

Modélisation des néoplasies endocriniennes multiples de type II par les cellules souches pluripotentes induites porteuses de mutations germinales du gène RET

Julien Hadoux

► To cite this version:

Julien Hadoux. Modélisation des néoplasies endocriniennes multiples de type II par les cellules souches pluripotentes induites porteuses de mutations germinales du gène RET. Cancer. Université Paris Saclay (COmUE), 2016. Français. NNT: 2016SACLS389. tel-01995544

HAL Id: tel-01995544 https://theses.hal.science/tel-01995544

Submitted on 27 Jan 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.





NNT: 2016SACLS389

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PARIS-SACLAY PRÉPARÉE A L'UNIVERSITÉ PARIS SUD

ÉCOLE DOCTORALE N° 582 CANCÉROLOGIE : BIOLOGIE - MÉDECINE - SANTÉ (CBMS)

Spécialité de doctorat : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Par

Julien Hadoux

Modélisation des néoplasies endocriniennes multiples de type II par les cellules souches pluripotentes induites porteuses de mutations germinales du gène *RET*

Thèse présentée et soutenue à Villejuif, le 23 novembre 2016

Composition du Jury :

Pr Martin Schlumberger	Professeur des universités, Université Paris Sud	Présio
Pr Vincent Rohmer	Professeur des universités, université d'Angers	Rapp
Dr Corinne Dupuy	Directrice de recherche, CNRS	Rappo
Dr Cécile Martinat	Directrice de recherche, I-STEM	Exam
Dr Carine Giovannangeli	Directrice de Recherche Inserm	Exam
Dr Xavier Nissan	Chef d'équipe, I-Stem	Exam
Pr Ali Turhan	Professeur des universités, Université Paris Sud	Direct

Président Rapporteur Rapporteur Examinatrice Examinatrice Examinateur Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, je tiens à remercier l'ensemble des personnes qui ont contribué à ce projet.

Je remercie d'abord mon directeur de thèse, le Pr Ali Turhan pour m'avoir permis de travailler sur ce sujet aux croisements des thématiques de développement et d'oncogénèse. Mes remerciements vont également au Pr Annelise Bennaceur pour m'avoir accueilli dans son unité.

Je tiens également à remercier les membres de mon jury de thèse, je suis très reconnaissant au Pr Vincent Rohmer et au Dr Corinne Dupuy d'avoir accepté d'être mes rapporteurs, aux Dr Cécile Martinat, Carine Giovannangeli et Xavier Nissan d'avoir accepté d'examiner cette thèse.

Je remercie le Pr Martin Schlumberger de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury et pour sa confiance dans mon activité clinique actuelle.

Je remercie également les Dr Christine Baldeschi et Jenifer Allouche ainsi que les Dr Lorenz Studer et Faranak Fattahi pour leurs collaborations et leurs conseils dans la mise au point de la différenciation en crête neurale.

Je remercie l'ensemble des membres de l'unité 935 pour les connaissances qu'ils m'ont apportées, leur soutien, les discussions scientifiques et amicales qui m'ont enrichi et les virées aux salons des vignerons indépendants qui se poursuivront à l'avenir, je l'espère. Je remercie particulièrement le Dr Olivier Féraud pour son amitié et son aide précieuse dans la conduite de ce projet ; le Dr Stéphane Flamant pour m'avoir transmis son goût pour la biologie moléculaire ; Dominique Divers et Emilie Gobbo pour leur aide en culture cellulaire ; Mathieu Guibert pour nos manips de biologie moléculaire en musique ; le Dr Paule Opolon pour sa collaboration dans les analyses histologiques, les Dr Adlen Foudi, Jérôme Artus et Hervé Acloque pour leurs conseils et discussions concernant ce projet. Merci aux autres thésardes Lucie, Mélanie, Cécile, Masae et Gladys.

Merci à ma famille et mes amis pour leur soutien de tous les instants.

Enfin, un grand merci à ma femme, Elise, pour sa présence à mes côtés chaque jour.

RÉSUMÉ

La technologie de cellules souches pluripotentes induites (CSPi) offre des perspectives thérapeutiques majeures dans le cadre de la médecine régénerative et permet la possibilité de modélisation de processus pathologiques dans tous les domaines de la Médecine. En Oncologie, les CSPi ont un intérêt potentiel pour la modélisation de syndromes de prédisposition au cancer liés à des mutations germinales de gènes impliqués dans l'oncogenèse.

Au cours de ce travail, nous avons généré des lignées de CSPi à partir de cellules sanguines de patients atteints de néoplasies endocriniennes multiples de type 2, porteurs de mutations germinales du proto-oncogène RET appartenant aux 3 classes de risque de l'ATA : mutation C620R de risque moyen, mutation C634Y de haut risque et mutation M918T de très haut risque. Pour tester les effets génomiques potentiels de ces mutations, nous avons utilisé l'ingénierie du génome via CRISPR/Cas9 en « corrigeant » la mutation C634Y. Ces CSPi présentent tous les critères de pluripotence avec un caryotype normal, expriment Ret et forment des tératomes après injection chez la souris immunodéprimée. L'étude histologique approfondie des tératomes a mis en évidence le développement de cellules C en leur sein et également de cellules neuroendocrines exprimant la Chromogranine A. Néanmoins, ces cellules étaient isolées et il n'a pas été observé d'aspect d'hyperplasie des cellules C ou de carcinome médullaire de la thyroïde ni de tumeur neuroendocrine réminiscente du phénotype des NEM2. L'analyse de l'expression des gènes des CSPi avec mutation RET^{C634Y} comparée aux CSPi RET sauvage et « corrigé » a mis en évidence, dès le stade de pluripotence, une activation du réseau transcriptionnel du gène EGR1 qui pourrait constituer un des mécanismes moléculaires, lié à la présence d'une mutation de RET, responsables du phénotype des néoplasies endocriniennes multiples de type II. Nous avons ensuite réalisé la différenciation de ces lignées de CSPi en cellules souches de la crête neurale, une première étape vers l'obtention des cellules d'origine cibles des tumeurs développées dans le cadre des NEM2, en particulier le phéochromocytome. La différenciation en cellules souches de la crête neurale était efficace et reproductible pour toutes nos lignées. Nous avons mis en évidence l'activation d'un programme commun invasif (activation de la locomotion et perturbation de l'adhésion cellulaire) au niveau des CSCN avec mutation RET^{C634Y} et RET^{M918T} ainsi qu'une forte

dérégulation du réseau des intégrines entrainant une forte dérégulation de l'adhésion cellulaire. Les expériences de migration in vitro utilisant des CSCN avec mutation de RET ont montré une augmentation des capacités de migration de ces cellules par rapport aux CSCN témoins.

Ainsi, ce travail qui a consisté à générer et caractériser les premières CSPi porteuses de mutation de *RET*, a permis d'identifier des voies de signalisations pouvant être impliquées dans la physiopathologie des néoplasies endocriniennes multiples de type 2 avec des applications potentielles en recherche fondamentale et translationnelle. Ce modèle pourrait servir à l'avenir au criblage moléculaire pour l'étude des néoplasies endocriniennes multiples de type 2.

ABSTRACT

Induced pluripotent stem cell (iPSC) technology offers major perspectives in all areas of medicine, including future regenerative medicine strategies but also disease modeling. In oncology, this technology can be used for modeling cancer predisposition syndromes associated with germline mutations of tumor suppressor genes or oncogenes. We generated IPSC lines from peripheral mononuclear blood cells of patients with multiple endocrine neoplasia type 2 (MEN2) who harbored germline mutations in the RET proto-oncogene belonging to the three risk classes according to ATA guidelines: moderate risk mutation C620R, high risk mutation C634Y and very high risk mutation M918T. To determine the potential genomic effects induced by this specific mutation, We have also generated an isogenic RET^{Y634C} iPSC control line by genome engineering using CRSPR/Cas9-mediated method to "correct" C634Y mutation. All iPSC lines exhibited all markers of pluripotency with a normal karyotype, expressed Ret and gave rise to teratomas after injection into immunodeficient mice. A thorough histological study of teratomas from these iPSC highlighted the development of C cells and Chromogranin Aexpressing neuroendocrine cells within them. However, these cells were isolated and Ccell hyperplasia, medullary thyroid carcinoma or neuroendocrine tumors reminiscent of MEN2 phenotype were not observed. Gene profiling analysis of RET^{C634Y}-mutated iPSC compared with RET^{wt} and RET^{Y634C} iPSCs revealed an activation of the EGR1 transcriptional network, at the pluripotent stem cell stage which could be one of the molecular effector of the NEM2, RET mutation-related, phenotype. We then performed in vitro neural crest stem cell (NCSC) differentiation of the RET-mutated iPSC lines, with the goal of reproducing in vitro the cell of origin of some of the tumoral features of MEN2, especially pheochromocytoma. The neural crest differentiation was effective and reproducible for all our lines. Gene profiling analysis revealed an activation of cell invasion program (activation of the locomotion and disruption of cell adhesion) in RET^{C634Y} and RET^{M918T} -mutated NCSC and a deregulation of integrin network causing a strong deregulation of cell adhesion. The RET-mutated NCSC had increased migration capabilities in vitro.

Thus, we generated in this work the first *RET*-mutated iPSCs which allowed the identification of signaling pathways potentially implicated in the pathophysiology of multiple endocrine neoplasia type 2 and showed the possibility of modeling these tumors

in vitro with both fundamental and translational potential applications. This model will offer future perspectives of drug screening platform for tumors associated with MEN2.

ABRÉVIATIONS

Les abréviations et noms de gènes cités sont reportés dans l'ordre alphabétique

ABL: ABL proto-oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase ACE : Antigène Carcino-Embryonnaire ADK : adénocarcinome ADN : Acide Désoxyribonucléique ADNc : ADN complémentaire AF9: MLLT3, super elongation complex subunit AFP: Alfa Foeto-Protein ALDH1A1: Adehyde dehydrogenase 1 family member A1 ALK: anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase ALPPL2 : alkaline phosphatase, placental like 2 AMPc: Adénosine monophosphate cyclique Antigène T SV40 : SV40gp6, Simian Virus 40 APC : APC, WNT signaling pathway regulator ARN: Acide Ribonucléique ARNi : ARN interférent ARNm: ARN messager ARNseg: Séguençage d'ARN ATA: American Thyroid Association BCL2: BCL2, apoptosis regulator BCR: BCR, RhoGEF and GTPase activating protein bFGF : FGF2, Fibroblast Growth Factor 2 **BMP** : Bone Morphogenetic Protein BMP4: bone morphogenetic protein 4 BRCA1 : BRCA1, DNA repair associated CALCA : calcitonin related polypeptide alpha Cas9: endonucléase 9 associée à CRISPR CD133 : PROM1, Prominin 1 CD49d : IGA4, integrin subunit alpha 4 CD74: CD74 molecule CDK5: cyclin dependent kinase 5

CER1: cerberus 1, DAN family BMP antagonist CFTR: Cystic Fibrosis Transmembrane Conductor Receptor CgA : Chromogranine A CGH : Hybridation Génomique Comparative CMT : Cancer médullaire de la thyroïde crARN : ARN associé au CRISPR CRISPR : clustered regularly interspaced short palindromic repeats, Groupe de courtes répétitions palindromiques régulièrement espacées. CSC : Cellule Souche Cancéreuse CSCN: Cellules Souche de la Crête Neurale **CSE** : Cellules Souches Embryonnaires CSEp : Cellules souches de l'épiblaste CSM : Cellules souches Mésenchymateuses **CSP** : Cellules Souches Pluripotentes **CSPi : Cellules Souches Pluripotentes** induites DISP2: dispatched RND transporter family member 2 DNMT3L : DNA methyltransferase 3 like DOCK9: dedicator of cytokinesis 9 DPPA2 : Developmental PluriPotency Associated 2 EGR1: Early Growth Response 1 EML4: echinoderm microtubule associated protein like 4 ESRRB: EStrogen Related Receptor beta FGF : Fibroblast Growth Factor FGF4: fibroblast growth factor 4 FME : Fibroblastes murins embryonnaires FoxA1/2 : orkhead box A1/2 FOXD3 : forkhead box D3 GDF3: growth differentiation factor 3

GDNF: Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor **GFP: Green Fluorescent Protein** GFRa : GFRA1, GDNF family receptor alpha 1 **GHRH:** Growth Hormone Releasing Hormone GSK3B : glycogen synthase kinase 3 beta **GSN:** Gelsolin GST: Gène Suppresseur de Tumeur H19: H19, imprinted maternally expressed transcript (non-protein coding) HCC : hyperplasie des cellules C HES1: hes family bHLH transcription factor 1 HNF4A : hepatocyte nuclear factor 4 alpha. HNK1: B3GAT1, CD57, LEU7, beta-1,3glucuronyltransferase 1 HRAS : HRas proto-oncogene, GTPase IGF2: Insulin Growth Factor 2 IHC : Immunohistochimie IKBKAP: inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase complexassociated protein **IRES : Internal Ribosome Entry Site** IRM: Imagerie par Resonance Magnétique JENH : Jonction d'extrémités non homologues KIF5B: kinesin family member 5B KLF4: Kruppel like factor 4 Knock-in : mutagénèse dirigée avec insertion d'une séquence codante dans un locus Knock-out : invalidation de gène KRAS : KRAS proto-oncogene, GTPase LEFTY2: left-right determination factor 2 LIF : Leukemia inhibitory factor LIN28: lin-28 homolog A MASH1: ASCL1, achaete-scute family bHLH transcription factor 1 MDC1: mediator of DNA damage checkpoint 1 MDM2 : MDM2 proto-oncogene MGAM : maltase-glucoamylase

miARN: miR, micro-ARN MIBG : métaiodobenzylguanidine MIXL1 : Mix paired-like homeobox MLL: KMT2A, lysine methyltransferase 2A MYC: c-Myc, v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog NEM2 : Néoplasie endocriniennes Multiples de type 2 NF1 : Neurofibromin 1 NF2: Neurofibromin 2 NGFR : CD271, p75NTR, nerve growth factor receptor NIP : Néoplasie intra-épithéliale pancréatique NKX2-1: TTF1, NK2 homeobox 1 NODAL: nodal growth differentiation factor NRAS: neuroblastoma RAS viral oncogene homolog NSE: Neuron Specific Enolase NSG: NOD/SCID-IL2Ry-/-OCT-4 : Oct3/4, Oct3, POU5F1, POU class 5 homeobox 1 OKSM: les 4 gènes de pluripotence, Oct3/4, Klf4, Sox2 and c-Myc P19: ARF, CDKN2A, cyclin dependent kinase inhibitor 2A P21: CIP1, CDKN1A, cyclin dependent kinase inhibitor 1A P53: TP53, Tumor Protein p53 PASS : Pheochromocytoma of the Adrenal gland Scaled Score PAX3: paired box 3 PAX8: Paired box 8 PCR : Réaction de polymérisation en Chaîne PHOX2B: paired like homeobox 2b PIK3CA: PI3K, phosphatidylinositol-4,5bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha PKC-theta : PRKCQ, protein kinase C theta PPA2/3/5: pyrophosphatase (inorganic) 2/3/5PTEN : phosphatase and tensin homolog qPCR : PCR quantitative

RB: RB1, RB transcriptional corepressor 1 **RET : REarranged during Transfection** RH : Recombinaison homologue ROS1: ROS proto-oncogene 1, receptor tyrosine kinase ROSA26: Gt(ROSA)26Sor, gene trap ROSA 26, Philippe Soriano SEMA6A : semaphorin 6A SF3B1: splicing factor 3b subunit 1 sgARN : ARN simple guide SGM : Souris Génétiquement Modifiée shARN : petit ARN interférent en épingle à cheveux SLF : Syndrome de Li-Fraumeni SMAD4: SMAD family member 4 SNAIL: SNAI1, snail family transcriptional repressor 1 SOX10: SRY-box 10 SOX2: SRY-box2 SSEA3: Stage-specific embryonic antigen 3 SSEA4: Stage-specific embryonic antigen 4 ssODN : oligonucléotide simple brin STK11 : LKB1, serine/threonine kinase 11 T: T brachyury transcription factor TALEN : nucléases effectrices de type activateur de transcription TEM: Transition Epithélio-Mésenchymateuse TFCP2L1: transcription factor CP2 like 1 TGF- β : TGFB1, transforming growth factor beta 1 TMD : TTN, Titin TME: Transition mésenchymo-épthéliale TRA-1-60: Tumor Rejection Antigen-1-60 TRA-1-81: Tumor Rejection Antigen-1-81 TracrARN : ARN transactivateur UTF1 : Undifferentiated embryonic cell **Transcription Factor 1** ZFN : Nucléases à doigt de Zinc Zic1 : Zinc family member 1

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	2
ABSTRACT	4
ABRÉVIATIONS	6
INTRODUCTION	14
1. Introduction de certains concepts en biologie du cancer: maladie clonale, cell souches, cellule d'origine et syndromes de prédisposition	ules 15
1.1. Généralités	15
1.2. Évolution clonale et cellules souches cancéreuses	16
1.3. Caractéristiques communes des cellules souches pluripotentes et des cellu (souches) cancéreuses.	les 17
1.4. Cellule d'origine, syndrome de prédisposition au cancer et intérêt des cellul souches	es 20
2. Les Néoplasies endocriniennes multiples de type 2 et CMT familiaux	23
2.1. Mutations germinales du gène <i>RET</i>	23
2.2. Corrélation génotype/phénotype	25
2.3. Comment expliquer la survenue de tumeurs neuroendocrines chez les patients de mutations germinales de <i>RET</i> ?	ents 27
2.4. Le cancer médullaire de la thyroïde	28
2.4.1. Anatomo-pathologie, biomarqueurs, génétique et modèles tumoraux	28
2.4.1.1. La cellule C (ou parafolliculaire) normale et son développement.	28
2.4.1.2. Histologie du cancer médullaire de la thyroïde	31
2.4.1.3. Particularités histologiques des CMT héréditaires	31
2.4.1.4. Marqueurs biologiques du CMT	33
2.4.1.4.1. Calcitonine	33
2.4.1.4.2. Antigène carcino-embryonnaire	34
2.4.1.4.3. Temps de doublement des taux sériques de la calcitonine	34
2.4.1.5. Altérations génétiques somatiques des CMT sporadiques	35
2.4.1.6. Caractérisation moléculaire des CMT	36
2.4.2. Prise en charge clinique du CMT	37
2.4.2.1. Diagnostic, bilan pré-thérapeutique, stadification et pronostic	37
2.4.2.2. Pronostic	41
2.4.3. Prise en charge thérapeutique du CMT	41
2.4.3.1. Traitement initial de la tumeur primitive	41
2.4.3.2. Maladie avancée et métastatique	41
2.5. Modèles expérimentaux de CMT/NEM2	42
2.5.1. Souris transgéniques	42
2.5.2. Autres modèles	43

	2.5.3.	Lignées humaines	44
	2.5.4.	Cellules souches cancéreuses de CMT	45
3. (CRISPE	R/Cas 9 et ingénierie du génome	46
3.1	I.Introd	luction	46
3.2	2. Le sy	stème CRISPR/Cas9 est impliqué dans l'immunité bactérienne	46
3.3	3. Utilisa	ation du système CRISPR/Cas9 de type II pour l'ingénierie du génome	48
3.4	1. Spéci	ficité de la nucléase Cas9	51
3.5	5. Exten	sion du spectre d'activité du système CRISPR : Cas9	52
3.6	6. Applic	cation du système CRISPR en oncologie	53
4. l	_es Cel	lules souches embryonnaires et cellules souches pluripotentes induites	57
4.1	I.Cellul	es souches : définitions	57
4.2	2. Isoler	nent des cellules souches embryonnaires	59
4.3	3. Cellul	es souches pluripotentes induites	60
4	4.3.1.	Reprogrammation des cellules différenciées en CSPi	60
4	4.3.2.	Evènements moléculaires survenant au cours de la reprogrammation.	62
4	4.4. C	aractérisation de la pluripotence	65
4	4.4.1.	Marqueurs de pluripotence	65
4	4.4.2.	Autres caractérisations	66
4.5	5. Applio	cations du système CRISPR/Cas 9 dans la recherche sur les cellules	
SO	uches		67
4.6	6. Cellul	es souches pluripotentes en cancérologie	68
2	4.6.1. oncolog	Applications biomédicales potentielles des CSPi dans la recherche en jie	68
2	4.6.2.	Reprogrammation de cellules cancéreuses : lignées et cellules primair 72	es
4	4.6.3.	Modélisation de la progression du cancer avec les CSPi	75
4	4.6.4.	Modélisation de syndromes de prédisposition liés aux cancers	77
4.7	7. Différ	enciation des CSP en cellules souches de la crête neurale	78
2	4.7.1. différen	Voies de signalisations et facteurs de transcription impliqués dans la ciation en crête neurale	78
4	4.7.2.	Protocoles de différenciation in vitro	81
4	4.7.3.	Crête neurale et NEM2	82
OBJ	ECTIFS	5	84
1)	Géné	ration de cellules souches pluripotentes induites (CSPi) porteuses de	
mu	utation	de RET	85
de de	e mutati Gustav	ions <i>RET</i> cryoconservées et disponibles auprès du service de Génétiqu ve Roussy	ie 85
2) co	Évalu rrection	ation des effets phénotypiques et génomiques d'une lignée CSPi après de la mutation de <i>RET</i>	85

	3) Différenciation des CSPi mutées RET en cellules souches de la crête neurale : étude des capacités de différenciation et analyse comparative de l'expression des gènes	.,
R	-SUI TATS 86	5
	 Génération de cellules souches pluripotentes induites (CSPi) porteuses de nutation de RET	,
	Article 1:	
	Seneration of an RET-mutated induced pluripotent stem cell line from a patient with hereditary multiple endocrine neoplasia 2A (MEN2A) syndrome with <i>RET</i> mutation91	
	 Évaluation des effets phénotypiques et génomiques d'une lignée CSPi après correction de la mutation de RET)
	Article 2 (soumis):	
	Franscriptional landscape of a <i>RET^{C634Y}</i> -mutated iPSC and its CRISPR-corrected sogenic control reveals the putative role of EGR1 trancriptional program in the development of multiple endocrine neoplasia type 2A-associated tumors)
	3) Différenciation des CSPi mutées RET en cellules souches de la crête neurale : étude des capacités de différenciation et analyse comparative de l'expression des gènes)
	Article 3 (en préparation):	
	Human neural crest stem cells downregulate integrins network in the presence of RET mutations, a putative molecular mechanisms of the development of neural crest associated MEN2 features	
D	SCUSSION - PERSPECTIVES 173	;
В	3LIOGRAPHIE	;
A	INEXES	
	Annexe 1 : Revue sur la prise en charge du CMT avancé <i>(Lancet Diabetes</i> Endocrinol. 2016 Jan;4(1):64-71)	<u>,</u>
	Annexe 2: Séquences des plasmides décrits dans le manuscrit)

TABLE DES FIGURES & TABLEAUX

Figure 1: Caractéristiques de la cellule cancéreuse, adapté de (Hanahan and
Weinberg, 2011) 15
Figure 2: modèle d'évolution clonale et de cellules souches cancéreuses, adapté de
(Visvader and Lindeman, 2012) 16
Figure 3: Réseau moléculaire de l'activation de la transition mésenchymo-épithéliale
et de suppression de la transition épithélio-mésenchymateuse par les facteurs de
reprogrammation d'après (Li et al., 2010b) 19
Figure 4 : Récepteur Ret, activation de la signalisation par dimérisation 24
Figure 5: facteurs moléculaires au cours de la différenciation des cellules C chez la
souris
Figure 6: Progression tumorale des cellules C vers le CMT, d'après Dr A. Al Ghuzlan
Figure 7: épisage différentiel du gène CALCA en fonction de la cellule
Figure 8 Fonctionnement du système CRISPR de type II, d'après Zhang lab
(genome-engineering.org) 47
Figure 9 : Mécanismes de réparation après cassure double brin par Cas9 d'après
Hsu, Lander et zhang, Cell 2014 49
Figure 10: nCas9 à activité nickase associée en paire afin de générer une cassure
double brin, d'après Ran et al 2013 52
Figure 11: Les différents types de cellules souches et leur capacité de différenciation
(adapté de http://svt.ac-dijon.fr 58
Figure 12: Reprogrammation de cellules sanguines de patients avec le virus Sendaï,
d'après O.Féraud 61
Figure 13: Mécanismes moléculaires de la reprogrammation, adapté de (Xu et al.,
2016) et d'après (Cacchiarelli et al., 2015) 62
Figure 14: Applications potentielles des CSPi en recherche en cancérologie D'après
Saul J. Sharkis et al., Sci Transl Med 2012 70
Figure 15: Formation du tube neural et individualisation/migration des cellules de la
crête neurale (adapté de http://www.embryology.ch) 79
Figure 16: Caractérisation de la lignée CSPi PB46 RET ^{C620R}
Figure 17: Caractérisation de la lignée CSPi PB50 RET ^{M918T}

Figure 18 : Expression de ret par cytométrie en flux dans les lignées TT, MZCRC et CSPi
Figure 19: Expression relative de Ret dans les lignées de CMT et les CSPi
Figure 20: Mise au point et utilisation du système CRISPR dans les lignées 293T et
Figure 21: comparaison des CSPi RET^{C634Y} et RET^{Y634C}
Figure 22: foyer adénocarcinomateux observé dans un tératome secondaire issu de la CSPi <i>RET^{M918T}</i>
Figure 23: Immunohistochimie chromogranine A des tératomes issus des différentes
CSPi (x100)
Figure 24: Immunohistochimie calcitonine sur les tératomes issus des différentes
CSPi (x100)
Figure 25 : Analyse comparative de transcriptome de CSCN, cellules souches
endodermiques, CSE et CMT. Expression des marqueurs de cellules souches de la
crête neurale par les lignées de CMT 177
Tableau 1 : Corrélation génotype-phénotype dans les NEM2, d'après (Wells et al.,2015b)26

/	-
Tableau 2: embryologie de la thyroïde	. 29
Tableau 3: Mutations somatiques dans les CMT	. 35
Tableau 4: Classification TNM des CMT	. 39
Tableau 5: Stades UICC des CMT	. 40
Tableau 6: Résumé de l'analyse histologique des tératomes générés à partir	des
CSPi	146

INTRODUCTION

1. Introduction de certains concepts en biologie du cancer: maladie clonale, cellules souches, cellule d'origine et syndromes de prédisposition

1.1. Généralités

Le cancer peut être défini comme une maladie dans laquelle des cellules anormales vont croître de manière incontrôlée au sein d'un tissu jusqu'à l'envahir ainsi que les tissus adjacents et à distance. Les cellules normales sont constamment sujettes à une régulation stricte, par des signaux variés, de leur capacité de se diviser, de se différencier, de migrer ou de mourir. Les cellules cancéreuses vont devenir en partie indépendantes de ces différents signaux de régulation cellulaire et vont, dès lors, acquérir différentes caractéristiques clés qui vont être la source de leur pathogénicité. Ces caractéristiques sont : une résistance à la mort cellulaire, une capacité de prolifération illimitée, une capacité à échapper aux signaux inhibiteurs de croissance et à maintenir une signalisation favorisant leur croissance, une capacité d'invasion, de métastase et d'induction d'une néo-angiogénèse pour assurer leur croissance, l'ensemble de ces phénomènes est associé à une dérégulation de leur machinerie métabolique avec acquisition d'une capacité à échapper au système immunitaire. L'apparition de ces différentes caractéristiques, les « hallmarks » de Weinberg et Hanahan, est favorisée par une inflammation pro-tumorigénique et une instabilité génomique entrainant des mutations (Hanahan and Weinberg, 2011) (Figure 1).



Figure 1: Caractéristiques de la cellule cancéreuse, adapté de (Hanahan and Weinberg, 2011) La transformation et l'acquisition des caractéristiques du cancer par une cellule est un processus multi-étapes lié à des modifications génétiques et épigénétiques de la cellule normale qui va se transformer en une cellule tumorale. Cette transformation peut se produire sous l'influence de facteurs externes carcinogènes comme le tabac, par exemple, mais également sous l'influence de facteurs internes comme l'existence d'une mutation germinale de prédisposition au cancer. Dans ce cadre on peut citer les mutations germinales de *TP53*, à l'origine de syndrome de Li-Fraumeni, de *BRCA1* à l'origine des cancers du sein et de l'ovaire familiaux et la mutation germinale du proto-oncogène *RET* (REarranged during Transfection) prédisposant à la survenue de néoplasies endocriniennes multiples : cancer médullaire de la thyroïde (CMT), phéochromocytome, adénome parathyroïdien.

1.2. Évolution clonale et cellules souches cancéreuses.

La majorité des tumeurs présente un degré important d'hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle. Cette hétérogénéité parmi les cellules cancéreuses qui peuplent la tumeur est la conséquence de facteurs intrinsèques comme des altérations génétiques et épigénétiques, et de facteurs extrinsèques comme la variabilité des microenvironnements en fonction des différents organes envahis. Pour expliquer cette hétérogénéité tumorale, deux modèles d'oncogénèse ont été proposés : un premier modèle stochastique de progression tumorale et d'évolution clonale liée à l'instabilité génétique (Nowell, 1976) et un deuxième modèle lié à la différenciation de cellules aux propriétés de cellules souches, souvent appelées cellules souches cancéreuses (Figure 2) (Visvader and Lindeman, 2012).



Figure 2: modèle d'évolution clonale et de cellules souches cancéreuses, adapté de (Visvader and Lindeman, 2012)

Le modèle des cellules souches cancéreuses (CSC) implique une organisation hiérarchique des cellules tumorales et seules quelques cellules sont alors responsables du maintien de la tumorigénèse et de l'hétérogénéité tumorale. Ces CSC ont des capacités d'auto-renouvellement et de différenciation mais ne proviennent pas forcément de la transformation des cellules souches normales tissulaires où s'établit la tumeur. Les CSC sont capables de donner naissance à une nouvelle tumeur quand elles sont injectées chez l'animal et se divisent de manière asymétrique afin d'assurer leur auto-renouvellement et la différenciation en cellules tumorales sans caractéristique de cellule souche. Ce modèle des CSC permettrait d'expliquer la résistance aux traitements de chimiothérapie et radiothérapie ainsi que les rechutes après traitement adjuvant en lien avec leur quiescence. Les CSC ont été identifiées la première fois dans des leucémies aiguës myéloïdes (Bonnet and Dick, 1997) puis dans différentes tumeurs solides comme les cancers du sein, du côlon, du cerveau, du pancréas, du poumon, du foie (Visvader and Lindeman, 2008). Par ailleurs, il a été proposé récemment le concept de plasticité des CSC suggérant que ces populations cellulaires sont dynamiques et que des CSC et des cellules non CSC peuvent s'interconvertir (Gupta et al., 2011) en réponse à des facteurs du microenvironnement ou lors de la transition épithélio-mésenchymateuse par exemple (Mani et al., 2008).

1.3. Caractéristiques communes des cellules souches pluripotentes et des cellules (souches) cancéreuses.

Les cellules souches pluripotentes (CSP) ont la capacité de s'auto-renouveler et de donner naissance aux différents tissus d'origine embryonnaire, y compris la lignée germinale, (à l'exception des cellules extra-embryonnaires) par un processus de différenciation tout en restant elles-mêmes indifférenciées (cf chapitre 4). Ces CSP proviennent de l'embryon et sont appelées cellules souches embryonnaires (CSE) ou sont issues d'une reprogrammation et sont alors des cellules souches pluripotentes induites (CSPi). Les cellules cancéreuses ont certaines caractéristiques qu'on retrouve également dans les CSP : immortalité cellulaire, taux de prolifération élevé, similitudes dans les signatures d'expression de gènes et dans les statuts épigénétiques, instabilité chromosomique et formation de tumeurs après injection chez la souris immunodéficiente (Bernhardt et al., 2012). L'immortalité cellulaire implique une activité télomérase importante détectable à la fois dans les cellules

cancéreuses et dans les CSE/CSPi (Hiyama and Hiyama, 2007). Les CSE/CSPi sont sujettes à une instabilité chromosomique quand elles sont en culture in vitro (Baker et al., 2007; Tosca et al., 2015), l'instabilité chromosomique est également une caractéristique des cellules cancéreuses. De manière intéressante, certaines aberrations structurelles sont observées plus fréquemment; c'est le cas de gains au niveau des chromosomes 12, 17, 20 et X dans les CSE et les CSPi en culture (Laurent et al., 2011; Maitra et al., 2005). Certains de ces gains, en particulier le gain du 20q, sont fréquemment retrouvés dans différents cancers (Kim et al., 2013b).

Il existe également des similitudes entre cellules cancéreuses et cellules souches pluripotentes en ce qui concerne les profils d'expression des gènes (Schoenhals et al., 2009) et les marqueurs épigénétiques (Easwaran et al., 2012). Les cibles des facteurs de pluripotence Nanog, Oct4, Sox2 et c-Myc sont plus souvent surexprimées dans les cancers peu différenciés que bien différenciés ; ceci a été montré dans des échantillons de cancer du sein, de glioblastome et de cancer de la vessie (Ben-Porath et al., 2008). Une hyperméthylation des promoteurs des gènes suppresseurs de tumeur a été observée dans les CSE et une étude de méthylation sur l'ensemble du génome de CSPi a révélé la présence de profils de méthylation de promoteurs anormaux similaires à ceux retrouvés dans des cellules cancéreuses mais pas dans des CSE, ce qui confirme l'idée que reprogrammation et oncogenèse ont des mécanismes moléculaires communs (Ohm et al., 2010). Ceci est corroboré par l'importante expression des facteurs de reprogrammation de Yamanaka, Oct3/4, Klf4, Sox2 and c-Myc (OKSM) dans différents cancers (Bernhardt et al., 2012). La surexpression de c-Myc, dont le rôle transformant est démontré in vitro, est bien documentée dans plusieurs cancers. Klf4 joue un rôle dans le réseau transcriptionnel qui contrôle le maintien de la pluripotence et de l'auto-renouvellement dans les CSE et les CSPi et il joue également un rôle dans la biologie de différentes tumeurs. Son rôle est cependant protéiforme : il a été identifié en tant que gène suppresseur de tumeur (GST), avec une activité dépendant de p21, dans les cancers du côlon et de l'estomac mais il peut aussi agir comme un oncogène par inhibition de p53 ; ces différentes activités sont liées à ses différents variants d'épissage et modifications post-traductionelles (Tetreault et al., 2013). La surexpression d'Oct4 et Sox2, des facteurs clés du maintien de la pluripotence dans les CSP, a été rapportée dans divers cancers (Müller et al., 2016; Schoenhals et al., 2009). D'autres membres de la famille SOX, comme Sox9 sont surexprimés dans les mélanomes (Shakhova et al., 2015), dans les phéochromocytomes (Burnichon et al., 2012). Les facteurs Nanog et Lin28 ont également un rôle important dans le phénotype des CSP et sont retrouvés surexprimés dans les tumeurs ; en particulier, Lin28, est connu pour son rôle inhibiteur dans la maturation du micro-ARN (miARN ou miR) let-7 qui a une activité anti-tumorale (Jeter et al., 2015; Viswanathan et al., 2009). Par ailleurs, il existe plusieurs variants d'épissage et pseudogènes d'Oct4 et Nanog qui ne sont pas associés au maintien de la pluripotence mais qui sont surexprimés au cours de l'oncogenèse ce qui rend plus complexe leur étude en oncologie.

Certains miARN permettent la reprogrammation de cellules somatiques et la dérégulation de ces miARN est associée au développement et à la progression tumorale. Ainsi, la surexpression de miR-302 et miR-200 dans les tumeurs germinales est corrélée à une surexpression d'Oct4 et Nanog qui se lient eux-même à des séquences de régulation de ces miARN (Palmer et al., 2010). Ce miR-302 a été utilisé pour reprogrammer des cellules somatiques diffférenciées de peau en CSPi (Lin et al., 2008). Certains miARN, qui facilitent la transition mésenchymoépithéliale (TME), sont des facilitateurs de reprogrammation comme miR205 et miR 200 (Samavarchi-Tehrani et al., 2010). En effet, un évènement important durant la reprogrammation est la survenue d'une TME qui est assurée par l'inhibition du TGF- β (Tumor Growth Factor β) et de ses récepteurs par cMyc, Oct4 et Sox2 avec Klf4 qui a un rôle dans l'induction de l'expression de la e-cadherine (Figure 3) (Li et al., 2010b) .





Suppression de la signalisation du TGF- β par les facteurs OKSM et inhibition de Snail par Oct4 et Sox2 et activation de la TME par Klf4

La survenue d'une TME est donc une différence importante entre tumorigénèse et reprogrammation car la transition épithélio-mesenchymateuse (TEM) est considérée comme une étape importante dans la progression tumorale et peut être activée par la voie du TGF- β . Cependant, il a été récemment montré que l'invalidation de *SNAIL*, un facteur impliqué dans la TEM diminuait l'efficacité de la reprogrammation alors que sa surexpression augmentait cette efficacité (Unternaehrer et al., 2014). La survenue d'une TEM entraîne l'apparition de caractéristiques de cellules souches au sein des cellules cancéreuses qui l'ont subie (Mani et al., 2008). Il existe donc un lien complexe entre TEM, TME et caractère souche qui ne peut être résumé par l'antagonisme TME-reprogrammation vs TEM-progression tumorale.

La surexpression de facteurs de pluripotence par les cellules tumorales implique non seulement que les CSP et les cellules cancéreuses partagent certaines caractéristiques mais également que la reprogrammation et l'oncogénèse sont médiées par certains mécanismes moléculaires communs. Il a été montré que la sénescence constitue une barrière à la reprogrammation et que l'immortalisation des cellules via l'invalidation de certains éléments de la voie p19(Arf)-p53 augmente l'efficacité de la reprogrammation jusqu'à 40 fois. Par ailleurs, la voie p53-p21 bloque le processus de reprogrammation et la mutation p53, impliquée dans l'oncogénèse, facilite la reprogrammation des cellules somatiques (Bernhardt et al., 2012). Il existe donc des effecteurs communs entre les processus d'oncogénèse et de reprogrammation ce qui laisse penser que l'étude du processus de reprogrammation pourrait accroître les connaissances sur les mécanismes de la progression tumorale et éventuellement permettre d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques.

1.4. Cellule d'origine, syndrome de prédisposition au cancer et intérêt des cellules souches

La cellule d'origine du cancer est une cellule normale appartenant à un tissu donné et qui va acquérir la première mutation oncogénique à l'origine de la tumeur maligne. Dans ce modèle, la transformation n'est pas nécessairement liée aux cellules souches cancéreuses qui entretiennent le phénotype tumoral et reconstituent, à terme, la hiérarchie cellulaire des tumeurs par un phénomène de dédifférenciation en rapport avec la « plasticité » des cellules souches. A l'inverse, lorsque la transformation a lieu dans une cellule normale mais ayant une potentialité, « souche », la cellule d'origine est également une cellule souche cancéreuse et elle

est capable de maintenir le renouvellement des cellules tumorales par ses capacités d'autorenouvèlement. Dans la première hypothèse, le phénotype de CSC peut être acquis après plusieurs altérations génétiques par des cellules descendantes de la cellule d'origine initiatrice (Visvader, 2011). La mise en évidence des cellules d'origine pour un certain nombre de tumeurs a été permise par des expériences de « lineage tracing » chez la souris et de « barcoding » dans des xénogreffes de cellules humaines chez la souris (Blanpain and Simons, 2013; Nguyen et al., 2014).

La cellule d'origine, qui est la cible du premier évènement transformant qui va donner naissance au cancer, est particulièrement intéressante à étudier dans le cadre des syndromes de prédisposition au cancer, en particulier quand il existe une prédisposition à plusieurs tumeurs dans différents tissus. Le modèle le mieux étudié est celui du cancer du sein BRCA1 dont la présentation anatomopathologique habituelle est une tumeur triple négative de type « basal-like ». Cela laissait supposer que la cellule d'origine de ces tumeurs BRCA1 mutées triple négatives était la cellule souche mammaire basale. Cependant, cette hypothèse a été infirmée et il a été montré que la cellule d'origine de ces tumeurs était le progéniteur de type luminal (Lim et al., 2009). L'identification du progéniteur luminal comme étant la cellule d'origine du cancer du sein BRCA1 muté triple négatif soulève une autre question qui n'a pas de réponse à l'heure actuelle : est-ce que ce progéniteur est strictement similaire à un même progéniteur n'ayant pas de mutation hétérozygote de BRCA1? Autrement formulé : est ce que la présence d'une mutation germinale a une influence sur le phénotype des progéniteurs ? Il a été montré qu'une inactivation homozygote de BRCA1 entraîne une mort embryonnaire au jour 7.5 avec des embryons peu développé en raison d'un déficit de la prolifération cellulaire et une absence de mésoderme (Hakem et al., 1996). Cependant, les conséquences, à l'échelon cellulaire, d'une mutation BRCA1 hétérozygote au cours du développement embryonnaire et de la différenciation ne sont pas connues. On peut imaginer que cette anomalie génétique germinale entraîne des anomalies discrètes des progéniteurs luminaux étant donné l'activation de la voie PKC theta observée dans les CSPi avec mutation hétérozygote de BRCA1 dont nous rediscuterons dans la suite de cette introduction (Soyombo et al., 2013).

L'étude de syndrome de prédisposition au cancer sous le prisme des cellules souches (cancéreuses et pluripotentes) et des cellules d'origine permet donc de poser des questions relatives aux mécanismes moléculaires prédisposant une cellule

ou des cellules dans un ou différents organes à se transformer. Ce sont ces questions que nous souhaitons aborder dans cette thèse concernant les cancers médullaires de la thyroïde et les phéochromocytomes survenant dans le cadre des néoplasies endocriniennes multiples de type 2 liées aux mutations germinales de *RET*.

2. Les Néoplasies endocriniennes multiples de type 2 et CMT familiaux

2.1. Mutations germinales du gène RET

En 1961, à l'occasion d'une revue de 537 cas de phéochromocytome de la littérature, Sipple a calculé que la co-occurrence de néoplasies thyroïdiennes représentait une incidence de 112 cas pour 10 000 soit 14 fois l'incidence attendue; par conséquent, il a émis l'hypothèse d'un lien entre les deux maladies qu'il expliquait par un rôle possible des sécrétions de catécholamines (Sipple, 1961). En 1965, Williams a examiné 17 cas d'associations de cancer de la thyroïde et de phéochromocytomes de la littérature et a émis l'hypothèse qu'une prédisposition génétique pourrait être la cause de cette association (Williams, 1965). Les principales caractéristiques de ce syndrome clinique étaient la fréquence du type médullaire des cancers de la thyroïde, l'incidence élevée de tumeurs bilatérales des glandes surrénales et l'existence d'antécédents familiaux de cancer de la thyroïde. Ces études fondatrices conduirent à l'identification du syndrome des néoplasies endocriniennes multiples de type 2 (NEM2) qui sont subdivisées en NEM2A qui associent CMT, phéochromocytome, hyperparathyroïdie, lichen cutané amyloïde et en NEM2B qui associent CMT, phéochromocytome, habitus marfanoïde, anomalies oculaires, ganglioneuromatose (Wells et al., 2013). Les cancers médullaires de la thyroïdes familiaux (CMTF) sont maintenant rattachées aux NEM2A avec survenue exclusive de CMT (Wells et al., 2015a). Les NEM2 sont des maladies héréditaires autosomiques dominantes dont la physiopathologie est liée à des mutations du proto-oncogène RET (Rearranged pendant Transfection) (Takahashi et al., 1985), dont le locus est situé sur le chromosome 10q11.2 (Ishizaka et al., 1989; Simpson et al., 1987) avec différentes mutations causant différents syndromes (Carlson et al., 1994; Donis-Keller et al., 1993; Eng et al., 1994a; Hofstra et al., 1994; Mulligan et al., 1993).

La quasi-totalité des patients atteints de NEM2 a une mutation germinale du gène *RET* (Wells et al., 2013). Le gène *RET* code un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase composé d'un domaine extracellulaire avec 4 domaines type « cadhérine-like » et une région riche en cystéines immédiatement externe à la membrane, d'une région transmembranaire unique et d'un domaine tyrosine kinase intracellulaire (Figure 4). Il existe trois isoformes de la protéine Ret, qui diffèrent à leur extrémité C-terminale avec 9, 43 et 51 acides aminés respectivement (RET9,

RET 43 et RET 51) (Mulligan, 2014; Myers et al., 1995; Tahira et al., 1990) et qui ont été conservées au cours de l'évolution (Carter et al., 2001).



Figure 4 : Récepteur Ret, activation de la signalisation par dimérisation.

Le récepteur Ret s'associe à un co-récepteur de la famille du GFR α (GDNF (Glial Cell Derived Neurotrophic Factor) Receptor), dont il existe 4 membres, pour former un récepteur d'un ligand de la famille du GDNF. Les ligands de la famille du GDNF se lient au co-récepteur GFR α ce qui va entraîner le recrutement du récepteur Ret et sa dimérisation qui va induire l'autophosphorylation activatrice de son domaine tyrosine kinase et l'activation des voies de signalisation en aval.

Des mutations ponctuelles de *RET* peuvent entraîner une activation constitutionnelle du domaine tyrosine kinase du proto-oncogène. La mutation du codon 634, qui se produit au niveau des domaines riches en cystéines juxtamembranaires, entraîne la dimérisation du récepteur en l'absence de ligand, l'augmentation de l'autophosphorylation du domaine tyrosine kinase et l'activation constitutive des voies de signalisation d'aval. La mutation du codon 918, qui se produit au niveau du domaine tyrosine kinase, provoque une autophosphorylation constitutionnelle de Ret mais ne provoque pas de dimérisation du récepteur (Gujral et al., 2006). Les mutations causales des NEM2A affectent le domaine extracellulaire riche en cystéine juxta-membranaire, chacune entraînant la conversion d'une cystéine en un autre acide aminé, au niveau des codons 634 (exon 11) ou des codons 609, 611, 618, et 620 (exon 10). Ces mutations représentent 98% de toutes les mutations associées aux NEM2A; la mutation la plus courante, représentant plus de 80% de toutes les mutations associées aux NEM2A, affectant le codon 634 (Kouvaraki et al., 2005; Wells et al., 2013).

Chez environ la moitié des patients atteints de CMTF, les mutations affectent l'exon 10, au niveau des codons 618 et 620 principalement et, dans un nombre limité de familles, des mutations affectent l'exon 11 (codons 630, 631 ou 634). On retrouve également des mutations affectant l'exon 13 (codons 768, 790, 791), l'exon 14 (codons 804, 844) et l'exon 15 (codon 891) dans le domaine intra-cellulaire du gène chez un nombre croissant de patients (Niccoli-Sire et al., 2001).

Chez environ 95% des patients atteints de NEM2B, une seule mutation convertissant une méthionine en une thréonine au niveau du codon 918 (exon 16) a été identifiée (Carlson et al., 1994; Eng et al., 1994b; Hofstra et al., 1994). D'autres mutations impliquent le codon 883 (exon 15) ou des mutations doubles. Les familles avec deux ou plusieurs cas de CMT dans lesquelles aucune mutation du proto-oncogène *RET* n'a été identifiée dans l'un de ces 7 exons sont extrêmement rares et justifient la réalisation d'un séquençage complet du gène *RET*.

2.2. Corrélation génotype/phénotype

Il existe une relation étroite entre génotype et phénotype dans le cadre des NEM2 qui est résumée dans le Tableau 1.

Le risque de phéochromocytome est d'environ 50% chez les sujets présentant une mutation du codon 634 et de 8% chez les sujets ayant une mutation dans l'exon 10. Des phéochromocytomes ont été rapportés chez de rares patients avec des mutations dans les codons 790, 791, 804, et 891. Les phéochromocytomes survenant chez les patients atteints de NEM2 sont souvent bilatéraux (82% dans une large série américaine), sécrètent des métanéphrines et des normétanéphrines et ne sont quasiment jamais malins (Thosani et al., 2013). Presque toutes les familles présentant des cas d'hyperparathyroïdie ou de lichen cutané amyloïde ont une mutation du codon 634. Les familles chez qui s'associent NEM2A et maladie de Hirschsprung ont des mutations de l'exon 10 au niveau des codons 609, 618 ou 620.

	Exon	Risque	Incidence	Incidence	LCA	Hirschprung
Mutation		d'agressivité				
		СМТ	pheo	nrin		
G533C	8	Modéré	+	-	Ν	Ν
C609F/G/R/ S/Y	10	Modéré	+/++	+	Ν	0
C611F/G/S/ Y/W	10	Modéré	+/++	+	Ν	Ο
C618F/R/S	10	Modéré	+/++	+	Ν	0
C620F/R/S	10	Modéré	+/++	+	Ν	0
C630R/Y	11	Modéré	+/++	+	Ν	Ν
D631Y	11	Modéré	+++	-	Ν	Ν
C634F/G/R/ S/W/Y	11	Élevé	+++	++	0	Ν
K666E	11	Modéré	+	-	Ν	Ν
E768D	13	Modéré	-	-	Ν	Ν
L790F	13	Modéré	+	-	Ν	Ν
V804L	14	Modéré	+	+	Ν	Ν
V804M	14	Modéré	+	+	0	Ν
A883F	15	Élevé	+++	-	Ν	Ν
S891A	15	Modéré	+	+	Ν	Ν
R912P	16	Modéré	-	-	Ν	Ν
M918T	16	Très élevé	+++	-	Ν	Ν

Tableau 1 : Corrélation génotype-phénotype dans les NEM2, d'après (Wells et al., 2015b)CMT= carcinome médullaire de la thyroïde, LCA = lichen Cutané Amyloïde, pheo=phéochromocytome, HPTH = hyperparathyroïdie.

Incidence Pheo et HPTH :+ =~10%; ++ =~20%-30%; +++ =~50%.

Hirschrpung : O = association possible, N = pas d'association décrite.

Par rapport aux sujets porteurs de mutations du codon 634, le CMT clinique se révèle habituellement plus tard dans la vie et avec une moindre agressivité chez les sujets avec des mutations dans les exons 10, 13, 14 ou 15. L'agressivité du CMT peut varier entre les familles, mais est plus constante à l'intérieur d'une famille donnée, suggérant un rôle de la composante génétique familiale. Les mutations de

codon 634 et 918 sont associées à la première apparition du cancer médullaire de la thyroïde à l'âge de 15 et 9 mois respectivement (Machens et al., 2003). La corrélation agressivité clinique/âge précoce de survenue du CMT et génotype est traduite dans la classification en 3 niveaux de risques des recommandations de l'association américaine d'étude de la thyroïde (ATA) qui distinguent les mutations à risque modéré (ex :mutation du codon 620), à risque élevé (ex : mutation du codon 634) et à risque très élevé (mutation du codon 918) (Wells et al., 2015b). Le pronostic des patients atteints de NEM2 est clairement corrélé au pronostic du CMT associé car les phéochromocytomes sont le plus souvent bénins, découverts lors d'une surveillance systématique et résécables complètement.

2.3. Comment expliquer la survenue de tumeurs neuroendocrines chez les patients atteints de mutations germinales de *RET*?

Les mutations du proto-oncogène RET jouent un rôle central dans la physiopathologie du CMT et des NEM2. Cependant, la raison de la spécificité du spectre clinique des tumeurs dans ce syndrome est inconnue. En effet, il est frappant de constater que des mutations activatrices d'un oncogène, héritées dans le cadre d'un syndrome autosomique dominant, n'entraîne que la formation de tumeurs neuroendocrines (CMT, phéochromocytomes, hyperparathyroïdies) dont l'origine embryologique est, principalement ou en partie, issue de la crête neurale tandis qu'elle est impliquée dans le développement de tumeurs sporadiques du poumon ou par translocation ou mutations (Mulligan, 2014). La régulation du sein transcriptionnelle de RET implique, entre autres, PAX3, SOX10 et PHOX 2b qui sont des facteurs de transcription clés de la différenciation des crêtes neurales et on peut émettre l'hypothèse que cette régulation transcriptionnelle puisse expliquer l'activation « contexte-spécifique » de l'activité oncogénique de Ret (Lang and Epstein, 2003; Leon et al., 2009). En outre, l'association de Ret à différents membres de la famille des co-récepteurs GFR pourrait expliquer le développement de tumeurs tirant leur origine embryologique des crêtes neurales. Enfin, les mécanismes moléculaires qui collaborent avec RET pour la transformation sont mal connus; les études de séquençage ont été relativement décevantes pour démêler ces mécanismes car elles n'ont pas mis en évidence de mutations redondantes aossociées aux mutations de RET.

L'influence de la présence d'une mutation activatrice de *RET* dès le stade de la CSE et les mécanismes moléculaires susceptibles de favoriser l'émergence ultérieure de tumeurs dès le stade CSE ne sont pas connus et sont l'objet de ce travail de thèse.

2.4. Le cancer médullaire de la thyroïde

Le CMT résulte d'une transformation maligne des cellules parafolliculaires (ou cellules C) de la thyroïde, productrices de calcitonine, et représente 3 à 5% de l'ensemble des cancers de la thyroïde. Le CMT peut être sporadique ou héréditaire dans le cadre des NEM2 (Wells et al., 2013). Les CMT héréditaires représentent 25% de l'ensemble des CMT, sont de transmission autosomique dominante et ont une pénétrance liée à l'âge et au génotype avec une relation génotype-phénotype bien documentée.

Les données anatomopathologiques, génétiques, de biomarqueurs ainsi que la physiopathologie et les modèles tumoraux disponibles seront détaillées dans cette première partie.

2.4.1. Anatomo-pathologie, biomarqueurs, génétique et modèles tumoraux

2.4.1.1. La cellule C (ou parafolliculaire) normale et son développement

Au cours de l'embryogénèse, au 44^{ème} jours post conception (18^{ème} stade de Carnegie), les corps ultimobranchiaux, qui portent les cellules C et qui sont originaires de la 4^{ème} poche pharyngée , fusionnent avec les lobes thyroïdiens en formation (Nilsson and Fagman, 2013; O'Rahilly, 1973; Szinnai, 2014) (

Tableau

2).

Date d'apparition au cours de l'embryogénèse humaine

Spécification de l'ébauche médiane au niveau			
du plancher de l'intestin antérieur	22 JPC, 3C 10		
Bourgeonnement de l'ébauche thyroïdienne	26 ^{ème} JPC, SC 12		
Individualisation des corps ultimobranchiaux	37 ^{ème} JPC, SC15		
Migration de l'ébauche thyroïdienne et des corps ultimobranchiaux	28-48 ^{ème} JPC, SC 13-19		
Fusion des corps ultimobranchiaux avec les lobes thyroïdiens	44 ^{ème} JPC, SC18		
Différenciation terminale	48-80 ^{ème} JPC, SG 7-11		
Formation des follicules	73-80 ^{ème} JPC, SG 10-11		
Début de la synthèse des hormones thyroïdiennes	80 ^{ème} JPC, SG 11		

Tableau 2: embryologie de la thyroïde

JPC: Jour Post Conception, SC: Stade de Carnegie, SG: Semaine Gestationnelle.

Le développement des corps ultimobranchiaux et du mésenchyme pharyngien dérivé des crêtes neurales est dépendant de l'expression du facteur de transcription Hes1 (Kameda et al., 2013). Son invalidation chez la souris entraîne une diminution de 65 à 78% du nombre de thyrocytes mais également des cellules C (Carre et al., 2011). Les cellules C, qui vont envahir la thyroïde à partir des corps ultimobranchiaux, vont proliférer suite à l'activation des facteurs de transcription MASH1 (ASCL1) et NKX2-1 (TTF1), ce qui est confirmé par le phénotype des souris invalidées pour ces 2 gènes qui présentent une diminution des cellules C (Kameda et al., 2007a; Kusakabe et al., 2006). NKX2-1 est également important pour la fusion des corps ultimobranchiaux avec la thyroïde (Kusakabe et al., 2006). Les facteurs moléculaires impliqués dans le développement embryonnaire chez la souris sont résumés dans la Figure 5.



Figure 5: facteurs moléculaires au cours de la différenciation des cellules C chez la souris

Les données histologiques des tissus embryonnaires de souris invalidées pour différents facteurs de trancription ont permis d'établir les facteurs importants pour le développement des cellules C. Cependant, il n'est pas démontré que les mêmes facteurs soient impliqués chez l'homme, même si on peut s'attendre à une certaine similitude. Il a ainsi été montré, que, au niveau de la 4^{ème} poche pharyngienne, c'est NKX2-1 qui est exprimé chez la souris et PAX8 est exprimé chez l'homme.

Les cellules C présentent des caractéristiques neuroendocrines similaires à d'autres cellules neuroendocrines disséminées dans d'autres organes comme, par exemple, les cellules chromaffines de la surrénale. Sur le plan embryologique, elles ont été rapportées comme étant originaires de la crête neurale depuis les études cytochimiques menées chez le rongeur, le poulet (Pearse and Carvalheira, 1967; Polak et al., 1974) et la chimère caille-poulet (Le Douarin and Le Lièvre, 1970). Cependant, des expériences de « lineage tracing » chez la souris (Kameda et al., 2007b) et l'existence de carcinomes mixtes médullaires et papillaires (Nangue et al., 2009; Verdi et al., 2013) ont remis en question cette origine embryologique. Les données concernant l'embryologie des cellules C seront abordées plus loin dans cette introduction. Les cellules C sont localisées au sein des follicules thyroïdiens,

entre la membrane basale et les cellules folliculaires et représentent 0.1% des cellules thyroïdiennes. Elles sont retrouvées principalement à la jonction du tiers supérieur et du tiers moyen des lobes thyroïdiens et sont plus nombreuses chez l'homme que chez la femme.

2.4.1.2. Histologie du cancer médullaire de la thyroïde.

Le CMT en tant qu'entité clinicopathologique a été décrit par Hazard, Hawk et Crile en 1959 (Hazard et al., 1959) à partir d'une série anatomopathologique de 21 tumeurs caractérisées par une structure solide non folliculaire avec présence de substance amyloïde dans le stroma et une fréquence importante de métastases ganglionnaires. La cellule C (ou parafolliculaire) est la cellule d'origine du CMT (Williams, 1966) ; cette cellule produit de la calcitonine en réponse à l'hypercalcémie (Hazard, 1977). Macroscopiquement, la tumeur a une consistance ferme le plus souvent, de couleur pâle ou rougeâtre et elle est clairement délimitée par rapport au tissu environnant ou clairement invasif (Rosai 1992). Les tumeurs sont localisées, comme les cellules C, à la jonction du tiers supérieur et du tiers moyen des lobes thyroïdiens. Microscopiquement, le CMT est caractérisé par des amas de cellules étoilées, rondes ou polygonales séparées par un stroma fibreux et pouvant former des structures d'aspects différents, de trabéculaire à endocrine. Les noyaux sont réguliers et les mitoses sont rares, et le cytoplasme est éosinophile avec un aspect finement granuleux. La présence de matériel amyloïde dans le stroma est évocatrice et il est composé de calcitonine (Khurana et al., 2004). Le diagnostic différentiel avec une métastase de tumeur neuroendocrine d'origine trachéale ou laryngée peut être difficile, en particulier celles qui expriment la calcitonine (15% des cas). En effet, le diagnostic de CMT est posé par la positivité en immunohistochimie pour la calcitonine et l'ACE (Antigène Carcino-Embryonnaire). Des carcinomes mixtes sont observés dans 4 à 19% des cas (Machens and Dralle, 2012) et associent une composante médullaire et folliculaire (Biscolla et al., 2004). L'existence de ces carcinomes mixtes est une des données remettant en cause l'origine crête neurale des cellules C.

2.4.1.3. Particularités histologiques des CMT héréditaires.

La première caractéristique anatomopathologique spécifique observée dans les maladies héréditaires est l'hyperplasie des cellules C, visibles principalement grâce à l'immuno-histochimie anti calcitonine. L'hyperplasie des cellules C (HCC) est définie par une augmentation du nombre de cellules C (plus de 7 cellules par îlot de cellules C, des follicules entièrement entourés de cellules C et une distribution des cellules C au-delà de leur localisation anatomique habituelle (LiVolsi, 1997; Mete and Asa, 2013).

L'oncogénèse conduisant au CMT est, à l'instar de celle de l'adénocarcinome colo-rectal par exemple, un processus multiétape, l'hyperplasie des cellules C étant une lésion pré-néoplasique (Wolfe et al., 1973). De ce fait, les HCC bilatérales sont considérées comme des lésions pré-tumorales chez les patients atteints de NEM2 où elles sont présentes dans quasiment tous les cas et peuvent être associées à des micro CMT (< 1cm) (Etit et al., 2008; Kaserer et al., 1998). Les CMT héréditaires sont donc caractérisés par leur développement à partir des HCC, leur bilatéralité et leur multicentricité alors que les CMT sporadiques sont généralement des tumeurs uniques, bilatérales dans moins de 10% des cas ((Miyauchi et al., 2002) (Figure 6).



Figure 6: Progression tumorale des cellules C vers le CMT, d'après Dr A. Al Ghuzlan et (Machens et al., 2003)

Cependant, il faut distinguer les HCC « néoplasiques » des HCC « réactionnelles » qui peuvent être associées à l'hypercalcémie, aux hyperparathyroïdies ou à différentes maladies thyroïdiennes comme les thyroïdites auto-immunes où elles sont présentes dans 20% des cas. Les HCC « réactionnelles » ne se compliquent pas de CMT et ne sont donc pas considérées comme des lésions pré-tumorales (Guyétant et al., 2003, 2006; Kaserer et al., 1998).

2.4.1.4. Marqueurs biologiques du CMT

2.4.1.4.1. Calcitonine

La calcitonine est un peptide de 32 acides aminés qui est spécifiquement sécrété par les cellules C (Costante et al., 2009; Demers and Spencer, 2003). Le gène *CALCA* (calcitonin-related polypeptide alpha) est situé sur le bras court du chromosome 11 (11p15.2) et code la calcitonine ainsi qu'un second peptide, le calcitonin gene-related peptide (CGRP). Par épissage alternatif du transcrit primaire de ce gène, les cellules C vont générer l'ARNm de la calcitonine tandis que les cellules neurales vont générer l'ARNm du CGRP (Figure 7).



Figure 7: épissage différentiel du gène CALCA en fonction de la cellule

La traduction de l'ARNm de la calcitonine donne naissance à la préprocalcitonine dont le clivage va générer un peptide signal de 21 acides aminés (AA) et la procalcitonine qui sera elle-même ensuite clivée en calcitonine (57 AA en N-terminal) et en katacalcine (21 AA C-terminal)

La calcitonine est impliquée dans la régulation du métabolisme osseux. Sa sécrétion est régulée par le calcium extra-cellulaire : une augmentation du calcium stimule la sécrétion de calcitonine. D'autres substances comme la gastrine (et la pentagastrine), les agonistes β -adrenergiques, la GHRH (Growth Hormone Releasing Hormone) et plusieurs peptides d'origine intestinale peuvent stimuler la sécrétion de calcitonine par les cellules C.

La concentration normale dans le sérum est inférieure à 10 pg/ml et les concentrations basales de calcitonine sont plus élevées chez les hommes que chez les femmes. Les causes de faux positifs sont: l'insuffisance rénale sévère, l'hyperparathyroïdie, les thyroïdites auto-immunes, certaines tumeurs folliculaires et les tumeurs neuroendocrines du pancréas ou des voies respiratoires dans 15% des cas. Chez les patients atteints de CMT, les concentrations de calcitonine sériques sont corrélées à la masse tumorale et leur taux pré-opératoire est prédictif de l'étendue de la maladie et de la probabilité de guérison (Cohen et al., 2000; Machens et al., 2005). Il existe de rares CMT (<1% des patients), souvent mal différenciés, qui ne produisent que peu voire pas de calcitonine (Frank-Raue et al., 2013).

2.4.1.4.2. Antigène carcino-embryonnaire

L'ACE est produit par les cellules C néoplasiques (mais également dans d'autres néoplasies comme celles du côlon par exemple). La concentration sérique d'ACE est normale chez les patients avec un CMT pré-clinique. La mesure de la concentration sérique d'ACE est utile au cours du suivi, car de fortes concentrations ou des concentrations augmentant rapidement indiquent une agressivité tumorale et une progression de la maladie (Demers and Spencer, 2003; Mendelsohn et al., 1984).

2.4.1.4.3. Temps de doublement des taux sériques de la calcitonine

Au moins 4 mesures sérielles des taux sériques de la calcitonine et de l'ACE permettent la détermination de leur temps de doublement. Ce temps de doublement peut varier de quelques mois à plusieurs années d'un patient à un autre mais reste relativement stable pour un même patient. Le niveau de calcitonine sérique étant, chez un patient donné, étroitement liée au volume de la tumeur, son temps de doublement est un fort prédicteur de la progression tumorale (Giraudet et al., 2008) et de survie (Barbet et al., 2005). Un temps de doublement de la calcitonine entre 6 mois et 2 ans est associé à des taux de survie à 5 et 10 ans de 92% et 37%, alors qu'un temps de doublement de moins de 6 mois est associé à des taux de survie à 5 et 10 ans de 25% et 8%, respectivement. En général, les temps de doublement de l'ACE et de la calcitonine sont étroitement liés mais il peut arriver que l'ACE augmente sans variation de la calcitonine.
2.4.1.5. Altérations génétiques somatiques des CMT sporadiques

Des mutations somatiques ont été identifiées chez 53-94% des patients porteurs de CMT sporadique. La mutation du codon 918 de *RET* (M918T), similaire à celle retrouvée dans les NEM2B, représente 85% des mutations somatiques de *RET* trouvées dans les CMT sporadiques et elle est associée à un mauvais pronostic (Elisei et al., 2008). Dans une étude sur 160 tumeurs sporadiques, il a été observé que la prévalence de la mutation M918T augmentait de 11% dans les CMT <2cm, à 32% dans les CMT de 2 à 3 cm et 59% dans les tumeurs> 3cm. Ces données soulèvent la question du rôle « driver » de la mutation *RET* dans la physiopathologie du CMT (Romei et al., 2012). D'autres mutations somatiques sont rares et concernent les codons 634, 618, 768, 804 et 883 et des délétions partielles du gène *RET*.

Des mutations de *RAS* (principalement *HRAS*, *KRAS* et rarement *NRAS*) ont été trouvées dans 10 à 26% des CMT et sont mutuellement exclusives des mutations de RET dans la très grande majorité des cas. Les données de la littérature sont résumées dans le Tableau 3.

	Nombre	Mutation			
Auteur	tumeurs analysées	RET+ RAS-	RET+ RAS+	RET- RAS+	RET- RAS-
(Moura et al., 2011)	65	39 (60%)	1 (2%)	17 (26%)	8 (12%)
(Boichard et al., 2012)	50	34 (68%)	0	13 (26%)	3 (6%)
(Agrawal et al., 2013)	57	43 (75%)	0	9 (16%)	5 (9%)
(Ciampi et al., 2013)	188	80 (43%)	0	19 (10%)	89 (47%)
(Simbolo et al., 2014)	20	13 (65%)	0	4 (20%)	3 (15%)
(Agrawal et al., 2013) (Ciampi et al., 2013) (Simbolo et al., 2014)	57 188 20	43 (75%) 80 (43%) 13 (65%)	0 0 0	9 (16%) 19 (10%) 4 (20%)	5 (9%) 89 (47%) 3 (15%)

Tableau 3: Mutations somatiques dans les CMT

La prévalence des mutations somatiques de *RET* dans les CMT sporadiques est donc de 50 à 70% et celles des mutations *RAS* est de 10 à 25%. Parmi les 5 études résumées ci-dessus, deux ont recherché des mutations d'autres oncogènes. Simbolo et collaborateurs ont analysé 20 échantillons de CMT sporadiques par séquençage NGS (Next Generation Sequencing) de 50 oncogènes avec une couverture 100X moyenne de 98,8%: 65% des tumeurs présentaient une mutation M918T de RET et 20% une mutation de *HRAS* ou *KRAS* mutation (57% des tumeurs *RET* négatives) qui étaient mutuellement exclusives (Simbolo et al., 2014). Aucune autre mutation n'a été trouvée en dehors d'une mutation STK11^{F354L} dans une tumeur mutée RET^{C630R}. Agrawal et collaborateurs ont réalisé une étude exploratoire de séguençage NGS de l'exome de 17 échantillons de CMT sporadiques portant sur les exons codant de 21 000 gènes avec une couverture moyenne de 94X (Agrawal et al., 2013). Le nombre de mutations somatiques par tumeur était faible (17,9 (intervalle 4-29)) et 12 mutations de RET ont été trouvées, ainsi que des mutations dans MDC1, SF3B1, MGAM, DOCK9, SEMA6A, TMD et DISP2 dans au moins 2 des 17 tumeurs. Aucune mutation RAS n'a été trouvée. Un ensemble de 40 échantillons de CMT (dont 19 tumeurs sporadiques) a ensuite été utilisé pour valider la prévalence des mutations des gènes RET, HRAS, KRAS, MDC1: 78%, 18%, 5% et 3% de mutations somatiques ont été trouvés, respectivement. Analysées ensemble, la cohorte exploratoire et la cohorte de validation ont montré que 91% des échantillons de CMT présentaient une mutation de RET, HRAS ou KRAS qui étaient mutuellement exclusives. Il n'a pas été mis en évidence d'autre anomalie génomique récurrente (Agrawal et al., 2013).

Ces données de séquençage des tumeurs sporadiques confirment l'importance des mutations de RET, qui sont les plus fréquentes et avec très peu d'autres mutations associées, dans la physiopathologie des CMT sporadiques.

2.4.1.6. Caractérisation moléculaire des CMT

Des études de transcriptome sur puce à ARN ont été effectuées sur des échantillons de CMT afin d'établir une classification moléculaire de cette maladie. Dans une étude, 41 tumeurs ont été analysées, comprenant 7 CMT avec mutation RET^{634} , 14 RET^{M918T} et 20 tumeurs sans mutation RET. Le clustering hiérarchique a révélé une discrimination entre tumeurs RET^{M918T} et tumeurs $RET^{W1/RET^{634}}$ (Maliszewska et al., 2013). Les gènes associés aux tumeurs RET^{M918T} sont impliqués dans la prolifération, l'adhésion cellulaire et la diffusion métastatique ce qui est cohérent avec le phénotype plus agressif de ces tumeurs. Une autre étude a analysé le profil d'expression génique de 13 CMT dont 2 tumeurs avec mutation RET^{634} héréditaires, 2 tumeurs avec RET^{918} héréditaires, 2 tumeurs avec RET^{918} somatiques et 7 tumeurs RET^{W1} . Cette étude a également révélé 2 groupes de tumeurs: les tumeurs

mutées RET^{918} associées aux tumeurs RET^{wt} agressives d'une part et les tumeurs mutées RET^{634} associées aux tumeurs RET^{wt} indolentes (Ameur et al., 2009). Le premier groupe est caractérisé par l'expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, la migration et le remodelage de la matrice alors que le deuxième groupe est caractérisé par l'expression de gènes impliqués dans la survie cellulaire, la transcription et la signalisation intracellulaire. Ces études d'expression génique soulignent l'hétérogénéité moléculaire des CMT et le profil moléculaire spécifiquement "agressif" des tumeurs mutées RET^{918} qui est en corrélation avec leur agressivité clinique.

2.4.2. Prise en charge clinique du CMT

2.4.2.1. Diagnostic, bilan pré-thérapeutique, stadification et pronostic

Le CMT est diagnostiqué chez des patients entre la 4^{ème} et la 6^{ème} décennie présentant un nodule thyroïdien et dans 70% des cas des adénopathies. Des métastases à distance synchrones hépatiques, pulmonaires ou osseuses sont retrouvées dans 10% des cas (Kebebew et al., 2000a; Schlumberger et al., 2012; Wells et al., 2015b). Devant un nodule thyroïdien, certains éléments peuvent faire suspecter un CMT : la localisation au niveau du tiers supérieur d'un lobe, la douleur à la palpation du nodule ou d'une adénopathie, la présence de « sensation de chaleur » et ou de diarrhées, une histoire familiale de tumeurs thyroïdiennes. Très rarement, un syndrome de Cushing ectopique révèle la tumeur (Ilias et al., 2005; Wajchenberg et al., 1994). Le diagnostic peut être évogué par la cytologie (Papaparaskeva et al., 2000) mais des faux négatifs sont possibles. Le dosage de la calcitonine sur liquide de rinçage est une aide au diagnostic (Trimboli et al., 2015). En cas de suspicion de CMT, un dosage de calcitonine est pratiqué. Le dosage de calcitonine systématique devant tout nodule thyroïdien, est sujet à controverse en raison d'un rapport coût/efficacité incertain. En effet, un CMT est retrouvé chez seulement 0.3 à 1.4% des patients avec nodules thyroïdiens mais plus de 1% de la population générale présente un taux de CTN supérieur à 10 pg/ml, faux-positif dans la grande majorité des cas (Costante et al., 2007; Elisei et al., 2004; Vierhapper et al., 1997). L'ATA ne fournit pas de recommandation (Haugen et al., 2015; Wells et al., 2015b). Un deuxième contrôle du taux de CTN, le dépistage des faux-positifs, et le suivi des taux de CTN inférieur à 100 pg/ml sont recommandés.

En cas de CMT, un bilan pré-thérapeutique est nécessaire. Celui-ci comportera un bilan symptomatique, un examen clinique, la détermination des taux sériques de calcitonine et ACE et une échographie cervicale qui permettra de réaliser le bilan d'extension loco-régionale de la maladie (thyroïde et aires ganglionnaires). Une recherche de mutation germinale de *RET* est systématique, associée à la recherche d'une hyperparathyroïdie (NEM2A) et surtout d'un phéochromocytome qu'il faut impérativement dépister avant toute chirurgie. En cas de calcitonine supérieure à 500 pg/ml ou symptômes évocateurs, un bilan d'extension à la recherche de sites métastatiques comportera : un scanner cervico-thoraco-abdomino-pelvien avec injection de produit de contraste, une IRM abdominale et du rachis complet avec injection de gadolinium et une scintigraphie osseuse.

Le bilan pré-thérapeutique va permettre d'évaluer le stade de la maladie selon la classification TNM (Tumor, Nodes, Metastasis), en fonction de la taille de la tumeur primitive thyroïdienne et de son extension locale ou métastatique ganglionnaire et/ou à distance. Les stades TNM sont décrits dans le Tableau 4

Tumeur primitive (T)					
ТХ	Impossible d'évaluer la tumeur primitive.				
Т0	Aucun signe de tumeur primitive.				
T1	Tumeur de 2 cm ou moins de diamètre et limitée à la thyroïde.				
	T1a – Tumeur de 1 cm ou moins de diamètre.				
	T1b – Tumeur de plus de 1 cm mais ne dépassant pas 2 cm de diamètre.				
T2	Tumeur de plus de 2 cm mais ne dépassant pas 4 cm de diamètre et limitée				
	à la thyroïde.				
Т3	Tumeur de plus de 4 cm de diamètre et limitée à la thyroïde.				
	ou				
	Tumeur de toute taille avec extension extra thyroïdienne limitée (muscle				
	sternothyroïdien ou tissus mous péri-thyroïdiens).				
	Tumeur qui s'est propagée au-delà de la thyroïde.				
Τ4	T4a – envahissement des tissus mous sous cutanés, le larynx, la trachée,				
	l'œsophage ou le nerf laryngé récurrent.				
	T4b – envahissement du fascia prévertébral ou des vaisseaux médiastinaux				
	ou de l'artère carotide.				

Ganglions lymphatiques régionaux (N)

NX	Impossible d'évaluer les ganglions lymphatiques régionaux.					
N0	Absence de métastases dans les ganglions lymphatiques régionaux.					
	Présence de métastases dans les ganglions lymphatiques régionaux.					
	N1a – Présence de métastases dans les ganglions lymphatiques					
	prétrachéaux, paratrachéaux et prélaryngés (compartiment VI).					
N1	N1b – Présence de métastases dans les autres ganglions cervicaux					
	unilatéraux, bilatéraux ou controlatéraux à la tumeur (compartiments I, II, III,					
	IV ou V), ou encore dans les ganglions médiastinaux supérieurs					
	(compartiment VII).					

Métastases à distance (M)

M1	Présence de métastase(s) à distance
MO	Absence de métastase à distance

Tableau 4: Classification TNM des CMT

Les stades TNM sont ensuite regroupés en stades anatomiques et pronostiques, définis par l'UICC (Union Internationale Contre le Cancer) (Tableau 5).

Stade UICC	TNM			Description
Stade I				Tumeur de 2 cm ou moins de diamètre et limitée à la thyroïde
	T1a,T1b	N0	M0	Aucune propagation aux ganglions lymphatiques
	·			Aucune métastase à distance
		NO	МО	Tumeur de plus de 2 cm mais ne dépassant pas 4 cm de diamètre et limitée à la thyroïde
				ou
				Tumeur de plus de 4 cm de diamètre et limitée à la thyroïde
Stade II	T2,T3			ou
				Tumeur de toute taille qui a commencé à se propager légèrement aux tissus voisins de la glande thyroïde (extension extrathyroïdienne)
				Aucune propagation aux ganglions lymphatiques
				Aucune métastase à distance
				Tumeur de toute taille qui peut s'être propagée un peu à l'extérieur de la thyroïde
Stade III	T1 T2 T2	N1o	MO	Propagation aux ganglions lymphatiques prétrachéaux, paratrachéaux et
	11,12,13	INTA	NIO	prélaryngés (ou ganglions delphiens)
				Aucune métastase à distance
	T1,T2,T3	N1b		Tumeur de toute taille qui peut s'être propagée légèrement à l'extérieur de la thyroïde
			MO	Propagation aux ganglions lymphatiques d'un ou des deux côtés du cou ou aux ganglions situés dans la partie supérieure du thorax (ganglions médiastinaux supérieurs)
IVA				Aucune métastase à distance
	T4a	Tout N	MO	Tumeur qui s'est propagée à l'extérieur de la thyroïde aux tissus et aux nerfs voisins
				Propagation ou non aux ganglions lymphatiques
				Aucune métastase à distance
Stade IVB	T4b	Tout N	MO	Tumeur qui s'est propagée à la région entourant les os de la colonne vertébrale (fascia prévertébral) ou à un des principaux vaisseaux sanguins voisins, comme les vaisseaux médiastinaux ou l'artère carotide
				Propagation ou non aux ganglions lymphatiques
				Aucune métastase à distance
Stade IVC	Tout T	Tout N		Tumeur de toute taille qui s'est propagée ou non à l'extérieur de la thyroïde
			M1	Propagation ou non aux ganglions lymphatiques
				Présence de métastases à distance

Tableau 5: Stades UICC des CMT

2.4.2.2. Pronostic

De multiples facteurs pronostiques de survie des patients atteints de CMT ont été évoqués : l'âge au diagnostic, le sexe masculin, l'extension initiale de la maladie incluant la taille tumorale, l'extension extra-thyroïdienne, la présence de métastases ganglionnaires (fonction de leur localisation, leur nombre, leur taille et l'existence extension extra capsulaire) (Machens and Dralle, 2013) d'une ou à distance, l'invasion vasculaire, le compte mitotique, l'immunomarquage faible de la calcitonine et la présence de nécrose en anatomopathologie (Dottorini et al., 1996; Franc et al., 1998; Kebebew et al., 2000b; Pelizzo et al., 2007). En analyse multivariée, seuls l'âge (l'âge supérieur à 60 ans étant un facteur péjoratif) et le stade tumoral TNM restent des facteurs pronostiques significatifs indépendants. La survie à 10 ans en fonction des stades est de 100% pour le stade I, 93% pour le stade II, 71% pour le stade III et 20% pour le stade IV (Bergholm et al., 1997; Kebebew et al., 2000b). Enfin, la présence d'une mutation somatique de RET au niveau du codon 918 serait également un facteur de mauvais pronostic (Elisei et al., 2008). Le taux de base et le temps de doublement de la calcitonine et de l'ACE sont à prendre en compte (Rohmer et al., 2011).

2.4.3. Prise en charge thérapeutique du CMT

2.4.3.1. Traitement initial de la tumeur primitive

La thyroïdectomie totale avec curage ganglionnaire par une équipe expérimentée est le traitement standard de la tumeur primitive. Son objectif est la normalisation de la calcitonine de base. Elle détermine la survie globale, la survie sans rechute (Kebebew et al., 2000b; Pelizzo et al., 2007) et représente le premier temps thérapeutique chez tous les patients ayant une tumeur opérable. Après la chirurgie, une substitution par levothyroxine est nécessaire ainsi qu'une surveillance des marqueurs tumoraux (calcitonine et ACE) 2 à 3 mois après la chirurgie afin de confirmer la rémission complète en cas de négativation ou de rechercher une rechute ou des métastases en cas de taux élevé.

2.4.3.2. Maladie avancée et métastatique

La prise en charge médicale du CMT avancé et métastatique a fait l'objet d'une revue reproduite en annexe 1 (Hadoux et al., 2016a).

2.5. Modèles expérimentaux de CMT/NEM2

2.5.1. Souris transgéniques.

Un modèle murin de CMT a été généré par introduction en aval du promoteur de la calcitonine de la séguence codante de l'isoforme Ret9 mutée au niveau du codon 634 (RET⁶³⁴) (Michiels et al., 1997). Parmi les 45 souris transgéniques examinées, 42 ont développé une HCC bilatérale puis CMT avec apparitions de métastases chez certaines souris. Aucune anomalie des surrénales n'a été décrite chez ces souris. Des résultats similaires ont été rapportés pour une souris transgénique avec une isoforme différente (Ret51) mais la même mutation (RET⁶³⁴) (Reynolds et al., 2001); des pénétrances différentes ont été observées en fonction du fond génétique des souris ciblées pour la transgénèse, ce qui suggère l'existence de gènes d'association de gènes/polymorphismes à ou activité modificatrice/coopératrice de l'activité oncogénique de Ret (Cranston and Ponder, 2003). Un autre modèle de souris transgénique a été généré, avec la même mutation mais sous le contrôle d'un promoteur constitutivement actif, entrainant une expression ubiquitaire de Ret dans tous les tissus (Kawai et al., 2000). Dans ce modèle, des HCC et des CMT se sont développés dans toutes les souris transgéniques et la moitié de ces souris a également présenté des adénocarcinomes mammaires ou des adénocarcinomes de la glande parotide. Aucune tumeur surrénalienne n'a été observée. En outre, GFRa n'était pas exprimé dans les tissus tumoraux en raison de la corrélation inverse entre cette expression et la dimérisation de la protéine mutante Ret⁶³⁴. Dans un autre modèle de souris transgénique, La séquence codant Ret⁹¹⁸ liée aux NEM2B été introduite en aval du promoteur de la calcitonine et a conduit au développement d'HCC et de CMT (Acton et al., 2000). Enfin, une mutation M919T a été introduite au niveau du gène RET murin (équivalent de la mutation humaine M918T) ; à l'état hétérozygote celle-ci entraînait l'apparition d'hyperplasie des cellules C et des cellules chromaffines sans qu'il soit observé de CMT (même chez les souris homozygotes pour la mutation). Des tumeurs ressemblant à des phéochromocytomes étaient observées chez les souris homozygotes pour la mutation (Smith-Hicks et al., 2000).

Récemment, le développement de CMT dans un modèle de souris transgénique conditionnelle avec expression inductible par la doxycycline, sous contrôle du promoteur NSE (Neuron Specific Enolase), de l'isoforme active de cdk5, p25, a été rapporté (Pozo et al., 2013). Après induction par la doxycycline, les souris

ont développé une hyperplasie des cellules C puis des CMT qui ont ensuite régressé suite à la déprivation en doxycycline. Ce processus oncogénique était en relation avec la phosphorylation et l'inactivation de Rb par CDK5 activé. D'ailleurs, jusqu'à 70% des souris Rb+/- et p53+/- ;Rb+/- développent des CMT ce qui confirme l'importance potentielle de la voie Rb dans l'oncogénèse du CMT (Harvey et al., 1995; Williams et al., 1994). Ce modèle murin a montré l'implication d'autres voies de signalisation que la voie Ret dans le développement du MTC bien qu'aucune mutation ou amplification du gène CDK5 n'ait été rapportée dans les tumeurs humaines et que le statut mutationnel de RET ne soit pas connu dans les souris CDK5. Ceci est important pour l'interprétation du rôle de cdk5 dans l'oncogénèse du CMT car il a été montré, dans les souris double hétérozygotes RB+/- ;p53+/- la survenue de mutations additionnelle de RET (codon C611R, C611S et C622R) dans la moitié des CMT développés (Coxon et al., 1998). Par ailleurs, l'activation de cdk5 dans la lignée cellulaire TT (porteuse de la mutation RET⁶³⁴) a été observée, avec arrêt de la croissance de xénogreffes après traitement par un shARN CDK5 (Lin et al., 2007). Cdk5 est activé par la voie du GDNF dans les neurones sensitifs et sympathiques (Ledda et al., 2002). Par conséquent, on ne sait pas si l'activation/mutation de cdk5 est un événement transformant propre ou s'il s'agit d'un 2^{ème} évènement coopérant avec des mutations de RET. Dans un autre modèle murin transgénique l'insertion de l'antigène T du SV40 sous contrôle du promoteur de la calcitonine a conduit au développement de CMT (Baetscher et al., 1991). De même, la surexpression de c-mos conduit à la génération de CMT et de phéochromocytomes, avec des lésions neurologiques (Schulz et al., 1992).

Ces modèles murins ont donc confirmé le rôle fondamental des mutations de *RET* dans la physiopathologie de la maladie mais ont également mis en évidence le rôle de la voie Rb dont l'intéraction et la coopération avec l'oncogénèse médiée par Ret n'est pas encore bien définie.

2.5.2. Autres modèles

La drosophile a été utilisée pour modéliser le CMT car le gène *dRET* est hautement conservé par rapport à la forme des mammifères avec 52% d'homologie protéique (Das and Cagan, 2013; Read et al., 2005). L'expression des orthologues mutés de Ret⁶³⁴ (dRet^{MEN2A}) et Ret⁹¹⁸ (dRet^{MEN2B}) dans la rétine de drosophile entraîne une augmentation de la prolifération cellulaire et une activation de ras, src et

JNK similaire à ce qui est observé dans les tumeurs humaines. Le traitement par Vandetanib des drosophiles avec mutation de *dRET* a permis de restaurer un phénotype oculaire comparable à celui des mouches *dRET* sauvage (Vidal et al., 2005).

Ce modèle a été utilisé pour du criblage de molécule afin de mettre en évidence de nouveaux inhibiteurs de Ret (Dar et al., 2012). Pour ce criblage, l'orthologue de Ret⁹¹⁸, dRet^{MEN2B}, est exprimé dans l'ensemble des tissus de la drosophile et entraîne 50 et 100% de mortalité respectivement au stade pupe et adulte. Ce modèle permet d'identifier des inhibiteurs de Ret qui vont entraîner une augmentation de la survie des pupes et des drosophiles adultes qui sera également inversement proportionnelle à la toxicité des composants testés. Dans ce modèle, le vandétanib et le sorafenib ont un effet modéré sur le plan de l'amélioration de la survie de la drosophile, en raison d'une inhibition inefficace de dRET^{MEN2B} et/ou d'une toxicité importante. Le criblage a permis de mettre en évidence 2 molécules : A57 (N-[4-[4-amino-1-(1-methylethyl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-3-yl]phenyl]-N'-[3-(trifluoromethyl)phenyl]-urea), inhibiteur puissant de Ret avec une activité contre des lignées de cellules MTC in vitro et in vivo contre des xénogreffes et A80 1-(4-(4-amino-1-isopropyl-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-3-yl)phenyl)-3-(2-fluoro-5-

(trifluoromethyl)phenyl)urea) dont l'activité inhibitrice concomitante de dtor, diminue la toxicité et améliore l'efficacité (Dar et al., 2012; Das and Cagan, 2013). Les inhibiteurs mis en évidence dans cette étude n'ont pas été développés plus loin en clinique à notre connaissance.

2.5.3. Lignées humaines

Les lignées cellulaires les plus fréquemment utilisées dans les études in vitro portant sur le CMT sont les lignées TT et MZCRC-1. Elles ont été dérivées, respectivement, à partir d'un épanchement pleural néoplasique d'une patiente de 43 ans et à partir d'une biopsie à l'aiguille chez une patiente de 77 ans. La lignée TT comporte une mutation *RET*^{C634W} (Carlomagno et al., 1995) et la lignée MZCRC-1 comporte une mutation *RET*^{M918T}. Ces lignées cellulaires ont été utilisées pour l'étude et la validation pré-clinique de plusieurs thérapies ciblées comme le vandetanib (Verbeek et al., 2011; Vitagliano et al., 2011), le cabozantinib (Verbeek et al., 2011), le sunitinib (Broutin et al., 2011) ou le ponatinib (De Falco et al., 2013). Elles ont une utilité importante en tant que modèle cellulaire permettant d'étudier

l'inhibition de Ret mais elles sont porteuses d'anomalies caryotypiques majeures (80 chromosomes pour la lignée TT et 64 chromosomes pour la lignée MZCRC-1) qui ne sont pas retrouvées dans les CMT humains qui ont peu d'amplifications ou de délétions géniques en CGH (Comparative Genomic Hybridization) (Flicker et al., 2012; Frisk et al., 2001). La pertinence de ce modèle pour l'étude des éventuels évènements secondaires coopérants avec les mutations de Ret est donc discutable.

2.5.4. Cellules souches cancéreuses de CMT

Une étude de l'équipe du MD Anderson a identifié des cellules CD133+ parmi les lignées cellulaires de CMT TT et MZCRC (Zhu et al., 2010). Le CD133 est un marqueur de CSC pour certains cancers et a été retrouvé exprimé par une sous population des 2 lignées de CMT mais également en immunohistochime (IHC) et PCR quantitative sur les échantillons tumoraux de patients. Les auteurs ont ensuite isolé ces cellules et ont montré leur capacité à générer des sphères non adhérentes en culture, une des caractéristiques des CSC in vitro. Cette capacité à former des sphères était dépendante de l'activité de Ret car son invalidation par ARN interférent diminuait cette capacité. Cette étude a donc suggéré l'existence de CSC dans le CMT mais la démonstration de leur existence nécessite des expériences de transplantation chez la souris immunodéprimée afin de prouver la capacité de ces cellules à reconstituer une tumeur ; ces expériences n'ont pas été rapportées à l'heure actuelle.

3. CRISPR/Cas 9 et ingénierie du génome

3.1. Introduction

L'ingénierie du génome (terminologie proposée par l'INSERM (INSERM, 2016)) est une traduction du terme anglo-saxon « genome editing » qui correspond à la capacité à réaliser des modifications du génome (terminologie de l'académie de médecine (Jouannet et al., 2016)), éventuellement ciblées au niveau des cellules, ou de systèmes biologiques d'organismes. Cette technologie a un énorme potentiel en termes de recherche fondamentale, médicale et de bio-ingénierie. Les endonucléases séquence-spécifiques sont capables de réaliser des modifications précises du génome dans différents types cellulaires et différentes espèces et permettent d'étudier les mécanismes génétiques de processus biologiques, d'effectuer des criblages génomiques à haut débit, et éventuellement d'envisager des thérapies géniques.

Plusieurs technologies d'ingénierie du génome ont été décrites et comprennent les nucléases à doigt de zinc (Zinc-finger nucléases, ZFN) (Bibikova et al., 2003; Porteus and Baltimore, 2003), les nucléases effectrices de type activateur de transcription (transcription activator-like effector nucleases, TALEN) (Wood et al., 2011) et le système de nucléase guidée par ARN CRISPR/Cas9 (Cong et al., 2013; Jinek et al., 2013; Mali et al., 2013a). Les ZFNs et TALENs combinent un domaine catalytique à endonucléase avec des domaines de liaison à ľADN activité (Acide désoxyribonucléique) modulaires pour permettre la réalisation de cassures double brin au niveau de loci précis du génome. Cas 9 est une endonucléase, associée à un groupe de courtes répétitions palindromiques régulièrement espacées (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR), guidée par une molécule d'ARN qui va s'hybrider avec sa séquence cible au niveau du génome et constitue un système d'ingénierie du génome efficace, spécifique et plus simple à mettre en œuvre que les 2 systèmes précédents.

3.2. Le système CRISPR/Cas9 est impliqué dans l'immunité bactérienne

La nucléase Cas 9 guidée par l'ARN est issue du système immunitaire adaptatif bactérien « clustered regularly interspaced short palindromic repeats » (CRISPR) et permet de cliver les séquences d'ADN d'origine exogène lors des infections par les phages (Deveau et al., 2010). Trois types de systèmes CRISPR ont été identifiés (I à III) chez différentes espèces bactériennes. Chaque système CRISPR comprend un groupe de gènes associés au CRISPR (CRISPR-Associated, CAS) qui code les différentes sous-unités de la nucléase Cas et un ARN, l'«ARN CRISPR» (crARN), comportant une série d'éléments répétés intercalés avec des séquences « protospacer » ciblant les séquences spécifiques d'ADN cible exogènes des organismes invasifs vis-à-vis de la bactérie (Figure 8). Chaque séquence d'ADN cible d'un « protospacer » est toujours associée à un motif nucléotidique adjacent (Protospacer Adjacent Motif, PAM), nécessaire à la fixation de la nucléase Cas spécifique de chaque système CRISPR.



Figure 8 Fonctionnement du système CRISPR de type II, d'après Zhang lab (genomeengineering.org).

Le CRISPR de type II comprend la nucléase Cas9, le crARN et un ARN auxiliaire transactivateur, le « trans-activating crRNA» (tracrARN) qui facilite la décomposition du crARN en sous-unités fonctionnelles. Chacune des sous-unités fonctionnelles du crARN comprend une séquence-guide de 20 nucléotides et une séquence répétée. Cette séquence-guide de 20 nucléotides va s'hybrider avec la séquence d'ADN cible et entraîner le recrutement de Cas9 qui va créer une coupure double brin de l'ADN entre la 17^{ème} et la 18^{ème} paire de base de la séquence cible de 20 nucléotides. Dans le système CRISPR dérivé de streptococcus pyogenes (type II), qui est le système le plus développé pour l'ingénierie du génome, la séquence d'ADN cible complémentaire des 20 nucléotides du crRNA doit comporter, en 3' immédiat, un

motif nucléotidique, le PAM, de type 5'-NGG pour qu'une coupure double brin soit effectuée par Cas 9. La nucléase Cas 9 comporte 2 domaines nucléase : le domaine NHN coupe le brin d'ADN cible complémentaire de la séquence du crARN et le domaine RuvC-like coupe le brin d'ADN opposé au brin complémentaire. La mutagénèse d'un de ces domaines (mutation D10A NHN ou H804A de RuvC) génère un variant avec une activité de coupure simple brin (activité « nickase », entaille) tandis que le double mutant a uniquement une activité de fixation à l'ADN. L'intérêt de ces mutants sera détaillé plus loin.

3.3. Utilisation du système CRISPR/Cas9 de type II pour l'ingénierie du génome

Le système CRISPR/Cas9 de type II a été optimisé pour l'ingénierie du génome dans les cellules de mammifères et, en particulier, les cellules humaines. L'enzyme Cas9 a été modifiée par optimisation de codon pour faciliter sa transcription chez l'homme et le crRN et le tracrARN ont été fusionnés en une seule molécule d'ARN chimérique qui est appelée ARN simple guide (sgARN) (Cong et al., 2013). Par ailleurs, le système CRISPR étant capable d'induire des coupures multiples et simultanées d'ADN exogène lors d'une infection, des séquences contenant plusieurs sgRNA ciblant différents gènes permettent d'induire des modifications génomiques multiples simultanées (Cong et al., 2013; Mali et al., 2013a). Ces éléments ont été réunis dans des vecteurs plasmidiques permettant de les transfecter, de les microinjecter ou de produire des particules lentivirales ou adénovirales (Jo et al., 2015) (https://www.addgene.org/crispr/). Des techniques de transfection directe des complexes protéine Cas9 :sgRNA ont également été décrites (Zuris et al., 2015). Le système CRIPSR/Cas9 peut être facilement utilisé pour cibler n'importe quelle séquence de 20 nucléotides du génome, pourvu qu'une séquence PAM soit présente immédiatement à proximité, en modifiant uniquement la séquence du sgRNA qui lui est associée. Par exemple, des souris transgéniques ont été créées avec ce système (Wang et al., 2013a) et des modifications génomiques d'embryons humains ont également été rapportées (Kang et al., 2016; Liang et al., 2015) ce qui soulève une discussion éthique nécessaire sur les limites à envisager pour cette technique de modification du vivant.

La nucléase Cas9 induit des coupures double brins au niveau d'un locus cible d'ADN via ses deux domaines nucléase RuvC et HNH. Après coupure double brin de

l'ADN, deux principaux mécanismes de réparation cellulaire vont se mettre en œuvre : la recombinaison homologue (RH) et la jonction d'extrémités nonhomologues (JENH) (Doudna and Charpentier, 2014; Hsu et al., 2014). Ces deux mécanismes peuvent être exploités, en ingénierie du génome, pour différents objectifs (Figure 9).



Figure 9 : Mécanismes de réparation après cassure double brin par Cas9 d'après Hsu, Lander et zhang, Cell 2014

En l'absence de séquence de référence pour la réparation, c'est la JENH qui va entraîner une ligation des cassures double brin ; cette ligation est sujette aux erreurs qui vont entraîner des insertions ou délétions de bases (indel). Ceci peut donc être exploité pour induire des invalidations de gènes grâce aux indels induits par le processus de JENH qui vont aboutir à des mutations de type décalage du cadre de lecture ou codon stop prématuré au niveau des loci ciblés. Cette application de la technologie CRISPR/Cas9 permet de générer rapidement et simplement des invalidations géniques au niveau de cellules ou d'organismes entiers. L'identification d'une enzyme de restriction sensible aux mésappariements, l'endonucléase T7 qui va digérer les séquences mutées amplifiées par PCR et réhybridées. Par ailleurs, il a été possible de développer des librairies de sgARN couvrant une grande partie du génome humain codant (mais également murin et drosophile) afin de réaliser des

criblages à haut débit par sélection positive ou négative de gènes impliqués dans la progression tumorale par exemple (Shalem et al., 2014).

En présence d'une matrice de réparation, qui peut être apportée de manière exogène, c'est la recombinaison homologue qui va intervenir et va permettre de réaliser des modifications génomiques très précises à un locus donné. La recombinaison homologue n'est active que dans les cellules en division et son efficacité varie en fonction des types cellulaires, du locus ciblé ou de la matrice de réparation (Saleh-Gohari and Helleday, 2004). Cette matrice de réparation peut se présenter sous la forme d'ADN double brin plasmidique comportant des séquences homologues de part et d'autre de la coupure double brin induite afin de faciliter la recombinaison. Cette stratégie permet de réaliser des knock-in, de la GFP par exemple (Mali et al., 2013a). L'utilisation d'un oligonucléotide simple brin (ssODN) peut servir de matrice de recombinaison et permet de réaliser de petites modifications ciblées du génome de type mutations ponctuelles éventuellement multiples et simultanées et d'induire des délétions d'ADN ciblées de petites ou grandes tailles (Chen et al., 2011). Le taux de recombinants obtenus avec cette approche est de 1 à 30%; l'utilisation d'oligonucléotides modifiées avec des phosphothiorates peut en améliorer l'efficacité (Renaud et al., 2016). La meilleure efficacité de recombinaison est obtenue pour des ssODN avec des bras d'homologie de part et d'autre des cassures double brin entre 40 et 90 pb (paires de bases) (70 pb semble optimal) et un site de coupure se situant dans les 40 pb autour de la mutation ciblée (0-10 pb étant optimal)(Yang et al., 2013).

L'utilisation d'un oligonucléotide simple brin permet la génération d'une lignée cellulaire contrôle isogénique à partir d'une lignée cellulaire comportant une mutation sur un gène d'intérêt comme, par exemple, une mutation activatrice de RET sur le codon 634 TGC→ TAC. Il faut alors identifier une séquence à cibler par un sgARN au niveau de la mutation que l'on souhaite « corriger » et déterminer quelle séquence présente le moins de risque d'effet hors cible (« off target ») ; ceci peut être réalisé avec un outil internet comme le site « CRISPR design » (<u>http://crispr.mit.edu/</u>) du MIT (Massachussets Institute of Technology). Une fois le site de coupure identifié et pourvu qu'il soit situé le plus proche possible de la mutation ciblée, il faut alors mettre au point la séquence du ssODN qui va servir de matrice de recombinaison. Celui-ci comportera donc des bras d'homologie avec la séquence cible de part et d'autre du site de coupure, la séquence du codon 634

sauvage dans l'exemple d'une « correction » de mutation *RET* et également une mutation silencieuse du motif PAM afin d'éviter le clivage du ssODN par la Cas 9 lors de la recombinaison. L'utilisation de la T7 endonucléase pour le criblage des clones modifiés génétiquement n'est pas possible car l'objectif est d'obtenir des séquences homozygotes ; il faut alors essayer d'introduire des mutations silencieuses dans cet ssODN pour générer un site de restriction qui permettra l'identification des clones par PCR et digestion enzymatique.

3.4. Spécificité de la nucléase Cas9

La spécificité du système est de toute première importance car les modifications génomiques induites sont permanentes. La spécificité de la Cas 9 de streptococcus pyogenes a été étudiée de manière extensive par utilisation de librairies de sgARN comportant des mésappariement à différentes positions (Fu et al., 2014; Hsu et al., 2013; Mali et al., 2013b). Ces études ont pu démontrer que la nucléase Cas9 tolère des mésappariement entre le sgARN et la séguence ADN cible et également des séquences d'ADN non-cible en fonction de leur nombre, de leur position dans la séquence et de leur distribution mais également en fonction de la concentration intracellulaire de Cas9. La diminution de la concentration en Cas9 permet d'améliorer le ratio on/off target mais avec une efficacité diminuée sur la cible (Hsu et al., 2013). Cette tolérance aux mésappariement induit, de fait, le risque d'un effet hors cible, c'est-à-dire l'induction de coupure double brin à des loci différents de ceux ciblés par le sgRN. Plusieurs études ont rapporté une faible incidence de modifications hors cible dans les cellules souches pluripotentes humaines soumises à des modifications génomiques par CRISPR (Suzuki et al., 2014; Veres et al., 2014; Yang et al., 2014b). Des déficits de voies de la réparation de l'ADN dans les lignées cancéreuses utilisées pour les expérimentations initiales du système CRISPR/Cas9 pourraient expliquer une partie de cet effet hors cible et sa moindre importance dans les cellules souches pluripotentes induites en raison de la fonctionnalité des voies de réparation de l'ADN dans ces cellules (Hockemeyer and Jaenisch, 2016). Par ailleurs, l'appariement partiel entre sgARN et ADN génomique peut entraîner la fixation de la Cas9 à des séquences d'ADN non spécifiques sans pour autant entraîner de coupure double brin (Wu et al., 2014). Plusieurs groupes ont développé des algorithmes qui prédisent les séguences optimales de sgARN en minimisant le risque d'atteintes génomiques hors cible (par exemple http://tools.genome-engineering.org,

<u>http://zifit.partners.org</u>, and <u>www.e-crisp.org</u>). Une version nCas9 à activité « entaillase » (nickase) a été générée (Figure 10) par mutagénèse du domaine HNH avec insertion d'une mutation D10A ou insertion d'une mutation H804A dans le domaine RuvC (Mali et al., 2013b; Ran et al., 2013a). La nCas9 ne réalise plus que des coupures simple brin et il est alors nécessaire d'associer 2 SgARN à cette nCas9 afin de générer une coupure double brin permettant une modification génomique via JENH ou recombinaison homologue. Cette stratégie permet de diminuer de 50 à 1500 fois le risque d'effet hors cible (Ran et al., 2013a).





Enfin, une protéine de fusion associe une Cas9 catalytiquement inactive, qui va se fixer à une séquence génomique via un sgARN spécifique, au domaine nucléase de Fok1 qui nécessite une dimérisation pour effectuer des coupures double brin. En utilisant 2 sgARN spécifiques de séquences génomiques voisines, on peut induire une coupure sur un site précis avec une diminution du risque de coupure inappropriée (Guilinger et al., 2014).

3.5. Extension du spectre d'activité du système CRISPR : Cas9

La capacité de la Cas9 à se fixer sur des sites spécifiques de l'ADN définis par le sgARN et le PAM est une propriété clé qui a fait envisager son utilisation dans d'autres applications que son activité nucléase. Une version catalytiquement inactive, la dCAs9, a été utilisée pour inhiber la transcription de gènes, à la manière de l'ARN interférent (ARNi), et a été baptisée CRISPRi (Qi et al., 2013). L'efficacité du CRISPRi dépend de la localisation de la séquence complémentaire au sgARN sur la séquence codante : plus celle-ci est proche du site d'initiation de la transcription et du promoteur et plus l'inhibition de la transcription est efficace. Des protéines de

fusion entre cette dCas9 et des domaines activateurs (VP64) ou répresseurs de la transcription (KRAB) permettent d'activer ou de réprimer l'expression de gènes cibles (Gilbert et al., 2013). Ces études ont démontré que dCAs9 pouvait être utilisée comme une plateforme modulaire et flexible de fixation à l'ADN permettant le recrutement de protéines au niveau de régions génomiques cibles. Ceci a été utilisé pour l'imagerie de séquences répétées et de télomères dans des cellules vivantes en utilisant une protéine de fusion entre dCas9 et la GFP (Chen et al., 2013).

3.6. Application du système CRISPR en oncologie

Les études génomiques fonctionnelles à haut débit permettent de disséquer le rôle présumé d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeur. Ces études reposent classiquement sur des surexpressions d'ADNc (ADN complémentaire) et des interférences par ARN (ARNi) pour entraîner une perte d'expression. Ces approches ont certaines limitations comme une expression supraphysiologique en cas d'utilisation de systèmes d'expression à partir d'ADNc qui peut entraîner des effets artéfactuels. Les approches par ARNi sont limitées par l'incertitude concernant le degré et la stabilité de l'inhibition de l'expression ains qu'un effet hors cible ce qui peut perturber l'interprétation des résultats. Le système CRISPR/Cas9 permet une discrimination rapide des mutations conductrices (drivers) par rapport aux mutations passagères. La modification de locus unique ou de loci multiples peut être obtenue par l'expression transitoire ou permanente des composantes du système CRISPR/Cas9 par transfection ou infection retro- ou lentivirale. L'obtention de mutations perte de fonction repose sur l'utilisation d'un sgARN ciblant le gène choisi et sur la réparation par JENH qui va entraîner la génération d'indels comme décrit plus haut. L'obtention de mutation gain de fonction repose sur l'utilisation d'un sgARN accompagné d'une matrice de réparation sous la forme d'un ssODN le plus souvent qui permettra d'intégrer la mutation voulue par recombinaison homologue. Les lignées cellulaires ciblées et porteuses des indels et/ou mutation gain de fonction voulus peuvent ensuite être testées in vitro et in vivo afin d'établir leur influence sur le phénotype oncologique. Cette approche peut être utilisée sur des lignées cellulaires mais également sur des xenogreffes dérivées de patients, sur des organoïdes en culture.

3.6.1. Modélisation de mutations génétiques somatiques à potentiel oncogénique

La flexibilité et la modularité du système CRISPR/Cas9 a abouti au développement de multiples applications d'ingénierie du génome in vitro et in vivo avec des applications en recherche en cancérologie. Des études de mutations de type perte ou gain de fonction au niveau d'oncogène, de GST, de modulateur de la progression tumorale ou de la réponse au traitement ont été rapportées. Ainsi, la génération d'organoïdes intestinaux porteurs de mutations pertes de fonction dans 3 gènes suppresseurs de tumeurs *APC*, *SMAD4* et *TP53* et de mutations gain de fonction au niveau des oncogènes *KRAS* et/ou *PIK3CA* a permis de recréer le développement tumoral du cancer colorectal en reproduisant son paysage mutationnel grâce au système CRISPR/Cas9 dans ces organoïdes qui étaient tumoraux après injection sous la capsule rénale de souris immunodéprimées (Matano et al., 2015). Cependant, les capacités métastatiques n'étaient observées que dans les organoïdes générés à partir d'adénome avec microsatellites instables ce qui suggère que les mutations drivers ne sont pas toujours suffisantes pour induire l'ensemble du phénotype d'un cancer invasif métastatique.

Le système CRISPR/Cas9 a également été utilisé pour mimer des translocations oncogéniques via la génération de 2 coupures double brin de l'ADN (Ghezraoui et al., 2014) et a permis de générer des translocations drivers des cancers pulmonaires comme *CD74-ROS1*, *EML4-ALK* et *KIF5B-RET* dans des lignées cellulaires (Choi and Meyerson, 2014). Cette même stratégie a pu être appliquée in vivo afin de développer des modèles murins de mutagénèse et d'oncogénèse somatique par translocation *EML4-ALK* au niveau de l'épthélium pulmonaire après infection avec un adénovirus (Maddalo et al., 2014). Il a également été possible de générer des cancers du foie par injection hydrodynamique d'un plasmide exprimant Cas9 et des sgARN ciblant *TP53* et *PTEN* et reproduisant le phénotype des souris knock-out conditionnel *Pten^{fl/fl};p53^{fl/fl}* (Xue et al., 2014).

3.6.2. Réalisation de criblages pan-génomiques

Le système CRISPR/Cas9 permet aussi la réalisation de criblage pangénomique par l'utilisation de pool de vecteurs lentiviraux exprimant Cas9, un gène de résistance à la puromycine et une librairie de 65000 sgARN couvrant l'ensemble des séquences codantes du génome avec 6 sgARN pour chaque séquence codante

(librairie Genome-scale CRISPR Knock-Out (GeCKO) v2.0). Cette librairie permet de générer des invalidations au niveau de toutes les séquences codantes du génome et la transduction lentivirale avec une virémie faible permet de s'assurer qu'une cellule ne reçoit qu'une seule particule virale avec un seul SgARN. On obtient donc après transduction lentivirale une population de cellules comportant chacune une invalidation d'un seul gène : certaines cellules vont mourir en raison de cette invalidation, d'autres vont avoir un avantage prolifératif ou devenir plus résistantes (ou plus sensibles) à un traitement ; enfin, certaines invalidations n'auront aucune conséquence sur la cellule. Le séquençage à haut débit de la population cellulaire obtenue après transduction, sélection et éventuel traitement par un agent anticancéreux va donc permettre de mettre en évidence des gènes importants pour la survie cellulaire ou la réponse aux traitements. Ceci a permis d'étudier les mécanismes de résistance au vemurafenib d'une lignée de mélanome (Shalem et al., 2014). La lignée de mélanome A375 a été transduite par le pool de lentivirus, sélectionnée par la puromycine puis traitée par vemurafenib. Les cellules résistantes au vémurafenib ont ensuite été soumises à un séquençage à haut débit. Ce séquençage a permis d'identifier les sgARN ayant conféré aux cellules une résistance au vémurafenib et donc les gènes dont l'invalidation confère une résistance à ce traitement comme NF1 et NF2. Cette technique a été comparée à l'utilisation d'une librairie de 95000 shARN et montrait une meilleure sensibilité pour identifier des gènes candidats de résistance, en partie en raison d'une perte d'expression plus stable et plus significative avec les sgARN par rapport aux shARN (Shalem et al., 2014). Deux autres études ont comparé l'intérêt du criblage par CRISPR/Cas9 par rapport à un criblage par ShARN. Une première étude a trouvé que le criblage par invalidation de gène via CRISPR/Cas9 était le plus efficient, en comparaison au CRISPRi et aux shARN dans une étude portant sur des gènes essentiels et non essentiels, en raison d'une moindre variabilité des données, d'une plus grande constance dans différentes lignées cellulaires et d'une absence apparente d'effet hors cible (Evers et al., 2016). Une autre étude a mis en évidence une efficacité équivalente des 2 systèmes qui produisent des résultats différents et l'intérêt de combiner les deux approches pour améliorer la performance du criblage (Morgens et al., 2016). Ce système de criblage à haut débit a également été utilisé in vivo dans un modèle murin de métastases pulmonaires (Wu et al., 2014). Une lignée cellulaire dérivée d'un cancer bronchique à petites cellules murin, non métastatique,

a été transduite avec une librairie de sgARN ciblant toutes les séquences codantes murines puis les cellules ont été injectées en sous-cutané et ont généré des tumeurs mais également des métastases. Par le séquençage comparatif des tumeurs primaires et des métastases pour mettre en évidence les sgARN resppectivement représentés, les auteurs ont pu identifier des mutations perte de fonction favorisant le processus métastatique pulmonaire dans leur modèle, comme des mutations de *CDKN2B, NF2, PTEN* (Chen et al., 2015).

3.6.3. Modélisation de mutations germinales à potentiel oncogénique

Les modèles murins génétiquement modifiés de cancer ont joué un rôle important pour la découverte des mécanismes d'initiation, de maintenance et de progression tumorale (Sánchez-Rivera and Jacks, 2015). Par ailleurs, ils constituent des modèles valides pour tester différents agents anti-cancéreux et pour étudier les mécanismes de résistance aux traitements (Chen et al., 2012). Cependant, la génération de souris génétiquement modifiées (SGM) est un processus long et coûteux et il est difficile, avec les techniques classiques, d'introduire des modifications génomiques multiples dans les souris. Le système CRISPR/Cas9 permet la génération de SGM en une étape par micro-injection de sgARN, d'ARN messager de Cas9 et de matrice de réparation (si nécessaire) dans un zygote de souris permettant d'aboutir à un développement au stade blastocyste dans 76 à 87% des cas et l'obtention de SGM pour 18% environ des embryons réimplantés avec la possibilité d'obtenir des souris porteuses de mutations multiples (Wang et al., 2013a). Cette technique permet d'obtenir la première génération de SGM en 4 semaines environ (Yang et al., 2014a) ce qui va faciliter le développement de modèles murins de cancer de plus en plus précis.

Le système CRISPR est donc un formidable outil pour la recherche en cancérologie permettant de mimer des altérations génomiques uniques ou multiples afin d'étudier leur influence sur le phénotype tumoral in vitro ou in vivo, dans un contexte germinal ou constitutionnel, de réaliser des criblages pan-génomiques à le recherche de gènes pro ou anti-tumoraux ou responsables de sensibilité ou de résistance aux traitements anti cancéreux et enfin de générer des modèles murins d'oncogénèse au niveau germinal ou somatique rapidement et avec la possibilité d'étudier l'association de mutations diverses sur le phénotype tumoral.

4. Les Cellules souches embryonnaires et cellules souches pluripotentes induites

4.1. Cellules souches : définitions

Les deux caractéristiques principales des cellules souches (CS) sont la capacité d'auto-renouvèlement et de différenciation pour donner naissance à des cellules spécialisées, tout en restant elle-même indifférenciées. Plusieurs types de cellules souches sont actuellement identifiés et caractérisés par des tests fonctionnels ainsi que par des marqueurs phénotypiques et génomiques.

La totipotence est un terme réservé à l'œuf fécondé, les cellules souches totipotentes sont présentes du stade zygote au stade blastomère 8 cellules et sont capables de donner naissance à tous les tissus embryonnaires (ectoderme, mésoderme et endoderme) mais également extra-embryonnaires (placenta et cordon ombilical). Les cellules souches embryonnaires (CSE), générées par la mise en culture de la masse interne d'un blastocyste sont caractérisées par leur pluripotence blastocyste et sont capables de donner naissance aux différents tissus d'origine embryonnaire, y compris la lignée germinale, mais pas extra-embryonnaire.

La multipotence est un terme réservé aux cellules souches capables de reconstituer l'ensemble des CS d'un tissu entier (comme par exemple les cellules souches hématopoïétiques).

La capacité d'auto-renouvèlement signifie que les cellules souches sont capables, de manière physiologique, de se diviser de manière illimitée tout en conservant leurs propriétés phénotypiques, génétiques et épigénétiques à chaque génération. La génération de deux cellules filles identiques à la cellule mère définit la division symétrique tandis que la génération d'une cellule fille identique à la cellule mère et d'une autre cellule différente (engagée dans un processus de différenciation par exemple) est appelée division asymétrique. Les mécanismes fondamentaux qui permettent le maintien de ce processus sont actuellement connus, faisant intervenir des mécanismes intrinsèques notamment génomiques ou des mécanismes extrinsèques liés par exemple à l'action de la niche des CS (Morrison and Kimble, 2006; Tulina and Matunis, 2001). Les cellules souches ont la capacité de donner naissance à différents types cellulaires, par différenciation. Le potentiel de différenciation des cellules souches diminue au cours du développement embryonnaire et les CSP laissent ensuite la place à des cellules souches

multipotentes qui vont avoir un rôle dans l'organogénèse fœtale. On peut citer les cellules souches de la crête neurale, qui vont participer au développement de la face, du système nerveux autonome, de la lignée mélanocytaire, des surrénales, etc, les cellules souches mésenchymateuses qui peuvent se différencier en ostéocytes, chondrocytes, adipocytes et les cellules souches hématopoïétiques qui vont donner naissance aux différentes lignées de cellules sanguines et perdurent à l'âge adulte (Figure 11).



Figure 11: Les différents types de cellules souches et leur capacité de différenciation (adapté de http://svt.ac-dijon.fr.

Enfin, il existe des cellules souches uni-, bi- ou tri-potentes qui sont plus ou moins nombreuses et actives en fonction du tissu considéré et vont avoir un rôle dans l'homéostasie tissulaire ; on peut citer les cellules satellites musculaires qui sont unipotentes ou les cellules chondro-ostéogéniques de la moelle osseuse, dérivées des cellules souches mésenchymateuses, qui sont bipotentes, par exemple.

4.2. Isolement des cellules souches embryonnaires

Les premières lignées de CSE murines ont été isolées en 1981 (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981). Les cellules isolées à partir de la masse cellulaire interne du blastocyste furent mises en culture sur des fibroblastes embryonnaires murins mitotiquement inactivés (encore utilisés aujourd'hui pour la culture de ces cellules) et cultivées dans du milieu conditionné de cellules de tératocarcinome avec du sérum de veau fœtal (Martin, 1981). Ces lignées ont représenté des outils de recherche majeurs permettant des études de différenciation in vitro mais aussi in vivo grâce à la technologie de knock-out permettant la génération de souches de souris invalidées pour un gène donné (Doyle et al., 2012; Hockemeyer and Jaenisch, 2016).

Des cellules souches murines dérivées de l'épiblaste ont également été dérivées à partir d'embryon de 5.5 à 6.5 jours post conception (Brons et al., 2007). Ces cellules souches de l'épiblaste (CSEp) sont pluripotentes mais ne peuvent pas donner de chimères quand elles sont réinjectées dans des blastocystes murins, un de leur chromosome X est inactivé, il est difficile de les maintenir à l'état clonal, elles expriment les gènes de pluripotence mais également certains gènes de différenciation à des niveaux plus élevés que les cellules souches pluripotentes dérivées de la masse cellulaire interne. Ces différences ont conduit à proposer les appellations de cellules souches pluripotentes « naïves » pour Les CSP murines dérivées du blastocystes et de cellules souches pluripotentes « amorcées » pour les CSEp. Les CSP humaines ont des caractéristiques plus proches des CSEp que des CSP murines naïves et des conditions de culture particulières sont nécessaires pour obtenir des CSP humaines naïves comparables aux CSP murines (Hanna et al., 2010). Le développement de l'utilisation des CSP a ensuite été facilité par l'amélioration de leurs conditions de culture avec la mise en évidence de l'importance du facteur inhibant la leucémie (LIF) pour les CSP murines (Smith et al., 1988); facteur de croissance fibroblastique basique (bFGF) et du milieu sans sérum pour les CSP humaines (Amit et al., 2000).

Les premières lignées de CSE humaines furent dérivées en 1998 (Thomson et al., 1998) dont les lignées H1 (caryotype normal XY) et H9 (caryotype normal XX) qui

sont encore utilisées aujourd'hui dans les laboratoires étudiant les cellules souches embryonnaires et pluripotentes humaines. Initialement dérivées de blastocystes humains, les CSE humaines ont ensuite également été dérivées des cellules de la morula et le taux de dérivation est de 10 à 25% en fonction des blastocystes.

4.3. Cellules souches pluripotentes induites

4.3.1. Reprogrammation des cellules différenciées en CSPi

L'isolement et la mise en culture des CSP, en particulier humaines, pose des problèmes liés à la question éthique de la recherche sur l'embryon avec des disparités de législation et d'autorisation de recherche entre les pays. La recherche d'un procédé permettant de générer des CSP à partir de cellules somatiques différenciées a donc fait l'objet d'une intense recherche depuis plus de 50 ans et a abouti à la description des méthodes de reprogrammation de cellules somatiques différenciées en cellules souches pluripotentes induites, les CSPi. Cette « reprogrammation » a un intérêt considérable en recherche fondamentale et clinique. Elle pourrait permettre, pour un patient donné, d'obtenir des tissus histocompatibles générés par différenciées du patient.

La première description de reprogrammation nucléaire date de 1962 quand Gurdon a démontré qu'il était possible de générer des têtards de Xenope après transplantation de noyaux de cellules intestinales différenciées dans des ovocytes (Gurdon, 1962). Ces expériences ont montré que l'information génétique des cellules différenciées n'était pas modifiée au cours de la différenciation à partir de la cellule souche pluripotente et qu'une réversibilité était donc possible. Ceci a abouti à la naissance de la brebis Dolly (Wilmut et al., 1997). La deuxième technique de reprogrammation décrite a consisté à fusionner des cellules de carcinome embryonnaire à des thymocytes : les cellules pluripotentes imposent leur phénotype en cas de fusion cellulaire, ceci a été reproduit par la fusion de CSE avec des cellules différenciées (Cowan et al., 2005; Miller and Ruddle, 1976). Ces expériences de fusion cellulaire ont montré qu'il était possible de «reprogrammer » une cellule somatique adulte après induction d'une fusion avec les cellules CSE (Yu et al., 2006) qui s'accompagnait dans les cellules adultes d'une activation du gène Oct4.

En 2006, Takahashi et Yamanaka publièrent le premier article décrivant la reprogrammation de fibroblastes murins en CSPi par transduction virale de 4

facteurs : Oct3/4, Klf4, Sox2 and c-Myc (OKSM) (Takahashi and Yamanaka, 2006). Leur hypothèse de départ était basée sur le fait que la reprogrammation par fusion ou par transfert nucléaire suggérait que les CSP contenaient des facteurs permettant de conférer une pluripotence à des cellules somatiques différenciées. Après avoir sélectionné 24 facteurs impliqués dans la maintenance de la pluripotence des CSP, ils ont pu montrer que la transduction rétrovirale de ces 24 facteurs permettait d'obtenir des CSPi puis ont identifié les 4 facteurs nécessaires et suffisants à partir de cette liste: Oct3/4, Klf4, Sox2 and c-Myc. La génération de chimères murines à partir de ces CSPi a démontré le caractère pluripotent de ces cellules. Ces recherches ont valu le prix Nobel à Yamanaka en 2012. Peu après, la méthode a été appliquée aux cellules somatiques humaines (Takahashi et al., 2007).

Dans le cadre de la génération de CSPi humaines, les méthodes les plus fréquemment utilisées sont non intégratives et consistent en l'utilisation de virus Sendaï, de vecteurs épisomaux, de transfection d'ARN ou d'injection de protéines (Zhou and Zeng, 2013). Le tissu de départ est le plus souvent de la peau d'où sont extrait des fibroblastes ou des cellules sanguines, technique la plus utilisée dans notre laboratoire. La transduction virale des cellules sanguines de patients avec des virus Sendaï exprimant les 4 facteurs OKSM va entraîner l'expression de ces facteurs par les cellules différenciées et va initier la reprogrammation (Figure 12).



Figure 12: Reprogrammation de cellules sanguines de patients avec le virus Sendaï, d'après O.Féraud.

Au fur et à mesure que le processus moléculaire de reprogrammation progresse, l'expression virale des transgènes va être remplacée par l'expression

endogène des facteurs OKSM ce qui constitue l'avantage des méthodes non intégratives qui évitent de maintenir l'expression rétrovirale des facteurs de pluripotence après la génération de CSPi.

4.3.2. Evènements moléculaires survenant au cours de la reprogrammation

Le processus de reprogrammation est inefficace avec moins de 3% des cellules somatiques exprimant les facteurs OKSM qui vont donner naissance à des CSPi. Pour atteindre la pluripotence, les cellules doivent passer au travers de mutiples points de contrôles et de barrières potentielles : l'apoptose et la sénescence, la transition mésenchymo-épithéliale, une transition métabolique, l'acquisition des gènes précoces de pluripotences et finalement l'activation du réseau épigénétique et trancriptionnel complet de la pluripotence (Xu et al., 2016). La progression vers la pluripotence se fait via plusieurs « vagues » transcriptionnelles (Figure 13) (Cacchiarelli et al., 2015).



Évènements moléculaires

Vagues transcriptionnelles



La reprogrammation est un processus stressant au niveau cellulaire qui entraîne la production d'espèces réactives de l'oxygène et une réponse aux dommages de l'ADN qui peut entraîner une apoptose via l'activation des caspases 3/8 de manière Oct4 dépendante (Li et al., 2010a). Dans la phase précoce de la reprogrammation, le cycle cellulaire est crucial car les cellules quiescentes sont réfractaires à la reprogrammation alors que les cellules se divisant rapidement y sont particulièrement sensibles. Les cellules somatiques soumises à la reprogrammation (fibroblastes, cellules sanguines) sont d'origine mésenchymateuse alors que les CSE sont épithéliales ce qui nécessite la survenue d'une transition mésenchymo-épithéliale sous le contrôle des facteurs OKSM : Oct4, Sox2 et c-myc inhibe la signalisation du TGFβ et donc répriment Snail, un des régulateurs majeurs de la transition épithéliomésenchymateuse pendant que KLf4 augmente l'expression de gènes épithéliaux comme la E-cadhérine (Li et al., 2010b). La TME survient plus tard pour les cellules humaines par rapport aux cellules de souris ce qui explique en partie la lenteur du processus de reprogrammation chez l'homme. La reprogrammation implique une transition métabolique d'un métabolisme oxydatif mitochondrial vers un programme métabolique de type glycolytique qui permet d'aboutir à une production plus rapide d'énergie mais également à une suppression de la génération d'espèces réactives de l'oxygène car celle-ci sont un frein à la reprogrammation (Varum et al., 2011).

Le processus de reprogrammation, qui prend 3 à 4 semaines environ pour les cellules humaines, entraîne un remodelage épigénétique du statut de méthylation de l'ADN et des histones de cellules différenciées vers le statut de méthylation caractéristique des CSE (Maherali et al., 2007). Par ailleurs, des expériences d'analyse d'expression de gènes dans différentes populations de cellules au cours de la reprogrammation voire de cellules isolées ont révélé que le processus de reprogrammation est à la fois déterministe et stochastique. Les données des laboratoires de Hochedlinger et Jaenisch, portant sur l'étude de fibroblastes murins avec expression inductible des facteurs OKSM, suggèrent qu'une première « vague » de remodelage transcriptionnel fait intervenir les facteurs Klf4, qui va avoir un rôle de répresseur des gènes de différenciation, et c-Myc. Suite à cette première « vague » qui pousse les cellules différenciées dans la voie de la reprogrammation, des évènements stochastiques de remodelage épigénétique ou transcriptionnel vont intervenir. Cette phase stochastique, si elle aboutit à l'activation de régulateurs comme Utf1, Esrrb, Dppa2, et Lin28, va permettre à certaines cellules de progresser vers l'état pluripotent grâce à l'activation du locus de SOX2. Il y a alors une deuxième « vague » transcriptionnelle, dépendante de l'activité de Sox2, et dans laquelle

intervient également Klf4, dans un rôle d'activation des gènes de pluripotence, et qui va aboutir à l'apparition de CSPi (Buganim et al., 2012; Polo et al., 2010).

Chez l'homme, la diminution d'expression des gènes somatiques puis l'activation du réseau transcriptionnel de la pluripotence passe également par plusieurs vagues transcriptionnelles. La connaissance précise de ces différentes étapes transcriptionnelles de la reprogrammation a été rendue possible par l'étude moléculaire intégrative associant séquençage d'ARN (ARNseq), immunoprécipitation de chromatine et analyse de méthylation de l'ADN réalisée tous les 3 jours au cours du processus de reprogrammation inductible par la doxycycline de fibroblastes humains immortalisés par l'expression de la télomérase (Cacchiarelli et al., 2015). Ces données montrent qu'une première vague transcriptionnelle, survenant au 5^{ème} jour entraîne l'expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire et la transition métabolique comme IGF2, AFP, GSN et ALDH1A1. La 2^{ème} vague transcriptionnelle, survenant vers le 10^{ème} jour dans la fraction des cellules exprimant le marqueur de pluripotence SSEA3 (Stage-specific embryonic antigen 3), inclut des gènes homéotiques comme les gènes HOX et des marqueurs du développement mésodermique comme H19 et endodermique comme le facteur de transcription HNF. La 3^{ème} vague entraîne l'activation des gènes de l'embryogénèse précoce et de l'endoderme primitif comme NANOG, UTF1, LEFTY2, NODAL et GDF3 avec le pic d'expression de NANOG précédant l'activation complète du réseau transcriptionnelle de la pluripotence. Enfin, en parallèle de l'activation du réseau transcriptionnel de pluripotence dans les cellules TRA1-60 vers le 20^{ème} jour, il existe une vague d'expression de margueurs pré implantatoire ou trophoblastique comme PPA2/3/5, DNMT3L, ALPPL2, FGF4, and TFCP2L1 avec une diminution d'expression des marqueurs des 3 feuillets primitifs comme T, CER1, MIXL1 puis lors de l'apparition des CSPi, cette « vague pré-implantatoire » s'éteint et laisse place à un programme d'expression génique de type post-implantatoire. Ces données sur les différentes vagues transcriptionnelles obtenues par ARNseq ont ensuite été corroborées par les données de méthylation qui montrent un parallèle entre les sites de remodelage chromatinien et les différentes vagues transcriptionnelles observées ainsi qu'un état chromatinien de type pré-implantatoire en fin de reprogrammation dans les cellules TRA1-60 avant l'obtention des CSPi définitives (Cacchiarelli et al., 2015).

4.4. Caractérisation de la pluripotence

Indépendamment de leur origine et de la technique utilisée pour les isoler, les CSP partagent les mêmes propriétés biologiques mais présentent des variations propres à chaque lignée en culture, dans leurs capacités de différenciation et dans leur stabilité génétique et épigénétique. Ces différences sont probablement liées au fond génétique de chaque lignée qui lui est propre. Les CSP sont cultivées sous forme de colonies qui ne sont pas dissociées en cellules uniques lors de chaque passage afin de favoriser la croissance et la survie cellulaire. Par ailleurs, une différenciation spontanée in vitro est fréquemment observée en culture, principalement pour les CSP humaines, et il est donc nécessaire d'être particulièrement vigilant sur les conditions de culture (nécessité d'un changement de milieu quotidien) et d'éliminer toutes les cellules différenciées au fur et à mesure des passages. L'analyse morphologique des colonies de CSP humaines révèle des cellules habituellement arrondies, à bord net et ce contrôle visuel est une première étape dans la caractérisation des cellules.

Les CSP sont capables de former des corps embryonnaires quand elles sont mises en culture non adhérente dans un milieu de culture capable d'induire leur différenciation. Ces corps embryonnaires comportent alors des cellules filles issues des CSP et avec des capacités de différenciation dans les lignées endodermiques, mésodermiques et ectodermiques ce qui confirme le caractère pluripotent des CSP. Le test de pluripotence de référence pour les CSP murines est leur capacité à générer un chimérisme après injection dans la masse cellulaire interne d'un blastocyste suivi de réimplantation qui va donner naissance à une souris chimère dont une partie des tissus est originaire des CSP injectées dans le blastocyste. Ce test est impossible à réaliser pour les CSP humaines pour des raisons éthiques évidentes. La pluripotence des CSP humaines est confirmée par leur tératogénicité après injection intra-musculaire chez la souris et la mise en évidence de tissus normaux issus des 3 feuillets embryonnaires ectoderme, mésoderme et endoderme en analyse histologique. Ce test de tératogénicité est le « gold standard » pour affirmer la pluripotence.

4.4.1. Marqueurs de pluripotence

Des marqueurs de pluripotence membranaires peuvent être détectés. Les CSP humaines expriment des marqueurs extra-membranaires glycolipidiques

comme SSEA-3 et SSEA-4 (Stage-Specific Embryonic Antigen 3 et 4) qui sont exprimés par les cellules de la masse cellulaire interne du blastocyste mais dont la fonction reste inconnue. Les antigènes TRA-1-60 et TRA-1-81 (Tumor Rejection Antigen), des protéoglycanes kératanes sulfates sialylées, peuvent également être détectés sur les CSP humaines mais sont absents des CSP murines. Au cours de la reprogrammation, les cellules humaines vont d'abord acquérir l'expression de SSEA3 puis c'est TRA1-60 qui sera exprimé dans un second temps (Cacchiarelli et al., 2015).

D'autres marqueurs sont nucléaires et correspondent à des facteurs de transcription dont l'activité est fondamentale dans le maintien de la pluripotence ; on peut citer Oct4, Nanog ou Sox2. Oct4 est un facteur de transcription dont l'expression débute au stade 4 à 8 cellules puis se prolonge dans la masse cellulaire interne et dans les cellules de la lignée germinale. Nanog est exprimé à partir du stade morula puis dans les cellules de la masse cellulaire interne et également dans les cellules germinales précoces. Sox2 interagit avec les facteurs de transcription ayant un domaine POU, comme Oct4, avec lequel il est co-exprimé. Sox2 agit de manière synergique avec Oct4 avec un rôle de répresseur ou d'activateur en fonction des gènes régulés (Rizzino, 2013).

La mise en évidence de l'expression des facteurs membranaires et/ou nucléaires décrits ci-dessus est complémentaire du test de tératogénicité pour confirmer la pluripotence des CSP humaines.

4.4.2. Autres caractérisations

D'autres explorations sont nécessaires pour caractériser précisément les CSP et pouvoir les utiliser comme modèle robuste en recherche voire dans des applications cliniques. Tout d'abord, il est nécessaire de déterminer le caryotype afin de confirmer sa normalité. Cependant, il a été montré que la normalité du caryotype n'exclut pas la présence d'anomalies chromosomiques à type d'amplifications/délétions qui peuvent être mises en évidence par CGH (Comparative Genomic Hybridization) et qui sont mises en évidence de manière récurrente dans les CSP en culture (Tosca et al., 2015). D'autre part, les techniques d'empreinte génétique ou de typage HLA permettent d'assurer une traçabilité des lignées voir d'anticiper leur utilisation en clinique (Asprer and Lakshmipathy, 2015). Enfin, le contrôle de l'absence de contamination est nécessaire avec, en particulier, la nécessité de contrôler l'absence

d'infection à mycoplasme qui peut être fréquente dans les lignées en culture. L'absence d'infection virale doit être confirmée si une utilisation clinique est envisagée.

4.5. Applications du système CRISPR/Cas 9 dans la recherche sur les cellules souches

Les cellules souches pluripotentes induites représentent un outil majeur permettant des modifications géniques dans des CSP et leurs dérivatifs différenciés. Via cette capacité de générer un système embryonnaire, la technique permet d'étudier les effets des altérations génétiques spécifiques de maladies particulières au sein d'un tissu généré ex-vivo. Dès lors, ces cellules permettent d'obtenir un système d'étude in vitro pour modéliser la physiopathologie d'une maladie (Robinton and Daley, 2012). Cependant, la variabilité inter-lignée des CSPi, dans leur capacités de différenciation, par exemple, peut poser problème pour l'étude de variations phénotypiques légères d'une maladie donnée et il peut être difficile de conclure qu'une différence phénotypique observée entre 2 lignées est liée à une altération génomique ou à la variabilité inter-CSPi (Hockemeyer and Jaenisch, 2016). De ce fait, la génération de lignées isogéniques contrôle est très importante afin de comparer des cellules qui ne diffèrent que par l'altération génétique responsable de la maladie que l'on souhaite modéliser avec les CSPi. L'utilisation du système CRISPR/Cas9 permet de générer des CSPi contrôle dont la mutation est « corrigée » en exploitant la recombinaison homologue. Par exemple, ceci a permis de générer des CSPi « corrigées » à partir de CSPi issues de patients porteurs de myopathie de Duchenne et de montrer que les cellules musculaires issues de la différenciation de ces CSPi corrigées expriment la dystrophine ce qui n'est pas le cas des cellules musculaires différenciées à partir des CSPi des patients (Li et al., 2015). Cette approche a également été utilisée dans une étude « preuve du concept » pour corriger une mutation du gène CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductor Receptor) responsable de la mucoviscidose dans des organoïdes intestinaux et ainsi restaurer la réponse à l'AMPc qui est absente en cas de mutation de CFTR (Schwank et al., 2013).

Le système CRISPR/Cas 9 a également été utilisé pour induire des mutations dans des CSPi afin d'étudier des mécanismes pathogènes ou de résistance. On peut citer l'induction de mutation homozygote CCR5Δ32 dans des CSPi qui entraîne une

résistance à l'infection par le virus d'immunodéficience humaine par les monocytes/macrophages différenciés à partir de ces CSPi modifiées (Ye et al., 2014). Enfin, cette approche d'ingénierie du génome dans les CSPi est prometteuse pour étudier des maladies d'origine polygéniques et démontrer l'implication d'allèles ou d'association d'allèle dans la physiopathologie (Hockemeyer and Jaenisch, 2016).

4.6. Cellules souches pluripotentes en cancérologie

Le cancer est une maladie complexe qui est la résultante d'anomalies génétiques et épigénétiques. Comme on l'a détaillé plus haut, il y a des parallèles conceptuels entre la tumorigénèse et le processus de reprogrammation, en particulier en ce qui concerne les processus de remodelage épigénétique qui sont comparables dans une certaine mesure. De ce fait, la reprogrammation induite par la transduction de facteurs de transcription peut constituer un outil intéressant pour l'étude des processus de régénération et d'oncogénèse, avec des perspectives de développer de nouvelles approches thérapeutiques.

Les CSE humaines sont des outils cellulaires majeurs pour la recherche fondamentale et translationnelle mais posent des problèmes éthiques inhérents à leur utilisation. Le développement de la technique de la reprogrammation depuis les travaux de Yamanaka (Takahashi and Yamanaka, 2006) ont permis leur utilisation par le biais des CSPi dont l'utilisation en recherche biologique a été exponentielle avec une grande variété de technologies de reprogrammation dont les non-intégratives sont les plus largement utilisées aujourd'hui : virus de Sendaï, vecteurs épisomaux et ARNm. L'utilisation des CSPi comme outils de recherche sur le cancer a permis d'étudier l'impact de la reprogrammation sur des cellules cancéreuses, leur intérêt comme plateforme de criblage de potentiels nouveaux traitements ou de toxicités thérapeutiques potentielles et finalement les CSPi ont été utilisées pour la modélisation de prédisposition génétique familiale au cancer. Cependant, les applications en cancérologie des CSPi ont mis des limites qui ont été mises en évidence par les différentes études publiées.

4.6.1. Applications biomédicales potentielles des CSPi dans la recherche en oncologie

La reprogrammation de cellules cancéreuses primaires en cellules souches pluripotentes induites a de nombreuses applications potentielles en recherche en oncologie. Les CSPi dérivées de tumeurs pourraient être des objets d'étude pour les cancers provenant de tissus et cellules à durée de vie limitée en culture ou difficiles à obtenir des patients ; on pense, par exemple, au tissu cérébral ou aux cellules C. Par ailleurs, les CSPi pourraient aider à modéliser l'activité de gènes associés aux cancers dont il n'existe pas d'équivalent murin avec la même activité ou dont les mutations ou associations de mutations sont trop complexes à modéliser chez la souris. Les CSPi dérivées de tumeurs humaines peuvent également être utilisées pour préserver les génotypes uniques des cellules tumorales dans des biobanques afin d'être utilisées pour des études ultérieures et également pouvoir les différencier en différents tissus. La génération de CSPi à partir de cellules de cordon de patients qui développement tumoral chez ces individus (Broxmeyer, 2010).

L'utilisation de CSPi en recherche en oncologie présente des avantages et désavantages par rapport à l'utilisation de lignées cellulaires ou de modèles animaux. Tout d'abord, les CSPi sont spécifiques d'espèces et d'individus et donc les mutations oncogéniques peuvent être étudiées dans le cadre du contexte génomique spécifique du patient. Cependant, la nature stochastique du mécanisme moléculaire de la reprogrammation et la variabilité épigénétique qui en résulte peuvent rendre difficile l'interprétation de différences phénotypiques entre CSPi pour savoir si ces différences sont liées à la variabilité d'un clone donné ou à un mécanisme pathogénique de la maladie modélisée par les CSPi. Ensuite, les CSPi ont des capacités de prolifération et d'autorenouvellement illimitées ce qui les rend très attractives pour du criblage à haut débit d'agent anti-tumoraux ou pour des études toxicologiques. Les CSPi, bien que relativement stables sur le plan génétique, n'en sont pas moins des lignées cellulaires qui peuvent accumuler des mutations ou des anomalies chromosomiques lors de la culture au long cours (Tosca et al., 2015), ceci constituant un frein à leur utilisation en thérapie cellulaire. Enfin, les CSPi peuvent être redifférenciées vers des tissus sensibles ou résistants à la transformation oncogénique afin d'étudier comment un oncogène donné induit un phénotype dans un type cellulaire et à un stade de développement donné et ceci dans un environnement donné (niche). Cependant le fait que les voies de signalisation guidant la différenciation ne soient pas encore suffisamment, voire pas du tout connues pour un certain nombre de types cellulaires, représente un frein à la modélisation. La création de modèles d'organes entiers avec la reconstitution des

interactions des différents tissus intervenant dans l'oncogénèse n'est pas possible pour certains organes mais est envisageable dans d'autres, comme le cerveau ou le tube digestif, depuis la description d'organoïdes, qui sont des« mini organes » (minicôlon, mini-cerveau ou mini-rein), générées in vitro à partir de CSPi (Lancaster et al., 2013; Spence et al., 2011). On peut également imaginer la réalisation de cribles moléculaires à haut débit en utilisant des cellules différenciées à partir de CSPi spécifiques de cancer, comme cela a été montré, en neurosciences, pour des cellules souches de la crête neurales différenciées à partir d'CSPi porteuses de mutations IKBKAP de la dysautonomie familiale (Lee et al., 2012). Si la différenciation des CSPi peut modéliser le développement tumoral in vitro, alors des molécules éliminant sélectivement ces cellules tumorales peuvent être identifiées et également testées sur d'autres types cellulaires dérivés à partir de ces mêmes CSPi pour évaluer leur effet sur les tissus normaux et anticiper d'éventuels effets secondaires. Ceci peut donc déboucher sur des criblages de toxicités de différentes molécules sur différents types cellulaires dérivées des CSPi. Il est important d'étudier les capacités de différenciation de CSPi dérivées à partir de cellules cancéreuses car si elles présentaient des déficits dans leurs capacités de différenciation, ces déficits pourraient être étudiés et éventuellement servir au développement de thérapies à visée différenciant et de régression tumorale.



Figure 14: Applications potentielles des CSPi en recherche en cancérologie D'après Saul J. Sharkis et al., Sci Transl Med 2012.
Les méthodes d'ingénierie du génome sont largement applicables et appliquées aux CSP (Hockemeyer and Jaenisch, 2016) ce qui permet de réaliser des modèles d'oncogénèse « sur mesure » en introduisant des mutations dans des oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs connus et/ou supposés et ainsi d'étudier leur influence sur l'oncogénèse de différents tissus différenciés à partir des CSPi. L'ingénierie du génome pourrait également permettre de « corriger » une mutation responsable d'une maladie dans des cellules souches de patients afin de pouvoir les utiliser comme source de thérapie cellulaire, comme cela a été montré dans un modèle de drépanocytose humaine corrigée par la technologie CRISPR/Cas9 (Huang et al., 2015). En effet, les CSPi sont une source potentielle de tissus pour la médecine régénérative et, en oncologie, pourrait constituer une source de cellules souches hématopoïétiques pour la greffe de moëlle de patients traités pour leucémie ou encore une source de cellules de peau ou mésenchymateuses autologues pour faciliter la reconstruction et la cicatrisation lors de chirurgie étendues et délabrantes. Une étude a récemment utilisé les fibroblastes de patients atteints de leucémie aiguë myéloïdes afin de générer des CSPi puis de les différencier en progéniteurs hématopoïétiques normaux, c'est-à-dire sans aucune des anomalies constatées dans les cellules sanguines leucémiques (Salci et al., 2015). L'utilisation potentielle des CSPi pour de la greffe/transplantation autologue à visée reconstructrice post traitement pourrait s'organiser à travers une banque de tissu/CSPi spécifique de patients à l'échelle d'un pays comme celle constituée au l'iPS cell stock for regenerative medicine (http://www.cira.kyoto-Japon. u.ac.jp/e/research/stock.html). Les CSPi pourraient également être utilisées pour la génération de médiateurs cellulaires d'immunothérapies comme cela a été montré, par exemple, avec des cellules NK différenciées à partir de CSPi (Knorr et al., 2013). Cependant, la sécurité d'emploi de ces cellules en médecine régénérative n'est pas encore démontrée ; le premier essai de transplantation de cellules pigmentaires de la rétine autologue dérivées de CSPi chez l'homme au Japon a été suspendu en raison de la découverte de deux altérations géniques dans les cellules différenciées in vitro du 2^{ème} patient qui devait être traité (Scudellari, 2016). Plus inquiétant, il a été décrit récemment une compression médullaire secondaire à une lésion néoplasique à différenciation gliale localisée au niveau de la moelle épinière thoracique et du cul de sac dural et développée suite à l'injection intra-thécale de cellules souches mésenchymateuses, neurales et embryonnaires à un patient pour le traitement de

séquelles d'AVC (Berkowitz et al., 2016). L'utilisation de CSPi ou de leurs dérivées, même autologues, pour la médecine régénérative nécessite donc la plus grande prudence et de faire la preuve de son inocuité ; l'utilisation de stratégies de gène suicide à base de thymidine kinase du virus herpès par exemple pourrait être une mesure de sécurité à envisager pour l'utilisation de ces cellules en clinique.

L'utilisation d'organoïdes en trois dimensions in vitro permet de mieux modéliser la biologie tissulaire. Des organoïdes d'estomac, d'intestion grêle, de côlon, de foie, de poumon, de cerveau et de rein ont été générés à partir de CSPi d'origine humaine (Fatehullah et al., 2016). Les avantages des organoïdes sont multiples : reconstitution du milieu tissulaire, meilleure organisation spatiale des différents types cellulaires de l'organe, meilleure fonctionnement tissulaire et élément de remplacement potentiel des modèles animaux quand l'utilisation d'un organisme entier n'est pas nécessaire. Par exemple, les organoïdes de foie pourraient être utiles pour des études de toxicologie et de pharmacocinétique. Il reste encore des difficultés pour le développement des organoïdes en lien avec les connaissances des processus de différenciation et les échanges gazeux par exemple, mais ces modèles sont sources d'espoir de pouvoir un jour recréer des organes entiers à partir de cellules souches pluripotentes.

4.6.2. Reprogrammation de cellules cancéreuses : lignées et cellules primaires

Avant les travaux de Yamanaka, une étude a utilisé une approche de transplantation nucléaire de noyaux de cellules cancéreuses dans un ovocyte afin d'étudier l'influence de l'activité reprogrammante de l'ovocyte sur un génome oncogénique et les potentialités de ce génome à donner naissance à des tumeurs à l'échelon d'un organisme entier. Des cellules de leucémies, lymphomes, cancer du sein et mélanomes murins ont été utilisées pour ces transferts nucléaires et ont permis d'obtenir des blastocystes porteurs du génome oncogénique des noyaux transplantés. Ces données ont montré que malgré les nombreuses anomalies génétiques présentes dans une cellule cancéreuse, un développement cellulaire normal précoce est possible dans un contexte embryonnaire.

Cependant, seuls les blastocystes générés à partir de cellules de mélanome ont permis la dérivation de lignées de CSE porteuses de Ras inductible par la doxycycline. Ces CSE ont permis la génération de souris chimères développant

précocement des mélanomes mais également des rhabdomyosarcomes et des MPNST (Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor). Ce modèle permettait ainsi d'étudier le potentiel oncogénique d'altérations géniques données dans différents types de tissus (Hochedlinger et al., 2004).

A l'heure actuelle, des lignées de CSPi sont générées en routine par de nombreux laboratoires à partir de tissus différents comme la peau ou le sang (Yang, 2014), provenant de patients atteints de maladies spécifiques mais également de donneurs sains afin d'établir des lignées témoins. Les gènes suppresseurs de tumeur peuvent constituer un frein à la reprogrammation et leur invalidation permet d'en améliorer l'efficacité, comme cela a été montré avec RB (Kareta et al.), TP53 (Hong et al., 2009) ou PTEN (Liao et al., 2013). Cependant, alors que beaucoup de cellules cancéreuses ont des inactivations de GST, la reprogrammation de ces cellules a été particulièrement difficile et inefficace et relativement peu de publications ont rapporté des données dans ce domaine au regard de la littérature très abondante générées par les cellules souches. Les difficultés de reprogrammation des cellules cancéreuses sont probablement en lien avec des barrières génétiques liées aux mutations oncogéniques, aux modifications épigénétiques, à l'accumulation de dommages de l'ADN et à l'induction de la sénéscence par la reprogrammation dans ces cellules (Banito and Gil). Malgré ces difficultés, plusieurs publications ont rapporté la génération de lignées de CSPi à partir de lignées de cellules cancéreuses. Différents types de tumeurs ont été étudiés sous l'angle de la reprogrammation : le mélanome, le cancer de la prostate, les cancers digestifs, les leucémies myéloïdes chroniques, le cancer du poumon, du sein, de la vessie les glioblastomes et les sarcomes (Carette et al., 2010; Corominas-Faja et al., 2013; Iskender et al., 2016; Lin et al., 2008; Liu et al., 2014; Mathieu et al., 2011; Miyoshi et al., 2010; Stricker et al., 2013; Utikal et al., 2009; Zhang et al., 2013).

La reprogrammation de lignées cellulaires cancéreuses Colo (mélanome) et PC-3 (prostate) a été réalisée par l'expression du miARN mIR-302 (Lin et al., 2008) qui est exprimé dans les CSE et diminue lors de la différenciation. Miyoshi et collaborateurs ont reprogrammé plusieurs lignées cancéreuses gastro-intestinales mais ont été dans l'obligation d'optimiser la combinaison des gènes à transduire pour obtenir des CSPi et ont utilisé une combinaison de OKSM, NANOG, LIN28, BCL2, KRAS, et des shARN des gènes suppresseurs de tumeurs pour chaque lignée (Miyoshi et al., 2010). Des cellules KBM7 de leucémie myéloïde chronique porteuses

de la protéine de fusion Bcr-Abl ont été reprogrammées en CSPi par transduction rétrovirale des 4 facteurs OKSM. La reprogrammation rendait les cellules indépendantes de l'addiction oncogénique à bcr-abl et les CSPi étaient résistantes à l'imatinib, l'inhibiteur de bcr-abl, contrairement aux lignées parentales tumorales. Ceci suggère que les voies de signalisation de maintenance de la pluripotence « compensent » dans une certaine mesure la signalisation par bcr-abl, au stade CSPi (Carette et al., 2010). Un modèle murin de leucémie aiguë généré par transduction rétrovirale de la translocation MLL-AF9 dans des cellules souches hématopoïétiques de souris transgéniques porteuses des 4 facteurs OKSM sous contrôle de la doxycycline a permis, après ajout de la doxycycline, de générer des CSPi porteuses de cette translocation et capable de produire des tératomes et des chimères. La plupart des souris chimériques développait rapidement des leucémies, montrant que les conditions pour l'apparition de la leucémie étaient recréées au cours du développement des souris chimériques. Cette approche ne fonctionnait pas pour les leucémies aiguës lymphoïdes liées à notch (Liu et al., 2014). La reprogrammation de cellules porteuses d'anomalies génétiques oncogéniques n'est donc pas impossible mais certains cancers sont réfractaires aux tentatives de reprogrammation et la combinaison des facteurs de reprogrammation à utiliser est probablement ce qui demande le plus d'optimisation. Dans la plupart des études, ce sont des lignées cellulaires cancéreuses qui ont été reprogrammées, les études portant sur des cellules malignes humaines primaires sont limitées aux leucémies (Gandre-Babbe et al., 2013; Hu et al., 2011; Kotini et al., 2015; Kumano et al., 2012) et au cancer du pancréas (Kim et al., 2013a). Hu et collaborateurs ont rapporté la génération de CSPi à partir de cellules souches hématopoïétiques normales et cancéreuses provenant d'un patient atteint de leucémie myéloïde chronique par transduction des facteurs OKSM, NANOG, LIN28, et l'antigène T de SV40 (Hu et al., 2011). Dans une autre étude, les CSPi générées à partir de cellules de LMC de patients étaient insensibles à l'imatinib alors que les cellules hématopoïétiques différenciées à partir de ces CSPi retrouvaient une sensibilité à l'imatinib. Ces données illustrent l'importance du contexte cellulaire, et épigénétique, pour l'activité oncogénétique d'une anomalie moléculaire donnée (Kumano et al., 2012). Kim et collaborateurs ont réussi à dériver une lignée de CSPi à partir d'un adénocarcinome du pancréas porteur d'une mutation KRAS G12D ainsi qu'une lignée témoin à partir du tissu non tumoral environnant la tumeur (Kim et al., 2013a). La rareté des publications portant sur la

reprogrammation de tissu malin primaire, comparativement à l'ensemble de la littérature sur la reprogrammation, illustre probablement la difficulté de cette approche qui nécessiterait de nouveaux développements technologiques pour être appliquée de manière plus étendue.

4.6.3. Modélisation de la progression du cancer avec les CSPi

De nombreux modèles animaux ont été générés pour étudier le phénotype de maladies humaines et cependant, les meilleurs de ces modèles ne sont au mieux que des approximations de la pathologie humaine. Les tumeurs primaires de patients ainsi que les lignées cellulaires dérivées de ces tumeurs permettent l'étude des stades tardifs de l'oncogénèse, quand la tumeur est établie mais ne sont pas de bons modèles pour étudier les étapes précoces de l'oncogénèse d'un tissu. Les CSPi sont, en revanche, de bons modèles d'étude des étapes précoces de différenciation des tissus et pourraient constituer de ce fait de bons modèles pour l'étude des étapes précoces de l'oncogénèse ; elles pourraient permettre d'identifier les évènements moléculaires responsables de l'initiation de la progression tumorale dans un contexte cellulaire et à un temps donné. De même, comprendre la niche dans laquelle se développe le cancer est très important pour essayer de recréer le contexte dans lequel se développe le cancer et ainsi bâtir des modèles tumoraux plus physiologiques. Pour ces raisons, les modèles de cancérogénèse à partir de CSPi ont de nombreuses applications potentielles. L'étude de Kim et collaborateur portant sur des CSPi générées à partir d'adénocarcinome du pancréas KRAS muté est un exemple de ces applications potentielles. Il faut préciser que la reprogrammation des cellules d'adénocarcinome (ADK) du pancréas a été difficile, a nécessité la transduction de facteurs OKSM inductibles dont l'expression devait être maintenue par la doxycycline afin de maintenir le phénotype pluripotent. Ces CSPi d'ADK du pancréas généraient des tératomes, après injection sous cutanée dans des souris immunodéficientes, qui comportaient des néoplasies intraépithéliales pancréatiques (NIP) à 3 mois qui progressaient ensuite vers des lésions invasives à 9 mois. L'analyse protéomique a confirmé que les cellules dérivées de ces NIP étaient très proches des cellules observées en pathologie humaine au cours de la progression de l'ADK du pancréas. Il a également été possible de mettre en évidence le rôle du facteur de transcription HNF4a et de son réseau protéique, non connu jusqu'alors. En effet, HNF4a a été détecté dans des lésions humaines

précoces et intermédiaires mais pas avancées ce qui a confirmé son rôle dans la progression initiale de la maladie. Cette étude a donc permis de modéliser les étapes précoces du développement tumoral et de mettre en évidence un mécanisme moléculaire de cette progression précoce. Cependant, dans cette étude, les tératomes formés par ces iPS étaient beaucoup plus petits que les tératomes formés à partir de la lignée de CSE humaine H1 avec un biais de différenciation vers l'endoderme ce qui explique qu'il a été possible d'étudier le développement des tératomes jusque 9 mois après injection dans les souris immunodéficientes. Mais cela pose question sur la véritable nature et la pluripotence de ces « CSPi d'ADK du pancréas » qui nécessitaient une expression continue des facteurs OKSM inductibles par la doxycycline (alors qu'habituellement les facteurs de transcription endogène prennent le relais dans les CSpi), et généraient des « tératomes » biaisés vers l'endoderme.

La pluripotence, la reprogrammation, l'engagement de la différenciation et la transformation oncogénique sont des processus fondamentalement reliés en ce qu'ils reposent de manière importante sur des régulations de type épigénétique. Les gènes de pluripotence sont souvent surexprimés dans les tumeurs humaines agressives comme signalé ci-dessus ce qui suggère que la progression tumorale implique un processus de dé-différenciation. Un exemple assez net des liens mécanistiques entre reprogrammation et oncogénèse est apporté par les travaux de reprogrammation partielle in vivo par les auteurs Japonais (Ohnishi et al., 2014) et espagnols (Abad et al., 2013). Les auteurs japonais ont généré une lignée de CSE murine comportant les facteurs OKSM inductibles par la doxycycline intégrés au niveau du locus ROSA26. Les fibroblastes embryonnaires provenant de ces souris pouvaient être induits en CSPi après traitement par la doxycycline. Des chimères ont ensuite été générées à partir de ces CSPi afin d'étudier la possibilité d'établir une reprogrammation in vivo. Le traitement des souris par la doxycycline pendant 4 semaines entraînait la formation de tératomes multiples, confirmant le processus de reprogrammation in vivo. Après induction des 4 facteurs OKSM pour une durée plus courte, durant 3 à 9 jours, on observait l'apparition de tumeurs dans différents tissus comportant des cellules indifférenciées dysplasiques et porteuses de modifications épigénétiques importantes. Des tumeurs se développaient au niveau du rein et avaient des caractéristiques de tumeurs de Wilms, un cancer pédiatrique. Les cellules de ces tumeurs pouvaient être reprogrammées en CSPi après 2 semaines

de traitement par la doxycycline, réinjectées dans des blastocystes et contribuaient à la génération de souris chimères qui ne développaient pas plus de cancer suggérant que le processus oncogénique lié à la reprogrammation partielle était réversible (Ohnishi et al., 2014). Ces données suggèrent que les mêmes processus épigénétiques sont impliqués dans la reprogrammation et l'oncogénèse et sont réversibles.

4.6.4. Modélisation de syndromes de prédisposition liés aux cancers

Le syndrome de Li Fraumeni (SLF) est une maladie héréditaire de prédisposition au cancer causée par la présence d'une mutation germinale de p53 et a fait l'objet d'une étude de modélisation via les CSPi (Lee et al., 2015). Les modèles murins ne présentent pas toutes les caractéristiques de la maladie humaine. Les patients atteints de SLF peuvent être atteints de cancer du sein, de tumeurs cérébrales, d'ostéosarcome, de sarcomes des tissus mous, de leucémies et de corticosurrénalome. Des CSPi ont été dérivées à partir de fibroblastes de patients atteints de SLF et porteurs d'une mutation faux sens G245D ainsi qu'à partir de fibroblastes de membres de la famille non atteints pour servir de témoins. Des ostéoblastes ont été différenciés à partir des CSPi-SLF et présentaient des d'ostéosarcome : différenciation caractéristiques ostéoblastique perturbée. croissance clonale et tumorigénicité in vivo. L'expression de p53 était identique dans les cellules souches mésenchymateuses (CSM), précurseurs des ostéoblastes, mais l'expression des cibles de p53, p21 et MDM2 étaient diminuées dans les MSC SLF puis, l'activité transcriptionnelle de p53 diminuait tout au long de la différenciation ostéoblastique. Cependant l'invalidation de p53^{G245D} dans les ostéoblastes SLF entraînait une restauration de la différenciation ostéogénique suggérant que cette mutation se comportait comme une mutation gain de fonction. Concordant avec le déficit de différenciation ostéogénique, les ostéoblastes SLF présentaient un déficit de l'expression de H19 habituellement observée au cours de la différenciation ostéogénique et la restauration de son expression amenait une suppression de la tumorigénicité. Le profil d'expression des gènes des ostéoblastes SLF était comparable à celui d'ostéosarcome plutôt qu'à celui d'ostéoblaste normal tel que cela était observé pour les ostéoblastes différenciés à partir de CSPi avec p53 sauvage. Cette étude a démontré la possibilité de modéliser une prédisposition familiale au cancer avec les CSPi. Il est intéressant de noter que la modélisation a

été réalisée sur le modèle ostéosarcome car le protocole de différenciation ostéoblastique à partir des CSPi est bien établi, les auteurs n'ont pas décrit les autres types tumoraux du SLF, probablement en raison des difficultés techniques liées à la différenciation vers d'autres types cellulaires. La modélisation des syndromes de prédisposition au cancer avec les CSPi nécessite donc de prendre en compte les connaissances en biologie du développement et les techniques de différenciation in vitro qui ne sont pas connues pour tous les types cellulaires de l'organisme.

Une autre étude a rapporté la génération de 24 CSPi, par transfection d'ARN, à partir de biopsies cutanées pratiquées sur 4 membres d'une même famille, sur trois générations, et porteurs d'une mutation 5382insC de BRCA1 (Soyombo et al., 2013). Des CSPi ont été générées à partir des biopsies cutanées de 8 autres membres de cette famille, non porteurs de la mutation, pour servir de contrôle. L'analyse par PCR quantitative (qPCR) et western blot a montré que la transcription de BRCA1 était doublée dans les CSPi par rapport aux fibroblastes ; l'analyse par gPCR spécifique d'allèle a montré 50% d'allèle sauvage et 50% d'allèle muté dans les CSPi issues des sujets porteurs de la mutation BRCA15382insC. L'ensemble des CSPi étaient tératomes après injection de générer des dans des capable souris immunodéficientes. Par ailleurs, une augmentation de l'expression de PKC-theta dans les CSPi BRCA15382insC a été mise en évidence. Une surexpression de cette protéine avait déjà été mise en évidence dans des cancers du sein triple négatif qui correspondent au phénotype habituel des tumeurs BRCA1 mutées.

En faisant un parallèle avec l'étude du SLF par l'utilisation des CSPi, l'étude des mécanismes de développement du phénotype tumoral des NEM2 pourrait donc passer par l'étude de CSPi porteuses de mutations germinales de *RET* mais également par l'étude de cellules différenciées à partir de ces CSPi au premier rang desquelles, les cellules souches de la crête neurale nous ont paru de première importance au début de ce travail de thèse.

4.7. Différenciation des CSP en cellules souches de la crête neurale

4.7.1. Voies de signalisations et facteurs de transcription impliqués dans la différenciation en crête neurale

La crête neurale constitue une population de cellules souches multipotentes qui est induite à la périphérie de la plaque neurale durant la neurulation et va être à l'origine de nombreux types cellulaires différents. Les cellules de la crête neurale (CCN) vont migrer au stade de la gouttière neurale et constituer ce que certains considèrent comme un 4^{ème} feuillet embryonnaire avec une organisation segmentaire partielle participant à la formation du système nerveux périphérique (neurones ainsi que cellules gliales des systèmes nerveux sympathique, parasympathique et sensoriel), des cellules osseuses, cartilagineuses, musculaires lisses, pigmentées mélanocytaires et des cellules chromaffines surrénaliennes (Mayor and Theveneau, 2013; Sauka-Spengler and Bronner-Fraser, 2008). Les CCN sont un modèle d'étude de développement qui réunit les problématiques d'induction, de spécification, de différenciation, de migration et de régénération. Ces cellules constituent une caractéristique fondamentale des vertébrés qui les différencie des autres métazoaires et leurs capacités de différenciation et de régénération a généré une recherche importante étant donné les perspectives de médecine régénérative.

Durant le développement embryonnaire, la crête neurale se développe au cours d'une période allant de la gastrulation à l'organogénèse tardive en réponse à des facteurs intrinsèques et extrinsèques. Les cellules souches de la crête neurale (CSCN) sont induites à la limite entre le futur neuroectoderme et l'ectoderme non neural. Au fur et à mesure que la neurulation progresse, ces CSCN se retrouvent au niveau des bourrelets neuraux puis vont migrer en même temps que le tube neural se ferme (Figure 15).



Figure 15: Formation du tube neural et individualisation/migration des cellules de la crête neurale (adapté de <u>http://www.embryology.ch</u>)

A : Crête neurale en formation (stade plaque neurale). B : Formation de la gouttière neurale C : Crête neurale en migration (stade gouttière neurale). D : Crête neurale après migration (stade tube neural). 1. épiblaste 2. Gouttière neurale 2'. Bourrelets neuraux 3. Cellule de la crête neurale. 4. neuroépithélium 5. Canal épendymaire 6.tube neural Au cours de la formation du tube neural, les CSCN vont perdre leurs adhésions intercellulaires et entreprendre des réarrangements de leur cytosquelette et de leur morphologie afin d'être capables de migrer en dehors du tube neural. Ceci est possible par l'acquisition de capacités de migration, de récepteurs membranaires, de métalloprotéases et de protéines d'adhésion qui leur permettent de répondre aux différents signaux cellulaires et environnementaux qui dirigent leur migration. Arrivées à leur destination finale, les CSCN s'agrègent avant de réaliser leur différenciation terminale.

L'induction de la crête neurale à la périphérie de la placode neurale est médiée par des signaux comme le FGF (Fibroblast Growth Factor) provenant du mésoderme sous-jacent et le Wnt provenant également du mésoderme mais également de l'ectoderme non-neural adjacent. Ces signaux vont induire l'expression de PAX3 et Zic1 en présence de niveaux intermédiaire de BMP (Bone Morphogenetic Protein) qui, à leur tour, vont induire l'expression d'une série de facteurs de transcription comme Snail/Slug impliqués dans la transition épithéliomésenchymateuse; FoxD3 et les gènes SoxE comme Sox9 et Sox10 qui sont exprimés au cours de l'individualisation des CSCN et vont contrôler leur différenciation. Sox9 confère des propriétés de survie aux précurseurs de la crête neurale tronculaires par l'expression de Snail qui va avoir une activité antiapoptotique. L'expression de ces différents facteurs dans les précurseurs de la crête neurale va entraîner leur individualisation du neuroépithélium dorsal en contrôlant la prolifération cellulaire, la délamination des cellules et l'activation de la transition épithélio-mésenchymateuse (TME). D'autres facteurs spécifiques des crêtes neurales comme FoxD3 et Sox10 persistent dans les cellules en migration et contrôlent l'expression de gènes effecteurs comme des cadhérines et des métalloprotéases.

Au cours de leur migration, les cellules souches de la crête neurale vont exprimer des protéines membranaires comme HNK1 (CD57) et le récepteur au facteur de croissance neural (p75NTR, NGFR, CD271), l'expression de ces marqueurs permet l'identification des CSCN.

4.7.2. Protocoles de différenciation in vitro

Les premières études de différenciation en cellules neuronales ayant intéressé des cellules souches embryonnaires humaines reposaient sur la formation de corps embryonnaires et/ou de co-culture avec des cellules stromales MS5 et PA6. Ce mécanisme était en partie relié à une inhibition de la voie du BMP4 (Kawasaki et al., 2000). Au sein de la population de précurseurs neuronaux obtenus via la co-culture et/ou la formation de corps embryonnaires, il était possible d'obtenir une souspopulation de CSCN caractérisés par une expression de protéines membranaires comme HNK1 et p75NTR permettant un tri cellulaire par cytométrie en flux (Curchoe et al., 2010; Lee et al., 2007). Il a ensuite été montré que l'induction de cellules progénitrices neurales était possible par une double inhibition de la voie SMAD au moyen de petites molécules (Chambers et al., 2009) comme SB431542 ou Noggin qui bloque la voie de signalisation du TGFß/Nodal/activine qui a une activité inductrice vers la différenciation endodermique (D'Amour et al., 2005) et le LDN 193189 ou la dorsomorphine qui bloque la voie du récepteur au BMP (BMPR1) qui a une activité inductrice vers la différenciation mésodermique et épidermique, en association avec d'autres molécules (Williams et al., 2012). Cependant, il faut noter que des concentrations intermédiaires de BMP4 ont une activité sur la différenciation des CSP en CSCN de telle sorte que les concentrations respectives d'inhibiteurs et de BMP4 utilisées dans les différents protocoles a une importance capitale car il s'agit de bloquer incomplètement la voie (Nissan et al., 2011). Les CSCN s'individualisent au niveau du neuroectoderme embryonnaire en réponse à une stimulation de la voie Wnt comme décrit ci-dessus et ceci a permis de mettre au point des protocoles de différenciation des CSP en CSCN en utilisant une combinaison de double inhibition de la voie SMAD et d'activation de la voie Wnt via l'utilisation d'une autre petite molécule, le CHIR99021 qui, via l'inhibition du GSK3B, entraîne une activation de la voie Wnt (Menendez et al., 2013; Mica et al., 2013). Ces protocoles ont également été appliqués aux CSPi. Les protocoles de différenciation in vitro actuels permettent donc d'obtenir une population très enrichie de CSCN à partir de CSP en un peu moins de 2 semaines sans passer par des étapes de co-culture ou de corps embryonnaire dont la reproductibilité n'est pas parfaite. Par ailleurs, il a été montré récemment que le CD49d, exprimé sur la membrane, était le marqueur le plus corrélé à l'expression de Sox10, un facteur clé des CSCN, et permettait de trier les cellules pour obtenir une population très enrichie en CSCN (Fattahi et al., 2016).

4.7.3. Crête neurale et NEM2

L'existence d'une mutation germinale de *RET* peut aboutir, comme décrit plus haut, à la survenue de cancer médullaire de la thyroïde, de phéochromocytome, d'hyperplasie des cellules parathyroïdiennes, parfois, de syndrome de Hirschprung dans le cadre des mutations hypomorphiques. D'un point de vue embryologique, cela signifie que les cellules d'origine des anomalies du tableau clinique de cette maladie sont originaires de l'endoderme (cellules C et cellules parathyroïdienens) et de la crête neurale (phéochromocytome et Hirschprung).

Jusqu'à récemment et suite aux travaux classiques de Le Douarin sur les chimères caille-poulet, les cellules C, cellules d'origine du carcinome médullaire de la thyroïde, étaient réputées comme étant originaires des cellules de la crête neurale présentes au niveau des corps ultimobranchiaux (Le Douarin and Le Lièvre, 1970; Pearse and Carvalheira, 1967; Pearse and Polak, 1971). Cependant des expériences de « lineage tracing » chez la souris transgénique Wnt1-Cre/R26R, qui permet d'obtenir un marquage ßgalactosidase des CSCN neurale suite à l'activation précoce de Wnt, ont montré que les cellules C, présentes au niveau des corps ultimobranchiaux, n'étaient pas marquées par la ßgalactosidase suggérant une origine embryologique différente de la crête neurale (Kameda et al., 2007c). Ces données ont été confirmées très récemment et l'origine endodermique a été montrée au moyen d'une autre expérience de « lineage tracing » utilisant des souris transgénique Sox17/Cre qui marquent précocement les cellules endodermiques antérieures qui expriment Sox17: les cellules C, dans ces souris, étaient porteuses du marquage et exprimaient les facteurs de transcription endodermiques Foxa1 et Foxa2 dont l'expression était également retrouvée dans les échantillons de cancers médullaires de la thyroïde humains (Johansson et al., 2015). Cette remise en question de l'origine des cellules C est à mettre en parallèle avec la démonstration de l'origine endodermique des cellules neuroendocrines digestives et non neuroectodermiques comme cela avait été initialement avancé (May and Kaestner, 2010). Cependant, il n'est pas définitivement démontré que chez l'homme, l'embryologie et la différenciation des cellules C soient les mêmes que chez la souris.

La cellule d'origine du phéochromocytome est la cellule chromaffine qui est issue des cellules progénitrices sympatho-surrénaliennes qui vont se différencier en cellules neurales sympathiques et cellules chromaffines (Shtukmaster et al., 2013).

Les cellules progénitrices sympatho-surrénaliennes sont issues des CSCN qui s'agrègent au niveau de l'aorte dorsale où elles vont former le ganglion sympathique primaire. En réponse aux BMPs sécrétées par les parois de l'aorte dorsale, les cellules acquièrent une capacité de synthèse catécholaminergique avec l'expression d'enzymes de synthèse de la noradrénaline comme la tyrosine hydroxylase et la dopamine beta-hydroxylase et de marqueurs neuronaux sous la direction des facteurs de transcription MASH1 et Phox2b exprimés en réponse aux BMPs. Les progéniteurs sympathico-surrénaliens vont ensuite migrer, à partir du ganglion sympathique primaire, pour investir les ganglions sympathiques définitifs et la surrénale primitive. Dans ces localisations, les cellules entreprennent une différenciation terminale en neurone sympathique ou en cellule chromaffine (Huber et al., 2009).

Conclusion

Les CSPi sont donc utiles pour la modélisation de différents processus pathologiques. Leur utilisation pour la modélisation de l'oncogénèse est encore limitée, la modélisation du syndrome de Li Fraumeni constituant l'exemple le plus abouti. L'utilisation des CSPi pour la modélisation du développement des NEM2 est justifiée par le caractère germinale de la mutation d'un oncogène favorisant la survenue de cancers, modèle unique parmi les syndromes de prédisposition. Cependant, l'incertitude quant à la cellule d'origine du CMT initalement considérée comme provenant de la crête neurale et finalement d'origine endodermique selon les dernière données publiées très récemment est un obstacle à l'obtention d'un modèle d'oncogénèse du CMT dans le cadre de ce syndrome.

OBJECTIFS

Les Objectifs principaux de ce travail étaient les suivants :

1) Génération de cellules souches pluripotentes induites (CSPi) porteuses de mutation de *RET*

Le premier objectif de ce travail de thèse a été de générer des lignées de cellules souches pluripotentes induites à partir de cellules mononuclées du sang porteuses de mutations *RET* cryoconservées et disponibles auprès du service de Génétique de Gustave Roussy.

2) Évaluation des effets phénotypiques et génomiques d'une lignée CSPi après correction de la mutation de *RET*

Nous avons choisi de nous focaliser sur la lignée PB48, porteuses de la mutation faux sens C634Y de *RET* car il s'agit de la mutation germinale la plus fréquente dans les néoplasies endocriniennes multiples de type 2 et avons donc cherché à générer un contrôle isotypique de cette lignée. Nous avons également intégré un transgène exprimant la luciférase dans nos lignées de CSPi porteuses de mutation de *RET* afin de suivre le développement des tératomes in vivo.

3) Différenciation des CSPi mutées *RET* en cellules souches de la crête neurale : étude des capacités de différenciation et analyse comparative de l'expression des gènes.

Nous avons effectué la différenciation des lignées CSPi porteuses de mutation de RET en cellules souches de la crête neurale, l'objectif étant de s'approcher de la cellule d'origine du phénotype tumoral des NEM2, en particulier pour ce qui concerne le phéochromocytome car l'origine des cellules C a été remise en question à la fin de ce travail par une publication démontrant son origine endodermique. La génération des CSCN porteuses de mutations de *RET* avait pour but d'effectuer une étude comparative d'expression des gènes afin de mettre en évidence les mécanismes moléculaires susceptibles de favoriser un phénotype tumoral au niveau de la lignée crête neurale.

RÉSULTATS

1) Génération de cellules souches pluripotentes induites (CSPi) porteuses de mutation de *RET*

Identification des patients/échantillons pour la reprogrammation

Nous avons identifié trois patients suivis à Gustave Roussy et traités pour une néoplasie endocrinienne multiple de type 2.

La première patiente a été prise en charge en octobre 1989, à l'âge de 23 ans, en raison de la découverte d'un nodule thyroïdien gauche de 3 cm en médecine du travail associé à des adénopathies sous maxillaires gauches, la calcitonine était à 4610 pg/ml. Elle présentait également une hypertension artérielle, des flushs (bouffées de chaleur) et un phénotype associant visage triangulaire, lèvres éversées, paupières épaisses, aspect longiligne, pieds creux bilatéraux, hypotrophie musculaire, arachnodactylie, hyperlaxité ligamentaire et hypertrophie des filets nerveux cornéens. Il n'y avait pas de signe évident de neuromatose au niveau du bord libre des lèvres, du bout de la langue ou de la partie interne des yeux. La patiente présentait une raréfaction des sécrétions lacrymales. L'ensemble du phénotype était évocateur d'une néoplasie endocrinienne de type 2B. Devant ce phénotype, une recherche de métanéphrines urinaires a été demandée et était positive ; la scintigraphie à la MIBG (métaiodobenzylguanidine) a mis en évidence une fixation surrénalienne bilatérale. L'analyse génétique germinale du gène RET a révélé une mutation 2753T>C de l'exon 16 de type faux sens aboutissant à une substitution M918T; il a également été mis en évidence un polymorphisme G691 et P684P au niveau de l'exon 11 ainsi gu'un polymorphisme L769L de l'exon 13 et S904S de l'exon15. Il n'y avait pas d'antécédent familial et l'enquête génétique familiale a été négative, il s'agissait donc d'une mutation de novo. La patiente a eu une surrénalectomie bilatérale le 15 janvier 1990 ; l'examen anatomopathologique a mis en évidence que les deux surrénales étaient le siège d'une lésion tumorale bien délimitée, non encapsulée, constituée de grandes cellules d'aspect polymorphe, arrondi ou fusiformes, au cytoplasme acidophile finement granuleux et à noyau irrégulier, unique ou multiple parfois monstrueux, fortement nucléolé. Il n'y avait pas d'envahissement capsulaire ni embole vasculaire ; l'aspect était compatible avec un phéochromocytome bilatéral. La patiente a ensuite eu une thyroïdectomie totale avec curage récurrentiel et jugulo-carotidien bilatéral le 8 février 1990. A l'examen anatomopathologique : un nodule tumoral de 2 cm du lobe gauche et un nodule

tumoral de 1 cm du lobe droit ; la prolifération tumorale est mal limitée au sein du parenchyme thyroïdien et très invasive avec présence d'une extension extra thyroïdienne au contact de l'œsophage. Celle-ci est constituée par des faisceaux ou des amas de cellules généralement fusiformes ou cylindriques, le cytoplasme est d'abondance variable, souvent éosinophile et parfois clair, les noyaux sont irréguliers avec des nucléoles visibles ; la prolifération est associée à un stroma de type fibrohyalin et amyloïde, présence d'emboles vasculaires. Au niveau du curage ganglionnaire gauche: 1N+/19 en jugulo-carotidien et 2 N+/8N en récurrentiel gauche; au niveau du curage ganglionnaire droit : 5N+/11 en jugulo carotidien et 5N+/5N en récurrentiel. Le CMT a donc été classé pT3(m)N1bMx; la calcitonine post opératoire était à 228 pg/ml sans signe de maladie résiduelle structurelle. La patiente est ensuite suivie en consultation ; en juillet 1991, la calcitonine est à 220 pg/ml et une masse latéro-cervicale gauche est mise en évidence en échographie, la radio de thorax est normale, la surveillance est poursuivie. En septembre 1991, apparition d'un ganglion sus claviculaire droit et d'une métastase hépatique avec une progression qui se confirme en novembre 1991. Une chimiothérapie par VP16 est débutée à partir de janvier 1992 (la calcitonine est alors à 3890 pg/ml) dont elle reçoit 2 cures, relayée ensuite par 5fluoro-uracil et dacarbazine dont la patiente reçoit 7 cures sans efficacité avec une évolutivité métastatique pulmonaire, hépatique, ganglionnaire et osseuse (calcitonine à 19500 pg/ml) qui conduit à son décès en octobre 1993.

Le deuxième patient a été pris en charge à l'âge de 28 ans, à partir de juillet 2010, pour une masse thyroïdienne lobaire gauche et 2 nodules droits palpables. L'échographie était en faveur de 2 nodules de 19 et 29 mm à gauche et de 2 autres nodules de 10 et 16 mm à droite. La calcitonine était à 3560 pg/ml. La mère du patient avait été opérée en 1991 d'un CMT multifocal avec curage ganglionnaire bilatéral négatif et il s'agissait donc d'une forme familiale transmise de néoplasie endocrinienne multiple de type 2A. La scintigraphie à la MIBG a montré une fixation surrénalienne droite expliquant une augmentation des métanéphrines dans les urines. Une surrénalectomie droite a été réalisée en septembre 2010. L'anatomopathologie a mis en évidence deux nodules surrénaliens de 22 et 15 mm correspondant à un phéochromocytome de score PASS à 4 (Thompson, 2002), pas de mitose atypique, présence d'un petit foyer de cellules fusiformes, pas de foyer de nécrose ni d'infiltration capsulaire ni d'emboles tumoraux. Les cellules étaient

positives pour la chromogranine A et la synaptophysine en immunohistochimie, négatives pour la pan-cytokératine AE1/AE3 et avec un Ki67 à 1-2%. Le patient a ensuite eu une thyroïdectomie totale avec curage récurrentiel et jugulo-carotidien bilatéral en novembre 2010. L'anatomopathologie a mis en évidence un CMT plurifocal (2 foyers de 7 et 17 mm au niveau du lobe droit et 2 foyers de 30 et 18 mm au niveau du lobe gauche), non encapsulé, sans dépassement de la capsule thyroïdienne. Présence d'emboles tumoraux vasculaires. Les cellules tumorales exprimaient la thyrocalcitonine, la chromogranine et l'ACE en immunohistochimie avec un Ki-67 de moins de 5 %. Le rouge Congo confirme la présence de substance amyloïde. Les curages montraient : jugulo-carotidien droit, 51 N- ; récurrentiel droit, 4 N-; jugulo-carotidien gauche, 1 N+ / 24 N, récurrentiel gauche, 1N+R-/10 N. La lésion était classée pT2(m)N1bMx. Les dosages de calcitonine et de métanéphrines étaient indétectables en post opératoire et le patient a ensuite été surveillé en consultation sans signe de rechute ou de phéochromocytome gauche aux dernières nouvelles. L'analyse du gène *RET* a permis de mettre en évidence une mutation faux sens de l'exon 11, 1901 G>A, correspondant à une substitution C634Y.

Le troisième patient a été pris en charge à l'âge de 24 ans, en décembre 2003 dans le cadre du dépistage familial d'une NEM2 après découverte chez sa mère, qui avait été opérée d'un carcinome médullaire de la thyroïde, d'une mutation de *RET* au niveau du codon 620. La patient était asymptomatique, l'échographie thyroïdienne montrait un nodule gauche de 16 mm, la calcitonine était élevée à 207 pg/ml, les métanéphrines urinaires étaient négatives. La thyroïdectomie totale avec curage récurrentiel et jugulo-carotidien bilatéral a été réalisée en mars 2004. L'anatomopathologie montrait 2 nodules dans le lobe gauche de 15 et 5 mm et deux nodules dans le lobe droit de 2 et 3 mm qui sont non encapsulés, mal limités mais semblent rester dans les limites de la glande thyroïde. Les proliférations tumorales correspondaient à un CMT avec, à gauche, un aspect de type mixte médullaire et vésiculaire avec expression forte de la thyroglobuline. Les cellules tumorales exprimaient la thyrocalcitonine, la chromogranine et l'ACE en immunohistochimie. Les curages montraient : jugulo-carotidien droit, 37 N- ; récurrentiel bilatéral, 11 N- ; jugulo-carotidien gauche, 26 N-. La lésion était donc classée pT1b(m)N0Mx. La calcitonine post opératoire était indétectable; il n'y a pas eu de rechute et pas d'apparition de phéochromocytome. L'analyse du gène RET a permis de mettre en

évidence une mutation faux sens de l'exon 10, 1858 T>C, correspondant à une substitution C620R.

cliniques représentatifs corrélations Ainsi, ces cas sont des génotype/phénotype connues dans les NEM2. Le cas de NEM2B s'est présenté avec une maladie très agressive et un phéochromocytome bilatéral chez une patiente avec un morphotype caractéristique et une mutation M918T de novo. Le cas clinique de NEM2A muté C634Y montre la co-occurrence CMT et phéochromocytome chez ces malades alors que le cas clinique muté C620R est plutôt en faveur de ce qui était considéré auparavant comme un CMT familial et qui est regroupé actuellement dans les NEM2A avec CMT isolé. L'existence d'une forme mixte vésiculaire et médullaire dans le 3^{ème} cas clinique est à considérer sous l'angle de l'origine embryologique de la cellule d'origine du CMT et serait donc plutôt en faveur d'une origine d'un progéniteur endodermique qui pourrait se différencier à la fois en cellule folliculaire et en cellule C.

Génération des cellules souches pluripotentes induites

Les cellules mononuclées du sang cryoconservés de ces patients ont été obtenues auprès du service de génétique du Dr Bressac à Gustave Roussy et ont été utilisées pour la génération de trois lignées d'CSPi par méthode de transduction virale non intégrative (Sendaï). Les trois lignées CSPi générées sont : PB46, porteuse de la mutation *RET*^{C620R}; PB48, porteuse de la mutation *RET*^{C634Y} et PB50, porteuse de la mutation *RET*^{M918T}. Ces trois lignées ont été caractérisées quant à leur expression des marqueurs de pluripotence, de leur caryotype et de l'expression de Ret ainsi que de leur capacité à former des tératomes in vivo. La lignée PB48 a fait l'objet d'une publication reproduite ci-après.

Stem Cell Research 17 (2016) 154-157



Contents lists available at ScienceDirect

Stem Cell Research



journal homepage: www.elsevier.com/locate/scr

Generation of an induced pluripotent stem cell line from a patient with hereditary multiple endocrine neoplasia 2A (MEN2A) syndrome with *RET* mutation



J. Hadoux ^{a,b}, O. Féraud ^{a,c}, F. Griscelli ^{a,c,d}, P. Opolon ^e, D. Divers ^{a,c}, E. Gobbo ^{a,c}, M. Schlumberger ^b, A. Bennaceur-Griscelli ^{a,c,d,f}, A.G. Turhan ^{a,c,d,f,*}

^a INSERM U935, Université Paris Sud, 94800 Villejuif, France

^b Gustave Roussy, Department of Nuclear medicine and Endocrine Oncology, 94800 Villejuif, France

^c ESTeam Paris Sud, INSERM U935, Université Paris Sud, Université Paris-Saclay, 94800 Villejuif, France

^d INGESTEM National IPSC Infrastructure, 94800 Villejuif, France

^e Gustave Roussy, Laboratoire de Pathologie Expérimentale, F-94800 Villejuif, France

^f Division of Hematology, Paris Sud University hospitals, Le Kremlin Bicêtre 94275, Villejuif 94800, France

ARTICLE INFO

Article history: Received 30 May 2016 Accepted 25 June 2016 Available online 27 June 2016

ABSTRACT

Multiple Endocrine Neoplasia Type 2A (MEN2A) is a cancer-predisposing syndrome that affects patients with germline RET mutations. The clinical spectrum of the syndrome includes medullary thyroid carcinoma (MTC), pheochromocytoma, hyperparathyroidism and cutaneous lichen amyloidosis (CLA) and/or Hirschsprung disease in some variants.

Currently, there is no satisfactory animal model recapitulating all the features of the disease especially at the level of stem cells. We generated induced pluripotent stem cells (iPSCs) from a patient with *RET* mutation at codon 634 who developed pheochromocytoma and MTC. *RET^{C634Y}*-mutated cells were reprogrammed by non-integrative viral transduction. These iPSCs had normal karyotype, harboured the *RET^{C634Y}* mutation and expressed pluripotency hallmarks as well as RET. A comprehensive pathological assessment of teratoma was performed after injection in immunodeficient mice.

© 2016 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Resource table

Name of stem cell line	PB48	Resource table (continued)	
Institution	INSERM LI935 and INCESTEM	Name of stem cell line	PB48
institution	Université Paris Sud	Link to related literature	http://www.sciencedirect.com/science/
Person who created resource	J. Hadoux, O·Feraud		article/pii/S0092867407014717
Contact person and email	Ali G Turhan: turviv33@gmail.com,		http://www.stembook.org/node/765.html
	abenna@hotmail.fr		http://stembook.org/node/723.html
Date archived/stock date	Sept, 15, 2014		http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/
Origin	Human peripheral blood cells		thy.2014.0335?journalCode=thy
Type of resource	Biological reagent: induced pluripotent stem cell	Information in public databases	None
	(iPSC) generated by Sendai-virus mediated	Ethics	The project was approved by INSERM and
	pluripotency gene transfer		Ethical Committee CPP (Date of approval:
Sub-type	Cell line		17th January 2013,
Key transcription factors	Oct4, Sox2, cMyc, Klf4		Ref: PP-13-001)
Authentication	Identity and purity of cell line, expressing the		,
	same RET mutation as the peripheral blood		
	cells of the patient (figure 1)		

* Corresponding author at: ESTeam Paris Sud, INSERM U935, Université Paris Sud, Université Paris-Saclay, 94800 Villejuif, France.

E-mail addresses: julien.hadoux@gustaveroussy.fr (J. Hadoux), olivier.feraud@inserm.fr (O. Féraud), franck.griscelli@gustaveroussy.fr (F. Griscelli), paule.opolon@gmail.com (P. Opolon), dominique.divers@inserm.fr (D. Divers), emilie.gobbo@wanadoo.fr (E. Gobbo), martin.schlumberger@gustaveroussy.fr (M. Schlumberger), abenna@hotmail.fr (A. Bennaceur-Griscelli), ali.turhan@aphp.fr (A.G. Turhan).

http://dx.doi.org/10.1016/j.scr.2016.06.008

1873-5061/© 2016 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

1. Resource details

Multiple Endocrine Neoplasia Type 2 (MEN2) are autosomal dominant hereditary diseases, related to mutations of the RET (REarranged during Transfection) proto-oncogene (Donis-Keller et al., 1993). MEN2A is a rare syndrome which associates medullary thyroid cancer (MTC), pheochromocytoma, hyperparathyroidism, cutaneous lichen amyloidosis, and Hirschsprung disease in some patients (Wells et al., 2013). It affects therefore organs originating from endodermal and ectodermal layers. Mouse models have been unsuccessful in recapitulating the full clinical spectrum of MEN2A (Michiels et al., 1997). The most common mutation, accounting for over 80% of all mutations associated with the classic MEN2A, affects codon 634 (Wells et al., 2013). Mutations at codon 634 are classified as high risk, according to the American Thyroid Association (ATA) guidelines (Wells et al., 2015). In this work we sought to determine the feasibility of modelling the MTC from a patient with the germline RET mutation who developed this tumor in the context of familial cancer. This patient was a 28-year old man with MTC and pheochromocytoma. The mother of the patient had undergone surgery for MTC 20 years previously.

Cryopreseved peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from this patient were used for the generation of an induced pluripotent stem cell (iPSC) that harbour a "high risk" RET mutation according to ATA guidelines, i.e. a 1901G > A missense mutation leading to the most frequent C634Y amino acid substitution seen in Ret in MEN2A. iPSCs were generated by non-integrative transduction of Oct3/4, Sox2, Klf4, and cMyc (Takahashi et al., 2007). They expanded as typical iPSC colonies on either mouse embryonic fibroblast feeders (MEF) or in feeder-free conditions (Fig. 1A). Cytogenetics analysis was normal (Fig. 1B). These iPSCs exhibited typical markers of pluripotency with as expression of SSEA3, SSEA4 and TRA-1-60 (Fig. 1B). Cells also expressed Oct-4 at a high level (Fig. 1C). The 1901G > A missense mutation was confirmed at both genomic (Fig. 1D) and cDNA levels. RET expression on iPSC was demonstrated by FACS analysis using a phospho-RET antibody (Fig. 1E). A teratoma assay was performed to further confirm the pluripotent nature of the RET-mutated iPSC.

2. Materials and methods

2.1. Human iPS cell generation and culture

4 days before reprogramming, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were thawed, cultured and expanded in Myelocult[™] medium (Stemcell Technologies) supplemented with 1% penicillin-streptomycin (Life technologies), hSCF 100 ng/mL, hFLT-3100 ng/mL, hIL-3 20 ng/mL, hIL-6 20 ng/mL, and hIL7 20 ng/mL (all of them from Peprotech). 2×10^5 PBMC were then transduced overnight with Sendai viruses containing Oct3/4, Sox2, Klf4, and cMyc (CytoTune®-iPS Sendai Reprogramming Kit, Life technologies) each of them at multiplicity of infection (MOI) of 15. The next 2 days, medium was changed daily and cells were resuspended in expansion medium after 5 min centrifugation at $200 \times g$. The third day, cells were recovered by centrifugation and plated on Mitomycin-C-treated mouse embryonic fibroblasts (MEF, CD1 strain) in expansion medium for 2 additional days. At day 6, half of the medium was changed to human pluripotent stem cell medium (hPSC medium) based on DMEM/F12 supplemented with 20% Knock Out Serum Replacer, 1 mM L-glutamine, 1% penicillin/streptomycin, 100 µM 2mercaptoethanol (all of them from Life technologies) and 12.5 ng/mL basic FGF (Miltenyi Biotech). Then, the medium was changed daily with hPSC medium. At day 26, fully reprogrammed colonies were manually picked and transferred to freshly Mitomycin-C-treated MEF for amplification.

iPSC culture was performed according to two different procedures: in the presence of feeders or in feeder-free conditions. The feeder cultures were performed on Mitomycin C-treated MEF layer as described above with passaging every 7 days using 1 mg/mL collagenase IV in DMEM/F12 (Life technologies)); the feeder-free culture was performed on Geltrex[™] (Life technologies) in Essential 8 medium (Life technologies) and 1% penicillin/streptomycin with passaging every 3–4 days using in DPBS (Life technologies) supplemented with 0.5 mM EDTA (Life technologies) and 1.8 mg/L NaCl (Sigma).

2.2. Karyotyping and mutation analysis

For conventional cytogenetics, cells grown in 60 mm plates (Corning) on Mitomycin-C treated MEF for 5 days were cultured 2 h in hPSC medium supplemented with 100 ng/mL ColcemidTM (Life technologies). Cells were detached from the plate by 5 min treatment with 1 mL per plate of TrypLETM Express (Life technologies) at 37 °C, 5% CO₂. After trituration with a P1000 micropipet, 9 mL of 0.075 M KCI (Life technologies) was added to the cell suspension followed by incubation at 37 °C during 20 min to obtain an osmotic shock. Cell suspension was then prefixed by the addition of 1 mL of fixative composed of Methanol/Acetic Acid (3:1) followed by 10 min centrifugation at $130 \times g$ cell pellet was then resuspended in 10 mL of fixative and centrifuged 10 min at $130 \times g$ two times before a final resuspension in 10 mL of fixative. Cells were then spread on slides and stained with Giemsa. A minimum of 10 metaphases were captured and analysed using an automated imaging system (Meta Systems).

Genomic DNA from iPSC was extracted with DNeasy blood & Tissue kit (Ref 69504, Qiagen) according to the manufacturer instruction. Human Genomic DNA was used as control (Roche). RET exon 11 and surrounding intronic regions were PCR amplified with high-fidelity PCR polymerase (Herculase II fusion DNA polymerase, Agilent) using the following cycling parameter: 2 min of denaturation at 95 °C followed by 30 cycles with 10 s at 95 °C, 20 s at 55 °C and 30 °C at 72 °C and a final 3 min elongation step at 72 °C. Primers forward 5'-GCCAGCTGGTG TAATGAGCA-3' and reverse 5'-ACCGTTCACTCACACCCTTG-3' were used, leading to a 1058 bp amplicon (NC_000010.11, 43114189-43115246). This PCR product was then purified with exo SAP mix (0.5 µL Exonuclease I, Eurobio and 2 µL Shrimp Alkaline Phosphatase, Ozyme) incubation (15 min at 37 °C and then 15 min at 80 °C) associated with BigDye Xterminator kit used according to the manufacturer instruction (Applied Biosystems). Purified product was then subjected to sequencing reaction with BidDye Terminator kit (Applied biosystem): denaturation 5 min at 95 °C followed by 25 cycles with 10 s at 95 °C, 5 s at 50 °C and 4 min at 60 °C using either RET634_seq forward 5'-CAGAGCATACGCAGCCTGTA-3' RET_seq reverse 5'-CTCCGGAAGGTC ATCTCAGC-3' primers.

2.3. Pluripotency markers and ret expression

For flow cytometry analysis, iPSC colonies were recovered from Mitomycin-C inactivated MEF after incubation for 2 h in 1 mg/mL collagenase IV in DMEM/F12. After two cycles of washing/sedimentation with 10 mL DMEM/F12, colonies were washed once in $Ca^{2+}/Mg2 + free$ PBS (Life technologies) and then dissociated into a single cell suspension by 10 min incubation in Hank's balanced enzyme-free cell dissociation buffer (Life Technologies). For pluripotency marker analysis, 1×10^5 cells were incubated in 10 µL PBS containing 1 µL Phycoerythrin-conjugated rat monoclonal antibody anti-SSEA3, 1 µL V450conjugated mouse monoclonal anti-SSEA-4 and 1 µL Alexa647conjugated mouse monoclonal antibody anti-TRA1-60 (all of them from BD Biosciences) or conjugated isotype control. For Ret expression analysis, 1×10^5 cells were incubated in 10 µL PBS containing 1 µL APC-conjugated mouse monoclonal antibody anti-Ret (R&D) or conjugated isotype control. Cells were analysed with a MACSQuant flowcytometer using the MACSQuantify software.

Immunostaining were also performed on colonies cultured in 8 wells Lab-Tek[™] chambers (Nunc). Briefly, cells were fixed 20 min at room temperature in 4% paraformaldehyde in PBS and rinsed twice times with PBS. Cells were then permeabilized 5 min in 0.25% Triton-





X100 (Sigma) in PBS and then rinsed twice in PBS. Wells were stained 45 min at room temperature in 100 µL PBS containing 1 µL rat monoclonal antibody anti-Tra160 (Millipore) and 1 µL rabbit polyclonal antibody anti-Oct-4 (Millipore) or 1 µL of each irrelevant isotype controls. After two washes in PBS, cells were stained 45 min at room temperature in 100 µL PBS containing 0.2 µL Alexa488 conjugated goat anti-rabbit antibody and 0.2 µL Alexa594 conjugated goat anti-mouse IgM antibody (both from Life technologies). Wells were washed twice in PBS and mounted in Dapi containing mounting medium (Vector Laboratories) before analysis on a Nikon 90i fluorescent microscope.

2.4. In vivo pluripotency analysis by teratoma formation

MEN2A-iPSCs were subjected to teratoma formation assay by intramuscular injection of NSG mice $(2 \cdot 10^6$ cells in 150 µL of Geltrex/ DMEMEF12 1:1 dilution) and pathological analysis after 8 to 10 weeks of tumour growth. Teratoma formation assays were performed in triplicate in order to analyse the development of potentially malignant tumor tissue within teratomas. At + 2 months after injections, RET-mutated iPSC gave rise to teratomas, thus confirming the pluripotency of these cells (Fig. 1D). Pathological analyses showed the presence of a normal endodermal, ectodermal and mesodermal differentiation with no malignant tissue identified in several teratomas analysed (Fig. 1F).

Acknowledgements

This work was performed by resources from INGESTEM national consortium as well as by INSERM/INCA Studentship Grant to J. Hadoux.

References

- Donis-Keller, H., Dou, S., Chi, D., Carlson, K.M., Toshima, K., Lairmore, T.C., Howe, J.R., Moley, J.F., Goodfellow, P., Wells Jr., S.A., 1993. Mutations in the RET proto-oncogene are associated with MEN 2A and FMTC. Hum. Mol. Genet. 2, 851–856.
- 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.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S., 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell 131, 861–872.
- Wells, S.A., Pacini, F., Robinson, B.G., Santoro, M., 2013. Multiple endocrine neoplasia type 2 and familial medullary thyroid carcinoma: an update. J. Clin. Endocrinol. Metab. 98, 3149–3164.
- Wells, S.A., Asa, S.L., Dralle, H., Elisei, R., Evans, D.B., Gagel, R.F., Lee, N., Machens, A., Moley, J.F., Pacini, F., et al., 2015. Revised American thyroid association guidelines for the management of medullary thyroid carcinoma. Thyroid 25, 567–610.

Résultats supplémentaires

Caractérisation des lignées de CSPi PB46 RET^{C620R} et PB50 RET^{M918T}

Les cellules mononuclées du sang cryopréservées des patients porteurs de la mutation *RET* C620R et *RET* M918Tdont l'histoire clinique est décrite au début de ce chapitre ont été reprogrammées par transduction non-intégratives des facteurs Oct3/4, Sox2, Klf4, and cMyc (Takahashi et al., 2007) et cultivées sous forme de colonies sur FME ou en geltrex[®] (Figure 16 A & E & Figure 17 A & C)).



Figure 16: Caractérisation de la lignée CSPi PB46 RET^{C620R}



Figure 17: Caractérisation de la lignée CSPi PB50 RET^{M918T}

Nous n'avons pas observé d'anomalie caryotypique (Figure 16B & Figure 17 A) et les cellules exprimaient les marqueurs de pluripotence comme SSEA et TRA1-60 (Figure 16C & Figure 17) mais également Oct-4 (Figure 16E & Figure 17). L'expression de Ret sur les CSPi était faible mais présente et confirmée par cytométrie en flux (Figure 16D & Figure 17D). La présence de la mutation faux sens 1858 T>C a été confirmée par séquençage Sanger au niveau génomique (Figure 16F & Figure 17D) et du cDNA. Ces CSPi, généraient des tératomes, 2 mois après injection intra musculaire dans des souris immunodéprimées NSG et l'analyse histologique a confirmé la présence de tissus originaire des 3 feuillets ectodermique, endodermique et mésenchymateux, confirmant la pluripotence de ces cellules.

Analyse de l'expression de Ret dans les CSPi

Pour l'analyse de l'expression de Ret, nous disposions de 2 lignées cellulaires de CMT, la lignée TT, porteuse d'une mutation RET C634W et la lignée MZCRC porteuse d'une mutation M918T qui nous ont été fournies par le Dr Dupuy (UMR8200, Gustave Roussy). Nous avons pu mettre au point l'analyse par cytométrie en flux grâce à ces témoins positifs (Figure 18).



Figure 18 : Expression de ret par cytométrie en flux dans les lignées TT, MZCRC et CSPi L'expression de Ret est plus importante dans les lignées avec 88.9% des cellules TT et 95.2% des cellules MZCRC exprimant Ret alors que 45,1 à 66,1% des CSPi l'expriment (Figure 18).



Figure 19: Expression relative de Ret dans les lignées de CMT et les CSPi

L'expression relative de Ret, analysée en qPCR, dans les lignées de CMT par rapport aux lignées CSPi est 36 à 50 fois plus importante et il semble exister une variabilité dans l'expression de Ret entre les lignées de CSPi (test ANOVA, p<0.0001

et Figure 19). Nous n'avons pas pu détecter l'expression de Ret dans les lignées CSPi par Western blot alors que cela était possible dans les lignées de CMT, à la fois la forme totale et la forme phosphorylées, probablement en raison d'une expression faible de la protéine dans les CSPi comme suggéré par les données de cytométrie de flux et de qPCR.

Conclusion

Nous avons généré trois CSPi porteuses de mutations de *RET* ccorrespondant aux 3 classes de risque/d'agressivité pour le développement du carcinome médullaire de la thyroïde. La pluripotence de ces 3 CSPi a été validée par la démonstration du développement de tératomes suite à leur injection intramusculaire dans des souris immunodéprimées. L'expression de Ret est détectable par cytométrie en flux mais faible dans ces cellules. Elle est beaucoup plus faible que dans les lignées de CMT disponibles communément comme TT et MZCRC.

Les lignées PB48 et PB50 étant porteuses des mutations les plus fréquentes dans les NEM2A et NEM2B respectivement, nous nous sommes concentrés sur ces lignées pour la suite du travail. Nous avons fait l'hypothèse qu'il serait plus probable d'observer un phénotype avec les lignées porteuses de mutations les plus agressives de *RET*.

2) Évaluation des effets phénotypiques et génomiques d'une lignée CSPi après correction de la mutation de *RET*

Après génération des lignées de CSPi avec mutation RET, l'objectif a été de déterminer les caractéristiques phénotypiques et génomiques des lignées CSPi par rapport à une lignée sans mutation de RET. En première intention, l'utilisation d'une lignée témoin, RET sauvage, disponible au laboratoire a été considérée. Cependant, il nous a paru plus judicieux de réaliser une correction génomique pour obtenir une lignée témoin isogénique et tester directement les effets de cette correction. Nous avons utilisé le système CRISPR/Cas9 pour « corriger » la mutation de RET de PB48 et ainsi générer son contrôle isogénique, la lignée PB48A3 RET^{Y634C}. Nous avons ensuite procédé à une analyse histologique des tératomes générés à partir de ces 2 lignées ainsi qu'à l'étude du transcriptome. Ces études ont permis de mettre en évidence l'absence de développement de tumeur maligne au sein des tératomes qu'il y ait une mutation de RET ou qu'elle soit corrigée. Au niveau génomique, nous n'avons pas mis en évidence de mutation hors cible liée à la correction par CRISPR/Cas9, au niveau exonique, dans la lignée PB48A3. Notre modèle nous permet d'isoler les différences d'expression liées à la mutation dans un contexte génétique donné, qui est le même pour les deux lignées, et qui a donné lieu au développement à la fois d'un CMT et d'un phéochromocytome chez notre patient. Une analyse comparative de l'expression des gènes des deux CSPi isogéniques ainsi que d'une CSPi sans mutation de RET générée au laboratoire (Ozmadenci et al., 2015) a été réalisée. Nous avons mis en évidence une activation du programme transcriptionnel lié à EGR1 (Early Growth Response 1) et avons pu réaliser une étude moléculaire complète grâce à l'utilisation des données concernant la régulation d'EGR1 dans les CSE disponibles sur les bases de données. Il avait été suggéré que l'activation d'EGR1 via la voie Ret pouvait être un des mécanismes moléculaires favorisant le développement des NEM2A à partir de données dans les lignées de phéochromocytome de rat (PC12). Nos données confirment cette hypothèse et suggèrent qu'une activation du programme transcriptionnel d'EGR1 est observée en réponse à une mutation de RET dans les cellules souches pluripotentes induites et pourrait être le premier évènement moléculaire responsable du développement du phénotype tumoral des néoplasies endocriniennes multiples de type 2.

Article 2 (soumis):

Transcriptional landscape of a *RET^{C634Y}*-mutated iPSC and its CRISPRcorrected isogenic control reveals the putative role of EGR1 trancriptional program in the development of multiple endocrine neoplasia type 2Aassociated tumors

Authors:

Julien Hadoux^{1*}, Christophe Desterke^{2*}, Olivier Féraud³, Mathieu Guibert³, Roberta Francesca De Rose⁴, Paule Opolon⁵, Dominique Divers³, Emilie Gobbo³, Frank Griscelli⁶, Martin Schlumberger⁵, Annelise Bennaceur-Griscelli⁷, Ali Turhan⁸.

* These authors contributed equally to this work.

Affiliations:

¹Inserm UMRS 935, Villejuif, France;

²UMS-33, Villejuif, France;

³Inserm UMRS 935, ESTeam Paris Sud, Infrastructure INGESTEM, Villejuif, France;

⁴Department of Health Sciences, University of Catanzaro, Catanzaro, Italy;

⁵Gustave Roussy, Villejuif, France;

⁶Paris Descartes University & Gustave Roussy, Villejuif, France;

⁷APHP, Department of Hematology, University Paris Sud, Villejuif, France;

⁸APHP, Department of Hematology, University Paris Sud, Le Kremlin Bicêtre, France

Article category: Short Article

Word counts: Abstract: 261 words, text 35098 characters (including spaces): **Number of figures and tables:** 1 table and 3 figures, 3 supplemental tables, 4 supplementaL figures.

SUMMARY

Context

MEN2A is a cancer-predisposing syndrome that affects patients with germline *RET* mutations. We generated a MEN2A induced Pluripotent Stem Cell (iPSC) line with "high risk" RET mutation and an isogenic counterpart by correction of this mutation in order to study molecular pathways modified in these cells in the context of pluripotency with and without RET mutation.

Methods

Peripheral blood mononuclear cells from a patient with germline "high risk" *RET*^{C634Y} and mutation were reprogrammed by non-integrative viral transduction and an isogenic control iPSC was generated with the use of CRISPR-Cas9 genome edition. These iPSCs' pluripotency hallmarks, gene expression and genomic sequences were characterized and an integrative gene expression analysis was performed.

Results

The RET^{C634Y} and RET^{Y634C} iPSCs were generated and characterized for pluripotency markers expression and teratoma formation. Whole exome sequencing of both RET^{C634Y} and RET^{Y634C} iPSCs revealed no major exonic off target effect of the CRISPR correction. However, integrative differential gene expression analysis of RET^{C634Y} , RET^{Y634C} and RET^{wt} iPSCs revealed an activation of the Early Growth Response 1 (EGR1) transcriptional program in *RET*-mutated iPSC, a link previously suggested in *RET*-mutated cancer cell lines.

Conclusion

We show here the feasibility of the use of the iPSC technology in *RET*-mutated multiple endocrine neoplasia type 2A to unravel transcriptional events in the context of stem cells, leading to the discovery of a key pathway in the development of several cancers. These data constitute the first step toward understanding the molecular mechanisms underlying the development of MEN2A features using iPSCs and highlight the role of EGR1 transcriptional program in the development of this disease.

INTRODUCTION

Multiple Endocrine Neoplasia type 2 (MEN2) are autosomal dominant hereditary diseases, due to mutations of the RET (REarranged during Transfection) protooncogene (Takahashi et al., 1985). MEN2A is a rare syndrome (1/1,973,500 (Wells et al., 2015c)) which associates medullary thyroid cancer (MTC), pheochromocytoma, hyperparathyroidism, cutaneous lichen amyloidosis, and Hirschprung disease in some patients (Wells et al., 2013). It therefore affects organs of both endodermic and neural crest origin. Mouse models have been unsuccessful in recapitulating the full clinical spectrum of MEN2A (Kawai et al., 2000; Michiels et al., 1997). Mutations causing MEN2A affect the cysteine-rich extracellular domain, each converting a cysteine to another amino acid, in codon 634 (exon 11) or in codons 609, 611, 618, and 620 (exon 10). These mutations account for 98% of all mutations associated with the classic MEN 2A and the most common mutation, accounting for over 80 % of all mutations associated with the classic MEN 2A, involves codon 634 (Wells et al., 2013).

The molecular mechanisms by which RET alleles contribute to the development of MEN2A phenotype in humans remain to be elucidated. The pheochromocytoma PC12 cell line have been used to study this molecular mechanisms, revealing the induction of an aberrant pattern of differentiation, accompanied by unresponsiveness to growth inhibitory physiological signals (Califano et al., 1996). Activation of the Ras signalling pathways (Califano et al., 2000) has been suggested to be part of the mechanism of action of activated Ret in the pathogenesis of neuroendocrine tumours associated with MEN2 syndromes. Currently, there is no satisfactory experimental model using primary human cells in MEN2A-associated cancers.

In this work, we have used induced pluripotent stem cells (iPSC) from a MEN2A patient carrying the most frequent *RET*^{C634Y} mutation (Hadoux et al., 2016b) as a tool to identify the transcriptomic program responsible for the development of MEN2A features. In order to determine the potential molecular effects generated by this mutation in pluripotent stem cell stage, an isogenic IPSC cell line with correction of the Ret mutation was needed. We have used the CRISPR-Cas9 system (Cong et al., 2013; Mali et al., 2013a) in order to generate a RET-corrected isogenic iPSc control cell line with a single-stranded DNA oligonucleotides (ssODN) (Chen et al., 2011; Ran et al., 2013b). Here we report the generation of the CRISPR-corrected isogenic

counterpart of the MEN2A iPSC and describe the comprehensive transcriptomic landscape of the MEN2A iPSC.

METHODS

Human iPS cells culture & Pluripotency Markers and Ret Expression

iPSC culture was performed according to two different procedures: in the presence of feeders or feeder-free; Ret and pluripotency markers expressions were assessed by flow cytometry analysis as described elsewhere (Supplemental methods & Hadoux et al SCR 2016).

RET mutation correction by CRISPR/Cas9

RET codon 634 targeting gRNA was cloned in pX330-U6-Chimeric_BB-CBhhSpCas9 obtained from Addgene (Plasmid #42230) (Cong et al., 2013) and a single stranded oligodeoxynucleotide was used for genome editing of the mutated codon by homologous recombination (see Supplementary material for more details).

Off target effect evaluation

Putative exonic off targets, as computed by the CRISPR design online tool (http://crispr.mit.edu/) (Hsu et al., 2013) were assessed with two methods. First, direct Sanger sequencing was performed on the putative exonic off targets (supplemental methods). Second, Whole exome sequencing was performed on Illumina HiSEQ 4000 (Gnirke et al., 2009) (supplemental methods).

Transcriptome and Integrative analysis

Samples processing and bioinformatics pipeline for gene expression analysis are described in the supplemental information. The up regulated transcriptional program in the RET^{C634Y} IPSC was crossed by SQL query with the transcription factors expressed in various tissues database (Vaquerizas et al., 2009). The expression of transcription factors highlighted was studied according to their intensity expression and specificity among different human tissues. Affymetrix gene expression data for different human tissues were collected from the GDS3113 datasets. In particular, the expression of 9 transcription factors induced in the RET^{C634Y} IPSCs was characterized among these different human tissues. In silico chip-sequencing analysis was performed as described in supplemental methods.

HumanMine (Smith et al., 2012) was used for chromosomal enrichment of the *EGR1* dependent signature induced in the *RET*^{C634Y} IPSC and for collection of target molecules connections data in order to build a network of molecular connections with Cytoscape 3.3.0 software version. The functional annotations of connection partners were collected on genecard website (www.genecards.org). OmicsCircos package Bioconductor in R Version 3.2.3 software was used for the circos plot graph generation. The Fisher exact test was also performed using the R software Version 3.2.3.

RESULTS

Clinical Characteristics of the patient and generation of *RET*^{C634Y}**-mutated iPSC.** A MEN2A *RET*^{C634Y}-iPSC was generated from peripheral blood mononuclear cells of a 28 year-old patient with a familial history of medullary thyroid cancer in his mother. He was diagnosed with two pheochromocytomas of 22 and 15 mm in the right adrenal gland following positive urinary metanephrins results and a positive MIBG (méta-iodobenzylguanidine) scan. The two tumours were surgically removed, had no capsular nor vascular invasion features, PASS score was 4 and Ki67 was 2% (Thompson, 2002). The patient had also medullary thyroid carcinoma with 2 lymph node metastases which was surgically removed with bilateral neck lymph node dissection. The pathological stage was: pT2mN1bM0 (Hadoux et al., 2016b). This patient carried a germline missense 1901G>A mutation leading to a C634Y substitution at codon 634 which is the most common *RET* mutation observed in NEM2A patients; the patient is still free of disease.

Generation of the *RET^{Y634C}* iPSC isogenic control by CRISPR-mediated correction of a MEN2A *RET^{C634Y}* iPSC.

As we planned to use the RET^{C634Y} -iPSC to investigate the transcriptomic program underlying development of MEN2A phenotype, we decided to generate a RET^{Y634C} iPSC isogenic control by CRISPR-mediated genome editing. We selected a guide RNA (gRNA) overlapping the mutated TAC codon 634 of the *RET* gene in our RET^{C634Y} -iPSC. This gRNA was predicted to have 16 exonic and 16 non-coding putative off targets (Supplemental methods). We designed a ssODN with the corrected TGC wild type codon 634 and silent mutations disrupting the PAM (Protospacer Adjacent Motif) and introducing a Not1 restriction site (Figure 1A). The

Not1 restriction site was used for genome-edited iPSC clones screening; we observed 2 recombinant clones within 17 iPSC clones obtained after Cas9 and ssODN transfection which represents a 11.8% HDR (homology-directed repair) rate, a rate lower than previously described in iPSC (Ding et al., 2013). One of the clones (C2 clone) harboured insertion/deletion downstream of the HDR site (figure 1B). Thus, we obtained one clone (A3) harbouring the RET^{Y634C} corrected codon 634. The *RET*^{Y634C} iPSC grew as colonies with normal morphology on both MEF layer and geltrex, exhibited pluripotency markers (SSEA4, SSEA3 and TRA1-60) (figure 1C), a normal karyotype. Ret protein was expressed by both *RET*^{C634Y} and *RET*^{Y634C} iPSC and the mutated form was transcribed as demonstrated by Sanger sequencing of cDNA (figure 1D).

In teratoma assays using *RET*^{C634Y}, *RET*^{Y634C} and *RET*^{wt} iPSC a normal differentiation pattern with the three germ layers was observed in all teratoma analysed (Supplemental figure S2). Chromogranin A and calcitonin staining were also analysed (supplemental results & supplemental Figure S2).

Off Target assessment

Although it has been suggested that off-target mutations may have a low incidence after gene edition with CRISPR (Veres et al., 2014), we wished to confirm the absence of off-target mutations due to our CRISPR-ssODN strategy in the *RET*^{Y634C} iPSC. We used two methods to achieve this goal: Sanger sequencing of predicted exonic off targets and whole exome sequencing (WES). We observed a G>A SNP (rs148762104), resulting in an Ala304Thr missense mutation of TCEB3C (NM_145653.3), located 203 bp upstream of the putative CRIPSR off-target site and with unknown clinical significance. In the same region, we also observed a heterozygous T>C missense mutation (Lys375Pro) located in the middle of the putative GCCCGATCAGCTGTACCGCACAG off target site in the TCEB3C gene; this mutation (VAR_059654) corresponds to natural variant rs2261291 (UniProtKB - Q8NG57). There was a C>T SNP (rs763546633) in EVI5L (NM_145245) resulting in a silent mutation (Table 1). We did not succeed in sequencing 3 sites despite the use of different primers couples.

Illumina Paired end fastq sequencing files of WES for each sample (IPSC RET^{C634Y} and the CRISPR-corrected IPSC RET^{Y634C}) were aligned with Bowtie2 on HG19 version of human genome and BAM files were recalibrated in GATK (base

recalibration and realigned around known indels). CRISPR/Cas9 target modification in WES had a mean coverage of 117.7X for the RET^{C634Y} iPSC and 96.6X for the RET^{Y634C} iPSC in control sample. After removing PCR duplicate reads in BAM files, RET^{C634Y} iPSC sample harbored 43% of altered reads. Great majority of the RET^{C634Y} iPSC altered reads (99% of wild type reads) were found corrected in the RET^{Y634C} IPSC (Supplemental figure S1). Also, CRISPR/Cas9 predicted off targets in coding regions were verified in WES by BAM files visualization in Integrative genome viewer software: no reads modifications could be seen in these side effect regions (data not shown).

Micro-array analysis of RET^{C634Y} iPSC and CRISPR-mediated correction of the transcriptional program of the RET^{C634Y} iPSC reveals up regulation of EGR1 in RET mutated iPSC

Comparative gene expression analysis of our RET^{C634Y} iPSC with a RET^{wt} iPSC described elsewhere (Ozmadenci et al., 2015) was analysed with unsupervised classification and showed that most of the transcriptional program of the RET^{C634Y} iPSC is up regulated (231 up-regulated sequences vs. 29 down-regulated sequences) (Supplemental figure S2A & table S1). Functional enrichment revealed a significant involvement of the p53 network (BTG2, DDB2, DDIT4, TNFRSF10C, TP53INP1) participating in the ATM and ATR signalling (Supplemental Figure S2B). Comparative gene expression analysis of the CRIPSR-corrected RET^{Y634C} iPSC versus *RET*^{C634} iPSC was analysed with unsupervised classification (Supplemental figure S2C) and showed a down regulation of the majority of the transcriptional program of *RET*^{C634Y} iPSC in the CRISPR-corrected iPSC (5 sequences up regulated versus 229 down-regulated sequences). This suggests that reversing the activating RET^{C634Y} mutation in iPSC has a repressive action on the transcriptome of these cells. The lists of up regulated genes in the RET^{C634Y} IPSC as compared to the RET^{wt} iPSC and the list of down regulated genes in the RET^{Y634C} iPSC as compared to the RET^{C634Y} IPSC were crossed (Figure 2A & supplemental table S2): 28.3% of the transcriptional program induced in the RET^{C634Y} IPSC was repressed by CRISPRmediated RET mutation correction (56 of 198 genes) and 70.5% of the RET^{Y634C} iPSC down regulated transcription program was considered to be unrelated to the CRISPR-mediated correction (134 of 190 genes). Of the 56 sequences corrected by CRISPR (i.e. RET^{C634Y} differential signature) in the transcriptional program of the
RET^{C634Y} IPSC, 53% are coding sequences (Figure 2B). The noncoding transcriptome is relatively heterogeneous especially with significant proportions for snoRNA and antisense molecules (11% each). Unsupervised classification conducted with the RET^{C634Y} differential signature reclassified RET^{C634Y} IPSC samples away from the cluster formed by both RET^{Y634C} and RET^{wt} iPSCs suggesting that CRISPR-mediated correction induce a "return to a RET^{wt} state" of the RET^{Y634C} iPSC (Figure 2C). Taken together, these data validate of our CRISPRgenerated isogenic control as a valuable tool for integrative gene expression analysis of MEN2A iPSC. The cross-analysis of the RET^{C634Y} iPSC differential signature (Supplemental Table 1) with the census list of human transcription factors revealed up regulation of 9 transcription factors in RET^{C634Y} IPSC: EGR1, ZNF554, ZNF560, ZNF595, ZNF667, ZC3H6, ZMAT3, H1F0, HLA-DRB3. These 9 transcription factors reclassify RET^{C634Y} samples remotely from RET^{Wt} samples by clustering (Figure 2D) Among these transcription factors, only EGR1 has thyroid and adrenal gland (the two main target organs of tumour formation in MEN2A) specificity as well as significant expression in these organs according to the Body map dataset analysis (Figure 2E & supplemental figure S3A).

To determine if the increased EGR1 expression is consistently increased in *RET*mutated iPSC, we have analysed EGR1 expression in another patient-derived, *RET*^{M918T}-mutated iPSC. This analysis showed an increased EGR1 expression in a RET^{M918T} MEN2B iPSC which suggests that EGR1 elevated expression is related to *RET* mutation at the stem cell state (figure 2F). We conclude that EGR1 is a putative transcriptional effector of the MEN2A RETdependent developmental program at the iPSC state.

The EGR1 dependent regulation network in RET^{C634Y} iPSC

As we used a RET^{C634Y} iPSC model to study the early mechanisms of development of MEN2A features in human, we analysed the EGR ChipSequencing data in the human H1 hES cell line. One third of the EGR1 chip-sequencing peaks in H1 were found to be proximal position HG19 promoters (36.7% in the area upstream TSS -3000, figure 5E) which corresponds to a relative enrichment of 14.68 as compared to the complete genome (supplemental Figure S3B). By integrating the H1 hESC line chip sequencing analysis into the over ranking signature of the RET^{C634Y} iPSCs Supplemental table S3), a 99 identities overlay is

observed (Figure 3B) which results in an enrichment of EGR1 target sequences (Odds ratio=1.37) in the RET^{C634Y} differential signature versus RET^{wt} iPSC relative to the total transcriptome (Fisher exact test, p-value = 0.00419). This enrichment is depicted on the multiomics circosplot RET^{C634Y} IPSC samples away from RET^{wt} and RFT^{Y634C} iPSC by clustering 3C & and (Figure 3D). The research of de novo motif for EGR1 dependant genomic intervals in the RET^{C634Y} differential signature was used to check firstly that the EGR1 motifs were enriched, with 125 detected sites (Figure 3E) and secondly that those same EGR1 related intervals were also predicted for other transcription factors such as HIF1A:ARNT, SP1 and SP3, MAX (Figure 3F and supplemental Figure S3C) which have been implicated in RET transcriptional regulation in association with EGR1(Andrew et al., 2002), medullary thyroid carcinoma (Koperek et al., 2011) and pheochromocytoma (Huynh et al., 2006; Qin et al., 2014) pathophysiology. he molecular interactome of the EGR1 signature in RET^{C634Y} IPSC involved connections with transcriptional coactivator modules such as EP300 and COPS5; with transcription factors such as p53, JunB, YBX1; with RNA metabolism such as the ILF3 Module involving MALAT1 previously observed to be highly expressed in RET^{C634Y} IPSC; with the MDM2 module; with chromatin binding molecules such as YAP1 and HDAC1 and with a fibronectin 1 module (Supplemental figure 3D)

DISCUSSION

iPSC technology represents a major tool of disease modelling which has led to discovery of "disease in a dish" models in several fields of medicine, such as in cardiology (Long QT syndrome (Itzhaki et al., 2011)) and neurology (Parkinson (Kriks et al., 2011)). In patients with long QT syndrome this technology allowed the development of novel pharmacological tools the efficacy of which can be tested directly in vitro (Maddah et al., 2015). In the field of cancer biology, very few examples of the use of iPSC have been reported, and in hereditary cancer there are only two published reports describing the use of iPSC in patients with BRCA1-mutated breast cancer (Soyombo et al., 2013) and Li-Fraumeni syndrome (Lee et al., 2015). One of the major interests of the iPSC modelling is the availability of large numbers of cells amenable to gene correction; the efficiency and the result of which can be tested. Here we report the integrative gene expression analysis of the first MEN2A RET^{C634Y} -iPSC and its CRISPR genome-edited isogenic control.

Indeed, in cancer-predisposing syndromes, the genomic context in which a mutation arises in a predisposing gene can have some importance because of the presence of potential genetic modifiers (Barnes and Antoniou, 2012; Jakubowska et al., 2012; Kamihara et al., 2014; Lesueur et al., 2006; Robledo et al., 2003). Moreover, the generation of isogenic control has been reported to be of major importance for studying the mechanisms of disease development with iPSC (Soldner and Jaenisch, 2012; Soldner et al., 2011) which can be efficiently achieved with the CRISPR/Cas9 system (Hockemeyer and Jaenisch, 2016). Therefore, we have generated a genome-edited isogenic control in order to specifically study the transcriptional landscape role of a mutated RET or its corrected wild type counterpart in a genetic context that has already led to tumour development as observed in our patient. We have assessed exonic putative CRIPSR off targets in order to ensure the robustness of our comparative gene expression analysis. The strategy of comparing RET^{C634Y} iPSC and CRISPR-mediated corrected RET^{Y634C} iPSC has allowed us to perform integrated gene expression analysis and to identify Early Growth Response 1 (EGR1) as a putative effector of the development of MEN2A features.

EGR1 is a transcription factor that is induced by Nerve Growth Factor (NGF) (Milbrandt, 1987), glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), the Ret ligand (Consales et al., 2007) and activated Ret (Carlomagno et al., 1996). EGR1 is activated through the RAS-MAPK pathway signalling as already shown in a ret transfected rat pheochromocytoma cell line (PC12) (Califano et al., 2000). Moreover, it has been suggested, in the PC12 cell line, that mutated ret increases the expression of EGR1 and induces an aberrant neuronal differentiation program with no inhibition of cell proliferation and insensitivity of NGF-induced neurite outgrowth although the cell express neuron-specific markers. These observations led the authors to propose that ret-induced impairment of the correct differentiation program and of the response to cytokines causes the hyperplasia of neuroendocrine cells, which constitutes the initial step of the development of MEN2A features (Califano et al., 1996). Our data corroborate these assumptions by showing that EGR1 transcriptional program is activated in RET mutated undifferentiated iPSC and thus could be responsible for the development of MEN2A tumoral features. The lineage independence of the EGR1 transcriptional activation could explain the development of tumours in tissue of different germ layer origins (Huber et al., 2009; Johansson et al., 2015). Moreover, EGR1 shares target DNA intervals with other transcription

109

factors that have been implicated in RET transcriptional regulation (SP1 and SP3), medullary thyroid cancer (HIF1A) or pheochromocytoma (HIF1A, MAX, SP1) which reinforce its putative role in the development of MEN2A neoplastic features.

Our iPSC lines were generated from PBMC of a MEN2A patient. Whether the origin of the reprogrammed cell is important for the study of iPSCs is a matter of debate. Indeed, it has been shown that nuclear factors-based reprogrammed IPSC retains epigenetic features reminiscent to their cell of origin when compared to nuclear transfert-based reprogrammed cell in mouse (Kim et al., 2010). A bias in differentiation potential has been reported in human iPSCs derived for the neural tube (Hargus et al., 2014) and pancreatic islet beta cells (Bar-Nur et al., 2011). However, it has also been shown that this "epigenetic memory" is lost through serial passaging in mouse IPSCs (Polo et al., 2010). Our data have not revealed mesenchymal or hematologic bias in the integrative genomic analyses which suggest that the cell of origin of our iPSC is not of great importance in our study.

Generation of iPSC is of potential value in cancer research for disease progression modelling, drug screening and toxicology (Kim, 2015). In modelling hereditary disease, two studies have been published to date. The first study focused on hereditary breast cancer, BRCA15382insC mutant iPSCs were generated from skin fibroblast; these iPSCs did not give rise to cancerous or dysplastic teratoma after injection in immunocompromised mice but it was found that PKC-theta was overexpressed in the BRCA15382insC iPSCs (Soyombo et al., 2013). In the second study, p53^{G245D} mutant iPSC were generated from fibroblast of patients with Li-Fraumeni Syndrome who had developed several tumours including osteosarcoma (Lee et al., 2015). The teratoma generated from the p53-mutated iPSCs were not reported to have cancerous or dysplastic features but when osteogenic differentiation was induced, differentiated cells exhibited functional and gene expression features of osteosarcoma as seen in Li-Fraumeni syndrome. Gene correction strategies in these two models would certainly be of major interest to dissect the signalling pathways due to BRCA1 and TP53 mutations. Indeed, in these studies with hereditary cancer (Lee et al., 2015; Soyombo et al., 2013), control IPSC were generated by the reprogramming of fibroblasts from unaffected relatives to the patient and were not, therefore, isogenic control. . In sporadic cancers, Direct reprogramming of cancer tissues such as described in pancreas cancer (Kim et al., 2013a) could be a

successful strategy to generate iPSC-derived cancer cells, potentially facilitated by the epigenetics status of the target cells.

In this study, we report the generation of the first MEN2A iPSC together with a genome-edited isogenic control of the ATA high risk *RET*^{C634Y} mutation and its integrative gene expression characterization. We further show here the proof of concept that iPSC modelling can be a major and useful tool to dissect signalling pathways at the level of stem cells, a strategy which could not have been possible using primary MTC. We identify EGR1 as a potential transcriptional effector of MEN2A phenotype at the embryonic stage, independent on any differentiation program or bias which could explain the development of tumours in tissue of different embryonic origins in MEN2A patients.

We show here that EGR1 elicits a transcriptional program at the level of stem cells in two independent iPSC with *RET* mutation. This program has already been shown to be is responsible for the development of MEN2A features throughout foetal and adult development and differentiation. Our results demonstrate for the first time the usefulness of iPSC modelling in MEN2A associated MTC.

REFERENCES

Andrew, S.D., Capes-Davis, A., Delhanty, P.J.D., Marsh, D.J., Mulligan, L.M., and Robinson, B.G. (2002). Transcriptional repression of the RET proto-oncogene by a mitogen activated protein kinase-dependent signalling pathway. Gene 298, 9–19.

Barnes, D.R., and Antoniou, A.C. (2012). Unravelling modifiers of breast and ovarian cancer risk for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: update on genetic modifiers. J. Intern. Med. 271, 331–343.

Bar-Nur, O., Russ, H.A., Efrat, S., and Benvenisty, N. (2011). Epigenetic memory and preferential lineage-specific differentiation in induced pluripotent stem cells derived from human pancreatic islet beta cells. Cell Stem Cell 9, 17–23.

Califano, D., D'Alessio, A., Colucci-D'Amato, G.L., De Vita, G., Monaco, C., Santelli, G., Di Fiore, P.P., Vecchio, G., Fusco, A., Santoro, M., et al. (1996). A potential pathogenetic mechanism for multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes involves ret-induced impairment of terminal differentiation of neuroepithelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93, 7933–7937.

Califano, D., Rizzo, C., D'Alessio, A., Colucci-D'Amato, G.L., Cali, G., Bartoli, P.C., Santelli, G., Vecchio, G., and de Franciscis, V. (2000). Signaling through Ras is

essential for ret oncogene-induced cell differentiation in PC12 cells. J. Biol. Chem. 275, 19297–19305.

Carlomagno, F., De Vita, G., Berlingieri, M.T., de Franciscis, V., Melillo, R.M., Colantuoni, V., Kraus, M.H., Di Fiore, P.P., Fusco, A., and Santoro, M. (1996). Molecular heterogeneity of RET loss of function in Hirschsprung's disease. EMBO J. 15, 2717–2725.

Chen, F., Pruett-Miller, S.M., Huang, Y., Gjoka, M., Duda, K., Taunton, J., Collingwood, T.N., Frodin, M., and Davis, G.D. (2011). High-frequency genome editing using ssDNA oligonucleotides with zinc-finger nucleases. Nat. Methods 8, 753–755.

Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., et al. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science 339, 819–823.

Consales, C., Volpicelli, F., Greco, D., Leone, L., Colucci-D'Amato, L., Perrone-Capano, C., and di Porzio, U. (2007). GDNF signaling in embryonic midbrain neurons in vitro. Brain Res. 1159, 28–39.

Ding, Q., Regan, S.N., Xia, Y., Oostrom, L.A., Cowan, C.A., and Musunuru, K. (2013). Enhanced efficiency of human pluripotent stem cell genome editing through replacing TALENs with CRISPRs. Cell Stem Cell 12, 393–394.

Gnirke, A., Melnikov, A., Maguire, J., Rogov, P., LeProust, E.M., Brockman, W., Fennell, T., Giannoukos, G., Fisher, S., Russ, C., et al. (2009). Solution hybrid selection with ultra-long oligonucleotides for massively parallel targeted sequencing. Nat. Biotechnol. 27, 182–189.

Hadoux, J., Féraud, O., Griscelli, F., Opolon, P., Divers, D., Gobbo, E., Schlumberger, M., Bennaceur-Griscelli, A., and Turhan, A.G. (2016). Generation of an induced pluripotent stem cell line from a patient with hereditary multiple endocrine neoplasia 2A (MEN2A) syndrome with RET mutation. Stem Cell Res. 17, 154–157.

Hargus, G., Ehrlich, M., Araúzo-Bravo, M.J., Hemmer, K., Hallmann, A.-L., Reinhardt, P., Kim, K.-P., Adachi, K., Santourlidis, S., Ghanjati, F., et al. (2014). Origindependent neural cell identities in differentiated human iPSCs in vitro and after transplantation into the mouse brain. Cell Rep. 8, 1697–1703.

Hockemeyer, D., and Jaenisch, R. (2016). Induced Pluripotent Stem Cells Meet Genome Editing. Cell Stem Cell 18, 573–586.

Hsu, P.D., Scott, D.A., Weinstein, J.A., Ran, F.A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E.J., Wu, X., Shalem, O., et al. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. Nat. Biotechnol. 31, 827–832.

Huber, K., Kalcheim, C., and Unsicker, K. (2009). The development of the chromaffin cell lineage from the neural crest. Auton. Neurosci. Basic Clin. 151, 10–16.

Huynh, T.-T., Pacak, K., Wong, D.L., Linehan, W.M., Goldstein, D.S., Elkahloun, A.G., Munson, P.J., and Eisenhofer, G. (2006). Transcriptional regulation of phenylethanolamine N-methyltransferase in pheochromocytomas from patients with von Hippel-Lindau syndrome and multiple endocrine neoplasia type 2. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1073, 241–252.

Itzhaki, I., Maizels, L., Huber, I., Zwi-Dantsis, L., Caspi, O., Winterstern, A., Feldman, O., Gepstein, A., Arbel, G., Hammerman, H., et al. (2011). Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells. Nature 471, 225–229.

Jakubowska, A., Rozkrut, D., Antoniou, A., Hamann, U., Scott, R.J., McGuffog, L., Healy, S., Sinilnikova, O.M., Rennert, G., Lejbkowicz, F., et al. (2012). Association of PHB 1630 C>T and MTHFR 677 C>T polymorphisms with breast and ovarian cancer risk in BRCA1/2 mutation carriers: results from a multicenter study. Br. J. Cancer 106, 2016–2024.

Johansson, E., Andersson, L., Örnros, J., Carlsson, T., Ingeson-Carlsson, C., Liang, S., Dahlberg, J., Jansson, S., Parrillo, L., Zoppoli, P., et al. (2015). Revising the embryonic origin of thyroid C cells in mice and humans. Dev. Camb. Engl. 142, 3519–3528.

Kamihara, J., Rana, H.Q., and Garber, J.E. (2014). Germline TP53 mutations and the changing landscape of Li-Fraumeni syndrome. Hum. Mutat. 35, 654–662.

Kawai, K., Iwashita, T., Murakami, H., Hiraiwa, N., Yoshiki, A., Kusakabe, M., Ono, K., Iida, K., Nakayama, A., and Takahashi, M. (2000). Tissue-specific carcinogenesis in transgenic mice expressing the RET proto-oncogene with a multiple endocrine neoplasia type 2A mutation. Cancer Res. 60, 5254–5260.

Kim, J.J. (2015). Applications of iPSCs in Cancer Research. Biomark. Insights 10, 125–131.

Kim, J., Hoffman, J.P., Alpaugh, R.K., Rhim, A.D., Reichert, M., Stanger, B.Z., Furth, E.E., Sepulveda, A.R., Yuan, C.-X., Won, K.-J., et al. (2013). An iPS Cell Line From Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Undergoes Early to Invasive Stages of Pancreatic Cancer Progression. Cell Rep. 3, 2088–2099.

Kim, K., Doi, A., Wen, B., Ng, K., Zhao, R., Cahan, P., Kim, J., Aryee, M.J., Ji, H., Ehrlich, L.I.R., et al. (2010). Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. Nature 467, 285–290.

Koperek, O., Bergner, O., Pichlhöfer, B., Oberndorfer, F., Hainfellner, J.A., Kaserer, K., Horvat, R., Harris, A.L., Niederle, B., and Birner, P. (2011). Expression of hypoxia-associated proteins in sporadic medullary thyroid cancer is associated with desmoplastic stroma reaction and lymph node metastasis and may indicate somatic mutations in the VHL gene. J. Pathol. 225, 63–72.

Kriks, S., Shim, J.-W., Piao, J., Ganat, Y.M., Wakeman, D.R., Xie, Z., Carrillo-Reid, L., Auyeung, G., Antonacci, C., Buch, A., et al. (2011). Dopamine neurons derived

from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. Nature 480, 547–551.

Lee, D.-F., Su, J., Kim, H.S., Chang, B., Papatsenko, D., Zhao, R., Yuan, Y., Gingold, J., Xia, W., Darr, H., et al. (2015). Modeling familial cancer with induced pluripotent stem cells. Cell 161, 240–254.

Lesueur, F., Cebrian, A., Robledo, M., Niccoli-Sire, P., Svensson, K.-A., Pinson, S., Leyland, J., Whittaker, J., Pharoah, P.D., and Ponder, B.A.J. (2006). Polymorphisms in RET and its coreceptors and ligands as genetic modifiers of multiple endocrine neoplasia type 2A. Cancer Res. 66, 1177–1180.

Maddah, M., Heidmann, J.D., Mandegar, M.A., Walker, C.D., Bolouki, S., Conklin, B.R., and Loewke, K.E. (2015). A non-invasive platform for functional characterization of stem-cell-derived cardiomyocytes with applications in cardiotoxicity testing. Stem Cell Rep. 4, 621–631.

Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E., Norville, J.E., and Church, G.M. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. Science 339, 823–826.

Michiels, F.M., Chappuis, S., Caillou, B., Pasini, A., Talbot, M., Monier, R., Lenoir, G.M., Feunteun, J., and 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.

Milbrandt, J. (1987). A nerve growth factor-induced gene encodes a possible transcriptional regulatory factor. Science 238, 797–799.

Ozmadenci, D., Féraud, O., Markossian, S., Kress, E., Ducarouge, B., Gibert, B., Ge, J., Durand, I., Gadot, N., Plateroti, M., et al. (2015). Netrin-1 regulates somatic cell reprogramming and pluripotency maintenance. Nat. Commun. 6, 7398.

Polo, J.M., Liu, S., Figueroa, M.E., Kulalert, W., Eminli, S., Tan, K.Y., Apostolou, E., Stadtfeld, M., Li, Y., Shioda, T., et al. (2010). Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. Nat. Biotechnol. 28, 848–855.

Qin, N., de Cubas, A.A., Garcia-Martin, R., Richter, S., Peitzsch, M., Menschikowski, M., Lenders, J.W.M., Timmers, H.J.L.M., Mannelli, M., Opocher, G., et al. (2014). Opposing effects of HIF1 α and HIF2 α on chromaffin cell phenotypic features and tumor cell proliferation: Insights from MYC-associated factor X. Int. J. Cancer 135, 2054–2064.

Ran, F.A., Hsu, P.D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D.A., and Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. Nat. Protoc. 8, 2281–2308.

Robledo, M., Gil, L., Pollán, M., Cebrián, A., Ruíz, S., Azañedo, M., Benitez, J., Menárguez, J., and Rojas, J.M. (2003). Polymorphisms G691S/S904S of RET as genetic modifiers of MEN 2A. Cancer Res. 63, 1814–1817.

Smith, R.N., Aleksic, J., Butano, D., Carr, A., Contrino, S., Hu, F., Lyne, M., Lyne, R., Kalderimis, A., Rutherford, K., et al. (2012). InterMine: a flexible data warehouse system for the integration and analysis of heterogeneous biological data. Bioinforma. Oxf. Engl. 28, 3163–3165.

Soldner, F., and Jaenisch, R. (2012). iPSC Disease Modeling. Science 338, 1155–1156.

Soldner, F., Laganière, J., Cheng, A.W., Hockemeyer, D., Gao, Q., Alagappan, R., Khurana, V., Golbe, L.I., Myers, R.H., Lindquist, S., et al. (2011). Generation of Isogenic Pluripotent Stem Cells Differing Exclusively at Two Early Onset Parkinson Point Mutations. Cell 146, 318–331.

Soyombo, A.A., Wu, Y., Kolski, L., Rios, J.J., Rakheja, D., Chen, A., Kehler, J., Hampel, H., Coughran, A., and Ross, T.S. (2013). Analysis of Induced Pluripotent Stem Cells from a BRCA1 Mutant Family. Stem Cell Rep. 1, 336–349.

Takahashi, M., Ritz, J., and Cooper, G.M. (1985). Activation of a novel human transforming gene, ret, by DNA rearrangement. Cell 42, 581–588.

Thompson, L.D.R. (2002). Pheochromocytoma of the Adrenal gland Scaled Score (PASS) to separate benign from malignant neoplasms: a clinicopathologic and immunophenotypic study of 100 cases. Am. J. Surg. Pathol. 26, 551–566.

Vaquerizas, J.M., Kummerfeld, S.K., Teichmann, S.A., and Luscombe, N.M. (2009). A census of human transcription factors: function, expression and evolution. Nat. Rev. Genet. 10, 252–263.

Veres, A., Gosis, B.S., Ding, Q., Collins, R., Ragavendran, A., Brand, H., Erdin, S., Cowan, C.A., Talkowski, M.E., and Musunuru, K. (2014). Low Incidence of Off-Target Mutations in Individual CRISPR-Cas9 and TALEN Targeted Human Stem Cell Clones Detected by Whole-Genome Sequencing. Cell Stem Cell 15, 27–30.

Wells, S.A., Pacini, F., Robinson, B.G., and Santoro, M. (2013). Multiple endocrine neoplasia type 2 and familial medullary thyroid carcinoma: an update. J. Clin. Endocrinol. Metab. 98, 3149–3164.

Wells, S.A., Asa, S.L., Dralle, H., Elisei, R., Evans, D.B., Gagel, R.F., Lee, N., Machens, A., Moley, J.F., Pacini, F., et al. (2015). Revised american thyroid association guidelines for the management of medullary thyroid carcinoma. Thyroid Off. J. Am. Thyroid Assoc. 25, 567–610.

TABLES & FIGURES LEGENDS

Figure 1: CRISPR-mediated correction of the RET^{C634Y} mutation and generation of the RET^{Y634C} iPSC

Legend:

A: schematic representation of the gRNA and ssODN used for CRISPR-mediated correction of the RET^{C634Y} mutation.

B: Gel electrophoresis of Not 1 digested genomic DNA of CRISPR-targeted iPSc clones.

C: Morphology, expression of pluripotency markers SSEA4 and TRA-1 60, karyotype and teratoma assay of RET^{Y634C} iPSC.

D: RET expression by FACS analysis and sanger sequencing of RET cDNA in RET^{C634Y} and RET^{Y634C} iPSC.

Table 1: Sanger and whole exome sequencing sequencing of predicted exonicoff target mutations

Figure 2 : EGR1 is upregulated in *RET* mutated iPSC

A: Venn diagram of upregulated genes list in RET^{C634Y} compared to RET^{wt} iPSC (figure 3A & supplemental table 1) and downregulated genes in RET^{Y634C} (figure 4A);

B: Pie chart of RNA sequences types observed after crossing the RETC634Y upregulated genes list and the RETY634C downregulated genes list.

C: Heatmap of coding and non coding sequences induced in RETC634Y compared to RETwt iPSC and « corrected » following CRISPR-mediated generation of the the RETY634C iPSC.

D: Heatmap of the 9 up regulated transcription factors in RETC634Y iPSC.

E : Microarray expression thyroid & adrenal/microarray expression all tissues ratio table heatmap and expression sensitivity (low : 0-104, middle : 104-105, high > 105) of the 9 transcription factors according to dataset GDS3113

F: Box plot of EGR1 expression in RETC634Y and RETM918T iPSC as compared to RETwt iPSC.

Figure 3 : Integrative analysis of EGR1 transcriptional program in *RET*^{C634Y} iPSC

A : Piechart of the EGR1 ChipSeq peaks in H1 hESC line.

B : Venn diagramm of integrative crossing between target promoters of EGR1 in H1 hESC line and upregulated genes list in the RET^{C634Y} iPSC (Odds ratio of enrichment by Fisher exact Test)

C : Integrative analysis Circosplot . Purple line: EGR1 targets in H1 hESC line (Chip Seq BETA score). Blue line: Up regulated genes in the RET^{C634Y} iPSC (Fold Change). Red labels: multiomics intersection genes.

D : Unsupervised classification of the EGR1-dependant transcriptional program induced in RET^{C634Y} iPSC (euclidien distances – complete linkage).

E : JASPAR de novo motif discovery in the EGR1-dependant transcriptional program induced in RET^{C634Y} iPSC.

F : Trancription factors with shared regulating sequences among the the EGR1dependant transcriptional program induced in RET^{C634Y} iPSC (de novo discovery on JASPAR vertebrales 2016).

TABLE

 Table 1: Sanger and whole exome sequencing sequencing of predicted exonic

off target mutations

Predicte d off Target ID	Sanger Sequence obtained : Yes/No	WES sequenc e obtained yes/no	Off Target mutation/other
NR_0733 79	Yes	Yes	No
NM_020 836	Yes	Yes	No
NM_145 653	Yes	Yes	Heterozygote T->C mutation at bp1360 : L- >P/ rs148762104 : 910G>A, Ala304Thr
NM_013 432	Yes	Yes	No
NM_032 251	No	Yes	NA
NM_032 873	Yes	Yes	No
NM_001 385	Yes	Yes	No
NM_006 754	No	Yes	NA
NM_000 603	Yes	Yes	No
NM_052 920	Yes	Yes	No
NM_178 138	No	Yes	NA
NM_014 246	Yes	Yes	No
NM_001 165979	Yes	Yes	No
NM_145 245	Yes	Yes	No/SNP rs763546633 : 606C>T, lle202=
NR_0389 45	Yes	Yes	No
NM_030 877	Yes	Yes	No

Figure 1: CRISPR-mediated correction of the RET^{C634Y} mutation and generation of the RET^{Y634C} iPSC







Figure 2 : EGR1 is upregulated in RET mutated iPSC



Ε

HGNC symbol	ratio thyroid /all tissues (GDS3113)	Adrenal &Thyroid expression (GDS3113)
EGR1	1.24601489362174	HIGH
ZNF554	no data	no data
ZMAT3	0.740912988909332	low
ZNF595	1.20511694459081	middle
ZNF560	0.446154723418317	low
ZNF667	2.63042972091443	low
ZC3H6	2.07807626253902	low
H1F0	0.645474670898634	low
HLA-DRB3	0.357211459897955	middle

Figure 3: Integrative analysis of EGR1 transcriptional program in RET^{C634Y} iPSC



С





Figure 3: Integrative analysis of EGR1 transcriptional program in *RET*^{C634Y} iPSC (end)





Ε



SUPPLEMENTAL METHODS

In vivo Pluripotency analysis by teratoma formation

RET^{Y634C} iPSC were subjected to teratoma formation assay by intramuscular injection of NSG mice (2.10⁶ cells in 150µl of Geltrex/DMEMEF12 1:1dilution). Teratoma formation assays were performed in triplicate in order to analyze the development of potentially malignant tumor tissue within teratomas. Pathological analysis was performed after 8 to 10 weeks of tumor growth: teratomas were dissected and fixed in 4% paraformaldehyde and samples were embedded in paraffin and stained with Hematoxylin & Eosin in association with IHC, to assess the presence of ectodermic, endodermic, and mesodermic tissues and the xpression of chromogranin A and calcitonin. The IHC was performed as requested with a BenchMark Ultra[®] apparatus (Ventana Medical System) with prediluted primary antibodies raised against chromogranin A and calcitonin (DAKO). Chromogranin A staining was revealed with peroxidase/diaminobenzidine and calcitonine was revealed with alkaline phosphatase/Permanent Red.

Human iPS cells culture & Pluripotency Markers and Ret Expression

The feeder cultures were performed on Mitomycin C-treated MEF layer as described above with passaging every 7 days using 1 mg/ml collagenase IV in DMEM/F12 (Life technologies)); the feeder-free culture was performed on Geltrex[™] (Life technologies) Essential 8 medium (Life technologies) 1% in and penicillin/streptomycin with passaging every 3-4 days using in DPBS (Life technologies) supplemented with 0.5 mM EDTA (Life technologies) and 1.8 mg/L NaCl (Sigma).

Pluripotency Markers and Ret Expression

For flow cytometry analysis, iPSC colonies were recovered from Mitomycin-C inactivated MEF by 2 hours incubation in 1 mg/ml collagenase IV in DMEM/F12. After two cycles of washing/sedimentation with 10 ml DMEM/F12, colonies were washed once in Ca2+/Mg2+ free PBS (Life technologies) and then dissociated into a single cell suspension by 10 minutes incubation in Hank's balanced enzyme-free cell dissociation buffer (Life technologies). For pluripotency marker analysis, 1x105 cells were incubated in 10 µl PBS containing 1 µl Phycoerythrin-conjugated rat monoclonal

123

antibody anti-SSEA3, 1µI V450- conjugated mouse monoclonal anti-SSEA-4 and 1 µI Alexa647-conjugated mouse monoclonal antibody anti-TRA1-60 (all of them from BD Bisociences) or conjugated isotype control. For Ret expression analysis, 1x105 cells were incubated in 10 µI PBS containing 1 µI APC-conjugated mouse monoclonal antibody anti-Ret (R&D) or conjugated isotype control. Cells were analyzed with a MACSQuant flowcytometer using the FlowJo V10 software.

RET mutation correction by CRISPR/Cas9

Cas9 and chimeric guide RNA expression plasmid, pX330-U6-Chimeric_BB-CBhhSpCas9 (Cong et al., 2013), was ordered from Addgene (Plasmid #42230). Two single strand oligonucleotides (RET634 gRNA forward 5'-CACCGGTGCGACGAGCTGTACCGCA-3' 5'-RET634 gRNA reverse and AAACTGCGGTACAGCTCGTCGCACC-3') were annealed to form the guide RNA and cloned in this plasmid after digestion with Bbs1 as previously described (Ran et al., 2013b). The single-stranded oligodeoxynucleotides (ssODN) sequence used for RET 5'the mutation correction follows: was as CCTCACACCACCCCACCACAGATCCACTGTGCGACGAGCTGTGCAGAACCG TGATCGCGGCCGCTGTCCTCTTCTCCTTCATCGTCTCGGTGCTGCTGTCTTG-3'. RET^{C634}'--iPSC, cultured on feeder, were transfected with both RET⁶³⁴-guideRNAcontaining plasmid and the ssODN using Fugene HD. After transfection, iPSC were subcloned in multiwell plates and grown for one week. At the end of the expansion culture, each clone was splitted in 2 samples: one sample for further feeder-free culture and one sample for genomic DNA extraction. For genomic DNA lysates preparation, the subcloned iPSC sample was put in 50µl of QuickExtract DNA extraction solution (Epicentre), vortexed for 15 seconds and then incubated at 68°C during 15 min following by 95°C during 8 minutes and then stored at -20°C. PCR was performed on 0.5µl of this genomic DNA lysates with high-fidelity PCR polymerase (Herculase II fusion DNA polymerase, Agilent) using the following cycling parameter: 2 minutes of denaturation at 95°C followed by 30 cycles with 10 seconds at 95°C, 20 seconds at 55 °C and 30°C at 72°C and a final 3 min elongation step at 72°C. 5'-GCCAGCTGGTGTAATGAGCA-3' 5'-Primers forward and reverse ACCGTTCACTCACACCCTTG-3' were used, leading to a 1058 bp amplicon (NC 000010.11, 43114189-43115246). The PCR product was then subjected to digestion by Not1 enzyme (New England Biolabs, R0189S) during 1h at 37°C and gel

124

electrophoresis was performed. Clones that were positive by restriction enzyme digestion were sequenced.

Sanger Sequencing and WES of predicted exonic CRISPR off targets mutation Genomic DNA from iPS was extracted with DNeasy blood & Tissue kit (Ref 69504, Qiagen) according to manufacturer instruction. Predicted exonic and non-coding genomic off target sequences were as follows:

Off				Off Target Sequence		score	gene ID	gene	Coding
Target	chromo	stra	positio		Mismat			Name	Yes/No
Туре	some	nd	n		ches				
					nb				
Exonic	chr10	1	43609		1	26.8		RET	Yes
			934	GTGCGACGAGCTGT			NM_0209		
				GCCGCACGG			75		
	chr16	1	87723		3			JPH3	No
			333	GAGCCCCGAGCTGT		1.4680715	NR_0733		
				ACCGCAAGG		198	79		
	chr14	-1	10101		4			BEGAI	Yes
			1335	GGAGGACAAGCTGT		1.3458333	NM_0208	Ν	
				ACCGCATGG		3333	36		
	chr18	-1	44555		4			TCEB3	Yes
			078	GCCCGATCAGCTGTA		0.9192041	NM_1456	С	
				CCGCACAG		66667	53		
	chr8	-1	14566		4			TONSL	Yes
			2012	GTGGGTGAAGCTGTA		0.5472410	NM_0134		
				CCGCAGGG		54833	32		
	chr11	1	64110		4			CCDC	Yes
			019	GCGGGCCGAGCTGT		0.4219555	NM_0322	88B	
				ACCGCGAGG		45775	51		
	chr11	1	12252		4			UBAS	Yes
			6798	GAGAGAGGAGCTGT		0.4163454	NM_0328	НЗВ	
				ACAGCAAAG		16667	73		
	chr8	-1	10545		4			DPYS	Yes
			6601	GGGCCACGAGCTGT		0.1869158	NM_0013		
				GCCGCCCAG		4507	85		
	chr7	-1	10575		4			SYPL1	Yes
			2997	GTGCCAGGGGCTGA		0.0889618	NM_0067		
				ACCGCAGGG		300452	54		
	chr7	1	15070		4			NOS3	Yes
			4303	GGGCGACGAGCTGT		0.0719626	NM_0006		
				GCGGCCAGG		003521	03		
	chr2	1	23916		4			KLHL2	Yes
			196	GTGCAGCGAGCTCTA		0.0701651	NM_0529	9	
				CCACATGG		346567	20		
	chr9	-1	13909		4			LHX3	Yes
			1574	GGGCGACGAGTTCT		0.0678613	NM_1781		

				ACCTCATGG		693439	38		
	chr22	-1	46931		4			CELSR	Yes
			122	GTGTGCCGAGCTGG		0.0605954	NM_0142	1	
				ACCGCGAGG		893948	46		
	chr10	-1	96058		4			PLCE1	Yes
			385	GTGCCACAAGCTGTA		0.0515446	NM 0011		
				TCCCATGG		351931	65979		
	chr19	1	79139		4			EVI5I	Yes
		-	25	GTGCGAGAAGCTGAT	-	0 0384039	NM 1452		
			_0	CCGCAGGG		69664	45		
	chr7	1	15486		4	00001	10	HTR5A	No
	onn		2965	GTGCGACGTGCTTTG	-	0 0343543	NR 0389	-4.51	110
			2000	CTGCACGG		748967	45	101	
	chr20	-1	36322	0100/000	4	140001	-10	CTNN	Ves
	GIIIZO	-1	JUJZZ	GTGCGGCGAGCGGA	4	0.0170057	NM 0208		163
			412			0.0170037	77	DLI	
Non	obr16	4	22070	GUUGUAGAG	4	333430	None	Nono	No
non	CHITO	I	23970	CTCCCCCCACCTCT	4	0.0110024	None	None	INU
coung			540			0.0116034			
	a har	4	50000	ATATCAGAG	4	006646	Nana	Nama	Nia
	CUL2	Ĩ	56338	17000100107070	4	0 0000405	None	None	INO
			982	AIGGGACCAGCIGIA		0.6206165			
				CAGCAGGG		15837			
	chr10	-1	44532		4		None	None	No
			439	GIGCAACAAACIGIA		0.5329996			
				CIGCAAGG		0443			
	chr9	-1	13890		4		None	None	No
			3720	GGGCGTGGAGATGT		0.3281138			
				ACCGCACGG		68599			
	chr1	1	45100		4		None	None	No
			717	ATGCTAGGAGCTGTA		0.2197717			
				CCTCAGGG		74194			
	chr9	-1	65602		4		None	None	No
			776	GGGCGCCGCGCTGT		0.1514712			
				CCCGCAGAG		92382			
	chr2	1	24175		4		None	None	No
			8152	GTGCGACCTGGTGT		0.1259768			
				CCCGCAGAG		47763			
	chr12	-1	28622		4		None	None	No
			49	GCGCGCCGTGCTGT		0.1167925			
				ACCTCAAGG		80882			
	chr10	-1	87406		4		None	None	No
			450	GTGAGAAGAGTTGTA		0.1155817			
				CCTCAGAG		18886			
	chr6	-1	13686		4		None	None	No
			5709	GTGAGACGACCTGTA		0.0932497			
				AAGCATGG		677039			
	chr16	1	87294		4		None	None	No
			963	GTGCCAGGAGCTGC		0.0588944			
				ACAGCACAG		307753			
	chrX	-1	51812		4		None	None	No

	551	GTGGGTCGAGCTGC		0.0530641			
		ACTGCAGGG		637607			
X 1	51927		4		None	None	No
	712	GTGGGTCGAGCTGC		0.0530641			
		ACTGCAGGG		637607			
5 1	64333		4		None	None	No
	436	GTGTGACGATCTGTA		0.0483018			
		ACTCAAGG		248908			
12 1	11653		4		None	None	No
	428	GTGCGCCGGGCTCT		0.0421473			
		ACCTCAAGG		378275			
	< 1 5 1 12 1	551 (1 51927 712 5 1 64333 436 12 1 11653 428	551 GTGGGTCGAGCTGC ACTGCAGGG (1) 51927 712 GTGGGTCGAGCTGC ACTGCAGGG 5 1 64333 436 GTGTGACGATCTGTA ACTCAAGG 12 1 11653 428 GTGCGCCGGGCTCT ACCTCAAGG	551 GTGGGTCGAGCTGC ACTGCAGGG (1) 51927 4 712 GTGGGTCGAGCTGC ACTGCAGGG 5 1 64333 4 436 GTGTGACGATCTGTA ACTCAAGG 12 1 11653 4 428 GTGCGCCGGGCTCT ACCTCAAGG	551 GTGGGTCGAGCTGC 0.0530641 ACTGCAGGG 637607 4 712 GTGGGTCGAGCTGC 0.0530641 712 GTGGGTCGAGCTGC 0.0530641 ACTGCAGGG 637607 637607 5 1 64333 4 436 GTGTGACGATCTGTA 0.0483018 ACTCAAGG 248908 12 1 11653 4 428 GTGCGCCGGGCTCT 0.0421473 ACCTCAAGG 378275	551 GTGGGTCGAGCTGC 0.0530641 ACTGCAGGG 637607 X 1 51927 4 None 712 GTGGGTCGAGCTGC 0.0530641 ACTGCAGGG 637607 5 1 64333 4 None 436 GTGTGACGATCTGTA 0.0483018 ACTCAAGG 248908 12 1 11653 4 None 428 GTGCGCCGGGCTCT 0.0421473 378275	551 GTGGGTCGAGCTGC 0.0530641 ACTGCAGGG 637607 1 51927 4 None None 712 GTGGGTCGAGCTGC 0.0530641 1 1 ACTGCAGGG 637607 637607 1 64333 4 None None 5 1 64333 4 None None None 436 GTGTGACGATCTGTA 0.0483018 248908 1 11653 ACTCAAGG 248908 1 12 1 11653 4 None None None 12 1 6TGCGCCGGGCTCT 0.0421473 378275 1 1

Predicted exonic off target were PCR amplified with high-fidelity PCR polymerase (Herculase II fusion DNA polymerase, Agilent) using the following cycling parameter: 2 minutes of denaturation at 95°C followed by 30 cycles with 10 seconds at 95°C, 20 seconds at 55 °C and 30°C at 72°C and a final 3 min elongation step at 72°C. The following primers were used for the predicted exonic of targets:

Off Target ID	Primers used
NR_073379	CCCCATACAGGGCTGGAGTA
	GGAAGTCATCCACGAGCAGG
NM_020836	GCCATAAGGGTCGTGGGAG
	TGAATTCGGGCCTCCCTATC
NM_145653	AACTACGATCTGCTGTCCGCTTTT
	CTGTGGCTTTTCTTCCTTGAAGTC
NM_013432	CTGCTCAACTGATGCCACACAG
	TCTGGGAGTCTAGTGCTATTAGAGG
NM_032251	CGAAATAAGAAGGCTCCGCCA
	GTTTGGAGGCCGAAATAAGAAGG
	CCACCAAGATCTCTTCAGGTACTTT

	GCTCCCGCAGCGCCT
NM_032873	CTCACCAGGAAGCGTCAGAG
	ATCCATGCTTGATGGTGCCG
NM_001385	GAAGTGTTGGCTCTGGGGA
	AGAGGCTACAGACGTGGACT
NM_006754	CGGGCCCAACGAGCG
	GCTGGCGAACCAAGTAGATGTT
	GCGCAGGGGAAGACCG
	GTTGATCTGGAAGCCGGACA
NM_000603	GAGTTATAAGATCCGCTTCAACAGC
	GACCAAAGAACCAAACAGAATCAGG
NM_052920	GTTCAGAGAAGGATCTAGGGTGAC
	TTCTTGATCCACTTGATGACTGTCT
NM_178138	AAATGAGCCTCGCGCTTCC
	CCCTTAGTGAGCGCTTGGG
	CCAGGACTTCGTGTACCACC
	GGAGAGAATTTCCCCGGACG
NM_014246	ATGTCAACGACAACGAGCCT
	CCACCCCGAAGCTGTAGTG
NM_001165979	AACGTCTGTGTCGCAGGTAT
	TCTCACATATGGTGTGCCCC

NM_145245	CATGCCCGTCAAGAACCAGTA
	GTCTACCAGCGAGTATGCCT
NR_038945	GTGCGGAGCGTGTATTCCAT
	CTCTCGGTCTTCGGAGTGC
NM_030877	CGCTTGTCGCTCGCACT
	GAGCAAAGTAAAACGAGGGGC

PCR products were then purified with exo SAP mix (0.5 µl Exonuclease I, Eurobio and 2µl Shrimp Alkaline Phosphatase, Ozyme) incubation (15 min at 37°C and then 15 min at 80°C) associated with BigDye Xterminator kit used according to manufacturer instruction (Applied Biosystems). Purified product was then subjected to sequencing reaction with BidDye Terminator kit (Applied biosystem): denaturation 5 min at 95°C followed by 25 cycles with 10 seconds at 95°C, 5 seconds at 50°C and 4 min at 60°C.

Whole exome sequencing was performed by Integragen (Evry, France) Briefly, genomic DNA from iPS in culture was extracted with was captured using in-solution enrichment methodology (SureSelect Human Clinical Research Exome, Agilent) with biotinylated oligonucleotides probes library (Human Clinical Research Exome, Agilent), followed by paired-end 75 bases massively parallel sequencing on Illumina HiSEQ 4000.

Whole exome sequencing bioinformatic analysis

Illumina Paired end fastq sequencing files of WES for each sample (*RET*^{C634Y}-IPSC and *RET*^{Y634C}-IPSC) were aligned with Bowtie2 on HG19 version of human genome and BAM files were recalibrated in GATK (base recalibration and realigned around known indels).

Gene expression data: samples processing and bioinformatics

Total RNA was extracted from 2 biological replicates of iPSC grown on matrigel in E8 medium with TRIzol (ThermoFischer) according to manufacturer instruction. After

validation of the RNA quality with Bioanalyzer 2100 (using Agilent RNA6000 nano chip kit), 230 ng of total RNA is reverse transcribed following the Genechip Whole transcript (WTplus) Sense Target labelling assay kit (Affymetrix). Briefly, the resulting double strand cDNA is used for in vitro transcription with T7 RNA pol. After purification, 15 ug of cRNA is used for reverse transcription with random primers. The cDNA obtained is then purified and fragmented. After control of fragmentation using Bioanalyzer 2100, cDNA is end labelled with biotin using Terminal Transferase (using the WT terminal labelling kit of Affymetrix). cDNA is then hybridized to GeneChip® human Gene2.0 (Affymetrix) at 45°C for 17 hours. After overnight hybridization, chips are washed on the fluidic station FS450 following specific protocols (Affymetrix) and scanned using the GCS3000 7G. The image is then analyzed with Expression Console software (Affymetrix) to obtain raw data (cel files) and metrics for Quality Controls. The observations of some of these metrics and the study of the distribution of raw data show no outlier experiment. Raw data were annotated and normalized by RMA method. Computer analyses have been performed on the normalized and converted into log2 matrix.

The differential analyses and heat maps on normalized data were performed with the MeV software (Multi experiment View, Version 4.9.0): the Significance Microarray Analysis algorithm was used with the introduction of 100 matrices permutations and a False Discovery Rate <5%; the ranking product analysis algorithm was used 100 matrices permutations; the heat maps were made with a classification algorithm using Euclidean distances and full linkage. Functional enrichment performed on the transcriptome gene lists were made with the Go-elite software version 1.2 XXX (Zambon et al., 2012) with various databases such as Gene Ontology, Pathway Commons, Biomarkers contained in Homo sapiens annotations Version EnsMark 65XXX. diagramm done with The venn was Venny 2.1.0 website (http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/). The genes connected to literature were collected by textmining Pubmed quering (Krallinger, Valencia, and Hirschman 2008), especially with the keywords: C-cell, parafollicular cell, medullary thyroid cancer, chromaffin cell, pheochromocytoma Fisher oneway ANOVA statistical tests were performed with the R software, version 3.2.3.

In silico chip sequencing analysis

130

EGR1 DNA binding data in H1 human embryonic stem (hES) cell line were uploaded to the ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements) Consortium website at the following address: https://www.encodeproject.org/. Narrow peaks were analyzed in bed format with the Binding Expression and Target Analysis (BETA) integrative tool to predict the distal (-10000 bp -3000 bp) and proximal (-3000 bp, 50 bp) target promoters of transcription starting Site (TSS) (Wang et al., 2013b). The peaks analysis by Phastcon Conservation Profiles on the promoters of mammals as well as the mapping of gene enrichment analysis on HG19 was carried out with Galaxy cistrome integrative tools: http://cistrome.org/Cistrome/Cistrome_Project.html. The GREAT algorithm was used for verifying the location of Chip-sequencing peaks around the TSSs (McLean et al., 2010). The full Chip sequencing RSAT pipeline (Thomas-Chollier et al., 2012) was used for de novo search of patterns in *EGR1* dependent signature induced in the *RET*^{C634Y} IPSC by querying the JASPAR CORE vertebrata 2016 database.

SUPPLEMENTAL RESULTS

Teratoma growth and pathology from the *RET*^{C634Y} iPSC and its genome-edited isogenic control cell line.

As *RET* is a proto-oncogene, we wonder whether the *RET*^{C637Y} iPSc would give rise to teratoma with major dysplasia and/or malignant tumor as we previously observed for partially reprogrammed IPSC (Griscelli et al., 2012). Therefore, we performed teratoma assay for RET^{C634Y}, RET^{Y634C} and RET^{wt} iPSCs, in triplicate. As MEN2A is characterized by the development of neuroendocrine tumors, especially pheochromocytoma and medullary thyroid carcinoma, we analysed our teratoma for chromogranin A (neuroendocrine marker) and calcitonin (MTC marker) expression by immunohistochemistry. Chromogranin A and calcitonin staining were also analysed (supplemental information). Chromogranin A positive cells were found in all teratoma and were distributed near digestive-like endodermic structures or in clusters but without any pathological feature of invasiveness or dysplasia or hyperplasia (figure FigureS). We observed only isolated positive cells for calcitonin in either RET^{C634Y}, RET^{Y634C} and RET^{wt} iPSCs-derived teratoma (figure Figure S). Taken together, our teratoma data indicate that the presence of an oncogenic *RET* mutation in iPSCs is not sufficient to give rise to tumors or dysplasia in derived teratomas, especially no

structure reminiscent of MTC or pheochromocytoma, the two neoplastic features of MEN2A, were observed.

SUPPLEMENTAL TABLES LEGENDS

Table S1: Differentially expressed genes between *RET*^{C634Y} iPSC and *RET*^{wt} iPSC

Table S2: Differentially expressed genes between RET^{C634Y} iPSC and RET^{wt} iPSC crossed with downregulated genes in the RET^{Y634C} iPSC as compared to the RET^{C634Y} IPSC

Table S3: Integration of the EGR1 ChipSeq data in H1hESCline and the overranking signature of the *RET*^{C634Y} iPSC

SUPPLEMENTAL FIGURE LEGENDS

Figure S1: Whole exome sequencing of codon 634 of the *RET* gene in RET^{C634Y} and RET^{Y634C} iPSC.

Figure S2: Pathological analysis of RET^{C634Y}, RET^{Y634C}, and RET^{wt} iPSC.
A: three germ layers are observed in all three iPSC
B: Chromogarnina A staining of teratoma from RET^{C634Y}, RET^{Y634C}, and RET^{wt} iPSC showing positive cluster of cells near endoderm-like structure
C: Calcitonin staining of of teratoma from RET^{C634}, RET^{Y634C}, and RET^{wt} iPSC showing positively isolated cells

Figure S3: Gene expression analysis of RET^{C634Y} and RET^{Y634C} iPSC

A : Heatmap of significantly deregulated genes in RET^{C634Y} compared to RET^{wt} iPSC (Significance microarray analysis with False discovery rate (FDR) < 5%, unsupervised classification by euclidean distance-complete linkage)

B : Histogram of functional enrichment of signaling pathway in *RET*^{C634Y} iPSC Pathways Commons database (NegLog p-value : Negative logarithm of base 10 on FDR corrected p-value)

C : Heatmap of significantly deregulated genes in RET^{C634Y} compared to RET^{Y634C} iPSC (Significance microarray analysis with False discovery rate (FDR) < 5%, unsupervised classification by euclidean distance-complete linkage)

Figure S4 EGR1 expression in Human tissues, target sequences enrichment in H1 hESCline ChipSeq, RSAT motifs and targets enrichment in the differential

RET^{C634Y} signature

A: Analysis of the 9 transcription factors in human tissues according to Body Map data set (GDS3113)

B: EGR1 targets enrichment in promoters and whole genome

- C: RSAT motifs and predicted co-operating transcription factors
- **D**: EGR1 target enrichment in the differential RET^{C634Y} signature and interactome.

Figure S1: Whole exome sequencing of codon 634 of the *RET* gene in RET^{C634Y} and RET^{Y634C} iPSC.



Figure S2: Pathological analysis of *RET*^{C634Y}, *RET*^{Y634C}, and *RET*^{wt} iPSC.





Figure S4: A. EGR1 expression in Human tissues, B. target sequences enrichment in H1 hESCline ChipSeq, C. RSAT motifs and D. targets enrichment in the differential *RET*^{C634Y} signature



Figure S4: A. EGR1 expression in Human tissues, B. target sequences enrichment in H1 hESCline ChipSeq, C. RSAT motifs and D. targets enrichment in the differential RET^{C634Y} signature.



Chromosomal Distribution of ChIP Regions



Figure S4: A. EGR1 expression in Human tissues, B. target sequences enrichment in H1 hESCline ChipSeq, C. RSAT motifs and D. targets enrichment in the differential *RET*^{C634Y} signature.



Figure S4: A. EGR1 expression in Human tissues, B. target sequences enrichment in H1 hESCline ChipSeq, C. RSAT motifs and D. targets enrichment in the differential *RET*^{C634Y} signature.

D



EGR1 target genes in IPSCs RET634 (Number of interactions)

Matériels et méthodes supplémentaires

Mise au point de l'utilisation du système CRISPR/Cas9 et génération des lignées exprimant la luciférase

Le plasmide d'expression de Cas9 et de l'ARN guide chimérique, pX330-U6-Chimeric BB-CBh-hSpCas9 (Cong et al., 2013), a été commandé auprès d'Addgene (Plasmid #42230). Deux oligonucléotides simple brins (5AAVS1 gRNAT2 5'-CACCGGGGCCACTAGGGACAGGAT-3' et 5'-3AAVS1_gRNAT2 AAACATCCTGTCCCTAGTGGCCCC-3') ont été hybridés pour former l'ARN guide qui a été cloné dans le plasmide pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 après digestion de ce dernier par l'enzyme BBs1 (pJH070, séquence en annexe) (Ran et al., 2013b). Le plasmide de recombinaison avec AAVS1, AAV-CAGGS-EGFP a été commandé auprès d'Addgene (#22212). Ce plasmide a été digéré par les enzymes de restriction SgrA1 et Mlu1 (NEB) afin d'y cloner les séquences des ADNc de la luciférase suivie de la GFP (Green Fluorescent Protein) et séparées par un site IRES, provenant du plasmide pMEGIX_luc du laboratoire UMR1009 et amplifié par PCR (pJH100, séquence en annexe). Les cellules 293T et/ou les CSPi ont été cotransfectées avec les plasmides pX330_AAVS1 et soit le donneur de recombinaison portant la GFP soit le donneur de recombinaison portant luciférase_IRES_GFP avec du Fugene HD (Promega). Les cellules ont ensuite été sélectionnées avec de la puromycine à 0.2 µg/ml puis sous clonées et la culture cellulaire a été poursuivie, sur FME pour les CSPi. Le test à la luciférine a été réalisée avec le luciferase assay system[®] selon les recommandations du constructeur (Promega).

Formation de tératomes, de tératomes secondaires et analyse histologique

La pluripotence des CSPi a été validée par le test de formation de tératomes par l'injection intramusculaire dans des souris NSG de 2.10⁶ cellules dans 150µl d'un mélange Geltrex[®]/DMEMEF12 1:1 et l'analyse histologique a été réalisée après 8 à 10 semaines de croissance tératomateuse. Ces analyses ont été réalisées en triplicat avec réalisation d'immunohistochimie anti calcitonine et chromogranine à la recherche de foyers tissulaires tumoraux et/ou de type neuroendocrine voir médullaire de la thyroïde (calcitonine).

Des « tératomes secondaires » ont été générés. Après 8 semaines de développement du tératome primaire, les souris ont été sacrifiées et le tératome
partagé en 2 parties : une pour analyse histologique et une autre partie qui est découpée en petits échantillons au scalpel qui sont ensuite soumis à 3 cycles d'incubation pendant 30 minutes avec de la collagénase IV à 0.3% et dissociation au moyen d'un gentleMACS[®] dissociator dans des tubes M (Miltenyi). Le broyat cellulaire est ensuite resuspendu à la micropipette de 1000 µl et filtrer à 70µ. On réinjecte alors, dans un mélange mélange Geltrex[®]/DMEMEF12 1:1, 1.10⁶ de cellules de tératome primaire en intramusculaire chez la souris NSG.

Traitement des cellules CSPi avec le vandetanib

Les CSPi ont été mises en culture dans des plaques 6 puits, en colonies, sur Geltrex[®] dans du milieu E8[®] (Life technologies) pour obtenir une confluence de 50% environ le lendemain du passage. Les cellules sont ensuites traitées par des concentrations croissantes de vandetanib (0 à 2000 nM) (SelleckChem), dans du milieu E8 qui est changé tous les jours. Après 72h de culture, les colonies sont rincées avec du PBS puis fixées avec du paraformaldéhyde 3.7% pendant 10 min puis colorées avec une solution de crystal violet aqueuse à 0.5% (SIGMA) pendant 10 minutes avant d'êtres rincées avec de l'eau à plusieurs reprises. Les plaques 6 puits sont ensuite scannées automatiquement et analysées avec CellCellector[®] (ALS).

Résultats supplémentaires

Mise au point et génération de CSPi exprimant la luciférase.

Dans un premier temps, nous avons mis au point la technique dans le laboratoire en utilisant le plasmide de recombinaison dans AAVS1 porteur de la GFP et de la résistance à la puromycine que nous avons co-transfecté dans une lignée 293T avec le plasmide exprimant Cas9 dans lequel nous avons cloné le SgRNA ciblant AAVS1. Le plasmide de recombinaison comporte des séquences d'homologie de 850 bp avec le locus AAVS1 (Figure 20A) et il est possible de mettre en évidence par PCR son intégration dans le génome, celle-ci est effective à la fois dans la lignée 293T mais aussi dans les CSPi avec une efficacité de recombinaison de respectivement 33 et 21% (Figure 20A) et on observe des colonies de cellules exprimant la GFP après sélection par la puromycine (Figure 20B).



Figure 20: Mise au point et utilisation du système CRISPR dans les lignées 293T et CSPi

Nous avons ensuite généré, à partir du plasmide de recombinaison porteur de la GFP, un plasmide de recombinaison exprimant la luciférase suivie d'un site IRES (Internal Ribosome Entry Site) et de la GFP. Ceci nous a permis de générer une lignée 293T exprimant à la fois la GFP et la luciférase ainsi qu'une version exprimant la luciférase de nos deux lignées de CSPi porteuses des mutations de RET les plus agressives (RET^{C634Y} et RET^{M918T}), d'une lignée de CSPi RET^{wt} et de la lignée contrôle isogénique RET^{Y634C} dont il sera question dans la suite de ce chapitre (Figure 20 C). La GFP n'était pas exprimée dans les CSPi alors qu'elle l'était dans les 293T transfectées avec ce même plasmide. L'intérêt de ces lignées comportant la luciférase était de pouvoir suivre l'évolution des tératomes induits in vivo (Figure 20 D) qui comportaient la présence des 3 feuillets en anatomopathologie. En effet, les CSPi étant porteuses de mutation d'un oncogène, nous avons fait l'hypothèse que les tératomes pourraient avoir des propriétés invasives voir métastatiques. Nous avons suivi l'évolution des tératomes issus des guatre lignées exprimant la luciférase décrites plus haut et n'avons observé aucune différence en termes de croissance tumorale, d'invasivité et aucun développement métastatique. Ceci suggère qu'au

stade CSPi et de tératome, la présence d'une mutation de RET n'est pas suffisante pour induire un développement tumoral ce qui confirme nos données d'analyse histologique présentées dans le chapitre précédent.

Comparaison phénotypique et fonctionnelle des CSPi RET^{C634Y} et RET^{Y634C}

Les deux lignées de CSPi *RET*^{C634Y} *et RET*^{Y634C} ont été cultivées à la fois sur fibroblastes murins embryonnaires mitotiquement inactivés (FME) mais également sur Geltrex. Nous n'avons pas observé de différence de temps de doublement : les passages de ces deux lignées s'effectuaient une fois par semaine sur FME et tous les 4 jours environ sur Geltrex avec des ensemencements équivalents lors de chaque passage. Il n'y avait donc pas d'avantage prolifératif franc d'une de ces lignées par rapport à l'autre, la culture sous forme de colonie rend difficile la détermination du temps de doublement. Nous avons étudié le cycle cellulaire de ces deux lignées et en particulier le pourcentage de cellules en mitoses était similaire entre les 2 lignées et à celui des CSPi RET sauvage, C620R et M918T (0.8 à 1%) (Figure 21 A).



Figure 21: comparaison des CSPi RET^{C634Y} et RET^{Y634C}

La croissance des tératomes issus des 2 lignées de CSPi a été étudiée in vivo grâce à l'utilisation de leurs avatars exprimant la luciférase et n'a pas montré de différence significative en termes de signal luciférase, de volume ou de poids tumoral des tératomes (Figure 21 B). Enfin, nous avons étudié l'effet du vandetanib, un inhibiteur non spécifique de Ret sur la croissance des 2 lignées isogéniques et avons mis en évidence un effet inhibiteur du vandetanib sur la croissance des colonies de CSPi plus marquée en présence de la mutation C634Y, aux doses de 250 et 500 nM, qui correspondent aux IC50 déterminées sur les lignées MZCRC et TT, avec une diminution plus marquée du diamètre des colonies à ces doses pour la lignée RET^{C634Y} (p=0.0034 et 0.0009 respectivement) (Figure 21 C).

Analyse histologique des tératomes issus des CSPi RET sauvage, C634Y, Y634C et M918T de RET

Nous nous sommes concentrés sur les lignées porteuses des mutations les plus agressives en clinique et avons analysé histologiquement les tératomes issus de ces lignées. Nous avons également généré des « tératomes secondaires » à partir de cellules de tératomes primaires de 8 semaines réinjectées en intra musculaire chez la souris immunodéprimée afin d'allonger le temps de différenciation/développement des cellules issues de nos différentes CSPi. Les résultats de ces expériences sont résumés dans le Tableau 6.

Lignée	n	Présence des 3	Marquage	Type de	Marquage
		feuillets	calcitonine	marquage	Chromogranine
RET ^{wt}	3	Oui	3/3	Cellules isolées	3/3
				et foyer	
RET ^{C634Y}	4	Oui	3/4	Cellules isolées	4/4
				et foyers	
RET ^{Y634C}	3	Oui	3/3	Cellules isolées	3/3
RET ^{M918T}	3	Oui	3/3	Cellules isolées	3/3
				et foyer	

Tableau 6: Résumé de l'analyse histologique des tératomes générés à partir des CSPi

L'analyse histologique des tératomes a révélé qu'ils présentaient tous des tissus originaires des 3 feuillets embryonnaires sans biais en faveur de l'un ou l'autre des feuillets. Il n'a pas été observé de foyer tumoral dans aucun des tératomes analysés.

En revanche, nous avons observé une surreprésentation de certains tissus dans nos « tératomes secondaires », qui, eux, ne comportaient pas des tissus issus des 3 feuillets. Ainsi, les tératomes secondaires provenant de la CSPi RET^{sauvage} comportaient préférentiellement des cellules de type glandulaire donc d'origine endodermique, ceux issus de la CSPi RET^{C634Y} était assez pauvres en tissus et de nature principalement kystique avec des tissus de type malpighien, ceux issus de la CSPi RET^{M918T} étaient principalement mésenchymateux avec une abondance de tissus de type cartilage ou adipeux et enfin les tératomes secondaires RET^{Y634C} comportaient des tissus provenant des 3 feuillets embryonnaires. La quasi-totalité « tératomes secondaires » comportaient des tissus mésenchymateux, des d'abondance variable, suggérant que des cellules mésenchymateuses puissent être préférentiellement sélectionnées lors de la préparation et la réimplantation des cellules de tératomes primaires. Nous avons observé un foyer de tissu tumoral, de type adénocarcinome peu différencié sur un « tératome secondaire » issu de la CSPi RET^{M918T}, ce foyer adénocarcinomateux n'exprimait pas la calcitonine (Figure 22).



Figure 22: foyer adénocarcinomateux observé dans un tératome secondaire issu de la CSPi *RET*^{M918T}

Nous avons recherché, sur nos tératomes, l'expression de la chromogranine A (CgA), qui est un marqueur de tissu neuroendocrinien et de la calcitonine qui est un marqueur de cancer médullaire de la thyroïde. La CgA a été détectée sur l'ensemble des tératomes analysés ; les cellules CgA positives étaient préférentiellement situées au contact des structures glandulaires de type tube digestif (Figure 23) ; nous n'avons pas observé de foyer tumoral de cellules chromogranine A positives.



Figure 23: Immunohistochimie chromogranine A des tératomes issus des différentes CSPi (x100)

Une expression de la calcitonine a pu être mise en évidence sur la plupart des tératomes examinés ce qui signifie que des cellules C ou leurs cellules progénitrices sont présentes au sein de ces tératomes (Figure 24).



Figure 24: Immunohistochimie calcitonine sur les tératomes issus des différentes CSPi (x100)

Les cellules exprimant la calcitonine étaient rares au sein de tous les tératomes examinés. Nous avons observé des cellules exprimant la calcitonine sous 2 aspects : isolées au sein de tissus d'apparence principalement neuroectodermique et groupées en foyer de 3 à 5 cellules environ et situées au contact de structures d'origine endodermique, d'aspect glandulaire voire parfois d'architecture vésiculaire. Nous n'avons pas observé de foyer tumoral ou dysplasique contenant des cellules exprimant la calcitonine. L'ensemble de nos données immunohistochimiques suggèrent que des cellules de type neuroendocrines exprimant la chromogranine A sont présentes au sein des tératomes induits à partir des CSPi tout comme de rares cellules exprimant la calcitonine mais la présence d'une mutation germinale de *RET* ne semble pas avoir d'influence directe sur le développement de ces cellules au sein des tératomes.

Conclusion

Nous avons généré une lignée contrôle isogénique de la lignée RET^{C634Y} qui a été « corrigé » par recombinaison homologue médiée par le sytème CRISPR/Cas9. La lignée mutée RET^{C634Y} présente une activation du réseau transcriptionnel de EGR1, par rapport à la lignée contrôle isogénique, qui pourrait être l'effecteur moléculaire potentiel, au stade embryonnaire, du développement du phénotype des NEM2. Cette activation est retrouvée également dans les CSPi NEM2B. La lignée RET^{C634Y} ne montre pas de différence de prolifération par rapport à la lignée isogénique « corrigée ». En revanche, il semble exister une sensibilité plus marquée au vandetanib de la lignée RET^{C634Y} par rapport à son contrôle isogénique. Nous n'avons pas pu mettre en évidence de phénotype spécifique lié à la présence de Ret mutée au niveau des tératomes générés à partir de nos différentes CSPi tant au niveau de la différenciation que de la présence de cellules exprimant la calcitonine ou la chromogranine A. Il ne semble pas exister de phénotype franc au stade CSPi en lien avec la présence d'une mutation de RET, ceci pourrait être lié à la redondance des voies de signalisation dans les CSP. En revanche, des différences transcriptionnelles existent qui pourraient avoir un effet « fondateur » sur le développement ultérieur du phénotype NEM2.

Différenciation des CSPi mutées RET en cellules souches de la crête neurale : étude des capacités de différenciation et analyse comparative de l'expression des gènes.

Notre hypothèse de travail initiale basée sur les travaux d'embryologie fondamentale était l'origine neuroectodermique des tumeurs liées aux néoplasies endocriniennes multiples de type 2. Les travaux très récents chez la souris ont infirmé cette hypothèse pour les cellules C et probablement pour le CMT (Johansson et al., 2015). Néanmoins, le phéochromocytome étant originaire de la crête neurale, les données obtenues avec la différenciation de nos CSPi en cellules souches de la crête neurale permettent d'appréhender les voies de signalisation/fonctions cellulaires dérégulées dans les CSCN et qui pourraient contribuer au développement des anomalies de la crête neurale spécifique des néoplasies endocriniennes multiples de type 2.

Nous avons ainsi mis en place les techniques de différenciation des CSPi en CSCN. Une analyse phénotypique et génotypique des CSCN avec et sans mutation *RET* (*RET* corrigé) a été réalisée. Les données obtenues par l'analyse comparative de l'expression des gènes des cellules souches de la crête neurale porteuses des différentes mutations de *RET* sont rassemblées dans le manuscrit reproduit ci-dessous qui est en cours de préparation.

Article 3 (en préparation):

Human neural crest stem cells downregulate integrins network in the presence of *RET* mutations, a putative molecular mechanisms of the development of neural crest associated MEN2 features.

Authors:

Julien Hadoux^{1*}, Faranak Fattahi^{2*}, Christophe Desterke^{3*}, Olivier Féraud⁴, Mathieu Guibert⁴, Roberta Francesca De Rose⁵, Dominique Divers⁴, Emilie Gobbo⁴, Frank Griscelli⁶, Martin Schlumberger⁷, Lorenz Studer², Annelise Bennaceur-Griscelli⁸, Ali Turhan⁹.

* These authors contributed equally to this work.

Affiliations:

¹Inserm UMRS 935, Villejuif, France;

²Developemental biology program, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York; USA;

³UMS-33, Villejuif, France;

⁴Inserm UMRS 935, ESTeam Paris Sud, Infrastructure INGESTEM, Villejuif, France; ⁵Department of Health Sciences, University of Catanzaro, Catanzaro, Italy;

⁶Paris Descartes University & Gustave Roussy, Villejuif, France;

⁷Nuclear medicine & Endocrine oncology department, Gustave Roussy, Villejuif, France;

⁸APHP, Department of Hematology, University Paris Sud, Villejuif, France;

⁹APHP, Department of Hematology, University Paris Sud, Le Kremlin Bicêtre, France.

SUMMARY

Context

MEN2 is a cancer-predisposing syndrome that affects patients with germline *RET* mutations. We generated MEN2 iPSCs and one isogenic control and differentiated them into neural crest stem cell in order to explore the molecular mechanisms of the development of neural crest-derived tumours in this syndrome.

Methods

We performed in vitro differentiation of the different iPSC cell lines into neural crest stem cells (NCSC) and performed comparative gene expression analysis of the different cell lines.

Results

RET-mutated NCSC can be differentiated form IPSC and express neural crest markers such as SOX10 and PAX3 but exhibit a decreased Ret expression as compared to iPSC. Comparative gene expression analysis between RET-mutated and non-mutated NCSC reveals an up regulation in pathways involved in cell motility which could explain some of the neural crest features of MEN2. This increase in cell motility is confirmed at the cellular level with wound healing assay. We also observed a down regulation of the HIF2A pathway and the up regulation of genes through a putative decrease of H3K27 methylation, molecular alterations that have been described in *RET*-mutated pheochromocytoma.

Conclusion

Using iPSC-derived patient specific NCSC, we have shown that the presence of a *RET* mutation represses the cell-cell adhesion program and enhances cell migration and invasion. This could be one of the molecular mechanism, beyond *RET* mutation, which could explain the development of neural crest features of MEN2 syndromes such as pheochromocytoma.

INTRODUCTION

Multiple Endocrine Neoplasia type 2 (MEN2) are autosomal dominant hereditary diseases, due to mutations of the RET (REarranged during Transfection) protooncogene (Takahashi et al., 1985). MEN2A syndrome includes medullary thyroid pheochromocytoma, hyperparathyroidism, cutaneous cancer (MTC), lichen amyloidosis, and Hirschprung disease in some patients whereas MEN2B associates MTC, pheochromocytoma, and typical physical features with marfanoid body habitus, abnormalities, ophthalmologic skeletal malformations and а generalized ganglioneuromatosis throughout the aerodigestive tract (Wells et al., 2013). These syndromes involve the development of tumours and features of neural crest origin even if MTC has recently been reported to be of endodermic origin according to lineage tracing experiment (Johansson et al., 2015) as already suggested in previous studies (Kameda et al., 2007b). Mouse models do not recapitulate the full clinical spectrum of MEN2 (Acton et al., 2000; Kawai et al., 2000; Michiels et al., 1997; Smith-Hicks et al., 2000). The most frequent mutations causing MEN2A affect the cysteine-rich extracellular domain, each converting a cysteine to another amino acid, in codon 634 (exon 11), accounting for over 80 % of all mutations associated with the classic MEN 2A while the most frequent mutation, accounting for over 95 % of all mutations associated with the classic MEN2B, affects codon 918 (Wells et al., 2013). Mutations at codon 634 and codon 918 are classified as high and highest risk respectively according to the American Thyroid Association (ATA) guidelines (Wells et al., 2015c). The molecular mechanisms by which RET alleles contribute to the development of MEN2 phenotype in humans remain to be elucidated. The pheochromocytoma PC12 cell line have been used to study this molecular mechanisms, revealing the induction of an aberrant pattern of differentiation, accompanied by unresponsiveness to growth inhibitory physiological signals (Califano et al., 1996). Currently, there is no satisfactory experiment model using primary human cells in MEN2-associated cancers. From this regard, iPSC technology using patient cells could be of major interest for modelling MEN2-disease features.

In this work, we have used neural crest stem cell (NCSC) differentiated from induced pluripotent stem cell (iPSC) carrying the most frequent MEN2A-*RET*^{C634Y} and MEN2B-*RET*^{M918T} mutations (Hadoux et al., 2016b) as a tool to identify the transcriptomic program responsible for the development of neural crest-derived

MEN2 features. Here we describe the comparative gene expression of the MEN2 – related neural crest stem cells.

METHODS

Human iPS cells culture & Neural crest stem cell differentiation

iPSC culture was performed on Geltrex[®] in Essential 8 medium and 1% penicillin/streptomycin (E8) with passaging every 3-4 days using in DPBS supplemented with 0.5 mM EDTA (all from Life technologies). The day before eliciting neural crest differentiation (day -1), iPSC colonies grown on Geltrex were dissociated with EDTA diluted in PBS into a single cell suspension and were plated on Geltrex in E8 supplemented with 10µM of ROCK inhibitor Y-27632 so as to get a 70% confluence of single cells. On day 0 & day1, culture medium was changed for Essential 6 medium and 1% penicillin/streptomycin (E6) (Life technologies) supplemented with 10 µM SB-431542, 10 ng/ml BMP4 and 600 nM CHIR-99021 (all from Bio-Techne). From day 2 to the end of differentiation process (day 12), culture medium was switched to E6 supplemented with 10µM SB-431542 and 1.5 µM CHIR-99021 and was changed every day. At the end of the differentiation, neural crest stem cells (NCSC) were dissociated as a single cell suspension with $accutase^{\ensuremath{\mathbb{R}}}$ (Life technologies) and assessed for neural crest stem cell markers: 1x10⁵ cells were incubated in 10 µl PBS containing 1 µl Phycoerythrin-conjugated mouse monoclonal antibody anti-p75 NTR (CD271) (Miltenyi) or 1 µl of PE conjugated Mouse antihuman CD49d (BioLegend #304313) or conjugated isotype control. For Ret expression analysis, 1x10⁵ cells were incubated in 10 µl PBS containing 1 µl APCconjugated mouse monoclonal antibody anti-Ret (R&D) or conjugated isotype control. Cells were analysed with a MACSQuant flow cytometer and FlowJo V10 software. CD49d positive cells were sorted with MACS[®] Cell separation system with LS column. For cell separation, 10x10⁶ cells were resuspended in 100 µl and stained with 10 µl of PE conjugated Mouse anti-human CD49d (BioLegend #304313) in DPBS supplemented with 0.5%BSA and 2m MEDTA; after that, cells were washed, incubated with anti-PE microbeads and isolated with a LS column according to manufacturer instruction (Miltenyi). CD49d positive NCSC were then plated on polyornithine/laminin/fibronectin coated plates (Lee et al., 2010) at 50,000 cells/cm² and cultured in Neurobasal[®] medium supplemented with 1% penicillin/streptomycin, N2[®] supplement, and B27[®] supplement without vitamin A (life technologies), bFGF

10 ng/ml (Miltenyi) and CHIR 3µM (Tocris) (NC medium) and expanded for no more than 3 passages because they tend to differentiate during culture. NCSC differentiation into peripheral neurons and MSC were conducted as previously described (Lee et al., 2010) . Ret expression on NCSC were performed as previously described (Hadoux et al., 2016b). Wound healing assay was performed as previously described (Liang et al., 2007).

Sox10 immunofluorescence staining

NCSC were seeded on polyornithine/laminin/fibronectin coated cover slip after one passage and cultured during two days as previously described. When cells were 70% confluent, coverslips were washed with DPBS (Life technologies), fixed with 4% paraformaldehyde during 10 minutes at room temperature, washed 3 times and then permeabilized with 0.25% triton X100 (Sigma) diluted in DPBS during 10 minutes at room temperature. Cells were stained during 90 minutes with primary anti Sox10 antibody (Santa Cruz #sc-17342) diluted (1:200) in DPS with 0.1% tween (Sigma) and 10% Foetal Bovine Serum or isotype control. Cells were washed three times and stained with Alexa Fluor[®] 633 secondary rabbit anti-goat antibody (1:200) diluted as the primary antibody during 1h in a humidified chamber. Stained cells were washed three times and the primary antibody during 1h in a humidified chamber. Stained cells were washed three times in DBPS, stained with DAPI (1:1000), mounted in fluorescence mounting medium (DAKO) and analysed on a Nikon 90i fluorescent microscope.

Quantitative PCR analysis

RNA samples were extracted with TRIzol (ThermoFisher) were treated with RNAsefree DNAse (Invitrogen) and reverse transcribed into cDNA with oligo-dT primer using Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen). One part of the quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) was performed using SYBR-Green I Master Mix (Roche diagnostics) on an Mx3005P instrument (Stratagene). First, we assessed the Ct values at a threshold of 0.1 for 4 housekeeping genes on one sample of iPSC cDNA for each cell line (n=4) in triplicate together with one sample of NCSC cDNA for each cell line (n=4) in triplicate which helped us to determine the comprehensive housekeeping gene stability throughout the neural crest stem cell differentiation as previously described (Jacob et al., 2013; Xie et al., 2012). The housekeeping genes primers used for this study HSPCB 5'-TCTGGGTATCGGAAAGCAAGCC-3', reverse were: forward 5'-

5'-GTGCACTTCCTCAGGCATCTTG-3'; 18S forward AGAAACGGCTACCACATCCA-3', reverse 5'-CACCAGACTTGCCCTCCA-3'; Beta 2 microglobulin forward 5'-TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT-3', reverse 5'-TCTCTGCTCCCCACCTCTAAGT-3' GAPDH forward 5'and AGCTCATTTCCTGGTATGACAAC-3', REVERSE 5'-GTGGTCCAGGGGTCTTACTC-3'. The RefFinder (http://fulxie.0fees.us/?type=reference). Algorithm revealed that 18S was the most stable housekeeping gene throughout the neural crest differentiation protocol and was chosen as a normalizer. Sox10, Pax3 and Ret relative expression between iPSC and NCSC were assessed using the following primers: Sox10 forward 5'- CTTGGGACACGGTTTTCCACT-3', reverse 5'-AACGCCCACCTCCTCGG-3'; Pax3 forward 5'- GCCGTCAGTGAGTTCCATCA-3', reverse 5'- TTACCTCGCTCGCTCAGGAT-3' as described in (Nissan et al., 2011) and Ret forward 5'-GATTCTAGCACCGCTGTCCC-3', reverse 5' AAGGTTCAGAGCAGACTTTGGT-3'.

Gene expression data: samples processing and bioinformatics

Total RNA was extracted from 3 biological replicates of iPSC grown on matrigel[®] in E8 medium and on 3 biological replicates of CD49d+ NCSC at day 12 of differentiation with TRIzol (ThermoFisher) according to manufacturer instruction. After validation of the RNA quality with Bioanalyzer 2100 (using Agilent RNA6000 nano chip kit), 230 ng of total RNA is reverse transcribed following the Genechip Whole transcript (WTplus) Sense Target labelling assay kit (Affymetrix). Briefly, the resulting double strand cDNA is used for in vitro transcription with T7 RNA pol. After purification, 15 µg of RNA is used for reverse transcription with random primers. The cDNA obtained is then purified and fragmented. After control of fragmentation using Bioanalyzer 2100, cDNA is end labelled with biotin using Terminal Transferase (using the WT terminal labelling kit of Affymetrix). cDNA is then hybridized to GeneChip® human Gene2.0 (Affymetrix) at 45°C for 17 hours. After overnight hybridization, chips are washed on the fluidic station FS450 following specific protocols (Affymetrix) and scanned using the GCS3000 7G. The image is then analysed with Expression Console software (Affymetrix) to obtain raw data (cel files) and metrics for Quality Controls. The observations of some of these metrics and the study of the distribution of raw data show no outlier experiment. Raw data were annotated and normalized by RMA method with Affymetrix Expression console build 1.4.1.46 software.

Differential analyses were performed with the significance microarray analysis algorithm with a False Discovery Rate < 5% (Tusher et al., 2001). Transcriptome analyses were performed with R software v3.0.2 with the FactoMineR package for unsupervised analysis like principal component analysis and with gplots package for the heatmaps design. Functional enrichments were done with the Go-Elite Standalone (version1.2.5) on homo sapiens database Ensembl-Biomart version 77 (Zambon et al., 2012). Functional enrichment network were performed with the Cystoscape software (version 3.2.1) based on functional enrichments data (Cline et al., 2007). The stem cell dependant functional enrichment was performed with the ESCAPE (Embryonic Stem Cells Atlas of Pluripotency Evidence, (http://www.maayanlab.net/ESCAPE/) database (Xu et al., 2013).

RESULTS

RET-mutated iPSC can be differentiated into neural crest stem cells

We sought to model the first steps of the neural crest differentiation of our RETmutated (RET^{C634Y}, RET^{M918T}), RET "corrected" (RET^{Y634C}) and RET^M iPSC (Ozmadenci et al., 2015) in order to identify early molecular mechanisms involved in the development of MEN2 neural crest related features. The "RET corrected "iPSC cell line was generated through CRISPR-mediated genome editing in order to revert the oncogenic mutation. We used a feeder-free system for the differentiation of our iPSC into neural crest stem cell with double SMAD inhibition and a Wnt pathway agonist which allow us to obtain, by day 12 of differentiation, cells with NCSC morphology (figure 1A) that expressed Sox10 (figure 1B) after being sorted according to their expression of CD49d (Fattahi et al., 2016). SOX10 and PAX 3 were up regulated during the differentiation process in all RET-mutated cell lines which is in accordance with the neural crest identity of the cells we obtained (Figure 1C). This NCSC could be further differentiated into mesenchymal stem cells and peripheral neurons (Supplementary figure S1). Interestingly, we observed a decreased expression of RET in NCSC for all our cell lines of 10 to 50 fold of magnitude (figure 1C). Ret expression was low but detectable in NCSC by flow cytometry as previously described for iPSC cell lines (Hadoux et al., 2016b). Several differentiation experiments were performed for each cell lines (range 6-10) and yield between 57.4 to 90.7% of p75 NTR positive cells before sorting with CD49d; there was no statistical difference in the yield of p75 NTR positive NCSC between the RET C634Y

cell lines and its isogenic control while there was a statistical increase in the yield of p75 NTR positive NCSC during the differentiation of the RET^{M918T} -mutated iPSC as compared to our RET^{wt} control iPSC (p=0.001) (figure 1D). We conclude that all our *RET*-mutated iPSC can be efficiently differentiated into NCSC and that the presence of a *RET* mutation has no clear influence on this capacity.

Gene expression signature of up regulated genes in *RET*-mutated NCSC involves cellular adhesion and locomotion functions.

Comparative gene expression analysis was performed on our RET^{C634Y}, RET^{M918T}, RET^{Y634C} and RET^M NCSCs. Unsupervised Principal Component Analysis performed on all the transcriptome data showed a good reproducibility of the differentiation protocol at the trancriptomic levels for all the cell lines and a good discrimination along the first factorial axis (p=2.49e-05). The two groups of RET-mutated NCSC are clustered closely together and are distinct from the RET^{wt} NCSC on X axis while the RET-CRISPR "corrected" NCSC are anti-correlated from the RET-mutated NCSC along this same axis which confirm the "correction" effect of reversing the RET codon C634Y mutation (supplementary figure S2). Analysis of differentially expressed genes in RET^{C634Y} and RET^{M918T} NCSC as compared to RET^M NCSC revealed a list of 65 up regulated common genes in both RET-mutated cell lines (figure 2A and supplementary table 1) which allow the unsupervised reclassification of the RET^{C634Y}, *RET^{M918T}* and *RET^M* NCSC expression data (figure 2B). Functional analysis of these up regulated genes suggests the up regulation of cell adhesion and locomotion as well as neural development genes in the RET-mutated NCSCs (figure 2C). Among the most highly up regulated genes, NRN1 promotes neurite outgrowth and is overexpressed mainly in RET^{C634Y} NCSC (15.15 fold change) and MSTN is a member of the TGFß superfamily, known to repress muscle cell proliferation and is overexpressed in both RET^{C634Y} and RET^{M918T} NCSC (fold change of 13.67 and 14.56, respectively). Moreover, by integrating the 65 up-regulated genes signature of the *RET*-mutated NCSC with the ESCAPE database, we observed that this signature correlates with enrichment in H3K27 methylated histones (figure 3A & B).

Gene expression signature of down regulated genes in *RET*-mutated NCSC involves integrins network.

Analysis of differentially expressed genes in RET^{C634Y} and RET^{M918T} NCSC as compared to RET^M NCSC revealed a list of 633 down regulated common genes in both RET-mutated cell lines (figure 4A and supplementary table 2)) which allow the unsupervised reclassification of the RET^{C634Y}, RET^{M918T} and RET^M NCSC expression data (figure 4B). Functional analysis revealed the down regulation of integrin network pathway and in particular α 6ß4 integrin and of the HIF2 alpha pathway which is particularly repressed in the RET-mutated NCSC (fold change: - 28.43) and particularly in the RET^{M918T} NCSC as well as one of its target, ABCG2 (fold change: -8.73). Semaphorin receptor family receptors and pathway were also repressed in RET-mutated NCSC such as SEMA6A, SEMA7A and MET which ligand, HGF, was found to be up regulated in *RET*-mutated NCSC (figure 4C & D). Taken together, the list of deregulated genes in RET-mutated NCSC suggest that NCSC motility could be affected in the presence of a *RET* mutation at the neural crest stage. NCSC derived from RET-mutated iPSC had an increased motility in wound healing assay as compared *RET^{wt}* counterpart. More importantly, *RET^{Y634C}*-corrected iPSC-derived NCSC behaved like the normal RET^{wt}-NCSC in these experiments whereas there was no difference between the two *RET*-mutated cell lines (figure 4E). These results strongly suggested the existence of a functional relationship between the RET-Integrin signature and NCSC behaviour in our experimental system.

DISCUSSION

iPSC technology represents a major tool of disease modelling which has led to discovery of "disease in a dish" models in several fields of medicine (Zeltner and Studer, 2015). In the setting of hereditary cancers there are only two published reports describing the use of iPSC in patients with BRCA1-mutated breast cancer (Soyombo et al., 2013) and Li-Fraumeni syndrome (Lee et al., 2015). The first has addressed the genomic stability of the *BRCA*-mutated iPSC and its overexpression of PKC-theta while the other has modelled *TP53*-mutated osteosarcoma development and linked it to the repression of H19 during osteoblastic differentiation of the *TP53*-mutated iPSC. These two studies have shown that iPSC can be used to model cancer development for cancer originating from tissue for which in vitro differentiation

protocols are available: that is the case for osteoblastic differentiation while it was not the case for mammary differentiation.

Here, we have used iPSC technology for modelling the first step of the development of the neural crest-associated features of multiple endocrine neoplasia type 2 (MEN2). These are autosomic syndromes linked to a mutated oncogene, Ret, which is pretty unique in the setting of hereditary cancers since most of them are linked to loss of function mutations. Neural crest-derived tumours such as B while pheochromocytoma are observed among both MEN2 A and ganglioneuromatosis of the aerodigestive tract are observed in MEN2B. We have differentiated MEN2-iPSC together with a wild type control and a RET-"corrected" iPSC into neural crest stem cells (NCSC), the cell of origin of MEN2 associated pheochromocytoma for example. By gene expression analysis, we have found that genes up and down regulated in the MEN2-NCSC led to enhanced cell locomotion capability which was confirmed in vitro by a functional wound healing assay. This enhanced cell locomotion capacity may be one of the molecular mechanisms of the development of neural crest-associated features in MEN2. This is exemplified by the down regulation of semaphoring 6A in RET-mutated NCSC (fold change; -10.24 in RET^{M918T} and -4.8 in RET^{C634Y}) which has been shown to be involved in channelling sympathetic axons into the sympathetic chain and controlling the temporal sequence of sympathetic target innervation (Xu et al., 2000); therefore, down regulation of this molecule network could explain the development of neurogangliomatosis in MEN2B. We have found that HIF2A and its targets were repressed in RET-mutated NCSC which is in accordance with the model proposed for RET-related pheochomocytoma development in which HIF2A has a role for pheochromocytoma development in the setting of pseudo hypoxic tumours (cluster 1) and not tyrosine kinase receptor related tumours (cluster 2) (Qin et al., 2014). Moreover, the up regulated genes in RET mutated NCSC could be due to polycomb complex repression by Ret leading to a decrease in H3K27 methylation which is in accordance with OMICS data from RETmutated pheochromocytoma (Castro-Vega et al., 2015) and suggests that this feature could be maintained throughout terminal differentiation from NCSC to chromaffin cells.

In this study, we demonstrate the usefulness of the iPSC technology to unravel the signalling pathways involved in a stem cell stage impossible to apprehend in primary tumours due to the rarity of these cells from which MEN2A

develop in humans. We show for the first time to our knowledge, that RET mutations can induce a genomic signature allowing to obtain an insight into the molecular mechanisms of the development of the neural crest-related features of multiple endocrine neoplasia. Our results strongly suggest that *RET* mutations are responsible for enhanced cell locomotion capability in NCSC as demonstrated by both comparative gene expression assays and wound healing assay. Further studies will determine the functional role of some of the important genomic targets identified in RET-mutated NCSC.

REFERENCES

Acton, D.S., Velthuyzen, D., Lips, C.J., and Höppener, J.W. (2000). Multiple endocrine neoplasia type 2B mutation in human RET oncogene induces medullary thyroid carcinoma in transgenic mice. Oncogene 19, 3121–3125.

Califano, D., D'Alessio, A., Colucci-D'Amato, G.L., De Vita, G., Monaco, C., Santelli, G., Di Fiore, P.P., Vecchio, G., Fusco, A., Santoro, M., et al. (1996). A potential pathogenetic mechanism for multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes involves ret-induced impairment of terminal differentiation of neuroepithelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93, 7933–7937.

Califano, D., Rizzo, C., D'Alessio, A., Colucci-D'Amato, G.L., Cali, G., Bartoli, P.C., Santelli, G., Vecchio, G., and de Franciscis, V. (2000). Signaling through Ras is essential for ret oncogene-induced cell differentiation in PC12 cells. J. Biol. Chem. 275, 19297–19305.

Castro-Vega, L.J., Letouzé, E., Burnichon, N., Buffet, A., Disderot, P.-H., Khalifa, E., Loriot, C., Elarouci, N., Morin, A., Menara, M., et al. (2015). Multi-omics analysis defines core genomic alterations in pheochromocytomas and paragangliomas. Nat. Commun. 6, 6044.

Cline, M.S., Smoot, M., Cerami, E., Kuchinsky, A., Landys, N., Workman, C., Christmas, R., Avila-Campilo, I., Creech, M., Gross, B., et al. (2007). Integration of biological networks and gene expression data using Cytoscape. Nat. Protoc. 2, 2366–2382.

Fattahi, F., Steinbeck, J.A., Kriks, S., Tchieu, J., Zimmer, B., Kishinevsky, S., Zeltner, N., Mica, Y., El-Nachef, W., Zhao, H., et al. (2016). Deriving human ENS lineages for cell therapy and drug discovery in Hirschsprung disease. Nature 531, 105–109.

Hadoux, J., Féraud, O., Griscelli, F., Opolon, P., Divers, D., Gobbo, E., Schlumberger, M., Bennaceur-Griscelli, A., and Turhan, A.G. (2016). Generation of an induced pluripotent stem cell line from a patient with hereditary multiple endocrine neoplasia 2A (MEN2A) syndrome with RET mutation. Stem Cell Res. 17, 154–157.

Jacob, F., Guertler, R., Naim, S., Nixdorf, S., Fedier, A., Hacker, N.F., and Heinzelmann-Schwarz, V. (2013). Careful Selection of Reference Genes Is Required for Reliable Performance of RT-qPCR in Human Normal and Cancer Cell Lines. PLOS ONE 8, e59180.

Johansson, E., Andersson, L., Örnros, J., Carlsson, T., Ingeson-Carlsson, C., Liang, S., Dahlberg, J., Jansson, S., Parrillo, L., Zoppoli, P., et al. (2015). Revising the embryonic origin of thyroid C cells in mice and humans. Dev. Camb. Engl. 142, 3519–3528.

Kameda, Y., Nishimaki, T., Chisaka, O., Iseki, S., and Sucov, H.M. (2007). 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.

Kawai, K., Iwashita, T., Murakami, H., Hiraiwa, N., Yoshiki, A., Kusakabe, M., Ono, K., Iida, K., Nakayama, A., and Takahashi, M. (2000). Tissue-specific carcinogenesis in transgenic mice expressing the RET proto-oncogene with a multiple endocrine neoplasia type 2A mutation. Cancer Res. 60, 5254–5260.

Lee, D.-F., Su, J., Kim, H.S., Chang, B., Papatsenko, D., Zhao, R., Yuan, Y., Gingold, J., Xia, W., Darr, H., et al. (2015). Modeling familial cancer with induced pluripotent stem cells. Cell 161, 240–254.

Lee, G., Chambers, S.M., Tomishima, M.J., and Studer, L. (2010). Derivation of neural crest cells from human pluripotent stem cells. Nat. Protoc. 5, 688–701.

Liang, C.-C., Park, A.Y., and Guan, J.-L. (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. Nat. Protoc. 2, 329–333.

Michiels, F.M., Chappuis, S., Caillou, B., Pasini, A., Talbot, M., Monier, R., Lenoir, G.M., Feunteun, J., and 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.

Nissan, X., Larribere, L., Saidani, M., Hurbain, I., Delevoye, C., Feteira, J., Lemaitre, G., Peschanski, M., and Baldeschi, C. (2011). Functional melanocytes derived from human pluripotent stem cells engraft into pluristratified epidermis. Proc. Natl. Acad. Sci. 108, 14861–14866.

Ozmadenci, D., Féraud, O., Markossian, S., Kress, E., Ducarouge, B., Gibert, B., Ge, J., Durand, I., Gadot, N., Plateroti, M., et al. (2015). Netrin-1 regulates somatic cell reprogramming and pluripotency maintenance. Nat. Commun. 6, 7398.

Qin, N., de Cubas, A.A., Garcia-Martin, R., Richter, S., Peitzsch, M., Menschikowski, M., Lenders, J.W.M., Timmers, H.J.L.M., Mannelli, M., Opocher, G., et al. (2014). Opposing effects of HIF1α and HIF2α on chromaffin cell phenotypic features and

tumor cell proliferation: Insights from MYC-associated factor X. Int. J. Cancer 135, 2054–2064.

Smith-Hicks, C.L., Sizer, K.C., Powers, J.F., Tischler, A.S., and Costantini, F. (2000). C-cell hyperplasia, pheochromocytoma and sympathoadrenal malformation in a mouse model of multiple endocrine neoplasia type 2B. EMBO J. 19, 612–622.

Soyombo, A.A., Wu, Y., Kolski, L., Rios, J.J., Rakheja, D., Chen, A., Kehler, J., Hampel, H., Coughran, A., and Ross, T.S. (2013). Analysis of Induced Pluripotent Stem Cells from a BRCA1 Mutant Family. Stem Cell Rep. 1, 336–349.

Takahashi, M., Ritz, J., and Cooper, G.M. (1985). Activation of a novel human transforming gene, ret, by DNA rearrangement. Cell 42, 581–588.

Tusher, V.G., Tibshirani, R., and Chu, G. (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98, 5116–5121.

Wells, S.A., Pacini, F., Robinson, B.G., and Santoro, M. (2013). Multiple endocrine neoplasia type 2 and familial medullary thyroid carcinoma: an update. J. Clin. Endocrinol. Metab. 98, 3149–3164.

Wells, S.A., Asa, S.L., Dralle, H., Elisei, R., Evans, D.B., Gagel, R.F., Lee, N., Machens, A., Moley, J.F., Pacini, F., et al. (2015). Revised american thyroid association guidelines for the management of medullary thyroid carcinoma. Thyroid Off. J. Am. Thyroid Assoc. 25, 567–610.

Xie, F., Xiao, P., Chen, D., Xu, L., and Zhang, B. (2012). miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. Plant Mol. Biol.

Xu, H., Baroukh, C., Dannenfelser, R., Chen, E.Y., Tan, C.M., Kou, Y., Kim, Y.E., Lemischka, I.R., and Ma'ayan, A. (2013). ESCAPE: database for integrating high-content published data collected from human and mouse embryonic stem cells. Database J. Biol. Databases Curation 2013, bat045.

Xu, X.M., Fisher, D.A., Zhou, L., White, F.A., Ng, S., Snider, W.D., and Luo, Y. (2000). The transmembrane protein semaphorin 6A repels embryonic sympathetic axons. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 20, 2638–2648.

Zambon, A.C., Gaj, S., Ho, I., Hanspers, K., Vranizan, K., Evelo, C.T., Conklin, B.R., Pico, A.R., and Salomonis, N. (2012). GO-Elite: a flexible solution for pathway and ontology over-representation. Bioinforma. Oxf. Engl. 28, 2209–2210.

Zeltner, N., and Studer, L. (2015). Pluripotent stem cell-based disease modeling: current hurdles and future promise. Curr. Opin. Cell Biol. 37, 102–110.

TABLES & FIGURES LEGENDS

Figure 1: *RET* mutated iPSC can be differentiated into Neural Crest Stem Cells (NCSC)

A. Phase contrast

- **B.** SOX10 expression assessed by immunofluorescence,
- C. qPCR analysis of Ret, Sox10 & Pax3 expression by qPCR
- D. percentage of p75 positive NCSC obtained at day12 of differentiation

Figure 2 : Up-regulated genes by *RET* mutations in NCSC involves cellular adhesion & locomotion function

A: Venn diagram of upregulated genes list in RET^{C634Y} and RET^{M918T} compared to RET^{wt} NCSC (supplemental table 1)

B: Unsupervised classification of *RET* mutated and *RET* wt NCSC according to the 65 up-regulated genes list.

C: Histogram of functional enrichment of the 65 up-regulated genes on Gene Ontology Biological Process database (blue bar represents the number of genes implicated and red bar represent the different Z-scores of enrichment tests)

D: functional enrichment network of up-regulated genes in *RET*-mutated NCSC, enriched functions are depicted as octogons with size related to the number if genes involved in this function and colour related to the enrichment test Z-score.

Figure 3: The *RET*-related upregulated signature in NCSC is compatible with a decrease in H3K27 methylations linked to repression of the Polycomb complex PRC2

A: Enrichment Heatmap of the 65 up-regulated genes in the ESCAP database (colours reflect different type of experiment: RNAi : RNA interference, PPI: protein interaction by spectrometry and pull down assay; logof_UP: differential expression after overexpression, logof_DOWN: differential expression after knock-out; histone: histome modifications; CHIP: chip-sequencing)

B: p-values of the enrichment of the 65 up-regulated genes list in the ESCAPE database.

C: Proposed mechanisms of the up regulation of the 65 genes by RET mutation relying on a repressive action on the polycomb PRC2 complex.

Figure 4: Down-regulated genes by *RET* mutations in NCSC mainly involves the integrins network.

A: Venn diagram of downregulated genes list in RET^{C634Y} and RET^{M918T} compared to RET^{wt} NCSC (supplemental table 2)

B: Unsupervised classification of *RET* mutated and *RET* wt NCSC according to the 633 down-regulated genes list.

C: Histogram of functional enrichment of the 633 down-regulated genes on Gene Ontology Biological Process database (blue bar represents the number of genes implicated and red bar represent the different Z-scores of enrichment tests)

D: functional enrichment network of down-regulated genes in *RET*-mutated NCSC, enriched functions are depicted as octogons with size related to the number if genes involved in this function and colour related to the enrichment test Z-score.

E: Wound healing assay at different time points for the *RET*^{C634Y}, *RET*^{M918T}, *RET*^{Y634C} and *RET*^{wt} NCSC differentiated from iPSC (triplicate, **: p=0.005, ****: p<0.0001).

Figure 1: RET mutated iPSC can be differentiated into Neural Crest Stem Cells



166

Figure 2 : Up-regulated genes by *RET* mutations in NCSC involves cellular adhesion & locomotion function



Figure 3: The *RET*-related upregulated signature in NCSC is compatible with a decrease in H3K27 methylations linked to repression of the Polycomb complex PRC2



С

В

Terms	P-Value
MMEF_K27ME3_17603471	1.958e-8
MWHOLEBRAIN_H3K27ME3_18600261	1.906e-7
JARID2-20075857_UP	4.901e-7
MESC_H3K27ME3_17603471	4.695e-6
CHIP_SUZ12-18555785	7.300e-6
HESC_H3K27ME3_20682450	7.967e-6
CHIP_SUZ12-18692474	2.257e-5
CHIP_JARID2-20075857	2.875e-5
CHIP_MTF2-20144788	6.154e-5
CHIP_SUZ12-18974828	1.448e-4
CHIP_RNF2-18974828	2.451e-4
POU5F1-20526341_DOWN	4.150e-4
CHIP_JARID2-20064375	5.743e-4
CHIP_RNF2-22325148	6.975e-4
CHIP_REST-21632747	7.295e-4
CHIP_EZH2-18974828	9.482e-4
ESRRB-19136965_UP	2.933e-3
CHIP_SOX2-18358816	3.607e-3
CHIP_EED-16625203	4.587e-3
CHIP POU5F1-18347094	5.465e-3



Figure 4: Down-regulated genes by *RET* mutations in NCSC mainly involves the integrins network.









SUPPLEMENTARY TABLES & FIGURES LEGENDS

Figure S1: NCSC derived from iPSC can be differentiated into MSC and peripheral neurons.

A: immunofluorescence with peripherin of NCSC differentiated into peripheral neurons

B: Flow cytometry analysis of mesenchymal stem cells generated from RET-mutated and RET-corrected NCSC

Figure S2: Principal component analysis of the transcriptome of the four NCSC samples in triplicate.

 Table S1: list of the 65 up-regulated genes in RET-mutated NCSC

Table S2: list of the 633 down-regulated genes in *RET*-mutated NCSC

Figure S1: NCSC derived from iPSC can be differentiated into mesenchymal stem cell and peripheral neurons.

А



В



Figure S2: Principal component analysis of the transcriptome of the four NCSC samples in triplicate.



DISCUSSION

PERSPECTIVES

Ce travail de thèse a permis de générer des cellules souches pluripotentes induites (CSPi) à partir de cellules sanguines de patients atteints de néoplasies endocriniennes multiples de type 2 (NEM2), porteurs de mutations germinales du gène *RET* et ayant développé un carcinome médullaire de la thyroïde ainsi qu'un phéochromocytome pour les patients porteurs des mutations les plus à risque. En effet, nous avons choisi des patients ayant des mutations de *RET* (C620R, C634Y et M918T) correspondant aux 3 classes de risque de l'ATA (Wells et al., 2015c). L'objectif était de modéliser un syndrome de prédisposition au cancer à l'aide de CSPi. Nous avons pu utiliser les lignées générées afin d'effectuer des analyses d'expression géniques comparatives entre lignées mutées et non mutées aux stades de cellule souche pluripotente et au stade de cellule souche de la crête neurale. Nous avons également réalisé une étude approfondie des tératomes issus de nos CSPi à la recherche d'un phénotype. Ce travail met en évidence des problématiques liées à la modélisation du cancer par l'utilisation des CPSi que nous souhaitons aborder dans la discussion.

Génération des lignées CSPi témoin sans mutation génomique

La génération de CSPi porteuses de mutations d'un oncogène à partir de cellules sanguines de patients ayant développé le phénotype tumoral permet de réaliser une phénocopie cellulaire porteuse de la mutation oncogénique mais également du patrimoine génétique spécifique du patient. En effet, ce patrimoine génétique, hors mutation oncogénique, peut avoir un rôle dans le développement du phénotype tumoral. Dès lors, la question du type de lignée contrôle à utiliser se pose. En effet, utiliser une ou des lignées de CSPi sans mutation génétique peut paraître satisfaisant mais il s'agit alors de lignées témoin différentes non seulement du point de vue de l'oncogène mais également du point de vue du patrimoine génétique. Nous avons adressé cette question en générant un contrôle isogénique à notre lignée porteuse de la mutation de RET la plus fréquente, C634Y, au moyen de la technologie CRISPR/Cas9 et avec l'aide d'une matrice de réparation sous forme d'un ADN simple brin. Ce témoin est également une CSPi, dont la pluripotence a été prouvée et dont le profil d'expression des gènes se rapproche de celui d'une lignée sans mutation de RET montrant que notre approche CRISPR/Cas9 a permis de « corriger » l'impact de la mutation de RET. Nous n'avons pas encore généré de lignée isogénique témoin de nos deux autres lignées RET^{M918T} et RET^{C620R} ce qui

constitue une limite à ce travail mais le design des ARN guides ainsi que des matrices de réparation a été réalisé et il est donc envisageable de mener à bien des manipulations similaires afin d'obtenir dans le futur des lignées *RET^{T918M}* et *RET^{R620C}*. Ceci permettrait d'aboutir à l'obtention d'un l'ensemble de lignées CSPi représentative des mutations rencontrées dans les NEM2 ainsi qu'à leurs lignées isogéniques témoin permettant une étude fine des différences phénotypiques et des mécanismes de moléculaires coopérant avec la mutation *RET* pour le développement du phénotype NEM2.

Le syndrome de prédisposition au cancer, un processus moléculaire multiétape qui débute dès le stade de cellule souche pluripotente.

L'utilisation d'un témoin isogénique renforce la validité des données issues de l'analyse comparative d'expression des gènes de nos différentes lignées qui nous a permis de mettre en évidence le rôle potentiel de l'activation du réseau transcriptionnel d'EGR1 dans la physiopathologie, au stade de cellule souche pluripotente, des anomalies moléculaires qui interviendront ensuite dans l'initiation du phénotype des NEM2. Ces données illustrent que, dès le stade pluripotent, la présence d'une mutation de l'oncogène RET pourrait être responsable d'anomalies moléculaires transcriptionnelles. Ceci met en lumière l'intérêt des CSPi pour la modélisation du processus multi-étape, bien connu en cancérologie, et qui s'initie dès la cellule souche embryonnaire dans le cadre des syndromes de prédisposition au cancer. Ainsi, les CSPi porteuses de mutations hétérozygotes de BRCA1 présentent une surexpression la voie PKC theta (Soyombo et al., 2013) ce qui met en évidence le fait que des anomalies moléculaires surviennent dès le stade de CSE au cours des syndromes de prédisposition aux cancers même quand ceux-ci se révèlent à l'âge adulte. On peut imaginer que ces anomalies très précoces et encore très mal, voire totalement inconnues, vont faire le « lit moléculaire » de la progression multi-étape vers la tumeur cancéreuse au sein du tissu cible. Dans le cadre des syndromes de prédisposition au cancer, il faut donc probablement étendre le concept de cancérogénèse multi-étape aux toutes premières heures du développement embryonnaire. Ainsi, l'oncogène ou le gène suppresseur de tumeur « apparent », c'est à dire responsable de tel ou tel syndrome de prédisposition est secondé par les différentes abérrations moléculaires « adjuvantes » qu'il a engendré au cours de l'embryogénèse puis de l'organogénèse et du développement adulte et dont la

coopération va aboutir au développement de tumeurs. L'utilisation de CSPi pour la modélisation des syndromes de prédisposition au cancer pourrait donc théoriquement permettre d'étudier les mécanismes moléculaires « adjuvants » déclenchés tout au long du développement. Dans le cadre des NEM2 et de notre étude de transcriptome des CSPi, il manque une validation fonctionnelle du rôle d'EGR1 dans l'établissement du phénotype tumoral de ce syndrome. Ceci nécessiterait de réaliser, in vitro, la différenciation terminale des tissus d'origine des tumeurs de ce syndrome, à savoir les cellules chromaffines et les cellules C de la thyroïde puis d'étudier leur tumorigénèse spontanée comparativement aux lignées non mutées mais également dans le cadre de l'inactivation, au stade CSP, de la voie EGR1 afin de confirmer son rôle « adjuvant » dans l'établissement du phénotype. L'impossibilité, à l'heure actuelle, d'obtenir cette validation fonctionnelle in vitro illustre la difficulté majeure rencontrée au cours de ce travail de thèse, c'est-à-dire l'absence de protocole de différenciation in vitro de CSPi en cellules C, les cellules d'origine du cancer médullaire de la thyroïde, ou en cellules chromaffines.

La modélisation des syndromes de prédisposition au cancer nécessite des protocoles de différenciation validés.

Jusqu'à octobre 2015, l'hypothèse la plus communément admise pour l'origine embryologique des cellules C était la crête neurale car ces cellules proviennent des corps ultimobranchiaux qui fusionnent, au cours de l'organogénèse, avec les ébauches thyroïdiennes et vont donc permettre aux cellules C d'infiltrer la thyroïde. Chez le poulet, les travaux fondateurs de Le Douarin ont montré que les cellules C sécrétant la calcitonine étaient originaires de la crête neurale mais ces travaux ont été mis en doute par des première études de lineage tracing de crête neurale chez la souris ne montrant pas de marquage au niveau des corps ultimobranchiaux (Kameda et al., 2007c) puis des données très récentes de lineage tracing de crête neurale et d'endoderme ont confirmé l'origine endodermique des cellules C (Johansson et al., 2015). Ceci est plutôt contre-intuitif étant donné la nature neuroendocrine des cellules C et l'expression de marqueurs et facteurs de transcriptions que l'on retrouve dans la crête neurale comme MASH1. Cependant, cette origine endodermique des cellules C permet d'expliquer l'expression de facteurs comme TTF1 dans les CMT, ainsi que l'existence de tumeurs mixte papillaire thyroïdienne et médullaire laissant à penser qu'elles sont donc le résultat d'une oncogénèse débutée

dans un progéniteur endodermique. Étant donné l'état des connaissances concernant les facteurs de transcriptions impliqués dans le déveleoppement des cellules C chez la souris et résumés dans la Figure 5 de l'introduction, on peut donc émettre l'hypothèse que les cellules C se différencient suite à l'expression du facteur de transcription MASH1 dans un progéniteur endodermique. Quoi qu'il en soit, nous avons fait l'hypothèse, conformément aux données de la littérature d'une origine crête neurale des tumeurs associées au NEM2, raison pour laquelle nous avons mis au point la différenciation en crête neurale. Nous avons également fait une analyse comparative in silico des transcriptomes de CSCN, de cellules souches endodermiques et de CMT disponibles dans les bases de données et qui avait suggéré qu'il existait une proximité transcriptionnelle plus forte entre CMT et CSCN par rapport aux cellules souches endodermiques (Figure 25).



Figure 25 : Analyse comparative de transcriptome de CSCN, cellules souches endodermiques, CSE et CMT. Expression des marqueurs de cellules souches de la crête neurale par les lignées de CMT.

Nous avions également mis en évidence l'expression de marqueurs de cellules souches de la crête neurale au niveau des lignées de CMT : TT et MZCRC. Ces résultats sont donc finalement plutôt le reflet de l'expression de facteurs neuroendocriniens-crête neurale dans des cellules endodermiques et qui engendre la différenciation en cellules C. Basé sur les résultats obtenus chez la souris (et non

chez l'homme) le choix de la crête neurale n'est peut-être pas pertinent pour établir un modèle de CMT. Les premières expériences de différenciation endodermiques de CSPi au laboratoire ont permis d'obtenir des cellules exprimant FOXA2 et SOX17, des marqueurs des progéniteurs endodermiques, conformément aux protocoles publiés (D'Amour et al., 2005). Il a par ailleurs été difficile d'obtenir des cellules souches ayant les marqueurs de CSCN de manière robuste et reproductible malgré les nombreux protocoles publiés dans la littérature durant ce travail de thèse. Nous avons pu mettre au point cette différenciation grâce à la collaboration avec Jennifer Allouche de l'équipe de C. Baldescchi à iSTEM et également grâce à une collaboration avec L. Studer qui nous a transmis sa méthode de purification des CSCN via le tri CD49d avant que celle-ci ne soit publiée (Fattahi et al., 2016). Ceci nous a permis de réaliser des expériences de différenciation robustes et d'isoler des cellules avec toutes les caractéristiques de cellules souches de la crête neurale. Enfin, nous avons constaté que les CSCN ne maintiennent leur phénotype que de manière très transitoire, ce qui ne permet pas de les garder en culture au-delà de 3 passages et rend difficile leur cryoconservation. Ceci alourdit les expérimentations car il est nécessaire de multiplier les manipulations de différenciation de 12 jours afin d'obtenir régulièrement des CSCN « fraîches ». L'étude comparative phénotypique des différentes CSCN porteuses des différentes mutations de RET est donc compliquée par l'instabilité du phénotype CSCN qui est plutôt un état de passage vers une différenciation terminale qu'il s'agit ensuite d'induire, vers les cellules chromaffines dans le cadre des NEM2.

On peut conclure de notre expérience que la modélisation de syndromes de prédisposition au cancer nécessite d'avoir à disposition des protocoles de différenciation in vitro robustes vers la cellule d'orgine des tumeurs du syndrome étudié au risque de rencontrer des obstacles difficilement surmontables. Néanmoins, les données de la littérature nous permettent de formuler des hypothèses pour les travaux à venir afin d'aboutir à l'obtention de cellules C et de cellules chromaffines.

Vers la différenciation terminale des CSPi en cellules C et chromaffines.

L'origine embryologique des cellules C ayant été reliée à l'endoderme, il est donc nécessaire d'établir la différenciation endodermique ce qui est facilement réalisable, en particulier grâce à l'existence de kits de différenciation commerciaux. Ensuite, à partir des connaissances concernant les facteurs de transcription
impliqués dans le développement des cellules C, on peut faire l'hypothèse du rôle potentiel des facteurs de transcription PAX8, NKX2-1 et MASH1 qui, quand ils sont invalidés, entraînent une nette diminution voire une disparition des cellules C chez la souris. Par ailleurs, MASH1 et NKX2.1 sont encore exprimés par les CMT. On peut donc faire l'hypothèse que la surexpression de ces facteurs, dans un progéniteur endodermique, pourrait entraîner une différenciation de type cellule C à l'instar de ce qui a été réalisé, chez la souris, pour la différenciation de CSE en cellules thyroïdiennes par la surexpression lentivirale des facteurs PAX8 et NKX2.1 (Antonica et al., 2012). Dans cette optique, les ADNc de ces différents facteurs de transcription ont été clonés au laboratoire à partir de lignées de thyrocytes ou de CMT et insérés dans des vecteurs lentiviraux au cours de ce travail de thèse afin de réaliser leur surexpression soit au stade CSPi soit au stade endodermique, manipulations qui n'ont pas encore été réalisées. En ce qui concerne, les cellules chromaffines, cellesci sont originaires de la crête neurale et des données de différenciation de progéniteurs d'origine bovine ont montré l'importance de facteurs comme le NGF, le BMP4 et la dexaméthasone, ces deux derniers facteurs étant importants pour le développement des capacités neuroendocrines de ces cellules (Chung et al., 2009). Ces eléments, et d'autres facteurs concordants sont autant de pistes pour la mise au point de protocoles de différenciation de cellules chromaffines à partir de CSPi via les cellules souches de la crête neurale mais n'ont pas pu être explorées au cours de ce travail de thèse.

Modélisation de l'oncogénèse avec les CSPi : obstacles et applications pratiques.

Il est difficile de recréer toute la séquence de développement de la cellule souche vers les cellules qui vont devenir cancéreuses suite à une prédisposition germinale au cancer. Les obstacles, on l'a vu plus haut, sont principalement techniques liés aux diificultés à obtenir certains tissus par différenciation in vitro. Dès lors, qu'attendre de ce type d'étude? Tout d'abord, comme nous l'avons montré, il est possible de mettre en évidence dans un contexte unique de cellules souches impossibles à isoler probablement par ailleurs, les mécanismes moléculaires qui vont avoir une influence sur le développement du phénotype tumoral au cours du développement. L'intérêt de ce type de connaissance, outre un intérêt fondamental, pourrait être pratique voire thérapeutique car il pourrait donner lieu à la mise au point de stratégies, médicamenteuse ou non, visant à contrer ces mécanismes moléculaires « adjuvants » qui vont favoriser l'émergence du phénotype tumoral dans un syndrome donné. Par ailleurs, une fois la mise au point de différenciation in vitro robustes et reproductibles établies vers des types cellulaires pouvant servir de modèle tumoral, il est possible de réaliser des criblages à haut débit de molécules à visée anti-tumorale. Ceci a été démontré par l'équipe de L. Studer avec des cellules souche de la crête neurale de dysautonomie familiale qui ont pu être criblées afin de trouver une molécule, le SKF-86466, capable de restaurer l'expression de IKBKAP qui est diminuée dans cette maladie (Lee et al., 2012). Les applications des CSPi à la modélisation de l'oncogénèse sont donc tout d'abord cognitives ; les applications thérapeutiques étant d'horizon plus lointain. Néanmoins, aucune étude n'a encore rapporté de criblage de drogue à visée anti-tumorale avec l'aide de CSPi.

Enfin, la génération de CSPi à partir de cellules cancéreuses en tant que méthode pour maintenir de manière illimitée un génome oncogénique dans un modèle cellulaire en culture est probablement plus difficile et lourde à mettre en place que la méthode d'induction de cellules conditionnellement reprogrammées (conditionnaly reprogrammed cell, CRC). Cette méthode, développée par Rober Schlegel, consiste à mettre en culture des cellules primaires de tumeurs cancéreuses, principalement épithéliales, sur un stroma de fibroblastes murins irradiés dans un milieu de culture contenant de l'inhibiteur de Rock (Liu et al., 2012; Suprynowicz et al., 2012). Les cellules cancéreuses ainsi mises en culture acquièrent l'expression de marqueurs et gènes de pluripotence sont capables de se diviser de manière illimitée en culture sans nécessité de les immortaliser tout en maintenant leur génome qui reste semblable à celui de la tumeur primaire. Les cellules retrouvent ensuite leur phénotype intial quand elles sont retirées du stroma et du milieu avec inhibiteur de Rock, les conditions de culture étant utilisées pour les maintenir à long termes sans transformation supplémentaire. Elles peuvent donner naissance à des tumeurs lors de xénogreffes, reproduisant l'histologie de la tumeur primaire et également être utilisées pour du criblage d'agents pharmacologiques. Cette approche a été utilisée pour dériver des lignées cellulaires à partir de tumeurs de patients atteints de cancer du poumon ayant développé des résistances aux thérapies ciblant l'EGFR et ALK ; les lignées cellulaires ainsi générées ont permis d'identifier des combinaisons de thérapies ciblées efficaces sur certains de ces mécanismes de résistance (Crystal et al., 2014). La génération de CRC a également

180

été utilisé pour l'identification d'un traitement pour une papillomatose pulmonaire à HPV11, le vorinostat qui s'est révélé efficace en clinique (Yuan et al., 2012). Ainsi, les lignées de cellules cancéreuses conditionnellement reprogrammées pourraient être d'utilisation plus aisée pour le criblage à haut débit de molécules à visée antitumorale, les CSPi gardant un intérêt pour la modélisation des étapes précoces de l'oncogénèse, en particulier dans le cadre des syndromes de prédisposition au cancer.

Perspectives

Nous avons généré au cours de ce travail les premières CSPi porteuses de mutation de *RET* ainsi qu'un contrôle isogénique de la lignée C634Y. Nous avons pu réaliser une analyse comparative d'expression des gènes des CSPi et des cellules souches de la crête neurale qui nous a permis de mettre en évidence le rôle d'EGR1 au stade de CSPi et la dérégulation de l'adhésion et de la motilité cellulaire au stade de la crête neurale. Cependant, nous manguons de validation fonctionnelle de ces données, principalement en raison du fait que nous n'avons pas encore pu parvenir à recréer le phénotype tumoral des NEM2 par différenciation in vitro ce qui constitue donc la prochaine étape de ce travail afin d'obtenir une « NEM2 dans une boite de culture ». Nous n'avons pas non plus exploré la possibilité de surexprimer l'oncogène RET dans les CSPi ou les cellules souches de la crête neurale afin d' « accentuer » peut-être le phénotype. La forme RET^{C634Y} a été clonée dans un vecteur d'expression lentivirale et ces expérimentations pourraient être réalisées à l'avenir. Néanmoins, on s'éloignera alors d'une observation physiologique du phénotype des NEM2. La recréation, in vitro, de l'oncogénèse du CMT tout au long des différentes étapes de la différenciation à partir des CSPi permettra de mettre en évidence l'ensemble des mécanismes moléculaires qui coopèrent avec Ret pour aboutir au développement du CMT. Ces mécanismes moléculaires «adjuvants » pourraient constituer autant de cibles thérapeutiques potentielles en elles-mêmes ou en association avec le ciblage de Ret.

La poursuite de ce travail et en particulier l'obtention de cellules C à partir de CSPi pourrait avoir un intérêt dans le criblage de drogue « anti-Ret » car elle permettrait d'obtenir des cellules porteuses uniquement d'une mutation de *RET*, sans les importantes anomalies chromosomiques observées dans les lignées utilisées habituellement pour les tests de molécules à visée anti-tumorale et qui ne

181

correspondent pas à la réalité génomique du CMT qui ne présente que peu d'amplification et délétion génique. En effet, de nouveaux inhibiteurs de RET plus spécifiques sont actuellement en développement et notre modèle de NEM2 basé sur les CSPi pourrrait servir à valider l'activité de ces inhibiteurs dans cette maladie avant leur utilisation en clinique.

BIBLIOGRAPHIE

Abad, M., Mosteiro, L., Pantoja, C., Cañamero, M., Rayon, T., Ors, I., Graña, O., Megías, D., Domínguez, O., Martínez, D., et al. (2013). Reprogramming in vivo produces teratomas and iPS cells with totipotency features. Nature *502*, 340–345.

Acton, D.S., Velthuyzen, D., Lips, C.J., and Höppener, J.W. (2000). Multiple endocrine neoplasia type 2B mutation in human RET oncogene induces medullary thyroid carcinoma in transgenic mice. Oncogene *19*, 3121–3125.

Agrawal, N., Jiao, Y., Sausen, M., Leary, R., Bettegowda, C., Roberts, N.J., Bhan, S., Ho, A.S., Khan, Z., Bishop, J., et al. (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.

Ameur, N., Lacroix, L., Roucan, S., Roux, V., Broutin, S., Talbot, M., Dupuy, C., Caillou, B., Schlumberger, M., and Bidart, J.-M. (2009). Aggressive inherited and sporadic medullary thyroid carcinomas display similar oncogenic pathways. Endocr. Relat. Cancer *16*, 1261–1272.

Amit, M., Carpenter, M.K., Inokuma, M.S., Chiu, C.P., Harris, C.P., Waknitz, M.A., Itskovitz-Eldor, J., and Thomson, J.A. (2000). Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. Dev. Biol. 227, 271–278.

Andrew, S.D., Capes-Davis, A., Delhanty, P.J.D., Marsh, D.J., Mulligan, L.M., and Robinson, B.G. (2002). Transcriptional repression of the RET proto-oncogene by a mitogen activated protein kinase-dependent signalling pathway. Gene *298*, 9–19.

Antonica, F., Kasprzyk, D.F., Opitz, R., Iacovino, M., Liao, X.-H., Dumitrescu, A.M., Refetoff, S., Peremans, K., Manto, M., Kyba, M., et al. (2012). Generation of functional thyroid from embryonic stem cells. Nature *491*, 66–71.

Asprer, J.S.T., and Lakshmipathy, U. (2015). Current methods and challenges in the comprehensive characterization of human pluripotent stem cells. Stem Cell Rev *11*, 357–372.

Baetscher, M., Schmidt, E., Shimizu, A., Leder, P., and 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.

Baker, D.E.C., Harrison, N.J., Maltby, E., Smith, K., Moore, H.D., Shaw, P.J., Heath, P.R., Holden, H., and Andrews, P.W. (2007). Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis in vivo. Nat. Biotechnol. *25*, 207–215.

Banito, A., and Gil, J. Induced pluripotent stem cells and senescence: learning the bio-logy to improve the technology. EMBO Rep *2010*, 353–9.

Barbet, J., Campion, L., Kraeber-Bodéré, F., Chatal, J.-F., and 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.

Barnes, D.R., and Antoniou, A.C. (2012). Unravelling modifiers of breast and ovarian cancer risk for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: update on genetic modifiers. J. Intern. Med. *271*, 331–343.

Bar-Nur, O., Russ, H.A., Efrat, S., and Benvenisty, N. (2011). Epigenetic memory and preferential lineage-specific differentiation in induced pluripotent stem cells derived from human pancreatic islet beta cells. Cell Stem Cell *9*, 17–23.

Ben-Porath, I., Thomson, M.W., Carey, V.J., Ge, R., Bell, G.W., Regev, A., and Weinberg, R.A. (2008). An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. Nat. Genet. *40*, 499–507.

Bergholm, U., Bergström, R., and Ekbom, A. (1997). Long term follow-up of patients with medullary carcinoma of the thyroid. Cancer *79*, 132–138.

Berkowitz, A.L., Miller, M.B., Mir, S.A., Cagney, D., Chavakula, V., Guleria, I., Aizer, A., Ligon, K.L., and Chi, J.H. (2016). Glioproliferative Lesion of the Spinal Cord as a Complication of "Stem-Cell Tourism." New England Journal of Medicine *375*, 196–198.

Bernhardt, M., Galach, M., Novak, D., and Utikal, J. (2012). Mediators of induced pluripotency and their role in cancer cells - current scientific knowledge and future perspectives. Biotechnol J *7*, 810–821.

Bibikova, M., Beumer, K., Trautman, J.K., and Carroll, D. (2003). Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. Science *300*, 764.

Biscolla, R.P., Ugolini, C., Sculli, M., Bottici, V., Castagna, M.G., Romei, C., Cosci, B., Molinaro, E., Faviana, P., Basolo, F., et al. (2004). Medullary and papillary tumors are frequently associated in the same thyroid gland without evidence of reciprocal influence in their biologic behavior. Thyroid *14*, 946–952.

Blanpain, C., and Simons, B.D. (2013). Unravelling stem cell dynamics by lineage tracing. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *14*, 489–502.

Boichard, A., Croux, L., Al Ghuzlan, A., Broutin, S., Dupuy, C., Leboulleux, S., Schlumberger, M., Bidart, J.M., and Lacroix, L. (2012). 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. *97*, E2031-2035.

Bonnet, D., and Dick, J.E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Nat. Med. *3*, 730–737.

Brons, I.G., Smithers, L.E., Trotter, M.W., Rugg-Gunn, P., Sun, B., Lopes, C. de_Sousa, M, S., Howlett, S.K., Clarkson, A., Richter, A.-, et al. (2007). Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. Nature *448*, 191–195.

Broutin, S., Ameur, N., Lacroix, L., Robert, T., Petit, B., Oumata, N., Talbot, M., Caillou, B., Schlumberger, M., Dupuy, C., et al. (2011). Identification of soluble candidate biomarkers of therapeutic response to sunitinib in medullary thyroid carcinoma in preclinical models. Clin. Cancer Res. *17*, 2044–2054.

Broxmeyer, H.E. (2010). Will iPS cells enhance therapeutic applicability of cord blood cells and banking? Cell Stem Cell *6*, 21–24.

Buganim, Y., Faddah, D.A., Cheng, A.W., Itskovich, E., Markoulaki, S., Ganz, K., Klemm, S.L., van Oudenaarden, A., and Jaenisch, R. (2012). Single-cell expression analyses during cellular reprogramming reveal an early stochastic and a late hierarchic phase. Cell *150*, 1209–1222.

Burnichon, N., Buffet, A., Parfait, B., Letouzé, E., Laurendeau, I., Loriot, C., Pasmant, E., Abermil, N., Valeyrie-Allanore, L., Bertherat, J., et al. (2012). Somatic NF1 inactivation is a frequent event in sporadic pheochromocytoma. Hum. Mol. Genet. *21*, 5397–5405.

Cacchiarelli, D., Trapnell, C., Ziller, M.J., Soumillon, M., Cesana, M., Karnik, R., Donaghey, J., Smith, Z.D., Ratanasirintrawoot, S., Zhang, X., et al. (2015). Integrative Analyses of Human Reprogramming Reveal Dynamic Nature of Induced Pluripotency. Cell *162*, 412–424.

Califano, D., D'Alessio, A., Colucci-D'Amato, G.L., De Vita, G., Monaco, C., Santelli, G., Di Fiore, P.P., Vecchio, G., Fusco, A., Santoro, M., et al. (1996). A potential pathogenetic mechanism for multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes involves ret-induced impairment of terminal differentiation of neuroepithelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A *93*, 7933–7937.

Califano, D., Rizzo, C., D'Alessio, A., Colucci-D'Amato, G.L., Cali, G., Bartoli, P.C., Santelli, G., Vecchio, G., and de Franciscis, V. (2000). Signaling through Ras is essential for ret oncogene-induced cell differentiation in PC12 cells. J. Biol. Chem. *275*, 19297–19305.

Carette, J.E., Pruszak, J., Varadarajan, M., Blomen, V.A., Gokhale, S., Camargo, F.D., Wernig, M., Jaenisch, R., and Brummelkamp, T.R. (2010). Generation of iPSCs from cultured human malignant cells. Blood *115*, 4039–4042.

Carlomagno, F., Salvatore, D., Santoro, M., de Franciscis, V., Quadro, L., Panariello, L., Colantuoni, V., and 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.

Carlomagno, F., De Vita, G., Berlingieri, M.T., de Franciscis, V., Melillo, R.M., Colantuoni, V., Kraus, M.H., Di Fiore, P.P., Fusco, A., and Santoro, M. (1996). Molecular heterogeneity of RET loss of function in Hirschsprung's disease. EMBO J. *15*, 2717–2725.

Carlson, K.M., Dou, S., Chi, D., Scavarda, N., Toshima, K., Jackson, C.E., Wells, S.A., Jr, Goodfellow, P.J., and Donis-Keller, H. (1994). Single missense mutation in the tyrosine kinase catalytic domain of the RET protooncogene is associated with multiple endocrine neoplasia type 2B. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *91*, 1579–1583.

Carre, A., Rachdi, L., Tron, E., Richard, B., Castanet, M., Schlumberger, M., Bidart, J.-M., Szinnai, G., and Polak, M. (2011). Hes1 is required for appropriate morphogenesis and differentiation during mouse thyroid gland development. PLoS ONE *6*, e16752.

Carter, M.T., Yome, J.L., Marcil, M.N., Martin, C.A., Vanhorne, J.B., and Mulligan, L.M. (2001). Conservation of RET proto-oncogene splicing variants and implications for RET isoform function. Cytogenet. Cell Genet. *95*, 169–176.

Castro-Vega, L.J., Letouzé, E., Burnichon, N., Buffet, A., Disderot, P.-H., Khalifa, E., Loriot, C., Elarouci, N., Morin, A., Menara, M., et al. (2015). Multi-omics analysis defines core genomic alterations in pheochromocytomas and paragangliomas. Nat Commun *6*, 6044.

Chambers, S.M., Fasano, C.A., Papapetrou, E.P., Tomishima, M., Sadelain, M., and Studer, L. (2009). Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. Nat Biotech *27*, 275–280.

Chen, B., Gilbert, L.A., Cimini, B.A., Schnitzbauer, J., Zhang, W., Li, G.-W., Park, J., Blackburn, E.H., Weissman, J.S., Qi, L.S., et al. (2013). Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. Cell *155*, 1479–1491.

Chen, F., Pruett-Miller, S.M., Huang, Y., Gjoka, M., Duda, K., Taunton, J., Collingwood, T.N., Frodin, M., and Davis, G.D. (2011). High-frequency genome editing using ssDNA oligonucleotides with zinc-finger nucleases. Nat. Methods *8*, 753–755.

Chen, S., Sanjana, N.E., Zheng, K., Shalem, O., Lee, K., Shi, X., Scott, D.A., Song, J., Pan, J.Q., Weissleder, R., et al. (2015). Genome-wide CRISPR screen in a mouse model of tumor growth and metastasis. Cell *160*, 1246–1260.

Chen, Z., Cheng, K., Walton, Z., Wang, Y., Ebi, H., Shimamura, T., Liu, Y., Tupper, T., Ouyang, J., Li, J., et al. (2012). A murine lung cancer co-clinical trial identifies genetic modifiers of therapeutic response. Nature *483*, 613–617.

Choi, P.S., and Meyerson, M. (2014). Targeted genomic rearrangements using CRISPR/Cas technology. Nat Commun *5*, 3728.

Chung, K.-F., Sicard, F., Vukicevic, V., Hermann, A., Storch, A., Huttner, W.B., Bornstein, S.R., and Ehrhart-Bornstein, M. (2009). Isolation of Neural Crest Derived Chromaffin Progenitors from Adult Adrenal Medulla. STEM CELLS *27*, 2602–2613.

Ciampi, R., Mian, C., Fugazzola, L., Cosci, B., Romei, C., Barollo, S., Cirello, V., Bottici, V., Marconcini, G., Rosa, P.M., et al. (2013). Evidence of a low prevalence of RAS mutations in a large medullary thyroid cancer series. Thyroid *23*, 50–57.

Cline, M.S., Smoot, M., Cerami, E., Kuchinsky, A., Landys, N., Workman, C., Christmas, R., Avila-Campilo, I., Creech, M., Gross, B., et al. (2007). Integration of biological networks and gene expression data using Cytoscape. Nat Protoc *2*, 2366– 2382.

Cohen, R., Campos, J.M., Salaün, C., Heshmati, H.M., Kraimps, J.L., Proye, C., Sarfati, E., Henry, J.F., Niccoli-Sire, P., and 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.

Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., et al. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science *339*, 819–823.

Consales, C., Volpicelli, F., Greco, D., Leone, L., Colucci-D'Amato, L., Perrone-Capano, C., and di Porzio, U. (2007). GDNF signaling in embryonic midbrain neurons in vitro. Brain Res. *1159*, 28–39.

Corominas-Faja, B., Cufí, S., Oliveras-Ferraros, C., Cuyàs, E., López-Bonet, E., Lupu, R., Alarcón, T., Vellon, L., Iglesias, J.M., Leis, O., et al. (2013). Nuclear reprogramming of luminal-like breast cancer cells generates Sox2-overexpressing cancer stem-like cellular states harboring transcriptional activation of the mTOR pathway. Cell Cycle *12*, 3109–3124.

Costante, G., Meringolo, D., Durante, C., Bianchi, D., Nocera, M., Tumino, S., Crocetti, U., Attard, M., Maranghi, M., Torlontano, M., et al. (2007). Predictive value of serum calcitonin levels for preoperative diagnosis of medullary thyroid carcinoma in a cohort of 5817 consecutive patients with thyroid nodules. J. Clin. Endocrinol. Metab. *92*, 450–455.

Costante, G., Durante, C., Francis, Z., Schlumberger, M., and Filetti, S. (2009). Determination of calcitonin levels in C-cell disease: clinical interest and potential pitfalls. Nat Clin Pract Endocrinol Metab *5*, 35–44.

Cowan, C.A., Atienza, J., Melton, D.A., and Eggan, K. (2005). Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. Science *309*, 1369–1373.

Coxon, A.B., Ward, J.M., Geradts, J., Otterson, G.A., Zajac-Kaye, M., and Kaye, F.J. (1998). RET cooperates with RB/p53 inactivation in a somatic multi-step model for murine thyroid cancer. Oncogene *17*, 1625–1628.

Cranston, A.N., and Ponder, B.A.J. (2003). Modulation of Medullary Thyroid Carcinoma Penetrance Suggests the Presence of Modifier Genes in a RET Transgenic Mouse Model. Cancer Res *63*, 4777–4780.

Crystal, A.S., Shaw, A.T., Sequist, L.V., Friboulet, L., Niederst, M.J., Lockerman, E.L., Frias, R.L., Gainor, J.F., Amzallag, A., Greninger, P., et al. (2014). Patientderived models of acquired resistance can identify effective drug combinations for cancer. Science *346*, 1480–1486.

Curchoe, C.L., Maurer, J., McKeown, S.J., Cattarossi, G., Cimadamore, F., Nilbratt, M., Snyder, E.Y., Bronner-Fraser, M., and Terskikh, A.V. (2010). Early acquisition of neural crest competence during hESCs neuralization. PLoS ONE *5*, e13890.

D'Amour, K.A., Agulnick, A.D., Eliazer, S., Kelly, O.G., Kroon, E., and Baetge, E.E. (2005). Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. Nat. Biotechnol. *23*, 1534–1541.

Dar, A.C., Das, T.K., Shokat, K.M., and Cagan, R.L. (2012). Chemical genetic discovery of targets and anti-targets for cancer polypharmacology. Nature *486*, 80–84.

Das, T.K., and Cagan, R.L. (2013). A Drosophila approach to thyroid cancer therapeutics. Drug Discovery Today: Technologies *10*, e65–e71.

De Falco, V., Buonocore, P., Muthu, M., Torregrossa, L., Basolo, F., Billaud, M., Gozgit, J.M., Carlomagno, F., and Santoro, M. (2013). Ponatinib (AP24534) is a novel potent inhibitor of oncogenic RET mutants associated with thyroid cancer. J. Clin. Endocrinol. Metab. *98*, E811-819.

Demers, L.M., and Spencer, C.A. (2003). Laboratory medicine practice guidelines: laboratory support for the diagnosis and monitoring of thyroid disease. Clin. Endocrinol. (Oxf) *58*, 138–140.

Deveau, H., Garneau, J.E., and Moineau, S. (2010). CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions. Annu. Rev. Microbiol. *64*, 475–493.

Ding, Q., Regan, S.N., Xia, Y., Oostrom, L.A., Cowan, C.A., and Musunuru, K. (2013). Enhanced efficiency of human pluripotent stem cell genome editing through replacing TALENs with CRISPRs. Cell Stem Cell *12*, 393–394.

Donis-Keller, H., Dou, S., Chi, D., Carlson, K.M., Toshima, K., Lairmore, T.C., Howe, J.R., Moley, J.F., Goodfellow, P., and Wells, S.A., Jr (1993). Mutations in the RET proto-oncogene are associated with MEN 2A and FMTC. Hum. Mol. Genet. *2*, 851–856.

Dottorini, M.E., Assi, A., Sironi, M., Sangalli, G., Spreafico, G., and Colombo, L. (1996). Multivariate analysis of patients with medullary thyroid carcinoma. Prognostic significance and impact on treatment of clinical and pathologic variables. Cancer 77, 1556–1565.

Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2014). Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science *346*, 1258096.

Doyle, A., McGarry, M.P., Lee, N.A., and Lee, J.J. (2012). The Construction of Transgenic and Gene Knockout/Knockin Mouse Models of Human Disease. Transgenic Res *21*, 327–349.

Easwaran, H., Johnstone, S.E., Van Neste, L., Ohm, J., Mosbruger, T., Wang, Q., Aryee, M.J., Joyce, P., Ahuja, N., Weisenberger, D., et al. (2012). A DNA hypermethylation module for the stem/progenitor cell signature of cancer. Genome Res. *22*, 837–849.

Elisei, R., Bottici, V., Luchetti, F., Di Coscio, G., Romei, C., Grasso, L., Miccoli, P., Iacconi, P., Basolo, F., Pinchera, A., et al. (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.

Elisei, R., Cosci, B., Romei, C., Bottici, V., Renzini, G., Molinaro, E., Agate, L., Vivaldi, A., Faviana, P., Basolo, F., et al. (2008). Prognostic significance of somatic RET oncogene mutations in sporadic medullary thyroid cancer: a 10-year follow-up study. J. Clin. Endocrinol. Metab. *93*, 682–687.

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., and Tunnacliffe, A. (1994a). 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.

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., and Tunnacliffe, A. (1994b). 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.

Etit, D., Faquin, W.C., Gaz, R., Randolph, G., DeLellis, R.A., and Pilch, B.Z. (2008). Histopathologic and Clinical Features of Medullary Microcarcinoma and C-Cell Hyperplasia in Prophylactic Thyroidectomies for Medullary Carcinoma: A Study of 42 Cases. Archives of Pathology & Laboratory Medicine *132*, 1767–1773.

Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature *292*, 154–156.

Evers, B., Jastrzebski, K., Heijmans, J.P.M., Grernrum, W., Beijersbergen, R.L., and Bernards, R. (2016). CRISPR knockout screening outperforms shRNA and CRISPRi in identifying essential genes. Nat Biotech *34*, 631–633.

Fatehullah, A., Tan, S.H., and Barker, N. (2016). Organoids as an in vitro model of human development and disease. Nat Cell Biol *18*, 246–254.

Fattahi, F., Steinbeck, J.A., Kriks, S., Tchieu, J., Zimmer, B., Kishinevsky, S., Zeltner, N., Mica, Y., El-Nachef, W., Zhao, H., et al. (2016). Deriving human ENS lineages for cell therapy and drug discovery in Hirschsprung disease. Nature *531*, 105–109.

Flicker, K., Ulz, P., Höger, H., Zeitlhofer, P., Haas, O.A., Behmel, A., Buchinger, W., Scheuba, C., Niederle, B., Pfragner, R., et al. (2012). High-resolution analysis of alterations in medullary thyroid carcinoma genomes. Int. J. Cancer *131*, E66-73.

Franc, B., Rosenberg-Bourgin, M., Caillou, B., Dutrieux-Berger, N., Floquet, J., Houcke-Lecomte, M., Justrabo, E., Lange, F., Labat-Moleur, F., Le Bodic, M.F., et al. (1998). Medullary thyroid carcinoma: search for histological predictors of survival (109 proband cases analysis). Hum. Pathol. *29*, 1078–1084.

Frank-Raue, K., Machens, A., Leidig-Bruckner, G., Rondot, S., Haag, C., Schulze, E., Lorenz, A., Kreissl, M.C., Dralle, H., Raue, F., et al. (2013). Prevalence and clinical spectrum of nonsecretory medullary thyroid carcinoma in a series of 839 patients with sporadic medullary thyroid carcinoma. Thyroid *23*, 294–300.

Frisk, T., Zedenius, J., Lundberg, J., Wallin, G., Kytölä, S., and 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.

Fu, Y., Sander, J.D., Reyon, D., Cascio, V.M., and Joung, J.K. (2014). Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. Nat. Biotechnol. *32*, 279–284.

Gandre-Babbe, S., Paluru, P., Aribeana, C., Chou, S.T., Bresolin, S., Lu, L., Sullivan, S.K., Tasian, S.K., Weng, J., Favre, H., et al. (2013). Patient-derived induced pluripotent stem cells recapitulate hematopoietic abnormalities of juvenile myelomonocytic leukemia. Blood *121*, 4925–4929.

Ghezraoui, H., Piganeau, M., Renouf, B., Renaud, J.-B., Sallmyr, A., Ruis, B., Oh, S., Tomkinson, A.E., Hendrickson, E.A., Giovannangeli, C., et al. (2014). Chromosomal translocations in human cells are generated by canonical nonhomologous end-joining. Mol. Cell *55*, 829–842.

Gilbert, L.A., Larson, M.H., Morsut, L., Liu, Z., Brar, G.A., Torres, S.E., Stern-Ginossar, N., Brandman, O., Whitehead, E.H., Doudna, J.A., et al. (2013). CRISPRmediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. Cell *154*, 442–451.

Giraudet, A.L., Al Ghulzan, A., Aupérin, A., Leboulleux, S., Chehboun, A., Troalen, F., Dromain, C., Lumbroso, J., Baudin, E., and Schlumberger, M. (2008). Progression of medullary thyroid carcinoma: assessment with calcitonin and carcinoembryonic antigen doubling times. Eur. J. Endocrinol. *158*, 239–246.

Gnirke, A., Melnikov, A., Maguire, J., Rogov, P., LeProust, E.M., Brockman, W., Fennell, T., Giannoukos, G., Fisher, S., Russ, C., et al. (2009). Solution hybrid selection with ultra-long oligonucleotides for massively parallel targeted sequencing. Nat. Biotechnol. *27*, 182–189.

Griscelli, F., Féraud, O., Oudrhiri, N., Gobbo, E., Casal, I., Chomel, J.-C., Biéche, I., Duvillard, P., Opolon, P., Turhan, A.G., et al. (2012). Malignant germ cell-like tumors, expressing Ki-1 antigen (CD30), are revealed during in vivo differentiation of partially reprogrammed human-induced pluripotent stem cells. Am. J. Pathol. *180*, 2084–2096.

Guilinger, J.P., Thompson, D.B., and Liu, D.R. (2014). Fusion of catalytically inactive Cas9 to Fokl nuclease improves the specificity of genome modification. Nat Biotech *32*, 577–582.

Gujral, T.S., Singh, V.K., Jia, Z., and Mulligan, L.M. (2006). Molecular mechanisms of RET receptor-mediated oncogenesis in multiple endocrine neoplasia 2B. Cancer Res. *66*, 10741–10749.

Gupta, P.B., Fillmore, C.M., Jiang, G., Shapira, S.D., Tao, K., Kuperwasser, C., and Lander, E.S. (2011). Stochastic state transitions give rise to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells. Cell *146*, 633–644.

Gurdon, J.B. (1962). The Developmental Capacity of Nuclei taken from Intestinal Epithelium Cells of Feeding Tadpoles. Development *10*, 622–640.

Guyétant, S., Josselin, N., Savagner, F., Rohmer, V., Michalak, S., and Saint-André, J.-P. (2003). C-cell hyperplasia and medullary thyroid carcinoma: clinicopathological and genetic correlations in 66 consecutive patients. Mod. Pathol. *16*, 756–763.

Guyétant, S., Bléchet, C., and Saint-André, J.-P. (2006). C-cell hyperplasia. Ann. Endocrinol. (Paris) *67*, 190–197.

Hadoux, J., Pacini, F., Tuttle, R.M., and Schlumberger, M. (2016a). Management of advanced medullary thyroid cancer. Lancet Diabetes Endocrinol *4*, 64–71.

Hadoux, J., Féraud, O., Griscelli, F., Opolon, P., Divers, D., Gobbo, E., Schlumberger, M., Bennaceur-Griscelli, A., and Turhan, A.G. (2016b). Generation of an induced pluripotent stem cell line from a patient with hereditary multiple endocrine neoplasia 2A (MEN2A) syndrome with RET mutation. Stem Cell Research *17*, 154– 157.

Hakem, R., de la Pompa, J.L., Sirard, C., Mo, R., Woo, M., Hakem, A., Wakeham, A., Potter, J., Reitmair, A., Billia, F., et al. (1996). The Tumor Suppressor Gene Brca1 Is Required for Embryonic Cellular Proliferation in the Mouse. Cell *85*, 1009–1023.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. Cell *144*, 646–674.

Hanna, J., Cheng, A.W., Saha, K., Kim, J., Lengner, C.J., Soldner, F., Cassady, J.P., Muffat, J., Carey, B.W., and Jaenisch, R. (2010). Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *107*, 9222–9227.

Hargus, G., Ehrlich, M., Araúzo-Bravo, M.J., Hemmer, K., Hallmann, A.-L., Reinhardt, P., Kim, K.-P., Adachi, K., Santourlidis, S., Ghanjati, F., et al. (2014). Origindependent neural cell identities in differentiated human iPSCs in vitro and after transplantation into the mouse brain. Cell Rep *8*, 1697–1703.

Harvey, M., Vogel, H., Lee, E.Y., Bradley, A., and Donehower, L.A. (1995). Mice deficient in both p53 and Rb develop tumors primarily of endocrine origin. Cancer Res. *55*, 1146–1151.

Haugen, B.R., Alexander, E.K., Bible, K.C., Doherty, G., Mandel, S.J., Nikiforov, Y.E., Pacini, F., Randolph, G., Sawka, A., Schlumberger, M., et al. (2015). 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. Thyroid.

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., and Crile, G. (1959). Medullary (solid) carcinoma of the thyroid; a clinicopathologic entity. J. Clin. Endocrinol. Metab. *19*, 152–161.

Hiyama, E., and Hiyama, K. (2007). Telomere and telomerase in stem cells. Br. J. Cancer *96*, 1020–1024.

Hochedlinger, K., Blelloch, R., Brennan, C., Yamada, Y., Kim, M., Chin, L., and Jaenisch, R. (2004). Reprogramming of a melanoma genome by nuclear transplantation. Genes Dev. *18*, 1875–1885.

Hockemeyer, D., and Jaenisch, R. (2016). Induced Pluripotent Stem Cells Meet Genome Editing. Cell Stem Cell *18*, 573–586.

Hofstra, R.M., Landsvater, R.M., Ceccherini, I., Stulp, R.P., Stelwagen, T., Luo, Y., Pasini, B., Höppener, J.W., van Amstel, H.K., and Romeo, G. (1994). A mutation in the RET proto-oncogene associated with multiple endocrine neoplasia type 2B and sporadic medullary thyroid carcinoma. Nature *367*, 375–376.

Hong, H., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Kanagawa, O., Nakagawa, M., Okita, K., and Yamanaka, S. (2009). Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. Nature *460*, 1132–1135.

Hsu, P.D., Scott, D.A., Weinstein, J.A., Ran, F.A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E.J., Wu, X., Shalem, O., et al. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. Nat. Biotechnol. *31*, 827–832.

Hsu, P.D., Lander, E.S., and Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. Cell *157*, 1262–1278.

Hu, K., Yu, J., Suknuntha, K., Tian, S., Montgomery, K., Choi, K.-D., Stewart, R., Thomson, J.A., and Slukvin, I.I. (2011). Efficient generation of transgene-free induced pluripotent stem cells from normal and neoplastic bone marrow and cord blood mononuclear cells. Blood *117*, e109-119.

Huang, X., Wang, Y., Yan, W., Smith, C., Ye, Z., Wang, J., Gao, Y., Mendelsohn, L., and Cheng, L. (2015). Production of Gene-Corrected Adult Beta Globin Protein in Human Erythrocytes Differentiated from Patient iPSCs After Genome Editing of the Sickle Point Mutation. Stem Cells *33*, 1470–1479.

Huber, K., Kalcheim, C., and Unsicker, K. (2009). The development of the chromaffin cell lineage from the neural crest. Auton Neurosci *151*, 10–16.

Huynh, T.-T., Pacak, K., Wong, D.L., Linehan, W.M., Goldstein, D.S., Elkahloun, A.G., Munson, P.J., and Eisenhofer, G. (2006). Transcriptional regulation of phenylethanolamine N-methyltransferase in pheochromocytomas from patients with von Hippel-Lindau syndrome and multiple endocrine neoplasia type 2. Ann. N. Y. Acad. Sci. *1073*, 241–252.

Ilias, I., Torpy, D.J., Pacak, K., Mullen, N., Wesley, R.A., and Nieman, L.K. (2005). Cushing's syndrome due to ectopic corticotropin secretion: twenty years' experience at the National Institutes of Health. J. Clin. Endocrinol. Metab. *90*, 4955–4962.

INSERM (2016). Saisine concernant les questions liées au développement de la technologie CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeat)-Cas9 (CRISPR Comité éthique Inserm).

Ishizaka, Y., Itoh, F., Tahira, T., Ikeda, I., Sugimura, T., Tucker, J., Fertitta, A., Carrano, A.V., and Nagao, M. (1989). Human ret proto-oncogene mapped to chromosome 10q11.2. Oncogene *4*, 1519–1521.

Iskender, B., Izgi, K., and Canatan, H. (2016). Reprogramming bladder cancer cells for studying cancer initiation and progression. Tumour Biol.

Itzhaki, I., Maizels, L., Huber, I., Zwi-Dantsis, L., Caspi, O., Winterstern, A., Feldman, O., Gepstein, A., Arbel, G., Hammerman, H., et al. (2011). Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells. Nature *471*, 225–229.

Jacob, F., Guertler, R., Naim, S., Nixdorf, S., Fedier, A., Hacker, N.F., and Heinzelmann-Schwarz, V. (2013). Careful Selection of Reference Genes Is Required for Reliable Performance of RT-qPCR in Human Normal and Cancer Cell Lines. PLOS ONE *8*, e59180.

Jakubowska, A., Rozkrut, D., Antoniou, A., Hamann, U., Scott, R.J., McGuffog, L., Healy, S., Sinilnikova, O.M., Rennert, G., Lejbkowicz, F., et al. (2012). Association of PHB 1630 C>T and MTHFR 677 C>T polymorphisms with breast and ovarian cancer risk in BRCA1/2 mutation carriers: results from a multicenter study. Br. J. Cancer *106*, 2016–2024.

Jeter, C.R., Yang, T., Wang, J., Chao, H.-P., and Tang, D.G. (2015). Concise Review: NANOG in Cancer Stem Cells and Tumor Development: An Update and Outstanding Questions. Stem Cells *33*, 2381–2390.

Jinek, M., East, A., Cheng, A., Lin, S., Ma, E., and Doudna, J. (2013). RNAprogrammed genome editing in human cells. Elife 2, e00471.

Jo, Y.-I., Suresh, B., Kim, H., and Ramakrishna, S. (2015). CRISPR/Cas9 system as an innovative genetic engineering tool: Enhancements in sequence specificity and delivery methods. Biochim. Biophys. Acta *1856*, 234–243.

Johansson, E., Andersson, L., Örnros, J., Carlsson, T., Ingeson-Carlsson, C., Liang, S., Dahlberg, J., Jansson, S., Parrillo, L., Zoppoli, P., et al. (2015). Revising the embryonic origin of thyroid C cells in mice and humans. Development *142*, 3519–3528.

Jouannet, P., Adolphe, M., Allilaire, J., Ardaillou, R., Bergoignan-Esper, C., Fischer, A., Le Gall, J., Mattei, J., Milliez, J., and Spira, A. (2016). Modifications du génome des cellules germinales et de l'embryon humains. (Académie Nationale de Médecine).

Kameda, Y., Nishimaki, T., Miura, M., Jiang, S.-X., and Guillemot, F. (2007a). Mash1 regulates the development of C cells in mouse thyroid glands. Dev. Dyn. *236*, 262–270.

Kameda, Y., Nishimaki, T., Chisaka, O., Iseki, S., and Sucov, H.M. (2007b). Expression of the epithelial marker E-cadherin by thyroid C cells and their precursors during murine development. J. Histochem. Cytochem. *55*, 1075–1088.

Kameda, Y., Nishimaki, T., Chisaka, O., Iseki, S., and Sucov, H.M. (2007c). Expression of the epithelial marker E-cadherin by thyroid C cells and their precursors during murine development. J. Histochem. Cytochem. *55*, 1075–1088.

Kameda, Y., Saitoh, T., Nemoto, N., Katoh, T., Iseki, S., and 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. Kamihara, J., Rana, H.Q., and Garber, J.E. (2014). Germline TP53 mutations and the changing landscape of Li-Fraumeni syndrome. Hum. Mutat. *35*, 654–662.

Kang, X., He, W., Huang, Y., Yu, Q., Chen, Y., Gao, X., Sun, X., and Fan, Y. (2016). Introducing precise genetic modifications into human 3PN embryos by CRISPR/Casmediated genome editing. J Assist Reprod Genet *33*, 581–588.

Kareta, M.S., Gorges, L.L., and Hafeez, S. Inhibition of pluripotency networks by the rb tumor suppressor restricts reprogramming and tumorigenesis. Cell Stem Cell *2015*, 39–50.

Kaserer, K., Scheuba, C., Neuhold, N., Weinhäusel, A., Vierhapper, H., Haas, O.A., and Niederle, B. (1998). C-cell hyperplasia and medullary thyroid carcinoma in patients routinely screened for serum calcitonin. Am. J. Surg. Pathol. *22*, 722–728.

Kawai, K., Iwashita, T., Murakami, H., Hiraiwa, N., Yoshiki, A., Kusakabe, M., Ono, K., Iida, K., Nakayama, A., and Takahashi, M. (2000). Tissue-specific carcinogenesis in transgenic mice expressing the RET proto-oncogene with a multiple endocrine neoplasia type 2A mutation. Cancer Res. *60*, 5254–5260.

Kawasaki, H., Mizuseki, K., Nishikawa, S., Kaneko, S., Kuwana, Y., Nakanishi, S., Nishikawa, S.-I., and Sasai, Y. (2000). Induction of Midbrain Dopaminergic Neurons from ES Cells by Stromal Cell–Derived Inducing Activity. Neuron *28*, 31–40.

Kebebew, E., Ituarte, P.H.G., Siperstein, A.E., Duh, Q.-Y., and Clark, O.H. (2000a). Medullary thyroid carcinoma. Cancer *88*, 1139–1148.

Kebebew, E., Ituarte, P.H., Siperstein, A.E., Duh, Q.Y., and Clark, O.H. (2000b). Medullary thyroid carcinoma: clinical characteristics, treatment, prognostic factors, and a comparison of staging systems. Cancer *88*, 1139–1148.

Khurana, R., Agarwal, A., Bajpai, V.K., Verma, N., Sharma, A.K., Gupta, R.P., and Madhusudan, K.P. (2004). Unraveling the amyloid associated with human medullary thyroid carcinoma. Endocrinology *145*, 5465–5470.

Kim, J.J. (2015). Applications of iPSCs in Cancer Research. Biomark Insights *10*, 125–131.

Kim, J., Hoffman, J.P., Alpaugh, R.K., Rhim, A.D., Reichert, M., Stanger, B.Z., Furth, E.E., Sepulveda, A.R., Yuan, C.-X., Won, K.-J., et al. (2013a). An iPS Cell Line From Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Undergoes Early to Invasive Stages of Pancreatic Cancer Progression. Cell Rep *3*, 2088–2099.

Kim, K., Doi, A., Wen, B., Ng, K., Zhao, R., Cahan, P., Kim, J., Aryee, M.J., Ji, H., Ehrlich, L.I.R., et al. (2010). Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. Nature *467*, 285–290.

Kim, T.-M., Xi, R., Luquette, L.J., Park, R.W., Johnson, M.D., and Park, P.J. (2013b). Functional genomic analysis of chromosomal aberrations in a compendium of 8000 cancer genomes. Genome Res. *23*, 217–227.

Knorr, D.A., Ni, Z., Hermanson, D., Hexum, M.K., Bendzick, L., Cooper, L.J.N., Lee, D.A., and Kaufman, D.S. (2013). Clinical-scale derivation of natural killer cells from human pluripotent stem cells for cancer therapy. Stem Cells Transl Med *2*, 274–283.

Koperek, O., Bergner, O., Pichlhöfer, B., Oberndorfer, F., Hainfellner, J.A., Kaserer, K., Horvat, R., Harris, A.L., Niederle, B., and Birner, P. (2011). Expression of hypoxia-associated proteins in sporadic medullary thyroid cancer is associated with desmoplastic stroma reaction and lymph node metastasis and may indicate somatic mutations in the VHL gene. J. Pathol. *225*, 63–72.

Kotini, A.G., Chang, C.-J., Boussaad, I., Delrow, J.J., Dolezal, E.K., Nagulapally, A.B., Perna, F., Fishbein, G.A., Klimek, V.M., Hawkins, R.D., et al. (2015). Functional analysis of a chromosomal deletion associated with myelodysplastic syndromes using isogenic human induced pluripotent stem cells. Nat. Biotechnol. *33*, 646–655.

Kouvaraki, M.A., Shapiro, S.E., Perrier, N.D., Cote, G.J., Gagel, R.F., Hoff, A.O., Sherman, S.I., Lee, J.E., and Evans, D.B. (2005). RET proto-oncogene: a review and update of genotype-phenotype correlations in hereditary medullary thyroid cancer and associated endocrine tumors. Thyroid *15*, 531–544.

Kriks, S., Shim, J.-W., Piao, J., Ganat, Y.M., Wakeman, D.R., Xie, Z., Carrillo-Reid, L., Auyeung, G., Antonacci, C., Buch, A., et al. (2011). Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. Nature *480*, 547–551.

Kumano, K., Arai, S., Hosoi, M., Taoka, K., Takayama, N., Otsu, M., Nagae, G., Ueda, K., Nakazaki, K., Kamikubo, Y., et al. (2012). Generation of induced pluripotent stem cells from primary chronic myelogenous leukemia patient samples. Blood *119*, 6234–6242.

Kusakabe, T., Hoshi, N., and 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. *235*, 1300–1309.

Lancaster, M.A., Renner, M., Martin, C.-A., Wenzel, D., Bicknell, L.S., Hurles, M.E., Homfray, T., Penninger, J.M., Jackson, A.P., and Knoblich, J.A. (2013). Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. Nature *501*, 373–379.

Lang, D., and Epstein, J.A. (2003). Sox10 and Pax3 physically interact to mediate activation of a conserved c-RET enhancer. Hum. Mol. Genet. *12*, 937–945.

Laurent, L.C., Ulitsky, I., Slavin, I., Tran, H., Schork, A., Morey, R., Lynch, C., Harness, J.V., Lee, S., Barrero, M.J., et al. (2011). Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture. Cell Stem Cell *8*, 106–118.

Le Douarin, N., and Le Lièvre, C. (1970). [Demonstration of neural origin of calcitonin cells of ultimobranchial body of chick embryo]. C.R. Hebd. Seances Acad. Sci., Ser. D, Sci. Nat. *270*, 2857–2860.

Lee, D.-F., Su, J., Kim, H.S., Chang, B., Papatsenko, D., Zhao, R., Yuan, Y., Gingold, J., Xia, W., Darr, H., et al. (2015). Modeling familial cancer with induced pluripotent stem cells. Cell *161*, 240–254.

Lee, G., Kim, H., Elkabetz, Y., Shamy, G.A., Panagiotakos, G., Barberi, T., Tabar, V., and Studer, L. (2007). Isolation and directed differentiation of neural crest stem cells derived from human embryonic stem cells. Nature Biotechnology *25*.

Lee, G., Chambers, S.M., Tomishima, M.J., and Studer, L. (2010). Derivation of neural crest cells from human pluripotent stem cells. Nature Protocols *5*, 688–701.

Lee, G., Ramirez, C.N., Kim, H., Zeltner, N., Liu, B., Radu, C., Bhinder, B., Kim, Y.J., Choi, I.Y., Mukherjee-Clavin, B., et al. (2012). Large-scale screening using familial dysautonomia induced pluripotent stem cells identifies compounds that rescue IKBKAP expression. Nat. Biotechnol. *30*, 1244–1248.

Leon, T.Y.Y., Ngan, E.S.W., Poon, H.-C., So, M.-T., Lui, V.C.H., Tam, P.K.H., and Garcia-Barcelo, M.M. (2009). Transcriptional regulation of RET by Nkx2-1, Phox2b, Sox10, and Pax3. J. Pediatr. Surg. *44*, 1904–1912.

Lesueur, F., Cebrian, A., Robledo, M., Niccoli-Sire, P., Svensson, K.-A., Pinson, S., Leyland, J., Whittaker, J., Pharoah, P.D., and Ponder, B.A.J. (2006). Polymorphisms in RET and its coreceptors and ligands as genetic modifiers of multiple endocrine neoplasia type 2A. Cancer Res. *66*, 1177–1180.

Li, F., He, Z., Shen, J., Huang, Q., Li, W., Liu, X., He, Y., Wolf, F., and Li, C.-Y. (2010a). Apoptotic Caspases Regulate Induction of iPSCs from Human Fibroblasts. Cell Stem Cell *7*, 508–520.

Li, H.L., Fujimoto, N., Sasakawa, N., Shirai, S., Ohkame, T., Sakuma, T., Tanaka, M., Amano, N., Watanabe, A., Sakurai, H., et al. (2015). Precise correction of the dystrophin gene in duchenne muscular dystrophy patient induced pluripotent stem cells by TALEN and CRISPR-Cas9. Stem Cell Reports *4*, 143–154.

Li, R., Liang, J., Ni, S., Zhou, T., Qing, X., Li, H., He, W., Chen, J., Li, F., Zhuang, Q., et al. (2010b). A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. Cell Stem Cell *7*, 51–63.

Liang, C.-C., Park, A.Y., and Guan, J.-L. (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. Nat Protoc 2, 329–333.

Liang, P., Xu, Y., Zhang, X., Ding, C., Huang, R., Zhang, Z., Lv, J., Xie, X., Chen, Y., Li, Y., et al. (2015). CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. Protein Cell *6*, 363–372.

Liao, J., Marumoto, T., Yamaguchi, S., Okano, S., Takeda, N., Sakamoto, C., Kawano, H., Nii, T., Miyamato, S., Nagai, Y., et al. (2013). Inhibition of PTEN tumor suppressor promotes the generation of induced pluripotent stem cells. Mol. Ther. *21*, 1242–1250.

Lim, E., Vaillant, F., Wu, D., Forrest, N.C., Pal, B., Hart, A.H., Asselin-Labat, M.-L., Gyorki, D.E., Ward, T., Partanen, A., et al. (2009). Aberrant luminal progenitors as

the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. Nat. Med. *15*, 907–913.

Lin, S.-L., Chang, D.C., Chang-Lin, S., Lin, C.-H., Wu, D.T.S., Chen, D.T., and Ying, S.-Y. (2008). Mir-302 reprograms human skin cancer cells into a pluripotent ES-cell-like state. RNA *14*, 2115–2124.

Liu, X., Ory, V., Chapman, S., Yuan, H., Albanese, C., Kallakury, B., Timofeeva, O.A., Nealon, C., Dakic, A., Simic, V., et al. (2012). ROCK Inhibitor and Feeder Cells Induce the Conditional Reprogramming of Epithelial Cells. Am J Pathol *180*, 599–607.

Liu, Y., Cheng, H., Gao, S., Lu, X., He, F., Hu, L., Hou, D., Zou, Z., Li, Y., Zhang, H., et al. (2014). Reprogramming of MLL-AF9 leukemia cells into pluripotent stem cells. Leukemia *28*, 1071–1080.

LiVolsi, V.A. (1997). C cell hyperplasia/neoplasia. J. Clin. Endocrinol. Metab. *8*2, 39–41.

Machens, A., and Dralle, H. (2012). Simultaneous medullary and papillary thyroid cancer: a novel entity? Ann. Surg. Oncol. *19*, 37–44.

Machens, A., and Dralle, H. (2013). Prognostic impact of N staging in 715 medullary thyroid cancer patients: proposal for a revised staging system. Ann. Surg. *257*, 323–329.

Machens, A., Niccoli-Sire, P., Hoegel, J., Frank-Raue, K., van Vroonhoven, T.J., Roeher, H.-D., Wahl, R.A., Lamesch, P., Raue, F., Conte-Devolx, B., et al. (2003). Early malignant progression of hereditary medullary thyroid cancer. N. Engl. J. Med. *349*, 1517–1525.

Machens, A., Schneyer, U., Holzhausen, H.-J., and Dralle, H. (2005). Prospects of remission in medullary thyroid carcinoma according to basal calcitonin level. J. Clin. Endocrinol. Metab. *90*, 2029–2034.

Maddah, M., Heidmann, J.D., Mandegar, M.A., Walker, C.D., Bolouki, S., Conklin, B.R., and Loewke, K.E. (2015). A non-invasive platform for functional characterization of stem-cell-derived cardiomyocytes with applications in cardiotoxicity testing. Stem Cell Reports *4*, 621–631.

Maddalo, D., Manchado, E., Concepcion, C.P., Bonetti, C., Vidigal, J.A., Han, Y.-C., Ogrodowski, P., Crippa, A., Rekhtman, N., de Stanchina, E., et al. (2014). In vivo engineering of oncogenic chromosomal rearrangements with the CRISPR/Cas9 system. Nature *516*, 423–427.

Maherali, N., Sridharan, R., Xie, W., Utikal, J., Eminli, S., Arnold, K., Stadtfeld, M., Yachechko, R., Tchieu, J., Jaenisch, R., et al. (2007). Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. Cell Stem Cell *1*, 55–70.

Maitra, A., Arking, D.E., Shivapurkar, N., and al, et (2005). Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells. Nat. Genet *37*, 1099–1103.

Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E., Norville, J.E., and Church, G.M. (2013a). RNA-guided human genome engineering via Cas9. Science 339, 823–826.

Mali, P., Aach, J., Stranges, P.B., Esvelt, K.M., Moosburner, M., Kosuri, S., Yang, L., and Church, G.M. (2013b). CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. Nat. Biotechnol. *31*, 833–838.

Maliszewska, A., Leandro-Garcia, L.J., Castelblanco, E., Macià, A., de Cubas, A., Goméz-López, G., Inglada-Pérez, L., Álvarez-Escolá, C., De la Vega, L., Letón, R., et al. (2013). Differential gene expression of medullary thyroid carcinoma reveals specific markers associated with genetic conditions. Am. J. Pathol. *182*, 350–362.

Mani, S.A., Guo, W., Liao, M.-J., Eaton, E.N., Ayyanan, A., Zhou, A.Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C.C., Shipitsin, M., et al. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. Cell *133*, 704–715.

Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *78*, 7634–7638.

Matano, M., Date, S., Shimokawa, M., Takano, A., Fujii, M., Ohta, Y., Watanabe, T., Kanai, T., and Sato, T. (2015). Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9mediated engineering of human intestinal organoids. Nat. Med. *21*, 256–262.

Mathieu, J., Zhang, Z., Zhou, W., Wang, A.J., Heddleston, J.M., Pinna, C.M.A., Hubaud, A., Stadler, B., Choi, M., Bar, M., et al. (2011). HIF induces human embryonic stem cell markers in cancer cells. Cancer Res. *71*, 4640–4652.

May, C.L., and Kaestner, K.H. (2010). Gut endocrine cell development. Mol. Cell. Endocrinol. *323*, 70–75.

Mayor, R., and Theveneau, E. (2013). The neural crest. Development *140*, 2247–2251.

McLean, C.Y., Bristor, D., Hiller, M., Clarke, S.L., Schaar, B.T., Lowe, C.B., Wenger, A.M., and Bejerano, G. (2010). GREAT improves functional interpretation of cisregulatory regions. Nat. Biotechnol. *28*, 495–501.

Mendelsohn, G., Wells, S.A., and Baylin, S.B. (1984). Relationship of tissue carcinoembryonic antigen and calcitonin to tumor virulence in medullary thyroid carcinoma. An immunohistochemical study in early, localized, and virulent disseminated stages of disease. Cancer *54*, 657–662.

Menendez, L., Kulik, M.J., Page, A.T., Park, S.S., Lauderdale, J.D., Cunningham, M.L., and Dalton, S. (2013). Directed differentiation of human pluripotent cells to neural crest stem cells. Nat Protoc *8*, 203–212.

Mete, O., and Asa, S.L. (2013). Precursor lesions of endocrine system neoplasms. Pathology *45*, 316–330.

Mica, Y., Lee, G., Chambers, S.M., Tomishima, M.J., and Studer, L. (2013). Modeling neural crest induction, melanocyte specification, and disease-related pigmentation defects in hESCs and patient-specific iPSCs. Cell Rep *3*, 1140–1152.

Michiels, F.M., Chappuis, S., Caillou, B., Pasini, A., Talbot, M., Monier, R., Lenoir, G.M., Feunteun, J., and 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.

Milbrandt, J. (1987). A nerve growth factor-induced gene encodes a possible transcriptional regulatory factor. Science *238*, 797–799.

Miller, R.A., and Ruddle, F.H. (1976). Pluripotent teratocarcinoma-thymus somatic cell hybrids. Cell *9*, 45–55.

Miyauchi, A., Matsuzuka, F., Hirai, K., Yokozawa, T., Kobayashi, K., Ito, Y., Nakano, K., Kuma, K., Futami, H., and Yamaguchi, K. (2002). Prospective trial of unilateral surgery for nonhereditary medullary thyroid carcinoma in patients without germline RET mutations. World J Surg *26*, 1023–1028.

Miyoshi, N., Ishii, H., and Nagai, K. (2010). Defined factors induce reprogramming of gastrointestinal cancer cells. In Proc Natl Acad Sci, p. 5.

Morgens, D.W., Deans, R.M., Li, A., and Bassik, M.C. (2016). Systematic comparison of CRISPR/Cas9 and RNAi screens for essential genes. Nat Biotech *34*, 634–636.

Morrison, S.J., and Kimble, J. (2006). Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. Nature *441*, 1068–1074.

Moura, M.M., Cavaco, B.M., Pinto, A.E., and Leite, V. (2011). High prevalence of RAS mutations in RET-negative sporadic medullary thyroid carcinomas. J. Clin. Endocrinol. Metab. *96*, E863-868.

Müller, M., Hermann, P.C., Liebau, S., Weidgang, C., Seufferlein, T., Kleger, A., and Perkhofer, L. (2016). The role of pluripotency factors to drive stemness in gastrointestinal cancer. Stem Cell Res *16*, 349–357.

Mulligan, L.M. (2014). RET revisited: expanding the oncogenic portfolio. Nat. Rev. Cancer *14*, 173–186.

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., and Papi, L. (1993). Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. Nature *363*, 458–460.

Myers, S.M., Eng, C., Ponder, B.A., and 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.

Nangue, C., Bron, L., Portmann, L., Volante, M., Ris, H.-B., Monnier, P., and Andrejevic-Blant, S. (2009). Mixed medullary-papillary carcinoma of the thyroid: report of a case and review of the literature. Head Neck *31*, 968–974.

Nguyen, L.V., Makarem, M., Carles, A., Moksa, M., Kannan, N., Pandoh, P., Eirew, P., Osako, T., Kardel, M., Cheung, A.M.S., et al. (2014). Clonal Analysis via Barcoding Reveals Diverse Growth and Differentiation of Transplanted Mouse and Human Mammary Stem Cells. Cell Stem Cell *14*, 253–263.

Niccoli-Sire, P., Murat, A., Rohmer, V., Franc, S., Chabrier, G., Baldet, L., Maes, B., Savagner, F., Giraud, S., Bezieau, S., et al. (2001). Familial medullary thyroid carcinoma with noncysteine ret mutations: phenotype-genotype relationship in a large series of patients. J. Clin. Endocrinol. Metab. *86*, 3746–3753.

Nilsson, M., and Fagman, H. (2013). Chapter Four - Mechanisms of Thyroid Development and Dysgenesis: An Analysis Based on Developmental Stages and Concurrent Embryonic Anatomy. In Current Topics in Developmental Biology, Paul Thomas, ed. (Academic Press), pp. 123–170.

Nissan, X., Larribere, L., Saidani, M., Hurbain, I., Delevoye, C., Feteira, J., Lemaitre, G., Peschanski, M., and Baldeschi, C. (2011). Functional melanocytes derived from human pluripotent stem cells engraft into pluristratified epidermis. PNAS *108*, 14861–14866.

Nowell, P.C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. Science *194*, 23–28.

Ohm, J.E., Mali, P., Van Neste, L., Berman, D.M., Liang, L., Pandiyan, K., Briggs, K.J., Zhang, W., Argani, P., Simons, B., et al. (2010). Cancer-related epigenome changes associated with reprogramming to induced pluripotent stem cells. Cancer Res. *70*, 7662–7673.

Ohnishi, K., Semi, K., Yamamoto, T., Shimizu, M., Tanaka, A., Mitsunaga, K., Okita, K., Osafune, K., Arioka, Y., Maeda, T., et al. (2014). Premature termination of reprogramming in vivo leads to cancer development through altered epigenetic regulation. Cell *156*, 663–677.

O'Rahilly, R. (1973). Developmental Stages in Human Embryos: Including a Survey of the Carnegie Collection (Carnegie Institutions of Washington).

Ozmadenci, D., Féraud, O., Markossian, S., Kress, E., Ducarouge, B., Gibert, B., Ge, J., Durand, I., Gadot, N., Plateroti, M., et al. (2015). Netrin-1 regulates somatic cell reprogramming and pluripotency maintenance. Nat Commun *6*, 7398.

Palmer, R.D., Murray, M.J., Saini, H.K., van Dongen, S., Abreu-Goodger, C., Muralidhar, B., Pett, M.R., Thornton, C.M., Nicholson, J.C., Enright, A.J., et al. (2010). Malignant germ cell tumors display common microRNA profiles resulting in global changes in expression of messenger RNA targets. Cancer Res. *70*, 2911– 2923.

Papaparaskeva, K., Nagel, H., and Droese, M. (2000). Cytologic diagnosis of medullary carcinoma of the thyroid gland. Diagn. Cytopathol. *22*, 351–358.

Pearse, A.G., and Carvalheira, A.F. (1967). Cytochemical evidence for an ultimobranchial origin of rodent thyroid C cells. Nature *214*, 929–930.

Pearse, A.G., and Polak, J.M. (1971). Cytochemical evidence for the neural crest origin of mammalian ultimobranchial C cells. Histochemie *27*, 96–102.

Pelizzo, M.R., Boschin, I.M., Bernante, P., Toniato, A., Piotto, A., Pagetta, C., Nibale, O., Rampin, L., Muzzio, P.C., and Rubello, D. (2007). Natural history, diagnosis, treatment and outcome of medullary thyroid cancer: 37 years experience on 157 patients. Eur J Surg Oncol *33*, 493–497.

Polak, J.M., Pearse, A.G., Le Lièvre, C., Fontaine, J., and Le Douarin, N.M. (1974). Immunocytochemical confirmation of the neural crest origin of avian calcitoninproducing cells. Histochemistry *40*, 209–214.

Polo, J.M., Liu, S., Figueroa, M.E., Kulalert, W., Eminli, S., Tan, K.Y., Apostolou, E., Stadtfeld, M., Li, Y., Shioda, T., et al. (2010). Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. Nat. Biotechnol. *28*, 848–855.

Porteus, M.H., and Baltimore, D. (2003). Chimeric nucleases stimulate gene targeting in human cells. Science *300*, 763.

Pozo, K., Castro-Rivera, E., Tan, C., Plattner, F., Schwach, G., Siegl, V., Meyer, D., Guo, A., Gundara, J., Mettlach, G., et al. (2013). The role of Cdk5 in neuroendocrine thyroid cancer. Cancer Cell *24*, 499–511.

Qi, L.S., Larson, M.H., Gilbert, L.A., Doudna, J.A., Weissman, J.S., Arkin, A.P., and Lim, W.A. (2013). Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. Cell *152*, 1173–1183.

Qin, N., de Cubas, A.A., Garcia-Martin, R., Richter, S., Peitzsch, M., Menschikowski, M., Lenders, J.W.M., Timmers, H.J.L.M., Mannelli, M., Opocher, G., et al. (2014). Opposing effects of HIF1 α and HIF2 α on chromaffin cell phenotypic features and tumor cell proliferation: Insights from MYC-associated factor X. Int. J. Cancer *135*, 2054–2064.

Ran, F.A., Hsu, P.D., Lin, C.-Y., Gootenberg, J.S., Konermann, S., Trevino, A.E., Scott, D.A., Inoue, A., Matoba, S., Zhang, Y., et al. (2013a). Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. Cell *154*, 1380–1389.

Ran, F.A., Hsu, P.D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D.A., and Zhang, F. (2013b). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. Nat Protoc *8*, 2281–2308.

Read, R.D., Goodfellow, P.J., Mardis, E.R., Novak, N., Armstrong, J.R., and Cagan, R.L. (2005). A Drosophila model of multiple endocrine neoplasia type 2. Genetics *171*, 1057–1081.

Renaud, J.-B., Boix, C., Charpentier, M., De Cian, A., Cochennec, J., Duvernois-Berthet, E., Perrouault, L., Tesson, L., Edouard, J., Thinard, R., et al. (2016). Improved Genome Editing Efficiency and Flexibility Using Modified Oligonucleotides with TALEN and CRISPR-Cas9 Nucleases. Cell Rep *14*, 2263–2272.

Reynolds, L., Jones, K., Winton, D.J., Cranston, A., Houghton, C., Howard, L., Ponder, B.A., and Smith, D.P. (2001). C-cell and thyroid epithelial tumours and altered follicular development in transgenic mice expressing the long isoform of MEN 2A RET. Oncogene *20*, 3986–3994.

Rizzino, A. (2013). Concise review: The Sox2-Oct4 connection: critical players in a much larger interdependent network integrated at multiple levels. Stem Cells *31*, 1033–1039.

Robinton, D.A., and Daley, G.Q. (2012). The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. Nature *481*, 295–305.

Robledo, M., Gil, L., Pollán, M., Cebrián, A., Ruíz, S., Azañedo, M., Benitez, J., Menárguez, J., and Rojas, J.M. (2003). Polymorphisms G691S/S904S of RET as genetic modifiers of MEN 2A. Cancer Res. *63*, 1814–1817.

Rohmer, V., Vidal-Trecan, G., Bourdelot, A., Niccoli, P., Murat, A., Wemeau, J.L., Borson-Chazot, F., Schvartz, C., Tabarin, A., Chabre, O., et al. (2011). Prognostic factors of disease-free survival after thyroidectomy in 170 young patients with a RET germline mutation: a multicenter study of the Groupe Francais d'Etude des Tumeurs Endocrines. J. Clin. Endocrinol. Metab. *96*, E509-518.

Romei, C., Ugolini, C., Cosci, B., Torregrossa, L., Vivaldi, A., Ciampi, R., Tacito, A., Basolo, F., Materazzi, G., Miccoli, P., et al. (2012). Low prevalence of the somatic M918T RET mutation in micro-medullary thyroid cancer. Thyroid *22*, 476–481.

Salci, K.R., Lee, J.-H., Laronde, S., Dingwall, S., Kushwah, R., Fiebig-Comyn, A., Leber, B., Foley, R., Dal Cin, A., and Bhatia, M. (2015). Cellular Reprogramming Allows Generation of Autologous Hematopoietic Progenitors From AML Patients That Are Devoid of Patient-Specific Genomic Aberrations. Stem Cells *33*, 1839–1849.

Saleh-Gohari, N., and Helleday, T. (2004). Conservative homologous recombination preferentially repairs DNA double-strand breaks in the S phase of the cell cycle in human cells. Nucleic Acids Res. *32*, 3683–3688.

Samavarchi-Tehrani, P., Golipour, A., David, L., Sung, H., Beyer, T.A., Datti, A., Woltjen, K., Nagy, A., and Wrana, J.L. (2010). Functional Genomics Reveals a BMP-Driven Mesenchymal-to-Epithelial Transition in the Initiation of Somatic Cell Reprogramming. Cell Stem Cell *7*, 64–77.

Sánchez-Rivera, F.J., and Jacks, T. (2015). Applications of the CRISPR-Cas9 system in cancer biology. Nature Reviews. Cancer *15*, 387.

Sauka-Spengler, T., and Bronner-Fraser, M. (2008). A gene regulatory network orchestrates neural crest formation. Nat Rev Mol Cell Biol *9*, 557–568.

Schlumberger, M., Bastholt, L., Dralle, H., Jarzab, B., Pacini, F., Smit, J.W.A., and European Thyroid Association Task Force (2012). 2012 European thyroid association guidelines for metastatic medullary thyroid cancer. Eur Thyroid J *1*, 5–14.

Schoenhals, M., Kassambara, A., De Vos, J., Hose, D., Moreaux, J., and Klein, B. (2009). Embryonic stem cell markers expression in cancers. Biochem. Biophys. Res. Commun. *383*, 157–162.

Schulz, N., Propst, F., Rosenberg, M.P., Linnoila, R.I., Paules, R.S., Kovatch, R., Ogiso, Y., and 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.

Schwank, G., Koo, B.-K., Sasselli, V., Dekkers, J.F., Heo, I., Demircan, T., Sasaki, N., Boymans, S., Cuppen, E., van der Ent, C.K., et al. (2013). Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. Cell Stem Cell *13*, 653–658.

Scudellari, M. (2016). How iPS cells changed the world. Nature 534, 310–312.

Shakhova, O., Cheng, P., Mishra, P.J., Zingg, D., Schaefer, S.M., Debbache, J., Häusel, J., Matter, C., Guo, T., Davis, S., et al. (2015). Antagonistic cross-regulation between Sox9 and Sox10 controls an anti-tumorigenic program in melanoma. PLoS Genet. *11*, e1004877.

Shalem, O., Sanjana, N.E., Hartenian, E., Shi, X., Scott, D.A., Mikkelsen, T.S., Heckl, D., Ebert, B.L., Root, D.E., Doench, J.G., et al. (2014). Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. Science *343*, 84–87.

Shtukmaster, S., Schier, M.C., Huber, K., Krispin, S., Kalcheim, C., and Unsicker, K. (2013). Sympathetic neurons and chromaffin cells share a common progenitor in the neural crest in vivo. Neural Dev *8*, 12.

Simbolo, M., Mian, C., Barollo, S., Fassan, M., Mafficini, A., Neves, D., Scardoni, M., Pennelli, G., Rugge, M., Pelizzo, M.R., et al. (2014). High-throughput mutation profiling improves diagnostic stratification of sporadic medullary thyroid carcinomas. Virchows Arch.

Simpson, N.E., Kidd, K.K., Goodfellow, P.J., McDermid, H., Myers, S., Kidd, J.R., Jackson, C.E., Duncan, A.M., Farrer, L.A., and Brasch, K. (1987). Assignment of multiple endocrine neoplasia type 2A to chromosome 10 by linkage. Nature *328*, 528–530.

Sipple, J.H. (1961). The association of pheochromocytoma with carcinoma of the thyroid gland. The American Journal of Medicine *31*, 163–166.

Smith, A.G., Heath, J.K., Donaldson, D.D., Wong, G.G., Moreau, J., Stahl, M., and Rogers, D. (1988). Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. Nature *336*, 684–687.

Smith, R.N., Aleksic, J., Butano, D., Carr, A., Contrino, S., Hu, F., Lyne, M., Lyne, R., Kalderimis, A., Rutherford, K., et al. (2012). InterMine: a flexible data warehouse system for the integration and analysis of heterogeneous biological data. Bioinformatics *28*, 3163–3165.

Smith-Hicks, C.L., Sizer, K.C., Powers, J.F., Tischler, A.S., and Costantini, F. (2000). C-cell hyperplasia, pheochromocytoma and sympathoadrenal malformation in a mouse model of multiple endocrine neoplasia type 2B. EMBO J. *19*, 612–622.

Soldner, F., and Jaenisch, R. (2012). iPSC Disease Modeling. Science 338, 1155–1156.

Soldner, F., Laganière, J., Cheng, A.W., Hockemeyer, D., Gao, Q., Alagappan, R., Khurana, V., Golbe, L.I., Myers, R.H., Lindquist, S., et al. (2011). Generation of Isogenic Pluripotent Stem Cells Differing Exclusively at Two Early Onset Parkinson Point Mutations. Cell *146*, 318–331.

Soyombo, A.A., Wu, Y., Kolski, L., Rios, J.J., Rakheja, D., Chen, A., Kehler, J., Hampel, H., Coughran, A., and Ross, T.S. (2013). Analysis of Induced Pluripotent Stem Cells from a BRCA1 Mutant Family. Stem Cell Reports *1*, 336–349.

Spence, J.R., Mayhew, C.N., Rankin, S.A., Kuhar, M.F., Vallance, J.E., Tolle, K., Hoskins, E.E., Kalinichenko, V.V., Wells, S.I., Zorn, A.M., et al. (2011). Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. Nature *470*, 105–109.

Stricker, S.H., Feber, A., Engström, P.G., Carén, H., Kurian, K.M., Takashima, Y., Watts, C., Way, M., Dirks, P., Bertone, P., et al. (2013). Widespread resetting of DNA methylation in glioblastoma-initiating cells suppresses malignant cellular behavior in a lineage-dependent manner. Genes Dev. *27*, 654–669.

Suprynowicz, F.A., Upadhyay, G., Krawczyk, E., Kramer, S.C., Hebert, J.D., Liu, X., Yuan, H., Cheluvaraju, C., Clapp, P.W., Boucher, R.C., et al. (2012). Conditionally reprogrammed cells represent a stem-like state of adult epithelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A *109*, 20035–20040.

Suzuki, K., Yu, C., Qu, J., Li, M., Yao, X., Yuan, T., Goebl, A., Tang, S., Ren, R., Aizawa, E., et al. (2014). Targeted gene correction minimally impacts whole-genome mutational load in human-disease-specific induced pluripotent stem cell clones. Cell Stem Cell *15*, 31–36.

Szinnai, G. (2014). Genetics of normal and abnormal thyroid development in humans. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism *28*, 133–150.

Tahira, T., Ishizaka, Y., Itoh, F., Sugimura, T., and Nagao, M. (1990). Characterization of ret proto-oncogene mRNAs encoding two isoforms of the protein product in a human neuroblastoma cell line. Oncogene *5*, 97–102.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. Cell *126*, 663–676.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell *131*, 861–872.

Takahashi, M., Ritz, J., and Cooper, G.M. (1985). Activation of a novel human transforming gene, ret, by DNA rearrangement. Cell *4*2, 581–588.

Tetreault, M.-P., Yang, Y., and Katz, J.P. (2013). Krüppel-like factors in cancer. Nat. Rev. Cancer *13*, 701–713.

Thomas-Chollier, M., Darbo, E., Herrmann, C., Defrance, M., Thieffry, D., and van Helden, J. (2012). A complete workflow for the analysis of full-size ChIP-seq (and similar) data sets using peak-motifs. Nat Protoc 7, 1551–1568.

Thompson, L.D.R. (2002). Pheochromocytoma of the Adrenal gland Scaled Score (PASS) to separate benign from malignant neoplasms: a clinicopathologic and immunophenotypic study of 100 cases. Am. J. Surg. Pathol. *26*, 551–566.

Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science *282*, 1145–1147.

Thosani, S., Ayala-Ramirez, M., Palmer, L., Hu, M.I., Rich, T., Gagel, R.F., Cote, G., Waguespack, S.G., Habra, M.A., and Jimenez, C. (2013). The Characterization of Pheochromocytoma and Its Impact on Overall Survival in Multiple Endocrine Neoplasia Type 2. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism *98*, E1813–E1819.

Tosca, L., Feraud, O., Magniez, A., Bas, C., Griscelli, F., Bennaceur-Griscelli, A., and Tachdjian, G. (2015). Genomic instability of human embryonic stem cell lines using different passaging culture methods. Mol Cytogenet *8*, 30.

Trimboli, P., Guidobaldi, L., Bongiovanni, M., Crescenzi, A., Alevizaki, M., and Giovanella, L. (2015). Use of fine-needle aspirate calcitonin to detect medullary thyroid carcinoma: A systematic review. Diagn. Cytopathol.

Tulina, N., and Matunis, E. (2001). Control of stem cell self-renewal in Drosophila spermatogenesis by JAK-STAT signaling. Science *294*, 2546–2549.

Tusher, V.G., Tibshirani, R., and Chu, G. (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *98*, 5116–5121.

Unternaehrer, J.J., Zhao, R., Kim, K., Cesana, M., Powers, J.T., Ratanasirintrawoot, S., Onder, T., Shibue, T., Weinberg, R.A., and Daley, G.Q. (2014). The epithelial-mesenchymal transition factor SNAIL paradoxically enhances reprogramming. Stem Cell Reports *3*, 691–698.

Utikal, J., Maherali, N., Kulalert, W., and Hochedlinger, K. (2009). Sox2 is dispensable for the reprogramming of melanocytes and melanoma cells into induced pluripotent stem cells. J. Cell. Sci. *122*, 3502–3510.

Vaquerizas, J.M., Kummerfeld, S.K., Teichmann, S.A., and Luscombe, N.M. (2009). A census of human transcription factors: function, expression and evolution. Nat. Rev. Genet. *10*, 252–263.

Varum, S., Rodrigues, A.S., Moura, M.B., Momcilovic, O., Iv, C.A.E., Ramalho-Santos, J., Houten, B.V., and Schatten, G. (2011). Energy Metabolism in Human Pluripotent Stem Cells and Their Differentiated Counterparts. PLOS ONE *6*, e20914. Verbeek, H.H.G., Alves, M.M., Groot, J.-W.B. de, Osinga, J., Plukker, J.T.M., Links, T.P., and Hofstra, R.M.W. (2011). The Effects of Four Different Tyrosine Kinase Inhibitors on Medullary and Papillary Thyroid Cancer Cells. JCEM *96*, E991–E995.

Verdi, D., Pennelli, G., Galuppini, F., Pelizzo, M.R., and Toniato, A. (2013). Synchronous medullary, papillary and follicular carcinomas in the same thyroid: case report and review of literature. Updates Surg *65*, 329–332.

Veres, A., Gosis, B.S., Ding, Q., Collins, R., Ragavendran, A., Brand, H., Erdin, S., Cowan, C.A., Talkowski, M.E., and Musunuru, K. (2014). Low Incidence of Off-Target Mutations in Individual CRISPR-Cas9 and TALEN Targeted Human Stem Cell Clones Detected by Whole-Genome Sequencing. Cell Stem Cell *15*, 27–30.

Vidal, M., Wells, S., Ryan, A., and Cagan, R. (2005). ZD6474 suppresses oncogenic RET isoforms in a Drosophila model for type 2 multiple endocrine neoplasia syndromes and papillary thyroid carcinoma. Cancer Res. *65*, 3538–3541.

Vierhapper, H., Raber, W., Bieglmayer, C., Kaserer, K., Weinhäusl, A., and Niederle, B. (1997). Routine measurement of plasma calcitonin in nodular thyroid diseases. J. Clin. Endocrinol. Metab. *82*, 1589–1593.

Visvader, J.E. (2011). Cells of origin in cancer. Nature 469, 314–322.

Visvader, J.E., and Lindeman, G.J. (2008). Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. Nat. Rev. Cancer *8*, 755–768.

Visvader, J.E., and Lindeman, G.J. (2012). Cancer Stem Cells: Current Status and Evolving Complexities. Cell Stem Cell *10*, 717–728.

Viswanathan, S.R., Powers, J.T., Einhorn, W., Hoshida, Y., Ng, T.L., Toffanin, S., O'Sullivan, M., Lu, J., Phillips, L.A., Lockhart, V.L., et al. (2009). Lin28 promotes transformation and is associated with advanced human malignancies. Nat. Genet. *41*, 843–848.

Vitagliano, D., Falco, V.D., Tamburrino, A., Coluzzi, S., Troncone, G., Chiappetta, G., Ciardiello, F., Tortora, G., Fagin, J.A., Ryan, A.J., et al. (2011). The tyrosine kinase inhibitor ZD6474 blocks proliferation of RET mutant medullary thyroid carcinoma cells. Endocr Relat Cancer *18*, 1–11.

Wajchenberg, B.L., Mendonca, B.B., Liberman, B., Pereira, M.A., Carneiro, P.C., Wakamatsu, A., and Kirschner, M.A. (1994). Ectopic adrenocorticotropic hormone syndrome. Endocr. Rev. *15*, 752–787.

Wang, H., Yang, H., Shivalila, C.S., Dawlaty, M.M., Cheng, A.W., Zhang, F., and Jaenisch, R. (2013a). One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. Cell *153*, 910–918.

Wang, S., Sun, H., Ma, J., Zang, C., Wang, C., Wang, J., Tang, Q., Meyer, C.A., Zhang, Y., and Liu, X.S. (2013b). Target analysis by integration of transcriptome and ChIP-seq data with BETA. Nat Protoc *8*, 2502–2515.

Wells, S.A., Pacini, F., Robinson, B.G., and Santoro, M. (2013). Multiple endocrine neoplasia type 2 and familial medullary thyroid carcinoma: an update. J. Clin. Endocrinol. Metab. *98*, 3149–3164.

Wells, S.A., Asa, S.L., Dralle, H., Elisei, R., Evans, D.B., Gagel, R.F., Lee, N., Machens, A., Moley, J.F., Pacini, F., et al. (2015a). Revised American Thyroid Association guidelines for the management of medullary thyroid carcinoma. Thyroid *25*, 567–610.

Wells, S.A., Asa, S.L., Dralle, H., Elisei, R., Evans, D.B., Gagel, R.F., Lee, N.Y., Machens, A., Moley, J.F., Pacini, F., et al. (2015b). Revised American Thyroid Association Guidelines for the Management of Medullary Thyroid Carcinoma The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Medullary Thyroid Carcinoma. Thyroid.

Wells, S.A., Asa, S.L., Dralle, H., Elisei, R., Evans, D.B., Gagel, R.F., Lee, N., Machens, A., Moley, J.F., Pacini, F., et al. (2015c). Revised american thyroid association guidelines for the management of medullary thyroid carcinoma. Thyroid *25*, 567–610.

Williams, E.D. (1965). A REVIEW OF 17 CASES OF CARCINOMA OF THE THYROID AND PHAEOCHROMOCYTOMA. J. Clin. Pathol. *18*, 288–292.

Williams, E.D. (1966). Histogenesis of medullary carcinoma of the thyroid. J. Clin. Pathol. *19*, 114–118.

Williams, B.O., Remington, L., Albert, D.M., Mukai, S., Bronson, R.T., and Jacks, T. (1994). Cooperative tumorigenic effects of germline mutations in Rb and p53. Nat. Genet. *7*, 480–484.

Williams, L.A., Davis-Dusenbery, B.N., and Eggan, K.C. (2012). SnapShot: directed differentiation of pluripotent stem cells. Cell *149*, 1174–1174.e1.

Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., and Campbell, K.H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature *385*, 810–813.

Wolfe, H.J., Melvin, K.E., Cervi-Skinner, S.J., Saadi, A.A., Juliar, J.F., Jackson, C.E., and Tashjian, A.H. (1973). C-cell hyperplasia preceding medullary thyroid carcinoma. N. Engl. J. Med. *289*, 437–441.

Wood, A.J., Lo, T.-W., Zeitler, B., Pickle, C.S., Ralston, E.J., Lee, A.H., Amora, R., Miller, J.C., Leung, E., Meng, X., et al. (2011). Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs. Science *333*, 307.

Wu, X., Scott, D.A., Kriz, A.J., Chiu, A.C., Hsu, P.D., Dadon, D.B., Cheng, A.W., Trevino, A.E., Konermann, S., Chen, S., et al. (2014). Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells. Nat. Biotechnol. *32*, 670–676.

Xie, F., Xiao, P., Chen, D., Xu, L., and Zhang, B. (2012). miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. Plant Mol. Biol.

Xu, H., Baroukh, C., Dannenfelser, R., Chen, E.Y., Tan, C.M., Kou, Y., Kim, Y.E., Lemischka, I.R., and Ma'ayan, A. (2013). ESCAPE: database for integrating high-content published data collected from human and mouse embryonic stem cells. Database (Oxford) *2013*, bat045.

Xu, X.M., Fisher, D.A., Zhou, L., White, F.A., Ng, S., Snider, W.D., and Luo, Y. (2000). The transmembrane protein semaphorin 6A repels embryonic sympathetic axons. J. Neurosci. *20*, 2638–2648.

Xu, Y., Zhang, M., Li, W., Zhu, X., Bao, X., Qin, B., Hutchins, A.P., and Esteban, M.A. (2016). Transcriptional Control of Somatic Cell Reprogramming. Trends in Cell Biology *26*, 272–288.

Xue, W., Chen, S., Yin, H., Tammela, T., Papagiannakopoulos, T., Joshi, N.S., Cai, W., Yang, G., Bronson, R., Crowley, D.G., et al. (2014). CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver. Nature *514*, 380–384.

Yang, W. (2014). iPSC reprogramming from human peripheral blood using Sendai Virus mediated gene transfer. StemBook.

Yang, H., Wang, H., and Jaenisch, R. (2014a). Generating genetically modified mice using CRISPR/Cas-mediated genome engineering. Nat Protoc *9*, 1956–1968.

Yang, L., Guell, M., Byrne, S., Yang, J.L., De Los Angeles, A., Mali, P., Aach, J., Kim-Kiselak, C., Briggs, A.W., Rios, X., et al. (2013). Optimization of scarless human stem cell genome editing. Nucleic Acids Res. *41*, 9049–9061.

Yang, L., Grishin, D., Wang, G., Aach, J., Zhang, C.-Z., Chari, R., Homsy, J., Cai, X., Zhao, Y., Fan, J.-B., et al. (2014b). Targeted and genome-wide sequencing reveal single nucleotide variations impacting specificity of Cas9 in human stem cells. Nat Commun *5*, 5507.

Ye, L., Wang, J., Beyer, A.I., Teque, F., Cradick, T.J., Qi, Z., Chang, J.C., Bao, G., Muench, M.O., Yu, J., et al. (2014). Seamless modification of wild-type induced pluripotent stem cells to the natural CCR5 Δ 32 mutation confers resistance to HIV infection. PNAS *111*, 9591–9596.

Yu, J., Vodyanik, M.A., He, P., Slukvin, I.I., and Thomson, J.A. (2006). Human embryonic stem cells reprogram myeloid precursors following cell–cell fusion. Stem Cells *24*, 168–176.

Yuan, H., Myers, S., Wang, J., Zhou, D., Woo, J.A., Kallakury, B., Ju, A., Bazylewicz, M., Carter, Y.M., Albanese, C., et al. (2012). Use of Reprogrammed Cells to Identify Therapy for Respiratory Papillomatosis. N Engl J Med *367*, 1220–1227.

Zambon, A.C., Gaj, S., Ho, I., Hanspers, K., Vranizan, K., Evelo, C.T., Conklin, B.R., Pico, A.R., and Salomonis, N. (2012). GO-Elite: a flexible solution for pathway and ontology over-representation. Bioinformatics *28*, 2209–2210.

Zeltner, N., and Studer, L. (2015). Pluripotent stem cell-based disease modeling: current hurdles and future promise. Curr. Opin. Cell Biol. *37*, 102–110.

Zhang, X., Cruz, F.D., Terry, M., Remotti, F., and Matushansky, I. (2013). Terminal differentiation and loss of tumorigenicity of human cancers via pluripotency-based reprogramming. Oncogene *32*, 2249–2260, 2260-21.

Zhou, Y., and Zeng, F. (2013). Integration-free Methods for Generating Induced Pluripotent Stem Cells. Genomics, Proteomics & Bioinformatics *11*, 284–287.

Zhu, W., Hai, T., Ye, L., and 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.

Zuris, J.A., Thompson, D.B., Shu, Y., Guilinger, J.P., Bessen, J.L., Hu, J.H., Maeder, M.L., Joung, J.K., Chen, Z.-Y., and Liu, D.R. (2015). Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing in vitro and in vivo. Nat Biotech *33*, 73–80.

ANNEXES

Review



Management of advanced medullary thyroid cancer

Julien Hadoux, Furio Pacini, R Michael Tuttle, Martin Schlumberger

Abstract

Lancet Diabetes Endocrinol 2016; 4: 64–71

Published Online October 23, 2015 http://dx.doi.org/10.1016/ S2213-8587(15)00337-X Department of Nuclear Medicine and Endocrine Oncology, Gustave Roussy and University Paris Sud, Villejuif, France (| Hadoux MD, Prof M Schlumberger MD); Department of Medical, Surgical and Neurological Sciences, University of Siena, Via Bracci, Siena, Italy (Prof F Pacini MD); and Endocrinology Service, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY, USA (Prof R M Tuttle MD) Correspondence to: Prof Martin Schlumberger, Department of Nuclear Medicine and Endocrine Oncology, Gustave Roussy, 94805 Villejuif Cedex, France martin.schlumberger@ gustaveroussy.fr

Medullary thyroid cancer arises from calcitonin-producing C-cells and accounts for 3–5% of all thyroid cancers. The discovery of a locally advanced medullary thyroid cancer that is not amenable to surgery or of distant metastases needs careful work-up, including measurement of serum calcitonin and carcinoembryonic antigen (and their doubling times), in addition to comprehensive imaging to determine the extent of the disease, its aggressiveness, and the need for any treatment. In the past, cytotoxic chemotherapy was used for treatment but produced little benefit. For the past 10 years, tyrosine kinase inhibitors targeting vascular endothelial growth factor receptors and RET (rearranged during transfection) have been used when a systemic therapy is indicated for large tumour burden and documented disease progression. Vandetanib and cabozantinib have shown benefits on progression-free survival compared with placebo in this setting, but their toxic effect profiles need thorough clinical management in specialised centres. This Review describes the management and treatment of patients with advanced medullary thyroid cancer with emphasis on current targeted therapies and perspectives to improve patient care. Most treatment responses are transient, emphasising that mechanisms of resistance need to be better understood and that the efficacy of treatment approaches should be improved with combination therapies or other drugs that might be more potent or target other pathways, including immunotherapy.

Introduction

Medullary thyroid cancer arises from calcitoninproducing C-cells and accounts for 3-5% of all thyroid cancers. About 75% of medullary thyroid cancer cases present in sporadic form and the remainder in a hereditary pattern. A germline activating mutation in the RET (rearranged during transfection) proto-oncogene (*RET*) is reported in nearly all cases of hereditary medullary thyroid cancer and a somatic *RET* mutation in up to 50% of sporadic tumours.¹⁻⁵

At initial diagnosis, neck disease is usually amenable to surgery but recurrences are frequent and are often associated with, or precede, the discovery of distant metastases. Advanced medullary thyroid cancer includes patients with a locally advanced disease not amenable to surgery and those with distant metastases. Clinically detected distant metastases are present at diagnosis of medullary thyroid cancer in 4–17% of patients.⁴¹² Although distant metastases are often not clinically detectable they might be present initially in an even larger proportion of patients with medullary thyroid cancer; this might account for persistent high calcitonin levels after complete surgery. Distant metastases will be detected during follow-up in another 18–38% of patients.²¹³

In retrospective series, survival after the discovery of distant metastases is 26% at 5 years and 10% at 10 years.^{6,10} Currently, distant metastases are often found at an early stage when small and could have an indolent course over years or decades, but patients with an aggressive disease might need treatment.

Clinical presentation

Clinical medullary thyroid cancer usually presents as a thyroid nodule that can be associated with palpable lymph node metastases; initial treatment includes a total thyroidectomy and a neck lymph node dissection. Recurrence in the neck after initial surgery occurs mostly in lymph nodes, and more rarely in the thyroid bed and in soft tissues. In some patients with extensive neck disease at the time of initial treatment or at recurrence, surgical resection is not feasible.

Many distant metastases are often noted in involved organs and metastases can simultaneously affect several organs, such as the liver, lungs, and bones and, less frequently, the brain and soft tissues. Symptoms might be associated with local invasion and metastatic sites should be regularly assessed to anticipate and manage any complications. Furthermore, symptoms can also be associated with tumour hormone production-eg, diarrhoea, flushes, or (less frequently) Cushing's syndrome-but quality of life is usually acceptable. Other patients might be asymptomatic and the presence of distant metastases is shown by imaging approaches in the presence of raised serum calcitonin and carcinoembryonic antigen (CEA) concentrations.

Laboratory and radiological assessment Serum markers: calcitonin and CEA doubling times

Calcitonin is a monomeric peptide that is secreted by both normal and neoplastic thyroid C-cells. It is a highly sensitive and specific tumour marker. CEA, which is produced only by neoplastic C-cells, is a less sensitive and less specific tumour marker than calcitonin, but high CEA concentrations are associated with a poor outcome of rapidly progressing disease.

Serial (at least four) measurements of calcitonin and CEA allow the determination of their doubling time (defined as the interval of time in which the level has doubled). Doubling times might vary widely among patients with medullary thyroid cancer, from a few months to several years, but doubling time mostly remains unchanged in a specific patient during their life time. Because serum calcitonin concentration is closely associated with tumour volume, the doubling time is a

www.thelancet.com/diabetes-endocrinology Vol 4 January 2016

strong predictor of tumour progression¹⁴ and survival.¹⁵ A calcitonin doubling time of longer than 6 months is associated with a 5-year survival rate of 92% and a 10-year survival rate of 37%, whereas a calcitonin doubling time of less than 6 months is associated with a 5-year survival rate of 25% and a 10-year survival rate of 8%.^{14,15} In some patients, serum CEA concentration increases progressively, whereas the calcitonin concentration does not, or even decreases, and this difference suggests cellular dedifferentiation. Therefore, both calcitonin and CEA doubling times should be taken into account for prognosis and should also be used to determine the frequency with which imaging is undertaken (figure).

Finally, less than 1% of patients do not produce a substantial amount of calcitonin in blood; these patients often have poorly differentiated medullary thyroid cancer.¹⁶

Imaging

In patients with elevated serum markers, imaging should identify all clinically relevant sites of disease, including tumours in the neck or at distant sites that might need focal intervention. In tumours large enough to be serially assessed to determine progression and response to therapy using Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST 1.1) before starting systemic treatment.¹⁷

In patients with medullary thyroid cancer and detectable calcitonin levels, ultrasonography of the neck (including the thyroid bed and lymph node areas) and the liver is done on a routine basis. In patients with medullary thyroid cancer and postoperative serum calcitonin levels above 150 pg/mL, the higher the calcitonin level the greater the chance that the disease in the neck and at distant sites can be seen on imaging.^{14,18} Distant metastases should be identified with contrast enhanced CT scan of the head, neck, chest, and abdomen. MRI of the brain and liver is preferable because MRI is more sensitive for the detection of liver metastases that can be difficult to visualise with a CT scan during antiangiogenic treatment. Bone scintigraphy and MRI of the spine and pelvis are used to search for bone metastases (figure).1 Fluorodeoxyglucose (18F-FDG) uptake is usually low, and for this reason this method has poor sensitivity; the exception is in a few patients with rapidly progressive medullary thyroid cancer, in whom ¹⁸F-FDG uptake on PET scanning can be high.19,20 PET with 6-18F-fluoro-L-dihydoxyphenylalanine (18F-DOPA) is more sensitive than ¹⁸F-FDG and might show yet unknown metastases.^{21,22}

Assessment of progressive disease

Tumour progression that can be assessed by the doubling times of serum calcitonin and CEA concentrations should be confirmed by imaging before initiation of any systemic treatment. Most kinase inhibitors will decrease the production of calcitonin in the blood by inhibiting the RET protein,²³ but this decrease might not be paralleled by a decrease in tumour size and therefore



Figure: Management algorithm for patients with medullary thyroid cancer who have undergone primary therapy (total thyroidectomy and lymph node dissection) CEA=carcinoembryonic antigen. ^{ai}F-DOPA=6-^{ai}F-fluoro-L-dihydoxyphenylalanine.

ACTH=adrenocorticotropic hormone.

cannot be used alone to assess treatment efficacy. Also, fluctuations of serum calcitonin during treatment should not be regarded as evidence of progression.^{23–25} Only tumour size according to RECIST 1.1 can be used as a criterion for efficacy and deciding whether to continue or withdraw treatment in the presence of toxic effects. Because the best tumour response on imaging during treatment could be stabilisation, progression should be shown by imaging before initiating treatment.

In the absence of treatment, imaging should be repeated every 6 months or at more frequent intervals if the doubling time of tumour markers is reduced.

Treatment approaches in patients with advanced medullary thyroid cancer Therapy of local and regional recurrences

In patients with local and regional recurrence, imaging should identify all clinically relevant sites of disease in the neck, mediastinum, and at distant sites. Surgery is the main treatment for clinical neck recurrences, and might also be indicated in patients with a recurrence in the mediastinum. The indication for surgery should take into account the size and extent of the recurrence and also of distant metastases.¹ If surgical resection of the tumour is not feasible or has been incomplete, external radiation therapy to the neck and mediastinum could be indicated for local tumour control, particularly in the absence of known distant metastases (figure).

Surgery and external radiation therapy to the neck might also be indicated in patients with tumours entering the aerodigestive structures, and could be necessary before initiation of treatment with kinase inhibitors to avoid fatal bleeding. Medullary thyroid carcinomas invading the central airway might be amenable to laser or photodynamic therapy or airway stenting.²⁶

Symptomatic and focal treatments

Symptomatic treatments of diarrhoea include diet recommendations (low residue regimen, no consumption of alcoholic beverages) and treatment with loperamide, diphenoxylate, or atropine methonitrate, and codeine. Interferon α and somatostatin analogues only produced a transient effect on diarrhoea in only a few patients.³⁷ Adequate psychological support should be provided. Control of the rare case of Cushing's syndrome might be achieved by: debulking of large hepatic metastases (eg, by surgery or chemoembolisation); medical therapy using ketoconazole, mifepristone, aminoglutethimide, metyrapone, or mitotane; bilateral adrenalectomy;²⁸ or vandetanib.²⁹

Bisphosphonates (especially zoledronic acid) and the drug denosumab (directed at receptor activator of nuclear factor- κ B ligand) have been shown to improve local pain and to delay time to occurrence of skeletal-related events in other solid tumours with bone metastases.^{30,31} Therefore, these should be used in patients with medullary thyroid cancer who have bone metastases.^{30,31}

Focal treatment approaches are used in patients with local symptoms or those at high risk of local complications, preferably before initiation of systemic treatment, and might help postpone systemic treatment in patients with few metastases that are stable over time. Surgery could be indicated for bone metastases in patients with orthopaedic or neurological complications, or those at high risk of such complications, and in cases in which a single or a few metastases are located in the brain, lungs, or liver (figure). However, medullary thyroid cancer can often cause multiple metastases in each involved organ and surgery is mainly palliative. External radiation therapy can procure rapid relief of bone pain and slow recalcification of bone lesions.³² For brain metastases not amenable to surgery or as first-line treatment, stereotactic irradiation should be the preference over whole brain irradiation whenever possible because life expectancy of patients with metastatic medullary thyroid cancer can be extended and this approach yields fewer neurological complications.³³ In the case of predominant liver metastases, embolisation or chemoembolisation proved to be effective both for symptoms and for reduction of tumour masses in some patients with medullary thyroid cancer.^{34,35} Finally, percutaneous thermal ablation (eg, radiofrequency or cryoablation) for bone (eventually combined with cement injection), lung, or liver metastases is becoming the preferred focal treatment approach for patients with several metastases. Percutaneous thermal ablation is less aggressive than surgical resection, is locally efficient, and can be combined with other focal treatment approaches.³⁶⁻³⁹

Systemic treatment approaches

Candidates for systemic treatments are rare patients with advanced disease, substantial tumour burden (many measurable lesions greater than 1–2 cm in diameter) and progressive lesions in less than 12 months (figure). The annual incidence of these patients is one per 1–1.5 million population.⁴⁰

Treatment with radioactive iodine (¹³¹I) is pointless, because medullary thyroid cancer derives from C-cells, which do not take up iodine. ¹³¹I covalently linked to meta-iodobenzylguanidine could be concentrated by some medullary thyroid cancers but does not offer much benefit. Treatment with bispecific antibodies directed against CEA and diethylene triamine penta-acetic acid (DTPA), with DTPA labelled with ¹³¹I, or with octreotide analogues labelled with yttrium-90 seem to only reduce progression,^{41,42} and haematological and renal toxic effects were frequent.

During cytotoxic chemotherapy, when doxorubicin was used as a single drug or in combination with cisplatin, the response rate was 0-20%.^{43,44} Furthermore, all responses were partial and short-lived (eg, only for a few months). The combination of 5-fluorouracil with dacarbazine seemed to be more effective with a response rate of about 20%.^{45,46} Use of chemotherapy is limited to the few patients with rapidly progressive metastatic disease. In more typical patients with stable or slowly progressive disease, the regimens available seem to offer little, if any, benefit.

Molecular targeted therapies

The two main targets of drugs used in patients with medullary thyroid cancer are the kinases of RET and vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR2). Activating mutations in the RET gene, which encodes a tyrosine kinase receptor, is the main driver mutation in medullary thyroid cancer.⁴³ A germline *RET* mutation is reported in almost all familial forms of medullary thyroid cancer, and a somatic RET mutation is reported in about 50% of sporadic medullary thyroid cancer tumours; of these, 85% are mutations at codon 918, which are associated with a poor outcome.2 Retrovirus associated sequences oncogene (RAS) mutations have been noted in up to 68% of medullary thyroid cancer tumours without RET mutation but are rarely noted in medullary thyroid cancer harbouring a RET mutation.34 Complete gene sequencing did not show any additional recurrent mutation.⁵

www.thelancet.com/diabetes-endocrinology Vol 4 January 2016
Also, vascular endothelial growth factors (VEGF), VEGFR1 (Flt-1), and VEGFR2 (Flk-1 and KDR) are often overexpressed in medullary thyroid cancer tissues, both in tumour cells and supporting vascular endothelium.⁴⁷ Receptors for fibroblast growth factor and for plateletderived growth factor might also play a part in tumour angiogenesis. Hepatocyte growth factor and its receptor, c-met, are frequently overexpressed in medullary thyroid cancer.⁴⁸

The aims of any treatment in oncology are both to improve the quality of life and to extend overall survival. Because it is difficult to show an improved overall survival in patients with a long life expectancy, surrogate parameters (ie, objective response rate and prolongation of progression-free survival) have been used in prospective trials of molecular targeted therapies. However, the objective response rate (partial and complete response rate) is poorly associated with overall survival, and progression-free survival (time between treatment initiation and first documentation of progression or death) is better associated with overall survival.

Efficacy of available treatments

Several drugs that target the kinases of VEGFR2 and RET have produced high response rates in phase 2 trials in patients with metastatic medullary thyroid cancer; all these targeted therapies might provide benefits in selected patients with this cancer (table 1). Among these drugs, only vandetanib⁶⁰ and cabozantinib^{61,62} have been investigated in large phase 3 trials with a primary objective to show increased progression-free survival compared with placebo (table 2).

Vandetanib inhibits kinases of VEGFR2, VEGFR3, RET, and epidermal growth factor receptor (EGFR). In a phase 2 trial that enrolled 30 patients with hereditary medullary thyroid cancer, vandetanib (300 mg/day) induced a partial response in ten patients and stable disease for longer than 24 weeks in another 16 patients (both defined according to RECIST¹⁷).⁴⁹ In the remaining four patients, tumour progression occurred.49 In another phase 2 trial,63 19 patients with hereditary medullary thyroid cancer were treated with vandetanib at 100 mg/day: partial response was noted in three patients and stable disease for longer than 24 weeks in a further ten patients. In the other six patients disease progressed. Subsequently in a different study, vandetanib was reported to be effective in children with multiple endocrine neoplasia 2B and adolescents with metastatic medullary thyroid cancer.64

A randomised phase 3 trial of vandetanib⁶⁰ included 331 patients with locally advanced or metastatic medullary thyroid cancer, but documented progression was not requested in symptomatic patients for inclusion in the trial. Patients were randomly assigned (2:1) to receive vandetanib (300 mg/day) or placebo. The median progression-free survival was significantly extended from 19-3 months in the placebo group to a predicted median of 30.5 months in the vandetanib group (hazard ratio [HR] 0.46; p<0.001); partial responses were noted in 45% of patients, with a predicted median duration of 22 months. Benefits of vandetanib treatment were reported in all subgroups of patients, irrespective of *RET* mutation status, location of metastases, progression rate,

	Targets	Number of patients	Partial response (%)	Progression- free survival (months)
Vandetanib ⁴⁹	VEGFR, RET, EGFR	30	30%	27.9
Sorafenib ⁵⁰	VEGFR, BRAF	19	11%	17.9
Motesanib ⁵¹	VEGFR, PDGFR, c-KIT	83	2%	12.0
Axitinib ⁵²	VEGFRs 1, 2, 3	12	22%	NA
Sunitinib malate53	VEGFR, RET	6	50%	NA
Lenvatinib54	RET, VEGFR, FGFR, PDGFR, c-KIT	59	36%	9.0
Cabozantinib ⁵⁵	VEGFR, RET, c-MET	35	49%	NA
Pazopanib ⁵⁶	VEGFR, PDGFR, RET, c-KIT	35	14%	9.4
Gefitinib ⁵⁷	EGFR	4	0%	NA
Imatinib mesilate ^{58,59}	c-KIT, PDGFR	15, ⁵⁸ 9 ⁵⁹	0%	NA

VEGFR=vascular endothelial growth factor receptor. RET=rearranged during transfection. EGFR=epidermal growth factor receptor. BRAF=murine sarcoma viral oncogene homologue B. PDGFR=platelet-derived growth factor receptor. c-KIT=mast or stem cell growth factor receptor. NA=not applicable. FGFR=fibroblast growth factor receptor. c-MET=hepatocyte growth factor receptor.

Table 1: Phase 2 studies of different tyrosine kinase inhibitor drugs tested in medullary thyroid cancer

	Vandetanib (ZETA study) ⁶⁰	Cabozantinib (EXAM study) ^{61,62}	
Number of patients	331	330	
Randomisation ratio (active treatment: placebo)	2:1	2:1	
Hereditary disease	10%	6%	
RET			
Positive	38%	45%	
Unknown	41%	39%	
RET 918	Not available	35%	
Distant metastasis	94%	95%	
Previous treatment	40%	38%	
Previous tyrosine kinase inhibitors	Unknown	20%	
Progressive disease before enrolment	Not requested	Yes (within 14 months)	
Safety			
Toxic effects (≥grade 3)	55% (24%)	69% (33%)	
Deaths	2% vs 2% (placebo)	5.6 vs 2.8% (placebo)	
Results			
Follow-up	24 months	14 months	
Median PFS	30.5 (estimated) vs 19.3 months (reported)	11.2 vs 4.0 months	
PFS at 6 months	83% vs 63%	Not available	
PFS at 12 months	Not available	47% vs 7%	
Objective response rate	45% vs 13%	28% vs 0%	
Complete response	0%	0%	
Survival	Not available	27 vs 21 months	

Table 2: Summary of phase 3 clinical trials of vandetanib and cabozantinib versus placebo in patients with medullary thyroid cancer or tumour burden at baseline. However, treatment benefit in terms of overall survival was obscured by the possibility of crossover in patients randomly assigned to the placebo group and whose disease progressed.

Cabozantinib (XL-184) inhibits kinases of RET, VEGFR2, and c-met. In a phase 1 trial of patients with medullary thyroid cancer,55 cabozantinib induced a partial response in 17 of 34 evaluable patients and another 15 patients had stable disease.55 Subsequently, a randomised phase 3 trial was completed in 330 patients with metastatic medullary thyroid cancer who had documented progression on imaging within the 14 months before enrolment.⁶² Patients were randomly assigned (2:1) to receive cabozantinib (140 mg daily) or placebo, and no crossover was allowed in cases of progression in the placebo group.62 Estimated median progression-free survival was 11.2 months for cabozantinib versus 4.0 months for placebo (HR 0.28; p<0.001). Extended progression-free survival with cabozantinib was noted in all subgroups irrespective of age, tumour location, tumour burden, progression rate, prior kinase inhibitor treatment (in 20% of patients), and RET and RAS mutation status.⁶⁵ Partial response rate was 28% and median duration of response was 14.7 months. Median overall survival was 26.6 months in the cabozantinib group and $21 \cdot 1$ months in the placebo group (HR 0.85, p=0.2409). In the subgroup of 126 patients with the RET M918T mutation (cabozantinib: n=81, placebo: n=45), partial response rate was 34%, progression-free survival and overall survival were 13.9 months and 44.3 months in patients treated with cabozantinib and 4 months and 18.9 months in patients treated with placebo, respectively (overall survival, HR 0.60, p=0.0255 [not adjusted for multiple subgroup analyses]).61

Adverse events

Adverse events reported with vandetanib use-including diarrhoea, fatigue, skin toxicities (ie, rash and folliculitis, and photosensitisation),66 hypertension, and increase in the QT interval on electrocardiogram (ECG)-were frequent but mainly classified as grade 1 or 2.60 Extension of the QT interval can lead to torsades de pointes and sudden death, therefore great attention was exercised to prevent this occurrence: baseline QTc had to be no longer than 450 ms, electrolyte (potassium, calcium, and magnesium) concentrations were controlled, drugs that might increase QT were not allowed, and QT was checked on ECG at every control visit. However, 12% of patients receiving vandetanib discontinued treatment and 35% required dose reduction because of an adverse event. No evidence has shown that treatment efficacy decreases with reduced doses.63 The use of vandetanib in real life, outside a trial, showed its efficacy and did not disclose any unexpected toxic effects.40

For cabozantinib, adverse events including diarrhoea, abdominal discomfort, hypertension, palmar-plantar

erythrodysaesthesia (hand-foot syndrome), mucositis, decreased weight and appetite, nausea, and fatigue were frequent but mainly classified as grade 1 or 2 in severity. However, 16% of patients receiving cabozantinib discontinued treatment and 79% required dose reduction because of an adverse event.⁶²

Serum concentrations of thyroid-stimulating hormone might increase during treatment with kinase inhibitors, and this should lead to increases in the daily levothyroxine treatment dose. Also, hypocalcaemia can occur during treatment in patients treated for post-surgical hypoparathyroidism, which could necessitate to increases in the calcium and vitamin D analogue supplementation.⁶⁷

Conclusion and perspectives

The reported activity of vandetanib and cabozantinib in phase 3, randomised controlled trials, which included patients with locally advanced or metastatic medullary thyroid cancer that was progressive or aggressive and symptomatic, led to their approval for use from the US Food and Drug Administration (FDA; approved vandetanib in April, 2011, and cabozantinib in November, 2012) and European Medicines Agency (EMA; approved vandetanib in November, 2011, and cabozantinib in March, 2014). The FDA approved vandetanib with risk evaluation and mitigation strategies (REMS) concerning the QTc prolongation, whereas EMA approval was conditional to the production of data that quantified drug benefits in patients with medullary thyroid cancer without RET mutation in their tumour tissue, as well as the development of a programme of risk prevention and assessment. Furthermore, both the FDA and EMA requested additional studies on efficacy and toxic effects of cabozantinib when administered at a lower initial dosage (60 mg/day vs 140 mg/day). The FDA issued an important warning for cabozantinib about the possible development of gastrointestinal fistulas and lifethreatening bleeding.

These expensive drugs should not be used in patients with only detectable markers in blood and no imaging evidence of disease, and in those with small tumour masses (<1 cm in diameter) with no evidence of progression on imaging and who are generally asymptomatic and enjoy a good quality of life. Focal treatment approaches have an important role in the local control of the disease. Thermal ablation or embolisation should be used in patients with local symptoms or those at high risk of complications; it might also allow the initiation of systemic treatment to be postponed. These drugs have substantial toxic effects and could decrease a patient's quality of life, but only partial responses have been noted and treatment once initiated is maintained until side-effects or progression have occurred.

The choice of the drug to be used as first-line treatment (vandetanib or cabozantinib) is still a matter of discussion and should take into account their relative

www.thelancet.com/diabetes-endocrinology Vol 4 January 2016

Search strategy and selection criteria

We searched PubMed with the keywords "medullary thyroid cancer", "advanced/metastatic medullary thyroid cancer", and "molecular-targeted novel therapy of medullary thyroid cancer" for related publications reported between Jan 1, 1980, and June 15, 2015, which we weighted towards those published after 2005 and in English. We also included relevant studies cited in reports identified by this search strategy and relevant work from our own scientific literature collections.

contraindications.⁴⁸ Direct comparison of these two drugs is not possible in the absence of head to head comparison data; both are active and both had several toxic effects. Also, all patients should be considered for participation in clinical trials, even in countries where a drug is approved. These treatment approaches can be given for months or years, therefore education of patients and care providers, frequent controls for their use, symptomatic treatment with drug reduction or withdrawal, and further work to minimise toxic effects are needed.

Another challenge is to determine at what stage the drug should be stopped, either at progression or when there are no more clinical benefits. So far, the decision is based on medical expertise, which takes into account the benefits obtained, tumour growth rate, tolerance, and the patient's wishes. An important aspect is that when progression occurs, patients should not remain for long periods without any treatment and therefore the availability of alternative treatment approaches should also be considered.

The mechanisms of primary resistance and of resistance occurring during treatment are poorly understood. Progression might be associated with insufficient drug doses (which could be shown by pharmacokinetic studies) or with intra-tumour mechanisms (which could be identified by studies on tumour samples taken initially and at progression). Indeed, a RET mutation at codon 804 might induce resistance to vandetanib.69 The drugs used so far are anti-angiogenic and target the RET kinase. The role of the inhibition of each target or of their combined inhibition is unknown, and this issue is even more unclear since responses to vandetanib or cabozantinib have been noted in patients without RET mutation (although both drugs seem to be more effective on tumours with a RET mutation than without), and even in some patients with a RAS mutation.65

Future progress will be made with improvements in the knowledge of targets present in each individual tumour and increases in the number of drugs directed against each of these targets. Additionally, tests need to be done for other drugs or other drug combinations in patients with medullary thyroid cancer,⁷⁰ and sequential treatment approaches or immunotherapy used either alone or in combination with kinase inhibitors. Finally, optimum treatment of this rare disease is by multidisciplinary teams in specialised centres according to guidelines' and in the frame of national and international networks.

Contributors

All authors contributed in literature search, figures, writing, and approved the final and revised versions of the Review.

Declaration of interests

JH, FP, and RMT declare no competing interests. MS declares grants, personal fees, and non-financial support from AstraZeneca, Bayer, Eisai, and Exelixis, all outside the submitted work.

References

- Wells SA Jr, Asa SL, Dralle H, et al, and the American Thyroid Association Guidelines Task Force on Medullary Thyroid Carcinoma. Revised American Thyroid Association guidelines for the management of medullary thyroid carcinoma. *Thyroid* 2015; **25**: 567–610.
- Elisei R, Cosci B, Romei C, et al. Prognostic significance of somatic RET oncogene mutations in sporadic medullary thyroid cancer: a 10-year follow-up study. J Clin Endocrinol Metab 2008; **93**: 682–87.
- 3 Moura MM, Cavaco BM, Pinto AE, Leite V. High prevalence of RAS mutations in RET-negative sporadic medullary thyroid carcinomas. J Clin Endocrinol Metab 2011; 96: E863–68.
- 4 Boichard A, Croux L, Al Ghuzlan A, et al. 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 2012; 97: E2031–35.
- Agrawal N, Jiao Y, Sausen M, et al. Exomic sequencing of medullary thyroid cancer reveals dominant and mutually exclusive oncogenic mutations in RET and RAS. J Clin Endocrinol Metab 2013; 98: E364–69.
- 5 Bergholm U, Bergström R, Ekbom A. Long-term follow-up of patients with medullary carcinoma of the thyroid. *Cancer* 1997; 79: 132–38.
- Esfandiari NH, Hughes DT, Yin H, Banerjee M, Haymart MR. The effect of extent of surgery and number of lymph node metastases on overall survival in patients with medullary thyroid cancer. J Clin Endocrinol Metab 2014; **99**: 448–54.
- 8 Kebebew E, Ituarte PHG, Siperstein AE, Duh Q-Y, Clark OH. Medullary thyroid carcinoma: clinical characteristics, treatment, prognostic factors, and a comparison of staging systems. *Cancer* 2000; 88: 1139–48.
- Mehrotra PK, Mishra A, Mishra SK, Agarwal G, Agarwal A, Verma AK. Medullary thyroid cancer: clinico-pathological profile and outcome in a tertiary care center in North India. World J Surg 2011; 35: 1273–80.
- 10 Modigliani E, Cohen R, Campos J-M, et al. Prognostic factors for survival and for biochemical cure in medullary thyroid carcinoma: results in 899 patients. The GETC Study Group. Groupe d'étude des turneurs à calcitonine. Clin Endocrinol (Oxf) 1998; 48: 265–73.
- Pelizzo MR, Boschin IM, Bernante P, et al. Natural history, diagnosis, treatment and outcome of medullary thyroid cancer: 37 years experience on 157 patients. *Eur J Surg Oncol* 2007; 33: 493–97.
- 12 Saad MF, Ordonez NG, Rashid RK, et al. Medullary carcinoma of the thyroid. A study of the clinical features and prognostic factors in 161 patients. *Medicine (Baltimore)* 1984; 63: 319–42.
- 13 Pazaitou-Panayiotou K, Chrisoulidou A, Mandanas S, Tziomalos K, Doumala E, Patakiouta F. Predictive factors that influence the course of medullary thyroid carcinoma. *Int J Clin Oncol* 2014; 19: 445–51.
- 14 Laure Giraudet A, Al Ghulzan A, Aupérin A, et al. Progression of medullary thyroid carcinoma: assessment with calcitonin and carcinoembryonic antigen doubling times. *Eur J Endocrinol* 2008; 158: 239–46.
- 15 Barbet J, Campion L, Kraeber-Bodéré F, Chatal J-F, and the GTE Study Group. Prognostic impact of serum calcitonin and carcinoembryonic antigen doubling-times in patients with medullary thyroid carcinoma. J Clin Endocrinol Metab 2005; 90: 6077–84.
- 16 Frank-Raue K, Machens A, Leidig-Bruckner G, et al. Prevalence and clinical spectrum of nonsecretory medullary thyroid carcinoma in a series of 839 patients with sporadic medullary thyroid carcinoma. *Thyroid* 2013; 23: 294–300.

- 17 Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). Eur J Cancer 2009; 45: 228–47.
- 18 Machens A, Schneyer U, Holzhausen H-J, Dralle H. Prospects of remission in medullary thyroid carcinoma according to basal calcitonin level. J Clin Endocrinol Metab 2005; 90: 2029–34.
- 19 Giraudet AL, Vanel D, Leboulleux S, et al. Imaging medullary thyroid carcinoma with persistent elevated calcitonin levels. J Clin Endocrinol Metab 2007; 92: 4185–90.
- 20 Ong SC, Schöder H, Patel SG, et al. Diagnostic accuracy of ¹⁸F-FDG PET in restaging patients with medullary thyroid carcinoma and elevated calcitonin levels. J Nucl Med 2007; 48: 501–07.
- 21 Kauhanen S, Schalin-Jäntti C, Seppänen M, et al. Complementary roles of ¹⁸F-DOPA PET/CT and ¹⁸F-FDG PET/CT in medullary thyroid cancer. J Nucl Med 2011; **52**: 1855–63.
- 22 Verbeek HHG, Plukker JTM, Koopmans KP, et al. Clinical relevance of 18F-FDG PET and 18F-DOPA PET in recurrent medullary thyroid carcinoma. J Nucl Med 2012; 53: 1863–71.
- 23 Akeno-Stuart N, Croyle M, Knauf JA, et al. The RET kinase inhibitor NVP-AST487 blocks growth and calcitonin gene expression through distinct mechanisms in medullary thyroid cancer cells. *Cancer Res* 2007; 67: 6956–64.
- 24 Kurzrock R, Atkins J, Wheler J, et al. Tumor marker and measurement fluctuations may not reflect treatment efficacy in patients with medullary thyroid carcinoma on long-term RET inhibitor therapy. *Ann Oncol* 2013; **24**: 2256–61.
- 25 Postel-Vinay S, Schlumberger M, Soria J-C. Tumour markers fluctuations in patients with medullary thyroid carcinoma receiving long-term RET inhibitor therapy: ordinary lapping or alarming waves foreshadowing disease progression? *Ann Oncol* 2013; 24: 2201–04.
- 26 Tsutsui H, Kubota M, Yamada M, et al. Airway stenting for the treatment of laryngotracheal stenosis secondary to thyroid cancer. *Respirology* 2008; 13: 632–38.
- 27 Vitale G, Tagliaferri P, Caraglia M, et al. Slow release lanreotide in combination with interferon-alpha2b in the treatment of symptomatic advanced medullary thyroid carcinoma. J Clin Endocrinol Metab 2000; 85: 983–88.
- 28 Kamenický P, Droumaguet C, Salenave S, et al. Mitotane, metyrapone, and ketoconazole combination therapy as an alternative to rescue adrenalectomy for severe ACTH-dependent Cushing's syndrome. J Clin Endocrinol Metab 2011; 96: 2796–804.
- 29 Baudry C, Paepegaey A-C, Groussin L. Reversal of Cushing's syndrome by vandetanib in medullary thyroid carcinoma. N Engl J Med 2013; 369: 584–86.
- 30 Lipton A, Fizazi K, Stopeck AT, et al. Superiority of denosumab to zoledronic acid for prevention of skeletal-related events: a combined analysis of 3 pivotal, randomised, phase 3 trials. *Eur J Cancer* 2012; 48: 3082–92.
- 31 Wang Z, Qiao D, Lu Y, et al. Systematic literature review and network meta-analysis comparing bone-targeted agents for the prevention of skeletal-related events in cancer patients with bone metastasis. Oncologist 2015; 20: 440–49.
- 32 Tubiana M, Haddad E, Schlumberger M, Hill C, Rougier P, Sarrazin D. External radiotherapy in thyroid cancers. *Cancer* 1985; 55 (suppl): 2062–71.
- 33 Bernad DM, Sperduto PW, Souhami L, Jensen AW, Roberge D. Stereotactic radiosurgery in the management of brain metastases from primary thyroid cancers. J Neurooncol 2010; 98: 249–52.
- 34 Fromigué J, De Baere T, Baudin E, Dromain C, Leboulleux S, Schlumberger M. Chemoembolization for liver metastases from medullary thyroid carcinoma. J Clin Endocrinol Metab 2006; 91: 2496–99.
- 35 Lorenz K, Brauckhoff M, Behrmann C, et al. Selective arterial chemoembolization for hepatic metastases from medullary thyroid carcinoma. *Surgery* 2005; 138: 986–93.
- 36 de Baère T, Aupérin A, Deschamps F, et al. Radiofrequency ablation is a valid treatment option for lung metastases: experience in 566 patients with 1037 metastases. Ann Oncol 2015; 26: 987–91.
- 37 Deschamps F, Farouil G, de Baere T. Percutaneous ablation of bone tumors. Diagn Interv Imaging 2014; 95: 659–63.
- 38 Mohan H, Nicholson P, Winter DC, et al. Radiofrequency ablation for neuroendocrine liver metastases: a systematic review. J Vasc Interv Radiol 2015; 26: 935–42.

- 39 Wertenbroek MW, Links TP, Prins TR, Plukker JTM, van der Jagt EJ, de Jong KP. Radiofrequency ablation of hepatic metastases from thyroid carcinoma. *Thyroid* 2008; 18: 1105–10.
- 40 Chougnet CN, Borget I, Leboulleux S, et al. Vandetanib for the treatment of advanced medullary thyroid cancer outside a clinical trial: results from a French cohort. *Thyroid* 2015; 25: 386–91.
- 41 Iten F, Müller B, Schindler C, et al. Response to [90Yttrium-DOTA]-TOC treatment is associated with long-term survival benefit in metastasized medullary thyroid cancer: a phase II clinical trial. *Clin Cancer Res* 2007; **13**: 6696–702.
- 42 Kraeber-Bodéré F, Goldenberg DM, Chatal JF, Barbet J. Pretargeted radioimmunotherapy in the treatment of metastatic medullary thyroid cancer. *Curr Oncol* 2009; 16: 3–8.
- 43 Shimaoka K, Schoenfeld DA, DeWys WD, Creech RH, DeConti R. A randomized trial of doxorubicin versus doxorubicin plus cisplatin in patients with advanced thyroid carcinoma. *Cancer* 1985; 56: 2155–60.
- 44 Williams SD, Birch R, Einhorn LH. Phase II evaluation of doxorubicin plus cisplatin in advanced thyroid cancer: a Southeastern Cancer Study Group Trial. *Cancer Treat Rep* 1986; 70: 405–07.
- 45 Nocera M, Baudin E, Pellegriti G, Cailleux AF, Mechelany-Corone C, Schlumberger M. 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 2000; 83: 715–18.
- 46 Schlumberger M, Abdelmoumene N, Delisle MJ, Couette JE. Treatment of advanced medullary thyroid cancer with an alternating combination of 5 FU-streptozocin and 5 FU-dacarbazine. The Groupe d'Etude des Turmeurs a Calcitonine (GETC). Br J Cancer 1995; 71: 363–65.
- 47 Capp C, Wajner SM, Siqueira DR, Brasil BA, Meurer L, Maia AL. Increased expression of vascular endothelial growth factor and its receptors, VEGFR-1 and VEGFR-2, in medullary thyroid carcinoma. *Thyroid* 2010; 20: 863–71.
- 48 Papotti M, Olivero M, Volante M, et al. Expression of hepatocyte growth factor (HGF) and its receptor (MET) in medullary carcinoma of the thyroid. *Endocr Pathol* 2000; 11: 19–30.
- 49 Wells SA Jr, Gosnell JE, Gagel RF, et al. Vandetanib for the treatment of patients with locally advanced or metastatic hereditary medullary thyroid cancer. J Clin Oncol 2010; 28: 767–72.
- 50 Lam ET, Ringel MD, Kloos RT, et al. Phase II clinical trial of sorafenib in metastatic medullary thyroid cancer. J Clin Oncol 2010; 28: 2323–30.
- 51 Schlumberger MJ, Elisei R, Bastholt L, et al. Phase II study of safety and efficacy of motesanib in patients with progressive or symptomatic, advanced or metastatic medullary thyroid cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27: 3794–801.
- 52 Cohen EEW, Rosen LS, Vokes EE, et al. Axitinib is an active treatment for all histologic subtypes of advanced thyroid cancer: results from a phase II study. J Clin Oncol 2008; 26: 4708–13.
- 53 Carr LL, Mankoff DA, Goulart BH, et al. Phase II study of daily sunitinib in FDG-PET-positive, iodine-refractory differentiated thyroid cancer and metastatic medullary carcinoma of the thyroid with functional imaging correlation. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 5260–68.
- 54 Schlumberger M, Jarzab B, Cabanillas ME, et al. A phase II trial of the multitargeted kinase inhibitor lenvatinib (E7080) in advanced medullary thyroid cancer (MTC). *Clin Cancer Res* 2015; published online Aug 26. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-15-1127.
- 55 Kurzrock R, Sherman SI, Ball DW, et al. Activity of XL184 (Cabozantinib), an oral tyrosine kinase inhibitor, in patients with medullary thyroid cancer. J Clin Oncol 2011; 29: 2660–66.
- 56 Bible KC, Suman VJ, Molina JR, et al, and the Endocrine Malignancies Disease Oriented Group, Mayo Clinic Cancer Center, and the Mayo Phase 2 Consortium. A multicenter phase 2 trial of pazopanib in metastatic and progressive medullary thyroid carcinoma: MC057H. J Clin Endocrinol Metab 2014; 99: 1687–93.
- 57 Pennell NA, Daniels GH, Haddad RI, et al. A phase II study of gefitinib in patients with advanced thyroid cancer. *Thyroid* 2008; 18: 317–23.
- 58 Frank-Raue K, Fabel M, Delorme S, Haberkorn U, Raue F. Efficacy of imatinib mesylate in advanced medullary thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol* 2007; 157: 215–20.

www.thelancet.com/diabetes-endocrinology Vol 4 January 2016

- 59 de Groot JWB, Zonnenberg BA, van Ufford-Mannesse PQ, et al. A phase II trial of imatinib therapy for metastatic medullary thyroid carcinoma. J Clin Endocrinol Metab 2007; 92: 3466–69.
- 60 Wells SA Jr, Robinson BG, Gagel RF, et al. Vandetanib in patients with locally advanced or metastatic medullary thyroid cancer: a randomized, double-blind phase III trial. *J Clin Oncol* 2012; 30: 134–41.
- 61 Schlumberger M, Elisei R, Müller SP, et al. Final overall survival analysis of EXAM, an international, double-blind, randomized, placebo-controlled phase III trial of cabozantinib (Cabo) in medullary thyroid carcinoma (MTC) patients with documented RECIST progression at baseline. J Clin Oncol 2015; 33 (suppl 5): abstr 6012.
- 62 Elisei R, Schlumberger MJ, Müller SP, et al. Cabozantinib in progressive medullary thyroid cancer. J Clin Oncol 2013; 31: 3639–46.
- 63 Robinson BG, Paz-Ares L, Krebs A, Vasselli J, Haddad R. Vandetanib (100 mg) in patients with locally advanced or metastatic hereditary medullary thyroid cancer. J Clin Endocrinol Metab 2010; 95: 2664–71.
- 64 Fox E, Widemann BC, Chuk MK, et al. Vandetanib in children and adolescents with multiple endocrine neoplasia type 2B associated medullary thyroid carcinoma. *Clin Cancer Res* 2013; 19: 4239–48.

- 65 Sherman SI, Cohen EEW, Schoffski P, et al. Efficacy of cabozantinib (Cabo) in medullary thyroid cancer (MTC) patients with RAS or RET mutations: results from a phase III study. J Clin Oncol 2013; 31 (suppl): abstr 6000.
- 66 Giacchero D, Ramacciotti C, Arnault JP, et al. A new spectrum of skin toxic effects associated with the multikinase inhibitor vandetanib. Arch Dermatol 2012; 148: 1418–20.
- 67 Brassard M, Neraud B, Trabado S, et al. Endocrine effects of the tyrosine kinase inhibitor vandetanib in patients treated for thyroid cancer. J Clin Endocrinol Metab 2011; 96: 2741–49.
- 68 Cabanillas ME, Hu MI, Jimenez C. Medullary thyroid cancer in the era of tyrosine kinase inhibitors: to treat or not to treat—and with which drug—those are the questions. J Clin Endocrinol Metab 2014; 99: 4390–96.
- 69 Carlomagno F, Guida T, Anaganti S, et al. Disease associated mutations at valine 804 in the RET receptor tyrosine kinase confer resistance to selective kinase inhibitors. *Oncogene* 2004; 23: 6056–63.
- 70 Hong DS, Cabanillas ME, Wheler J, et al. Inhibition of the Ras/Raf/ MEK/ERK and RET kinase pathways with the combination of the multikinase inhibitor sorafenib and the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in medullary and differentiated thyroid malignancies. J Clin Endocrinol Metab 2011; 96: 997–1005.

www.thelancet.com/diabetes-endocrinology Vol 4 January 2016

Annexe 2: Séquences des plasmides décrits dans le manuscrit

pAAVS1_CAGGS_Luciférase_IRES_GFP_polyA, 11642 bp

 ${\tt CCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTATG$ ACCATGATTACGCCAAGCTCAGAATTAACCCTCACTAAAGGGACTAGTCCTGCAGGTTTAAACGAATTCGCCCTTTGCTTTCT CCTTCCCTGCCGCCTCCTTCAGGTTCCGTCTTCCTCCACTCCTCTTCCCCCTTGCTCTCTGCTGTGTTGCTGCCCCAAGGATGC TCTTTCCGGAGCACTTCCTTCTCGGCGCTGCACCACGTGATGTCCTCTGAGCGGATCCTCCCCGTGTCTGGGTCCTCCCGGG CATCTCTCCCCCCCCAACCCCATGCCGTCTTCACTCGCTGGGTTCCCTTTTCCTTCTCGGGGCCTGTGCCATCT CTCGTTTCTTAGGATGGCCTTCTCCGACGGATGTCTCCCTTGCGTCCCGCCTCCCTTCTTGTAGGCCTGCATCATCACCGTT ${\tt TCTCCTGTGGATTCGGGTCACCTCTCACTCCTTTCATTTGGGCAGCTCCCCTACCCCCTTACCTCTCTAGTCTGTGCTAGCT$ CTTCCAGCCCCTGTCATGGCATCTTCCAGGGGTCCGAGAGCTCAGCTAGTCTTCTTCCTCCAACCCGGGCCCCTATGTCCAC TTCAGGACAGCATGTTTGCTGCCTCCAGGGATCCTGTGTCCCCGAGCTGGGACCACCTTATATTCCCAGGGCCGGTTAATGTG GCTCTGGTTCTGGGTACTTTTATCTGTCCCCTCCACCCCACAGTGGGGCAAGCTTCTGACCTCTTCTCCTCCCCACAGGGC CTCGAGAGATCTGGCAGCGGAGAGGGCAGAGGGAGGAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCCGGCCCTAGGCTCGA GATGACCGAGTACAAGCCCACGGTGCGCCTCGCCACCGCGACGACGTCCCCAGGGCCGTACGCACCCTCGCCGCCGCGTTCG CCGACTACCCCGCCACGCCACACCGTCGATCCGGACCGCCACATCGAGCGGGTCACCGAGCTGCAAGAACTCTTCCTCACG AGCGGGGGGGGGTGTTCGCCGAGATCGGCCCGCGCATGGCCGAGTTGAGCGGTTCCCGGCTGGCCGCGCAGCAACAGATGGAAG GCCTCCTGGCGCCGCACCGGCCCAAGGAGCCCGCGTGGTTCCTGGCCACCGTCGGCGTCTCGCCCGACCACCAGGGCAAGGGT CTGGGCAGCGCCGTCGTGCTCCCCGGAGTGGAGGCGGCCGAGCGCGCGGGGTGCCCGCCTTCCTGGAGACCTCCGCGCCCCG CAACCTCCCCTTCTACGAGCGGCTCGGCTTCACCGTCACCGCCGACGTCGAGGTGCCCGAAGGACCGCGCACCTGGTGCATGA GTTGTTTGCCCCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGC GCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGGTCTCGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGT CATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCC CGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTT ACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGC CCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCCGCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG TTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTTGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCG TGCAACCCCCCTGCACCCCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTACGGGGCGTGGCGCG AAGATGGAACCGCTGGAGAGCAACTGCATAAGGCTATGAAGAGATACGCCCTGGTTCCTGGAACAATTGCTTTTACAGATGCA

CATATCGAGGTGGACATCACTTACGCTGAGTACTTCGAAATGTCCGTTCGGTTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGGGCTGAA ${\tt CAGTTGCGCCCGCGAACGACATTTATAATGAACGTGAATTGCTCAACAGTATGGGCATTTCGCAGCCTACCGTGGTGTTCGTT$ GGATTACCAGGGATTTCAGTCGATGTACACGTTCGTCACATCTCATCTACCTCCCGGTTTTAATGAATACGATTTTGTGCCAG AGTCCTTCGATAGGGACAAGACAATTGCACTGATCATGAACTCCTCTGGATCTACTGGTCTGCCTAAAGGTGTCGCCTCTGCCT CATAGAACTGCCTGCGTGAGATTCTCGCATGCCAGAGATCCTATTTTTGGCAATCAAATCATTCCGGATACTGCGATTTTAAG TGTTGTTCCATTCCATCACGGTTTTGGAATGTTTACTACACTCGGATATTTGATATGTGGATTTCGAGTCGTCTTAATGTATA GATTTGAAGAAGAAGACCTGTTCCTGAGGAGCCTTCAGGATTACAAGATTCAAAGTGCGCTGCTGGTGCCAACCCTATTCTCCTTC TTCGCCAAAAGCACTCTGATTGACAAATACGATTTATCTAATTTACACGAAATTGCTTCTGGTGGCGCTCCCCTCTCTAAGGA AGTCGGGGAAGCGGTTGCCAAGAGGTTCCATCTGCCAGGTATCAGGCAAGGATATGGGCTCACTGAGACTACATCAGCTATTC GGAAGCGACCAACGCCTTGATTGACAAGGATGGATGGCTACATTCTGGAGACATAGCTTACTGGGACGAAGACGAACACTTCT TCATCGTTGACCGCCTGAAGTCTCTGATTAAGTACAAAGGCTATCAGGTGGCTCCCGCTGAATTGGAATCCATCTTGCTCCAA CACCCCAACATCTTCGACGCAGGTGTCGCAGGTCTTCCCGACGATGACGCCGGTGAACTTCCCGCCGCCGTTGTTGTTTTGGA GCACGGAAAGACGATGACGGAAAAAGAGATCGTGGATTACGTCGCCAGTCAAGTAACAACCGCGAAAAAGTTGCGCGGAGGAG TTGTGTTTGTGGACGAAGTACCGAAAGGTCTTACCGGAAAACTCGACGCAAGAAAATCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAG GTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCT CCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAG TCAAATGGCTCTCCTCAAGGGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGG ${\tt CCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAAACGTCTAGGCCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCCT}$ TTGAAAAACACGATGATAATATGGCCACAACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTC GAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCT GAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCA GCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTC TTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGG CATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCG ACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTAC CAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCCGGCCCCTGAGCAAAGA CCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACA AGTAATGAGGATCCACGCGTGAATTCACTCCTCAGGTGCAGGCTGCCTATCAGAAGGTGGTGGCTGGTGGCCCAATGCCCTG GCTCACAAATACCACTGAGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCCTTGAGCATCTGACTTCTGG ${\tt CTAATAAAGGAAATTTATTTCATTGCAATAGTGTGTGTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAA}$ CTATAAAGAGGTCATCAGTATATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCCTTATTCCATAGAAAAGCCTTGACTTGAGGTTAGAT TCCTCTCCTGACTACTCCCAGTCATAGCTGTCCCCTCTTCTCTTATGGAGATCCCTCGACCTGCAGCCCAAGCCTTGGCGTAATC ATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAG ${\tt CCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGC$ ${\tt TCCTGATATTGGGTCTAACCCCCACCTCCTGTTAGGCAGATTCCTTATCTGGTGACACACCCCCATTTCCTGGAGCCATCTCT}$ AAGGGGGGGATGCGTGACCTGCCCGGTTCTCAGTGGCCACCCTGCGCTACCCTCTCCCAGAACCTGAGCTGCTCTGACGCGGC TGTCTGGTGCGTTTCACTGATCCTGGTGCTGCAGCTTCCTTACACTTCCCAAGAGAAGAAGCAGTTTGGAAAAACAAAATCAG AATAAGTTGGTCCTGAGTTCTAACTTTGGCTCTTCACCTTTCTAGTCCCCAATTTATATTGTTCCTCCGTGCGTCAGTTTTAC GAGAATGGTGCGTCCTAGGTGTTCACCAGGTCGTGGCCGCCTCTACTCCCTTTCTCTTTCCCATCCTTTCCTTAAAGAG TCCCCAGTGCTATCTGGGACATATTCCTCCGCCCAGAGCAGGGTCCCGCTTCCCTAAGGCCCTGCTCTGGGCTTCTGGGTTTG AGTCCTTGGCAAGCCCAGGAGAGGCGCTCAGGCTTCCCTGTCCCCCTTCCTCGTCCACCATCTCATGCCCCTGGCTCTCCTGC ${\tt CCCTTCCCTACAGGGGTTCCTGGCTCTGCTCTAAGGGCAAGGGCGAATTCGCGGCCGCTAAATTCAATTCGCCCTATAGTGAG$ TCGTATTACAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAAACCCTGGCGTTACCCCAACTTAATCGCCCTTGCAGC ACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTATACGTAC GGCAGTTTAAGGTTTACACCTATAAAAGAGAGAGAGCCGTTATCGTCTGTTTGTGGATGTACAGAGTGATATTATTGACACGCCG GGGCGACGGATGGTGATCCCCCTGGCCAGTGCACGTCTGCTGTCAGATAAAGTCTCCCGTGAACTTTACCCGGTGGTGCATAT CGGGGATGAAAGCTGGCGCATGATGACCACCGATATGGCCAGTGTGCCGGTCTCCGTTATCGGGGAAGAAGTGGCTGATCTCA GCCACCGCGAAAATGACATCAAAAAACGCCATTAACCTGATGTTCTGGGGAATATAAATGTCAGGCATGAGATTATCAAAAAGG ATCTTCACCTAGATCCTTTTCACGTAGAAAGCCAGTCCGCAGAAACGGTGCTGACCCCGGATGAATGTCAGCTACTGGGCTAT CTGGACAAGGGAAAACGCAAGCGCAAAGAGAAAGCAGGTAGCTTGCAGTGGGCTTACATGGCGATAGCTAGACTGGGCGGTTT TATGGACAGCAAGCGAACCGGAATTGCCAGCTGGGGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCTGCAAAGTAAACTGGATGGCT TTCTTGCCGCCAAGGATCTGATGGCGCAGGGGGATCAAGCTCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACA AGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCT ${\tt CTGCAAGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGC}$ GGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCCCTGCCGAGAAAGTATCCA CGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCCTCGCGCCAGCCGAACT ATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGC TACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTCGC AGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAATTATTAACGCTTACAATTTCCTGATGCGGTATTTTCTCCCTT ACGCATCTGTGCGGTATTTCACACCGCATCAGGTGGCACTTTTCGGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCT AAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTT TCTATTTCGTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTG AACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGT AAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTC TGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGG ATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTA ${\tt CCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGG$ GTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAAATGCCGCAAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTT TTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCA GCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATAC CAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACCTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTA ATCCTGTTACCAGTGGCTGCCGGTGGCCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGC

pX330_gRNA AAVS1_Chimeric_hSpCas9

AAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACC GGGGCCACTAGGACAGGATGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGC ACCGAGTCGGTGCTTTTTTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTTTTAGCGCGTGCGCCAATTC TGCAGACAAATGGCTCTAGAGGTACCCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCC ATTGACGTCAATAGCAACCCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAG TACATCAAGTGTATCATATGCCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTGTGCCCAGTAC ATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTT GCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCGCCGCAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGC CTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCTGAGCAAGAGGTAAGGGTT TGCCACCATGGACTATAAGGACCACGACGGAGACTACAAGGATCATGATATTGATTACAAAGACGATGACGATAAGATGGCCC CAAAGAAGAAGCGGAAGGTCGGTATCCACGGAGTCCCAGCAGCCGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAAC TCTGTGGGCCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCCAGCAAGAAATTCAAGGTGCTGGGCAACACCGGCCACAG CATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTCGACAGCGGCGAAACAGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGAAGAACCGCCAGAA TTCCACAGACTGGAAGAGTCCTTCCTGGTGGAAGAGGGTAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGA TGATCTATCTGGCCCTGGCCCACATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGAC GTGGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTCGAGGAAAACCCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGC CAAGGCCATCCTGTCTGCCAGACTGAGCAAGAGCAGACGGCTGGAAAATCTGATCGCCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAAGAATG GCCTGTTCGGAAACCTGATTGCCCTGAGCCTGGGCCTGACCCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGATGCCAAA CTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCGACCAGTACGCCGACCTGTTTCT GGCCGCCAAGAACCTGTCCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCTGAGCG CCTCTATGATCAAGAGATACGACGAGCACCACGAGCACCTGACCCTGACAGAAGCTCTCGTGCGGCAGCAGCAGCTGAGAAG GTTCATCAAGCCCATCCTGGAAAAGATGGACGGCACCGAGGAACTGCTCGTGAAGCTGAACAGAGAGGACCTGCTGCGGAAGC AGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCCACCAGATCCACCTGGGAGAGCTGCACGCCATTCTGCGGCGGCAGGAAGATTTT GGGAAACAGCAGATTCGCCTGGATGACCAGAAAGAGCGAGGAAACCATCACCCCCTGGAACTTCGAGGAAGTGGTGGACAAGG GCGCTTCCGCCCAGAGCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGATAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTGCCCAAGCACAGC CTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTATAACGAGCTGACCAAAGTGAAATACGTGACCGAGGGAATGAGAAAGCCCGCCTTCCT

GAGCGGCGAGCAGAAAAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAAGTGACCGTGAAGCAGCTGAAAGAGGACT ACTTCAAGAAAATCGAGTGCTTCGACTCCGTGGAAATCTCCGGCGTGGAAGATCGGTTCAACGCCTCCCCTGGGCACATACCAC GATCTGCTGAAAATTATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAATGAGGAAAACGAGGACATTCTGGAAGATATCGTGCTGACCCT GACACTGTTTGAGGACAGAGAGAGATGATCGAGGAACGGCTGAAAACCTATGCCCCACCTGTTCGACGACAAAGTGATGAAGCAGC TGAAGCGGCGGAGATACACCGGCTGGGGCAGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTCCGGCAAGACA ATCCTGGATTTCCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACAGAAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAAGA GGACATCCAGAAAGCCCAGGTGTCCGGCCAGGGCGATAGCCTGCACGAGCACATTGCCAATCTGGCCGGCAGCCCCGCCATTA AGAAGGGCATCCTGCAGACAGTGAAGGTGGTGGACGAGCTCGTGAAAGTGATGGGCCCGGCACAAGCCCCGAGAACATCGTGATC GAAATGGCCAGAGAGAACCAGACCACCAGAAGGGACAGAAGAACAGCCGCGAGAGAATGAAGCGGATCGAAGAGGGCATCAA AGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAACACCCCGTGGAAAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGC AGAATGGGCGGGATATGTACGTGGACCAGGAACTGGACATCAACCGGCTGTCCGACTACGATGTGGACCATATCGTGCCTCAG AGCTTTCTGAAGGACGACTCCATCGACAACAAGGTGCTGACCAGAAGCGACAAGAACCGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCCTC CGAAGAGGTCGTGAAGAAGATGAAGAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTCGACAATC TGACCAAGGCCGAGAGAGGCGGCCTGAGCGAACTGGATAAGGCCGGCTTCATCAAGAGACAGCTGGTGGAAACCCGGCAGATC ACAAAGCACGTGGCACAGATCCTGGACTCCCGGATGAACACTAAGTACGACGAGAATGACAAGCTGATCCGGGAAGTGAAAGT GATCACCCTGAAGTCCAAGCTGGTGTCCGATTTCCGGAAGGATTTCCAGTTTTACAAAGTGCGCGGAGATCAACAACTACCACC ACGCCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTCGTGGGAACCGCCCTGATCAAAAAGTACCCTAAGCTGGAAAGCGAGTTCGTGTAC CTACAGCAACATCATGAACTTTTTCAAGACCGAGATTACCCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCTCTGATCGAGACAA ACGGCGAAAACCGGGGAGATCGTGTGGGATAAGGGCCGGGATTTTGCCACCGTGCGGAAAGTGCTGAGCATGCCCCAAGTGAAT ATCGTGAAAAAGACCGAGGTGCAGACAGGCGGCTTCAGCAAAGAGTCTATCCTGCCCAAGAGGAACAGCGATAAGCTGATCGC CAGAAAGAAGGACTGGGACCCTAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTATTCTGTGCTGGTGGTGGCCCAAAG TGGAAAAGGGCAAGTCCAAGAAACTGAAGAGTGTGAAAGAGCTGCTGGGGATCACCATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAGAAG AATCCCATCGACTTTCTGGAAGCCAAGGGCTACAAAGAAGTGAAAAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCTAAGTACTCCCTGTT CGAGCTGGAAAACGGCCGGAAGAGAATGCTGGCCTCTGCCGGCGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCCCTGCCCTCCAAAT ATGTGAACTTCCTGTACCTGGCCAGCCACTATGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCCGAGGATAATGAGCAGAAACAGCTGTTTGTG GAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAGTTCTCCAAGAGAGTGATCCTGGCCGACGCTAATCT GGACAAAGTGCTGTCCGCCTACAACAAGCACCGGGATAAGCCCATCAGAGAGCAGGCCGAGAATATCATCCACCTGTTTACCC TGACCAATCTGGGAGCCCCTGCCGCCTTCAAGTACTTTGACACCACCATCGACCGGAAGAGGTACACCAGCACCAAAGAGGTG CTGGACGCCACCCTGATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACACGGATCGACCTGTCTCAGCTGGGAGGCGACAAAAG GCCGGCCGCCACGAAAAAGGCCGGCCAGGCAAAAAAGAAAAGTAAGAATTCCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCC AATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGGTGGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGG GAGGATTGGGAAGAGAATAGCAGGCATGCTGGGGAGCGGCCGCAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTGCG CGCGCAGCTGCCTGCAGGGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTCACACCGCATACGTCAAAGC AACCATAGTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTGGTGACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGC GCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGATTTGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGC ${\tt CATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACA}$ ACACTCAACCCTATCTCGGGCCTATTCTTTTGGTTTATAGGGGATTTTTGCCGGATTTCGGCCCTATTGGTTAAAAATGAGCTGAT TTAACAAAAATTTTAACGCGAATTTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTTATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATG CCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCCGCCAACACCCCGCTGACGCGCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCCGGCATCCGCTTAC AGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTTCACCGTCATCACCGAAAACGCGCGAGACGAAAAGGGCCT ${\tt CGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGC$ GCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGATAAATGCTTCAA

TAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGT TTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATC TCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGC GCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTC ACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTG CGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGGATCATGTAACTCGC CTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAAC CAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCGGCTGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGAAGCCGCGGT ATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGA ACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTT AGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAA TAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTA GCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGA CTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGA CCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCG GTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTT TTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGT

pX330_gRNA RET634_Chimeric_hSpCas9

AAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTA AAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACC GGTGCGACGAGCTGTACCGCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGG ${\tt CTGCAGACAAATGGCTCTAGAGGTACCCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCC$ CATTGACGTCAATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCA CATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGT GGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCCCCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCG ACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCTGAGCAAGAGGTAAGGGT TTAAGGGATGGTTGGTTGGTGGGGGTATTAATGTTTAATTACCTGGAGCACCTGCTGAAATCACTTTTTTTCAGGTTGGACCG GTGCCACCATGGACTATAAGGACCACGACGGAGACTACAAGGATCATGATATTGATTACAAAGACGATGACGATAAGATGGCC CCAAAGAAGAAGAAGCAGGAAGGTCGGTATCCACGGAGTCCCAGCAGAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAA GCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTCGACAGCGGCGAAACAGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGAGAACCGCCAGA AGAAGATACACCAGACGGAAGAACCGGATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTT CTTCCACAGACTGGAAGAGTCCTTCCTGGTGGAAGAGGATAAGAAGCACGAGCGCGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACG

 ${\tt CTGATCTATCTGGCCCTGGCCCACATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGA$ CGTGGACAAGCTGTTCATCCAGCTGCAGACCTACAACCAGCTGTTCGAGGAAAAACCCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACG CCAAGGCCATCCTGTCTGCCAGACTGAGCAAGAGCAGACGGCTGGAAAATCTGATCGCCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAAT GCCCTGTTCGGAAACCTGATTGCCCTGAGCCTGGGCCTGACCCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGATGCCAA ACTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCGACCAGTACGCCGACCTGTTTC TGGCCGCCAAGAACCTGTCCGACGCCATCCTGAGCGACATCCTGAGAGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCTGAGC GCCTCTATGATCAAGAGATACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCTGCTGAAAGCTCTCGTGCGGCAGCAGCTGCCTGAGAA AGTTCATCAAGCCCATCCTGGAAAAAGATGGACGGCACCGAGGAACTGCTCGTGAAGCTGAACAGAGAGGACCTGCCGGGAAG CAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCCACCAGATCCACCTGGGAGAGCTGCACGCCATTCTGCGGCGGCAGGAAGATTT TTACCCATTCCTGAAGGACAACCGGGAAAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGCATCCCCTACTACGTGGGCCCTCTGGCCA GGGGAAACAGCAGATTCGCCTGGATGACCAGAAAGAGCGAGGAAACCATCACCCCCTGGAACTTCGAGGAAGTGGTGGACAAG GGCGCTTCCGCCCAGAGCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGATAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTGCCCAAGCACAG CCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTATAACGAGCTGACCAAAGTGAAATACGTGACCGAGGGAATGAGAAAGCCCGCCTTCC TGAGCGGCGAGCAGAAAAAGGCCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAAGTGACCGTGAAGCAGCTGAAAGAGGAC TACTTCAAGAAAATCGAGTGCTTCGACTCCGTGGAAATCTCCGGCGTGGAAGATCGGTTCAACGCCTCCCTGGGCACATACCA CGATCTGCTGAAAATTATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAATGAGGAAAACGAGGACATTCTGGAAGATATCGTGCTGACCC TGACACTGTTTGAGGACAGAGAGATGATCGAGGAACGGCTGAAAACCTATGCCCACCTGTTCGACGACAAAGTGATGAAGCAG CTGAAGCGGCGGAGATACACCGGCTGGGGCAGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTCCGGCAAGAC AATCCTGGATTTCCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACAGAAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACGACGACCTGACCTTTAAAG AGGACATCCAGAAAGCCCAGGTGTCCGGCCAGGGCGATAGCCTGCACGAGCACATTGCCAATCTGGCCGGCAGCCCCGCCATT AAGAAGGGCATCCTGCAGACAGTGAAGGTGGTGGACGACGAGCTCGTGAAAGTGATGGGCCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGAT CGAAATGGCCAGAGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGACAGAAGAACAGCCGCGAGAGAATGAAGCGGATCGAAGAGGGCATCA AAGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAACACCCCGTGGAAAACACCCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTG CAGAATGGGCGGGATATGTACGTGGACCAGGAACTGGACATCAACCGGCTGTCCGACTACGATGTGGACCATATCGTGCCTCA GAGCTTTCTGAAGGACGACTCCATCGACAACAAGGTGCTGACCAGAAGCGACAAGAACCGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCCT CCGAAGAGGTCGTGAAGAAGATGAAGAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTCGACAAT CTGACCAAGGCCGAGAGAGGCGGCCTGAGCGAACTGGATAAGGCCGGCTTCATCAAGAGACAGCTGGTGGAAACCCGGCAGAT CACAAAGCACGTGGCACAGATCCTGGACTCCCGGATGAACACTAAGTACGACGAGAATGACAAGCTGATCCGGGAAGTGAAAG TGATCACCCTGAAGTCCAAGCTGGTGTCCGATTTCCGGAAGGATTTTCCAGTTTTACAAAGTGCGCGGAGATCAACAACTACCAC CACGCCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTCGTGGGAACCGCCCTGATCAAAAAGTACCCCTAAGCTGGAAAGCGAGTTCGTGTA TCTACAGCAACATCATGAACTTTTTCAAGACCGAGATTACCCTGGCCAACGGCGAGATCCCGGAAGCCGCCTCTGATCGAGACA AACGGCGAAACCGGGGAGATCGTGTGGGATAAGGGCCGGGATTTTGCCACCGTGCGGAAAGTGCTGAGCATGCCCCAAGTGAA TATCGTGAAAAAGACCGAGGTGCAGACAGGCGGCTTCAGCAAAGAGTCTATCCTGCCCAAGAGGAACAGCGATAAGCTGATCG CCAGAAAGAAGGACTGGGACCCTAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTATTCTGTGCTGGTGGTGGCCCAAA GTGGAAAAGGGCAAGTCCAAGAAACTGAAGAGTGTGAAAGAGCTGCTGGGGATCACCATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAGAA GAATCCCATCGACTTTCTGGAAGCCAAGGGCTACAAAGAAGTGAAAAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCTAAGTACTCCCTGT TCGAGCTGGAAAACGGCCGGAAGAAAGCTGGCCTCTGCCGGCGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCCCTGCCCTCCAAA TATGTGAACTTCCTGTACCTGGCCAGCCACTATGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCCGAGGATAATGAGCAGAAACAGCTGTTTGT GGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAGTTCTCCCAAGAGAGTGATCCTGGCCGACGCTAATC TGGACAAAGTGCTGTCCGCCTACAACAAGCACCGGGATAAGCCCATCAGAGAGCCGGAGAATATCATCCACCTGTTTACC CTGACCAATCTGGGAGCCCCTGCCGCCTTCAAGTACTTTGACACCACCATCGACCGGAAGAGGTACACCAGCACCAAAGAGGT GCTGGACGCCACCCTGATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACACGGATCGACCTGTCTCAGCTGGGAGGCGACAAAA GGCCGGCCACGAAAAAGGCCGGCCAGGCAAAAAAGAAAAGTAAGAATTCCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGC

TAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGG GGAGGATTGGGAAGAATAGCAGGCATGCTGGGGAGCGGCCGCAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCCTCTCTGC GCGCGCAGCTGCCTGCAGGGGGGCGCCTGATGCGGGTATTTTCTCCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTCACACCGCCATACGTCAAAG GGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGATTTGGGTGATGGTTCACGTAGTGGG AACACTCAACCCTATCTCGGGCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGA TTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTTATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGAT GCCGCATAGTTAAGCCAGCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCTGACGGGCCTTGTCTGCCCGGCATCCGCCTTA CAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTCACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCC TCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTG CGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCA ATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTG TTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGAT ${\tt CTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGG$ CGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACT CACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACT GCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCG CCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAA GCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAAGCCGTGGAAGCCGCGG TATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATG AACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATAACTT TAGATTGATTTAAAACTTCATTTTAAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCCTTA ACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAA GTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACCTCAAGAACTCTGT ACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCC TTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGT



Titre : Modélisation des néoplasies endocriniennes multiples de type II par les cellules souches pluripotentes induites porteuses de mutations germinales du gène *RET*

Mots clés : Néoplasies endocriniennes multiples de type 2, *RET*, cellules souches pluripotentes induites, crête neurale, carcinome médullaire de la thyroïde, pheochromocytome.

Les cellules souches pluripotentes induites (CSPi) permettent la modélisation de processus avec, en oncologie, un intérêt potentiel pour la modélisation de syndromes de prédisposition au cancer liés à des mutations germinales d'oncogènes.

Nous avons généré des lignées de CSPi à partir de patients atteints de néoplasies endocriniennes multiples de type 2 (NEM2), porteurs de mutations germinales du gène *RET*: *RET^{C620R}*, *RET^{C634Y}* et *RET^{M918T}*. Nous avons généré une CSPi *RET^{Y634C}*, contrôle isogénique, par correction de la mutation *RET^{C634Y}* via CRSPR/Cas9. Ces CSPi présentent tous les critères de pluripotence avec un caryotype normal et expriment Ret. L'étude histologique approfondie des tératomes a mis en évidence le développement de cellules C en leur sein et également de cellules neuroendocrines exprimant la Chromogranine A mais sans aspect d'hyperplasie des cellules C ou de carcinome médullaire de la thyroïde ni de tumeur neuroendocrine réminiscente du phénotype des NEM2. L'analyse comparative de l'expression des gènes de ces CSPi a mis en évidence, dès le stade de pluripotence, une activation du réseau transcriptionnel du gène EGR1 qui pourrait constituer un des mécanismes moléculaires responsables de la mise en place du phénotype des NEM2. La différenciation en cellules souches de la crête neurale (CSCN), cellules d'origine cibles des tumeurs développées dans le cadre des NEM2, en particulier le phéochromocytome, était efficace et reproductible pour toutes nos lignées. Nous avons mis en évidence l'activation d'un programme commun invasif au niveau des CSCN avec mutation RET^{C634Y} et RET^{M918T} ainsi gu'une forte dérégulation du réseau des intégrines entraînant une forte dérégulation de l'adhésion cellulaire. Ceci était confirmé par une augmentation des capacités de migration CSCN avec mutation de RET par rapport aux CSCN témoins.

Ainsi, la génération de CSPi avec mutation de *RET* a permis d'identifier des voies de signalisation potentiellement impliquées dans la physiopathologie des NEM2 et constitue une première étape vers la modélisation des NEM2 in vitro.

Title : Modelling multiple endocrine neoplasia type 2 with *RET*-mutated induced pluripotent stem cells

Keywords : multiple endocrine neoplasia type 2, RET, induced pluripotent stem cell, neural crest, medullary thyroid cancer, pheochromocytoma

Induced pluripotent stem cell (iPSC) offer major perspectives in disease modelling and, in the field, can be used for modelling cancer predisposition syndromes. oncoloav We generated IPSC lines from somatic cells of patients with multiple endocrine neoplasia type 2 (MEN2) who harboured germline mutations in the *RET* gene: RET^{C620R} , RET^{C634Y} et RET^{M918T} . We have also generated an isogenic RET^{Y634C} iPSC control line by genome engineering using CRSPR/Cas9-mediated method to "correct" C634Y mutation. All iPSC lines exhibited all markers of pluripotency with a normal karyotype and expressed Ret. A thorough histological study of teratomas from these iPSC highlighted the development of C cells and Chromogranin Aexpressing neuroendocrine cells within them but without C-cell hyperplasia, medullary thyroid carcinoma or neuroendocrine tumours reminiscent of MEN2 phenotype. Comparative gene expression analysis revealed an activation of the EGR1 transcriptional network, at the pluripotent stem cell stage which could be one of the molecular effector of the phenotype. Neural crest stem cell (NCSC), the cell of origin of some of the tumoral features of MEN2, could be differentiated in vitro from all our *RET*-mutated iPSC lines effectively. Gene expression analysis revealed an activation of cell invasion program in *RET*^{C634Y} and *RET*^{M918T}-mutated NCSC and a deregulation of integrin network causing a strong deregulation of cell adhesion which was confirmed with increased migration capabilities in vitro.

Thus, the generation of the first *RET*-mutated iPSCs allowed the identification of signalling pathways potentially implicated in the pathophysiology of MEN2 and constitute a first step in modelling these tumours in vitro.