo, C., Kotton, D., Vaziri, C., Anderlind, C., Spira, A., Cardoso, W.V., Lü, J., 2010. miR-129 regulates cell proliferation by downregulating Cdk6 expression. *Cell Cycle Georget. Tex* 9, 1809–1818.
- Wurster-Hill, D.H., Noll, W.W., Bircher, L.Y., Pettengill, O.S., Grizzle, W.A., 1986. Cytogenetics of medullary carcinoma of the thyroid. *Cancer Genet. Cytogenet.* 20, 247–253.
- Wurster-Hill, D.H., Pettengill, O.S., Noll, W.W., Gibson, S.H., Brinck-Johnsen, T., 1990. Hypodiploid, pseudodiploid, and normal karyotypes prevail in cytogenetic studies of medullary carcinomas of the thyroid and metastatic tissues. *Cancer Genet. Cytogenet.* 47, 227–241.
- Xiao, B., Wang, Y., Li, W., Baker, M., Guo, J., Corbet, K., Tsalik, E.L., Li, Q.-J., Palmer, S.M., Woods, C.W., Li, Z., Chao, N.J., He, Y.-W., 2013. Plasma microRNA signature as a noninvasive biomarker for acute graft-versus-host disease. *Blood* 122, 3365–3375. doi:10.1182/blood-2013-06-510586
- Xing, M., 2013. Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. *Nat. Rev. Cancer* 13, 184–199. doi:10.1038/nrc3431
- Xu, B., Teng, L.H., Silva, S.D. da, Bijian, K., Al Bashir, S., Jie, S., Dolph, M., Alaoui-Jamali, M.A., Bismar, T.A., 2013. The significance of dynamin 2 expression for prostate cancer progression, prognostication, and therapeutic targeting. *Cancer Med.* doi:10.1002/cam4.168
- Xu, N., Papagiannakopoulos, T., Pan, G., Thomson, J.A., Kosik, K.S., 2009. MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells. *Cell* 137, 647–658. doi:10.1016/j.cell.2009.02.038
- Yang, C., Wang, C., Chen, X., Chen, S., Zhang, Y., Zhi, F., Wang, J., Li, L., Zhou, X., Li, N., Pan, H., Zhang, J., Zen, K., Zhang, C.-Y., Zhang, C., 2013. Identification of seven serum microRNAs from a genome-wide serum microRNA expression profile as potential noninvasive biomarkers for malignant astrocytomas. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 132, 116–127. doi:10.1002/ijc.27657
- Yang, K.P., Castillo, S.G., Nguyen, C.V., Hickey, R.C., Samaan, N.A., 1990a. C-myc, N-myc, N-ras, and c-erb-B: lack of amplification or rearrangement in human medullary thyroid carcinoma and a derivative cell line. *Anticancer Res.* 10, 189–192.
- Yang, K.P., Nguyen, C.V., Castillo, S.G., Samaan, N.A., 1990b. Deletion mapping on the distal third region of chromosome 1p in multiple endocrine neoplasia type IIA. *Anticancer Res.* 10, 527–533.
- Yao, Q., Chen, J., Cao, H., Orth, J.D., McCaffery, J.M., Stan, R.-V., McNiven, M.A., 2005. Caveolin-1 interacts directly with dynamin-2. *J. Mol. Biol.* 348, 491–501. doi:10.1016/j.jmb.2005.02.003
- Ye, L., Santarpia, L., Cote, G.J., El-Naggar, A.K., Gagel, R.F., 2008. High resolution array-comparative genomic hybridization profiling reveals deoxyribonucleic acid copy number alterations associated with medullary thyroid carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93, 4367–4372. doi:10.1210/jc.2008-0912
- Yerly, S., Lobrinus, J.-A., Bongiovanni, M., Becker, M., Zare, M., Granger, P., Pusztaszeri, M., 2013. A carcinoma showing thymus-like elements of the thyroid arising in close association with solid cell nests: evidence for a precursor lesion? *Thyroid Off. J. Am. Thyroid Assoc.* 23, 511–516. doi:10.1089/thy.2011.0415

- Yin, D., Ogawa, S., Kawamata, N., Leiter, A., Ham, M., Li, D., Doan, N.B., Said, J.W., Black, K.L., Phillip Koeffler, H., 2013. miR-34a functions as a tumor suppressor modulating EGFR in glioblastoma multiforme. *Oncogene* 32, 1155–1163. doi:10.1038/onc.2012.132
- Yu, X., Zhang, W., Ning, Q., Luo, X., 2012. MicroRNA-34a inhibits human brain glioma cell growth by down-regulation of Notch1. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci. Hua Zhong Ke Ji Xue Xue Bao Yi Xue Ying Wen Ban Huazhong Keji Daxue Xuebao Yixue Yingdewen Ban* 32, 370–374. doi:10.1007/s11596-012-0064-0
- Zabel, M., 1984. Ultrastructural localization of calcitonin, somatostatin and serotonin in parafollicular cells of rat thyroid. *Histochem. J.* 16, 1265–1272.
- Zabel, M., 1985. Studies on in vitro effect of serotonin on calcitonin secretion by rat thyroid C cells. *Histochemistry* 83, 71–75. doi:10.1007/BF00495303
- Zabel, M., Grzeszkowiak, J., 1997. Characterisation of thyroid medullary carcinoma TT cell line. *Histol. Histopathol.* 12, 283–289.
- Zaidi, M., Moonga, B.S., Bevis, P.J., Bascal, Z.A., Breimer, L.H., 1990. The calcitonin gene peptides: biology and clinical relevance. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 28, 109–174. doi:10.3109/10408369009105900
- Zang, K.D., Singer, H., 1967. Chromosomal constitution of meningiomas. *Nature* 216, 84–85.
- Zeytinoğlu, F.N., Gagel, R.F., Tashjian, A.H., Jr, Hammer, R.A., Leeman, S.E., 1980. Characterization of neurotensin production by a line of rat medullary thyroid carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 3741–3745.
- Zhao, H., Shen, J., Medico, L., Wang, D., Ambrosone, C.B., Liu, S., 2010. A pilot study of circulating miRNAs as potential biomarkers of early stage breast cancer. *PloS One* 5, e13735. doi:10.1371/journal.pone.0013735
- Zheng, D., Haddadin, S., Wang, Y., Gu, L.-Q., Perry, M.C., Freter, C.E., Wang, M.X., 2011. Plasma microRNAs as novel biomarkers for early detection of lung cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 4, 575–586.
- Zhou, B., Zhang, Y., Zhang, F., Xia, Y., Liu, J., Huang, R., Wang, Y., Hu, Y., Wu, J., Dai, C., Wang, H., Tu, Y., Peng, X., Wang, Y., Zhai, Q., 2014. CLOCK/BMAL1 regulates circadian change of mouse hepatic insulin sensitivity via SIRT1. *Hepatology*. Baltim. Md. doi:10.1002/hep.26992
- Zhu, W., Hai, T., Ye, L., Cote, G.J., 2010. Medullary thyroid carcinoma cell lines contain a self-renewing CD133+ population that is dependent on ret proto-oncogene activity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95, 439–444. doi:10.1210/jc.2009-1485

