



Implication des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans la radiocarcinogenèse thyroïdienne

Myriem Boufraquech

► To cite this version:

Myriem Boufraquech. Implication des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans la radiocarcinogenèse thyroïdienne. Cancer. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT: 2011PA11T069 . tel-00747797

HAL Id: tel-00747797

<https://theses.hal.science/tel-00747797>

Submitted on 2 Nov 2012

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

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

UNIVERSITE PARIS XI

FACULTE DE MEDECINE PARIS SUD

Thèse

Pour obtenir la Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XI

CHAMP DISCIPLINAIRE : MEDECINE

ECOLE DOCTORALE : SIGNALISATION ET RESEAUX INTEGRATIFS EN BIOLOGIE
Soutenue le 21/10/2011 par

Myriem Boufraquech

**Implication des espèces réactives de l'oxygène
(ROS) dans la radiocarcinogenèse thyroïdienne**

Devant le jury composé de :

Pr. Schumacher Michael	Président
Dr. Miot Françoise	Rapporteur
Dr. Leguen Bernard	Rapporteur
Pr. Deutsch Eric	Examineur
Dr. Lopez Bernard	Examineur
Dr. Dupuy Corinne	Directrice de thèse

A mes parents, à mon frère

Et à toi Urbain

Remerciements :

Je souhaite remercier tout d'abord le Docteur Michael Schumacher de m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider cette thèse.

Je remercie les Docteurs Françoise Miot et Bernard Leguen, d'avoir accepté la lourde tâche de rapporteur

Je remercie les Docteurs Eric Deutsch et Bernard Lopez en qualité d'examineur de ce manuscrit.

Je tiens à remercier le Docteur Corinne Dupuy, ma directrice de thèse, qui en m'accueillant au sein du groupe thyroïde m'a permis de réaliser ce travail. Je souhaite lui exprimer toute ma reconnaissance.

Ce travail a été réalisé au sein de l'unité UMR 8200 dirigé par le Docteur Patricia Kannouche, que je tiens à remercier pour son soutien durant les trois années de thèse et pendant mes recherches de post-doc.

Je tiens également à remercier le Professeur Martin Schlumberger pour toute sa confiance, son aide et son appui tout au long de la thèse.

Je remercie le Docteur Alain Sarasin, pour son appui, son soutien et sa sympathie.

Je remercie Monique Talbot et le Docteur Bernard Caillou, pour l'énorme travail réalisé, ainsi que pour leur gentillesse et leur sympathie.

Je remercie le Docteur Patrick Saulnier et Ludovic Lacroix pour toute leur aide et leurs connaissances en biologie moléculaire.

Je remercie le Docteur Françoise Courtin pour nos nombreuses discussions scientifiques et pour toutes les corrections apportées au manuscrit.

Je remercie énormément deux personnes qui ont beaucoup compté pour moi, Odile Chevallier et Fanny Prenoï, pour tous les agréables moments passés ensemble, et pour leur présence et leur soutien pendant les moments difficiles. Je pense que je ne vous remercierais jamais assez. Rendez vous à Washington, les filles !!

Alain et Jacques, un grand merci à vous deux, de m'avoir appris beaucoup de choses à mon arrivée dans l'équipe, de m'avoir appris à persévérer. Je n'oublierais jamais vos précieux conseils. Merci Merci !!!

Un grand merci à Françoise Royer et Christelle Bouchot, pour toute leur disponibilité et leur sympathie.

Un grand merci à Saïd, Camille, Jérémy, et à toutes les filles de l'équipe TLS, pour leur bonne humeur quotidienne et leur sympathie.

Enfin, je remercie tout particulièrement mes parents et surtout mon papa pour leur soutien durant les moments difficiles, pour leur appui et pour leurs encouragements.

Urbain, tu l'avais dit il y'a un an, ta thèse a été notre premier bébé, la mienne sera le deuxième! Merci pour tout, et bientôt à Washington avec toi !

Je remercie le comité scientifique de l'électricité de France et l'association de recherche pour le cancer d'avoir financé cette thèse.

Plan de la thèse

I) La thyroïde :	14
1) La thyroïde normale	14
a) Anatomie de la thyroïde	14
b) Hormonosynthèse	15
b-1) Cascades de signalisation en réponse à la TSH	16
b-2) Captation et organification de l'iode	18
b-3) Libération des hormones thyroïdiennes	20
b-4) Rôle des hormones thyroïdiennes	20
c) Régulation des cellules thyroïdiennes	21
d) La Production d' H_2O_2 nécessaire à l'organification de l'iode	21
d-1) Les NADPH oxydases DUOX1 et DUOX2	21
d-2) Régulation des DUOXs	23
d-3) Hypothyroïdie associée à des mutations des gènes DUOX2/DUOX2A2	26
d-4) Les autres membres de la grande famille des NADPH oxydases	27
➤ NOX2 : La NOX prototype	27
➤ La NADPH oxydase NOX1	28
➤ La NADPH oxydase NOX4	29
➤ La NADPH oxydase NOX3	29
➤ La NADPH oxydase NOX5	29
2) Les tumeurs thyroïdiennes	30
a) Facteurs de risque	31
b) Les différents types de tumeurs de la thyroïde d'origine vésiculaire	32
b-1) Les tumeurs bénignes ou adénomes	32
b-2) les cancers différenciés d'origine vésiculaire	32
➤ Cancer papillaire	32
➤ Les cancers folliculaires	42
b-3) Les cancers peu différenciés	43
b-4) Les cancers indifférenciés ou anaplasiques	43
II) Les pathologies radioinduites :	44
1) Les radiations ionisantes	44
a) Définition	44
a-1) Les rayonnements électromagnétiques	44
a-2) Les rayonnements particuliers	45
b) Les unités de mesure des radiations ionisantes	45
2) Données épidémiologiques	46
a) Irradiation accidentelle	46
b) Irradiation thérapeutique	48
3) Les effets directs et indirects des radiations ionisantes	49
a) Les effets directs de l'irradiation	50
b) Les effets indirects de l'irradiation	50
4) Les dommages radioinduits aux tissus sains	53
a) Les lésions radioinduites de l'ADN	53
b) Les pontages radioinduits	56
c) La peroxydation des lipides	57
d) l'oxydation des protéines	57
a) Les systèmes antioxydants	58
b) Mécanismes de réparation des lésions radioinduites	59
➤ La réparation des mésappariements de bases (MMR)	60
➤ Excision de base et resynthèse	61
➤ Excision de nucléotide et resynthèse (NER)	62

➤ Recombinaison homologue (RH) :	63
➤ Jonction d'extrémités non homologues (NHEJ):	64
➤ La réparation des pontages:	65
c) Effets des radiations ionisantes sur le cycle cellulaire :	66
6) Effets non ciblés des radiations ionisantes :	67
7) Les cancers thyroïdiens associés aux radiations ionisantes :	69
III)- Signalisation moléculaire et irradiation :	70
1) Cytokines et irradiation :	70
2) Les voies de signalisation :	72
a) Voies des MAPKs	72
a-1) Les MAPK de la famille JNK :	75
a-2) Les MAPK de la famille P38 :	75
a-3) Les MAPK de la famille ERK :	76
b) La voie NFκB :	77
3) Voies de signalisation et irradiation :	77
B) Contexte de la recherche:	
C) Résultats	
1) Article 1	
2) Article 2 (En préparation)	
3) Résultats supplémentaires	146
D) Discussion générale :	149
E) Conclusions et perspectives :	161

Liste des abréviations

2-OH-A : 2-Hydroxy-Adénine

4-HNE : 4-Hydroxynonenal

8-oxoA : 8- oxo-Adénine

8-oxoG : 8- oxo- Guanine

ADN : acide désoxyribonucléique

AIT : Apical Iodide Transporter

AKAP9 : A-kinase anchor protein 9

ATC : Anaplastic thyroid carcinoma

ATM: Ataxia-telangiectasia mutated gene

BCL2: B-cell cll/lymphoma 2

BER : Base Excision Repair

Bq : Becquerel

BRAF : V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1

Ca²⁺ : calcium

Cat : catalase

CDB : Cassure double brin

CLC5 : Chloride Channel 5

CREB : cAMP response element

CSB: cassure simple brin

DAG : Diacylglycérol

DDR : DNA damage response.

DEHAL1 : Dehalogénase

DIT : Diiodotyrosine

DNAPKCs: DNA protein kinase subunits

DUOX : Dual oxydase

DUOXA : Dual oxydase activator

EFP1 : EF-hand Binding Protein 1

ERK : Extracellular signal-regulated kinase

FAD : Flavin Adenine Dinucléotide

FAD : Flavine adénine dinucléotide

FapyA : 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine

FapyG : 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine

FTC: Follicular thyroid cancer

FOXO1: Forkhead Box O1

G, C,T,A: Guanine, cytosine, thymine, adenine

GDNF: Glial cell line-derived neurotrophic factor

GPx : Glutathion peroxydase

GSH: Glutathion

Gy : Gray

H2AX: Variant H2A des histones

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

IL-x : Interleukine-x

INF γ : Interferon gamma

IP : Inositols phosphates

JNK : Jun N-terminal Kinase

LPO : Lactoperoxydase

MAPK : Mitogen-activated Protein Kinases

MEF2 : myocyte enhancer factor-2

MIT : moniodotyrosine

MMR: Mismatch repair

MSH : mutS homolog

MTC : Medullary thyroid carcinoma

NADPH oxidase : nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NER : Nucleotide excision repair

NF- κ B: nuclear factor kappa-B

NHEJ : Non-homologous end joining

NIS : Sodium/iodide symporter

NOX : NADPH oxydase

NOXA1 : NADPH oxydase Activator 1

NOXO1 : NADPH oxydase Organizer 1

NRTK: Neutrophic tyrosin kinase receptor

NTRK1 : neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 1

O₂ : Oxygène

O₂⁻ : Superoxyde

OH⁻ : Radical hydroxyle

OSCN : Hypothiocyanate

PAX8 : Paired box 8

PDC : Poorly Differentiated Carcinoma

PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinases

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase

PKA : Protéine kinase A

PKC : Protéine kinase C

Poldip2 : Polymerase (DNA-directed), delta interacting protein 2

PPAR γ : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma

PTC : Papillary Thyroid Carcinoma

PTEN : Phosphatase and tensin homolog

RAS : rat sarcoma virus oncogene

Rb : Retinoblaste

RET : REarranged during Transfection

RH : Recombinaison Homologue

ROS : Reactives Oxygène Species

RT-PCR: Real Time – Polymerase Chain Reaction

SAPK : stress activated protein kinase

SCN⁻ : Anion thiocyanate

Ser : Sérine

SOD : Superoxyde Dismutase

SV 40 : Simian Virus 40

Sv : Sievert

T3 : Triiodothyronine

T4 : Thyroxine

TEL : transfert linéaire d'énergie

Tg : Thyroglobuline

TGF β : Transforming Growth factor Bêta

Thr : Thréonine

TNF α : Tumor Necrosis factor Alpha

TPO : Thyroperoxydase

TRH : Thyrotropin-releasing hormone

TRK: Tyrosine kinase, receptor

TSH : Thyroid-stimulating hormone

TTF1: Tyroid transcription factor I

XP : Xeroderma pigmentosum

XRCC1: X-ray repair complementing defective in chinese hamster 1

PTP: protéine tyrosine phosphatases

TK: tyrosine kinase

Introduction

I) LA THYROÏDE :

1) LA THYROÏDE NORMALE

a) Anatomie de la thyroïde

La thyroïde est une glande endocrine située dans la région cervicale médiane basse, constituée de deux lobes reliés par un isthme. Elle pèse de 10 à 20 g chez l'adulte. Elle est organisée en follicules d'un diamètre moyen de l'ordre de 200 micromètres. Le follicule thyroïdien ressemble à une structure sphérique bordée par un épithélium simple de cellules folliculaires appelées « thyrocytes ». Ils constituent 99% des cellules de la glande thyroïde et sont responsables de la synthèse des hormones thyroïdiennes. Les thyrocytes délimitent une cavité (espace folliculaire) contenant la substance colloïde constituée essentiellement de thyroglobuline. Les thyrocytes sont des cellules bipolaires à double rôle : exocrine vers la cavité folliculaire et endocrine vers la circulation sanguine.

La thyroïde comporte par ailleurs des cellules claires ou cellules C qui sécrètent de la calcitonine, des cellules endothéliales formant la paroi des vaisseaux sanguins qui irriguent la glande et également des fibroblastes (Fig1).

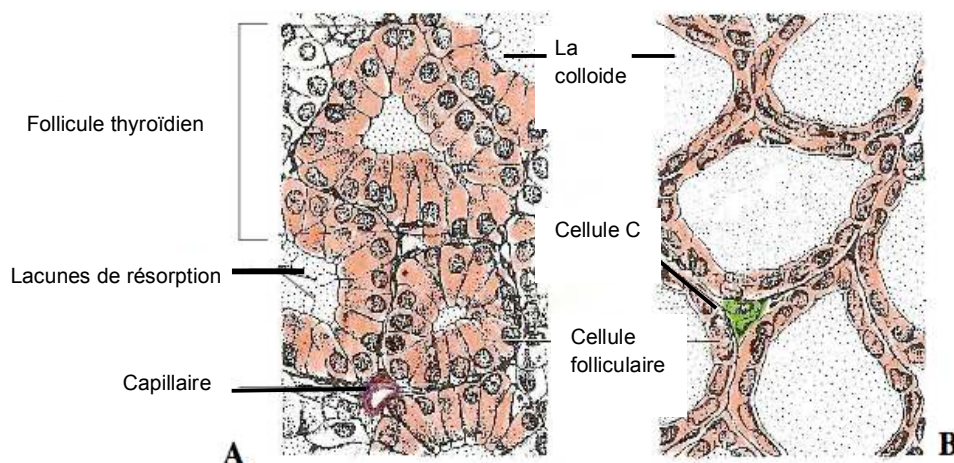


Figure 1: Schéma de l'histologie d'une thyroïde

b) Hormonosynthèse

Le rôle principal de la glande thyroïde est celui de la synthèse des hormones thyroïdiennes (T3 et T4). Ce sont des molécules indispensables, à la croissance et au développement du système nerveux central. Elles sont impliquées dans le métabolisme lipidique, glucidique et protéique, et régulent la fonction de nombreux tissus (dont le rythme cardiaque). La thyroïde est sous le contrôle d'une hormone sécrétée par les cellules de l'anté-hypophyse appelée TSH (**T**hyroid **S**timulating **H**ormone) qui initie la synthèse et la sécrétion des hormones thyroïdiennes. La production de la TSH est elle même induite par une hormone hypothalamique dite TRH (**T**hyrotropin **r**elasing **h**ormone). La T3 et la T4 assurent un rétrocontrôle négatif de la sécrétion de la TSH et de la TRH (Figure 2).

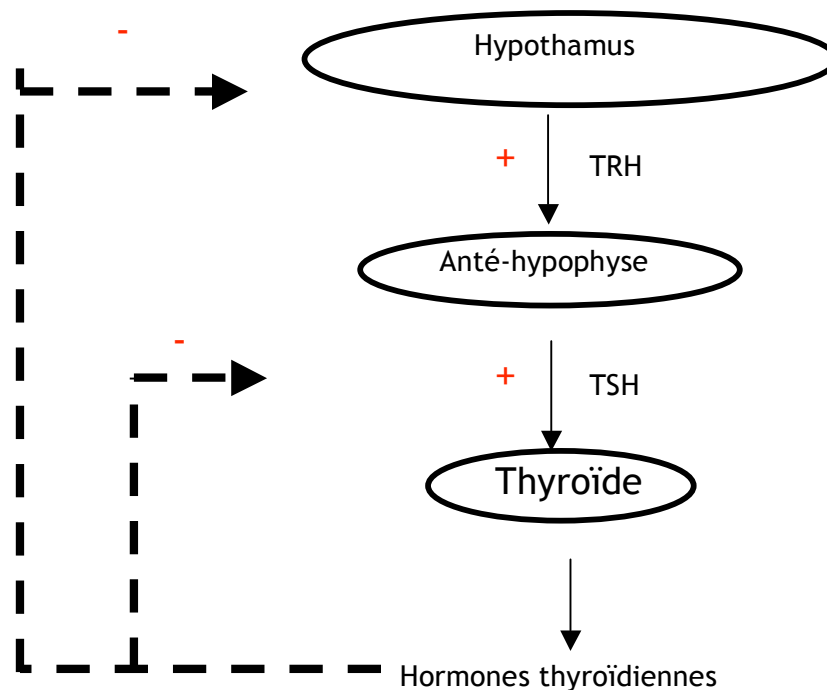


Figure 2 : Régulation hypothalamo-antéhypophysaire de la thyroïde

La synthèse des hormones thyroïdiennes est étroitement liée à la structure du follicule thyroïdien et à la polarisation du thyrocyte. L'élaboration des hormones thyroïdiennes met en jeu une série de processus cellulaires et biochimiques complexes.

b-1) Cascades de signalisation en réponse à la TSH:

La TSH joue un rôle majeur dans la physiologie du thyrocyte. Dans la thyroïde humaine la TSH active plusieurs voies de signalisation dont la voie de l'AMP cyclique (AMPC) et celle de la phospholipase C (PLC). Quand la TSH se fixe sur son récepteur, le TSHR, elle active par l'intermédiaire de la protéine Gs, l'adénylate cyclase et induit l'augmentation du taux d'AMPC. L'AMPC se fixe alors sur la protéine kinase A (PKA) libérant ainsi la sous-unité catalytique qui va phosphoryler différents substrats de la famille CREB/ATF-1 (cAMP response element (CRE) binding protein/activating transcription factor1). Ces derniers vont réguler à leur tour la transcription de différents gènes cibles au niveau des sites CRE (cAMP response element) des promoteurs.

L'effet mitogénique de l'AMPC médié par la TSH sur la thyroïde est renforcé par la présence d'insuline ou d'IGF-1 (kimura et coll 2001). L'effet de la TSH est mimé par la forskoline, un activateur de l'adénylate cyclase ou encore par la toxine cholérique qui active la grosse protéine Gs (Wynford Thomas et coll, 1987)(Roger et coll 1988). La TSH induit l'expression des marqueurs de la différenciation tel que la thyroglobuline (Tg), la thyroperoxydase (TPO), le récepteur de la TSH (TSHR) et le symporteur Na^+/I^- (NIS). Trois facteurs de transcription contrôlent l'expression de ces gènes dans la thyroïde : TTF1 (thyroid transcription factor), FOXE1, PAX8. Dans la lignée de cellules thyroïdiennes de rat FRTL-5 (Fisher rat thyroid cell line), un traitement par la TSH entraîne une diminution de l'expression du TSHR et de son ARN messenger. Cet effet est dépendant de l'AMPC (Saji et coll., 1991). Cette diminution de l'ARN messenger du TSHR par la TSH est un mécanisme transcriptionnel car il a été observé une diminution de l'expression des facteurs de transcription, se liant sur le promoteur du TSHR, comme TTF1.

La production importante de la TSH et son interaction avec son récepteur stimule la phospholipase C (PLC) via la grosse protéine Gq. L'activation de la cascade des inositols phosphates (IP) induit également la prolifération mais inhibe l'expression de la différenciation des thyrocytes (Laurent et coll, 1987). La cascade des IP nécessite cependant une concentration 10 fois plus élevée de TSH que pour l'activation de la

cascade de l'AMPc. L'interaction du ligand avec son récepteur provoque la stimulation de la PLC par l'intermédiaire de la sous-unité α de la protéine G_q ($G_{\alpha q}$) catalysant le remplacement du GDP par du GTP. La PLC hydrolyse le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP₂) situé dans la membrane plasmique, en inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) et diacylglycérol (DAG). L'IP₃ peut alors se lier à un récepteur spécifique du réticulum endoplasmique et favoriser la libération de Ca^{2+} . Le DAG active la protéine kinase C (PKC) qui à son tour va phosphoryler spécifiquement des protéines en aval. La PKC peut également être activée directement par les esters de phorbol et les analogues du diacylglycérol.

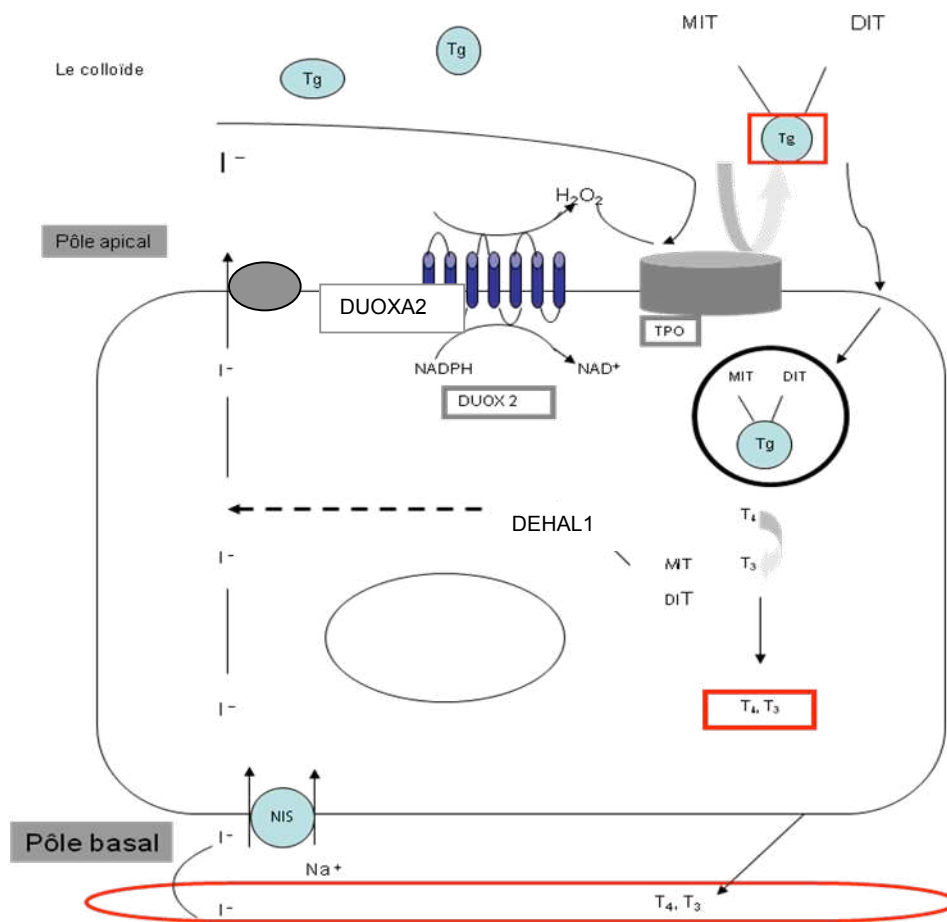
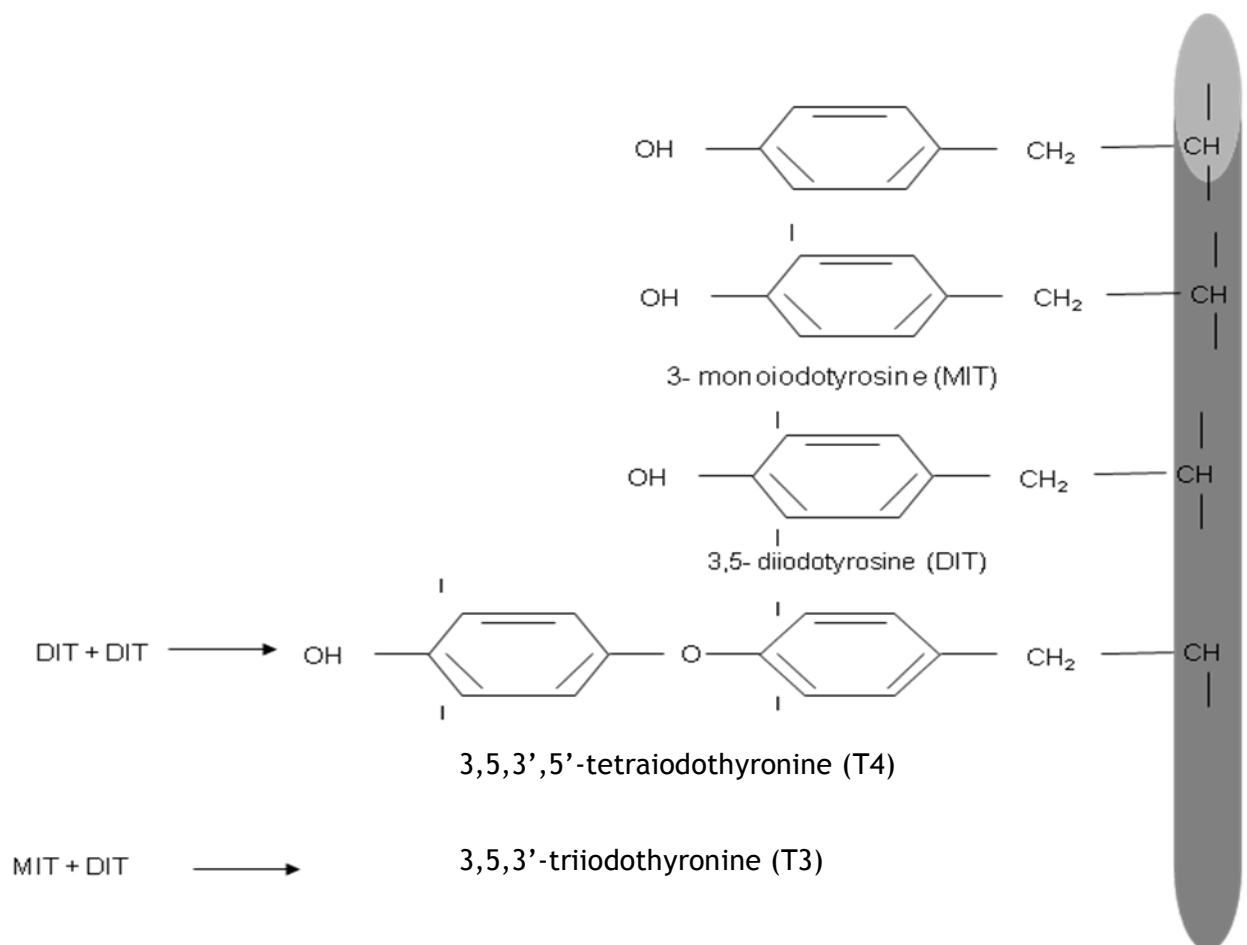


Figure 3 : Schéma des étapes de la synthèse des hormones thyroïdiennes

b-2) Captation et organification de l'iode :

L'iodure circulant est capté au niveau de la membrane basale du thyrocyte par un mécanisme de transport actif dépendant du symporteur Na^+/I^- (NIS). Les ions iodures sont ensuite transportés passivement au pôle apical du thyrocyte. Les deux canaux potentiels de l'iodure, vers la lumière folliculaire, identifiés jusqu'à maintenant sont l'AIT (apical iodide transporter) et la Pendrine. Toutefois leur mécanisme de transport reste encore mal connu et très controversé. Récemment l'existence d'un autre canal a été montrée, appelé CLC5 (Chloride channel-5) (Van Den Hove et coll, 2006). Celui-ci est fortement exprimé dans les thyrocytes de souris et module l'efflux d'iode au niveau apical. Une délétion au niveau du gène qui code pour CLC5 est associée à la formation de goître suggérant un rôle essentiel de ce canal dans la physiologie thyroïdienne. Plusieurs hypothèses concernant le mécanisme d'action du canal CLC5 ont été émises, il se comporterait comme un canal alternatif pour l'iode

ou encore il modulerait l'efflux d'iode en agissant de manière indirecte sur l'expression et/ou la fonction de la Pendrine (Van den Hove, 2005). Une fois à l'interface membrane apicale – lumière folliculaire, l'iodure est oxydé en ion iodinium, I^+ , par la thyroperoxidase (TPO) en présence de l' H_2O_2 généré par la NADPH oxydase DUOX2. L'iodure oxydé se fixe immédiatement sur les résidus tyrosine de la thyroglobuline (Tg), matrice de l'hormonosynthèse présente en grande quantité dans la lumière colloïdale, et forme ainsi des dérivés monoiodés (MIT) et diiodés (DIT) (Fig4). La TPO catalyse ensuite le couplage entre les résidus MIT et DIT. Ainsi l'association de deux groupes DIT donne naissance à l'hormone T4, et l'association d'un groupe DIT et MIT forme l'hormone T3 (Fig4).



Molécule de thyroglobuline (Tg)

Figure 4: Réaction d'organification de l'iode et synthèse des hormones thyroïdienne

b-3) Libération des hormones thyroïdiennes

La thyroglobuline, chargée de résidus hormonogéniques T3 et T4 selon le mécanisme précédent, est absorbée par micropinocytose en fonction des besoins périphériques. Une hydrolyse lysosomiale permet la libération des hormones T3 et T4 qui sont sécrétées au pôle baso-latéral dans le sang. Notons que l'essentiel de la T3 circulante provient en fait de la désiodation de la T4 dans différents tissus. La T3 est l'hormone thyroïdienne qui a le plus d'affinité pour les récepteurs des hormones thyroïdiennes (TR).

La désiodation des résidus MIT et DIT a été démontrée pour la première fois, dans les années 30 (Foster and Gutman 1930) mais ce n'est que dans les années 2000 que le gène qui code pour l'enzyme responsable de cette désiodation a été cloné à partir d'ARN messenger issus de tissu thyroïdien humain (Moreno 2001, 2003) et fut appelé *DEHAL1*. Il a également été montré que l'expression de l'ARN messenger *DEHAL1* était sous le contrôle de la voie AMPc activée par la production de TSH (Gnidehou et coll 2004). Ce gène est sujet à un épissage alternatif au niveau de l'exon 5, qui génère plusieurs isoformes. L'unique isoforme active et la plus abondante dans la thyroïde est l'isoforme A (Gnidehou et coll 2006). En 2008, des mutations du gène *DEHAL1* humain ont été retrouvées chez des patients qui souffrent d'hypothyroïdie prononcée, et de retard mental (Moreno et coll 2008).

b-4) Rôle des hormones thyroïdiennes

Les effets des hormones thyroïdiennes impliquent classiquement leur liaison aux récepteurs nucléaires des hormones thyroïdiennes, qui appartiennent à la superfamille des récepteurs hormonaux nucléaires. Les TRs se lient à des éléments de réponse spécifiques, présents dans la séquence des promoteurs de gènes cibles dont la transcription est activée ou réprimée en réponse aux hormones. Des analyses de microarrays montrent que ces dernières affectent l'expression de gènes participant à un grand nombre de fonctions et voies de signalisation cellulaire incluant la néoglucogenèse, la lipogenèse, la voie de l'insuline, la voie de l'adénylate cyclase, la prolifération cellulaire et l'apoptose (Feng et coll 2000; Yen et coll 2003; Stahlberg et coll 2005).

c) Régulation des cellules thyroïdiennes

Le principal mécanisme de régulation de l'activité thyroïdienne est l'axe thyroïdienne. Cependant il existe également un système d'autorégulation par l'iodure.

Il a été effectivement montré qu'une injection de 500 μ g d'iodure (100 fois plus que le besoin journalier en iode) à des rats induisait un blocage transitoire au niveau de l'incorporation de l'iode dans les résidus tyrosyl de la thyroglobuline qui constitue la première étape de la synthèse des hormones thyroïdiennes. Ce mécanisme d'autorégulation indépendant de la TSH qui est appelé l'effet Wolff Chaikoff protège l'organisme de la synthèse excessive d'hormones thyroïdiennes (Wolff and Chaikoff et coll, 1948). Cet effet est lié à l'inhibition par l'iodure de la production d' H_2O_2 (Corvilain et coll, 1988). L'effet Wolff Chaikoff, est rapidement suivi d'une diminution des ARN messager du *NIS* et de la *TPO* (Morand, 2003). L'inhibition de la biosynthèse du NIS va conduire alors la levée de l'effet Wolff Chaikoff. De même, la stimulation de la génération d' H_2O_2 par l'iodure à faible concentration peut permettre une utilisation optimale de l'iodure par la cellule (Corvilain et coll, 2000). Ce mécanisme peut retarder l'apparition d'hypothyroïdie lors d'une carence en iode.

d) La Production d' H_2O_2 nécessaire à l'organification de l'iode :

L'iodure est acheminé du pôle basal au pôle apical où il sera oxydé par la TPO en présence d' H_2O_2 . L' H_2O_2 est produit à l'interface pôle apical-colloïde par la NADPH oxydase DUOX2, clonée pour la première fois chez le porc (Dupuy et Coll 1999) et chez l'homme en 2000 (De Deken 2000). Le rôle physiologique de la DUOX2 dans la biosynthèse des hormones thyroïdiennes a été clairement démontré chez des patients atteints d'hypothyroïdie due à des mutations inactivatrices du gène *DUOX2*. Les DUOXs appartiennent à une nouvelle famille d'enzymes appelée les NADPH oxydases (NOX).

d-1) Les NADPH oxydases DUOX1 et DUOX2 :

L' H_2O_2 produit à l'interface pôle apical-colloïde, est le facteur limitant de la biosynthèse des hormones thyroïdiennes alors qu'il est produit en large excès comparativement à la quantité d'iode incorporée dans les protéines. Bien qu'une production d' H_2O_2 dépendante de la TSH a été mise en évidence en 1970 dans la thyroïde (Ahn, Rosenberg et coll, 1970), la nature du système générateur d' H_2O_2 est restée longtemps hypothétique. Des études menées dans les années 80, ont montré

que le système générateur d'H₂O₂ était localisé au pôle apical de follicules de thyroïde de rats (Bjorkman, et coll 1981). Cette production d'H₂O₂ est stimulée par le calcium intracellulaire (Bjorkman et coll 1984). De plus, l'addition du NADPH à des follicules de porc active la génération d'H₂O₂, suggérant ainsi l'implication d'une NADPH oxydase dans la biosynthèse des hormones thyroïdiennes.

L'ADNc du système générateur d'H₂O₂ associé à la thyroperoxydase a été cloné pour la première fois au début des années 2000, à partir d'ARN de thyroïdes porcine et humaine (Dupuy et coll, 1999, De Deken et coll, 2000), et code pour une protéine de 1548 acides aminés. Il s'agit d'une nouvelle famille de flavoprotéines comportant 7 segments transmembranaires avec le domaine N-terminal du côté extracellulaire et le domaine C-terminal du côté cytosolique.

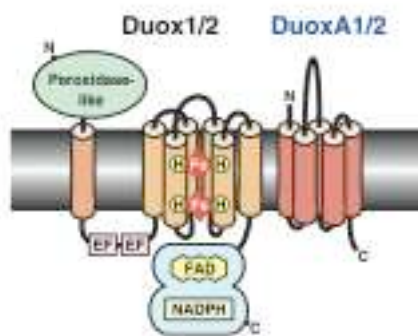


Figure 5: Structure de la protéine DUOX adressée à la membrane (par Sumimoto et coll, 2008)

La partie N-terminale, qui comporte 599 résidus, possède un peptide signal et plusieurs sites de glycosylation potentiels. Cette partie présente une importante homologie avec les peroxydases. La partie médiane de la molécule comporte deux motifs (EF-hands), démontrés récemment être impliqués dans l'activation de la protéine par le calcium (Dupuy et coll, 1988, Geiszt et coll, 2003). Enfin la séquence C-terminale est similaire à la gp91phox qui est la grosse sous unité de la NADPH oxydase de neutrophile appelée NOX2. On y retrouve les séquences de liaison au NADPH ainsi que la séquence consensus pour le FAD. Puisque cette protéine présente une double homologie avec les NADPH oxydases et les peroxydases, elle fut appelé Dual Oxydases (DUOX). Une autre isoforme de la DUOX

a été également clonée chez l'Homme (De Deken et coll, 2000). Les deux protéines DUOX1 et DUOX2 présentent 83% d'homologie. La DUOX2 est la NADPH oxydase qui génère l' H_2O_2 nécessaire à la thyroperoxydase pour la synthèse des hormones thyroïdiennes tandis que le rôle de DUOX1 dans la thyroïde demeure à ce jour inconnu.

d-2) Régulation des DUOXs :

Régulation transcriptionnelle : Les gènes qui codent pour la DUOX1 et la DUOX2 sont localisés sur le chromosome 15, séparés par une région relativement courte de 16 Kb (Pachucki et coll 2004). Le gène de la *DUOX1* fait 36 Kb, et contient 35 exons, tandis que celui de la *DUOX2* ne fait que 22 Kb pour 34 exons. La DUOX1 et la DUOX2 humaines contiennent respectivement 1551 et 1548 acides aminés, et possèdent 83% d'homologie.

La principale voie de signalisation de la TSH dans la thyroïde est la voie de l'AMPc. L'ARNm de *DUOX2* est régulé positivement par l'AMPc chez le porc et chez le rat (Dupuy et coll, 2000). Cette régulation positive de l'expression de la DUOX2 est également observée pour la DUOX1 chez l'Homme et chez le chien (De Deken et coll, 2000). L'insuline et l'IGF-1 n'ont pas d'effet mitogène propre mais sont nécessaires à l'action mitogène de la TSH. Des expériences réalisées chez le porc et chez l'Homme ont montré que l'insuline augmentait l'expression du transcrit DUOX2. De manière intéressante dans le cas d'hyperthyroïdie, qui se caractérise par une augmentation de l'expression des marqueurs de la différenciation NIS et TPO, on n'observe aucune augmentation mais plutôt une faible diminution de l'expression du messenger de la *DUOX2* (Lacroix et coll, 2001). À l'inverse dans le cas d'hypothyroïdie où les ARN messenger du *NIS* et de la *TPO* sont effondrés, l'expression de l'ARN messenger de la *DUOX2* reste inchangée. Ces travaux montrent que la DUOX2 n'obéit pas au même mode de régulation que les marqueurs de la différenciation NIS et TPO.

Régulation post-traductionnelle : L'analyse par western blot des protéines membranaires de thyroïde humaine et canine a révélé un doublet de protéines de masse moléculaire de 165 et 175 KDa correspondant à deux états de glycosylation de la protéine DUOX. En effet, la forme active adressée à la membrane est glycosylée (De Deken et coll, 2000). L'étude de la production d' H_2O_2 par les

protéines DUOX a montré qu'en fonction de son état de maturation, la DUOX2 génère de l' H_2O_2 ou de l' O_2^- (El hassani et coll, 2005). Ceci suggère des modifications post-traductionnelles qui se produisent durant la maturation de la protéine, et induisent des changements conformationnels qui favorisent la réduction ou la dismutation d' O_2^- . Les DUOXs présentent 43% d'homologie avec les peroxydases, mais ne possèdent aucune activité peroxydasiques. Ceci peut s'expliquer par l'absence des 2 histidines impliquées dans la fixation de l'Hème et qui est conservé dans les peroxydases. Il a été proposé que ce domaine soit impliqué ainsi dans la formation d' H_2O_2 en favorisant la réduction ou la dismutation d' O_2^- , et en empêchant ces radicaux d'être libérés et d'interagir avec la TPO dont on sait qu'ils sont inhibiteurs. Dans une étude récente de Song et coll a montré par des expériences de co-immunoprécipitation que DUOX1/2 interagisse(nt) avec TPO à la membrane plasmique (Song et coll, 2010). Cette interaction est fonctionnelle puisque TPO augmente l'activité génératrice d' H_2O_2 de DUOX2. Ceci est dû à l'activité catalase-like de TPO observée en absence d'iode et qui protège DUOX2 d'une inhibition par l' H_2O_2 qu'elle produit (Fortunato et coll, 2010). Cet effet catalase-like dépend de l'association entre les deux enzymes laquelle est liée à l'intégrité de l'ectodomaine de DUOX2 puisque celui-ci n'est plus observé dès lors qu'une des 5 cystéines de ce domaine est mutée. Cette étroite coopération entre les deux enzymes était jusqu'ici suggérée par leurs caractéristiques biochimiques intrinsèques. En effet, TPO a un K_m élevé pour H_2O_2 , ce qui implique une production d' H_2O_2 relativement importante à proximité pour qu'elle soit active (Corvilain et coll, 1994). DUOX2 produit justement ces quantités importantes d' H_2O_2 (Dupuy et coll, 1991).

L'activité des DUOXs est dépendante du calcium intracellulaire et des motifs EF-hands. La DUOX1 et la DUOX2 sont régulées par deux voies de signalisation différentes qui aboutissent à la phosphorylation des deux protéines. En effet, il a été montré que la DUOX1 est stimulée par la forskoline via la protéine kinase A (PKA), et que la phosphorylation de la DUOX2 est médiée par la protéine kinase C (PKC) (Rigutto et coll, 2009). Des travaux récents réalisés dans des thyrocytes humains montrent que l'activation des voies Gq/PLC par la TSH augmente l'association DUOX-TPO, tandis que l'activation de la voie AMPc-PKA par la forskoline diminue cette association (Song et coll, 2010).

Les DUOXs dans les muqueuses: L'expression des DUOXs n'est pas restreinte à la thyroïde. Des techniques de Northern Blot et de FISH ont permis de montrer l'expression de la DUOX2/1 dans les glandes salivaires (Geiszt et coll, 2003). La DUOX2 a également été retrouvée dans le tractus gastro-intestinal (Geiszt et coll 2003, El Hassani et coll 2005). De plus elles sont toutes les deux exprimées dans le tractus respiratoire. DUOX1 est également exprimée dans les testicules, le placenta, et le cœur. Un travail publié en 2010 a montré l'expression de la DUOX2 dans des fibroblastes humains en culture primaire (Salmeen et coll, 2010).

Lors de la synthèse des hormones thyroïdiennes, l'iodure est oxydé par la TPO en présence d' H_2O_2 en un composé nécessaire à l'hormonosynthèse (I^+). De la même manière dans le lait, les larmes, la salive, et les sécrétions bronchiques, la lactoperoxydase (LPO) oxyde le thiocyanate (SCN^-) en hypothiocyanite ($OSCN^-$) en présence d' H_2O_2 généré par les DUOXs. L'hypothiocyanite est un anion naturel présent dans les muqueuses, et fait partie de la première ligne de défense du système immunitaire de l'organisme. Des études menées en 2004 (Schwarzer et coll, 2004) ont montré l'expression de la DUOX1 dans les cellules ciliées de l'épithélium pseudostratifié de la trachée et des bronches. L'hypothiocyanite est absent chez les patients atteints de mucoviscidose.

La DUOX1 et la DUOX2 sont régulées différemment par les cytokines et les facteurs de croissance. L'interleukine 1α ($IL1\alpha$), l'interféron γ ($INF\gamma$) ainsi que l'Interleukine 10 ($IL10$) et le $TGF\beta$ diminuent l'expression de l'ARN messager des DUOXs dans les thyrocytes humains et les thyrocytes de rat (Gerard 2006, Poncin 2008), cet effet inhibiteur peut être contrebalancé par l'interleukine 4 ($IL4$) (Gerard 2006). Des études menées sur les cellules épithéliales issues du poumon ont montré que la DUOX1 est induite par les cytokines de type Th1 : $IL4$, et $IL13$, et que la DUOX2 est régulée positivement par les cytokines de type Th2 comme l' $INF-\gamma$ (Harper et coll, 2005).

Facteurs de maturation des DUOXs: Des travaux menés par Grasberger et collaborateurs en 2006 ont permis de montrer par des expériences dans des cellules HeLa, l'existence d'un partenaire pour les DUOXs, appelé DUOXA1 (DUOX activator) pour la DUOX1 et DUOXA2 pour la DUOX2. En effet, ce facteur permet à la protéine DUOX de quitter le réticulum endoplasmique et de se diriger vers la membrane plasmique permettant ainsi son activation qui se traduit par une production d' H_2O_2 . Les gènes *DUOX1/DUOXA1* et leur paralogue *DUOX2/DUOXA2*

sont situés sur le chromosome 15 selon une organisation « tête bêche », et séparés par une courte région de 16Kb (Pachucki et coll 2004), ce qui suggère que l'expression de chaque DUOX et de son facteur de maturation sont sous le contrôle du même promoteur (Fig6).



Figure 6: représentation schématique de l'organisation des gènes DUOXs et DUOXA humains (Pachuki et coll 2005, Grasberger et coll 2006)

Des travaux publiés en 2005 (Wang et coll 2005), ont permis de montrer l'existence d'un facteur important pour les DUOXs appelé EFP1 (EF-hand binding protein 1). Ce facteur ne serait pas nécessaire pour l'adressage à la membrane de la protéine DUOX, mais il jouerait un rôle dans l'assemblage du complexe protéique permettant la production de ROS à la membrane.

d-3) Hypothyroïdie associée à des mutations des gènes DUOX2/DUOXA2 :

L'hypothyroïdie congénitale est la pathologie congénitale endocrine la plus fréquente, dans 20% des cas, elle est associée à un goître hypothyroïdien suggérant un dysfonctionnement dans les mécanismes d'hormonosynthèse. L'hypothyroïdie congénitale peut être causée par des anomalies du récepteur de la TSH, du NIS, de la Tg, de la TPO, de la pendrine ou encore de la DEHAL1 (Moreno et coll 2008). Mais depuis la découverte des DUOXs des cas d'hypothyroïdie ont été associés à des mutations du gène DUOX2 ou DUOXA2. En 2002, les travaux de Moreno et coll ont montré l'existence de mutation DUOX2 dans le domaine peroxidase-like ou dans la boucle intracellulaire chez des patients souffrant d'hypothyroïdie congénitale (Moreno et coll, 2002). Des travaux publiés en 2008, ont décrit pour la première fois une mutation de DUOXA2 chez un patient hypothyroïdien (Zamproni et coll, 2008). Cette mutation localisée dans la région qui code pour l'une des boucles extracellulaires de la protéine DUOXA2, génère une protéine tronquée. La transfection de cette forme mutée dans des cellules HeLa a montré que la protéine

tronquée ne permettait pas l'adressage à la membrane de l'enzyme DUOX2 et donc de la production d'H₂O₂ nécessaire à l'organification de l'iode et à la synthèse des hormones thyroïdiennes.

Les DUOXs font partie d'une grande famille celle des « NADPH oxydases », dont nous allons citer les autres membres dans le paragraphe ci-dessous.

d-4) Les autres membres de la grande famille des NADPH oxydases

La production endogène de ROS a été longtemps restreinte à la mitochondrie. En effet la première source endogène de ROS identifiée est la respiration aérobie lors de laquelle l'O₂ est réduit en H₂O à la fin de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Cependant des pertes d'électrons peuvent avoir lieu, et peuvent mener à la réduction partielle d'O₂ en O₂⁻. Ce dernier peut être dismuté en H₂O₂. Il existe d'autres sources dont les réactions biologiques peuvent générer des ROS, comme le cytochrome P-450, ou les peroxysomes (Schleizinger et coll, 2002). Cependant, le système dont le principal rôle est la production de ROS est la NADPH Oxydase (NOX). La première NOX a été identifiée dans le phagocyte, et est impliquée dans la défense immunitaire. Les patients souffrant d'infections récurrentes associées à des réactions granulomateuses voient leur « burst oxydatif » baisser de manière très significative dans les leucocytes (Berendes et coll, 1957, Segal, Jones et coll 1978). Récemment, six autres homologues de la sous-unité catalytique de la NADPH oxydase de phagocyte (NOX2 ou gp91) dont les DUOXs, ont été identifiées au début des années 2000 et appelées notamment : la NOX1, la NOX3, la NOX4, la NOX5.

Cependant la distribution tissulaire et les mécanismes d'activation des membres de la famille des NOX sont très différents, suggérant qu'elles exercent des rôles physiologiques distincts (différenciation, apoptose, croissance, défense de l'hôte, etc). Une dérégulation de la fonction de ces différentes NADPH oxydases peut avoir un impact physiopathologique.

➤ NOX2 : La NOX prototype :

La NOX2 a été identifiée pour la première fois dans les phagocytes et les polynucléaires neutrophiles. La NADPH oxydase est un complexe multi-protéique composé d'un élément membranaire, le cytochrome b558, de protéines cytosoliques p47^{phox}, p67^{phox} et p40^{phox} et de deux petites protéines G Rac1/2 et Rap1A. Au repos,

les composants de la NOX2 sont dissociés et répartis entre la membrane plasmique et le cytosol. Lors de l'activation de la NOX2 les facteurs cytosoliques, $p47^{\text{phox}}$, $p67^{\text{phox}}$ et $p40^{\text{phox}}$ subissent des événements de phosphorylation et migrent vers la membrane plasmique où ils se fixent au cytochrome b558 ($\text{NOX2}+p22^{\text{phox}}$) (Fig7).

Le cytochrome b558 fixe le NADPH et le FAD, et contient 2 hèmes à potentiel d'oxydoréduction très faible. Il se forme alors une chaîne de transport d'électrons à travers le NADPH, FAD et les 2 hèmes, jusqu'à l' O_2 qui sera ainsi réduit.

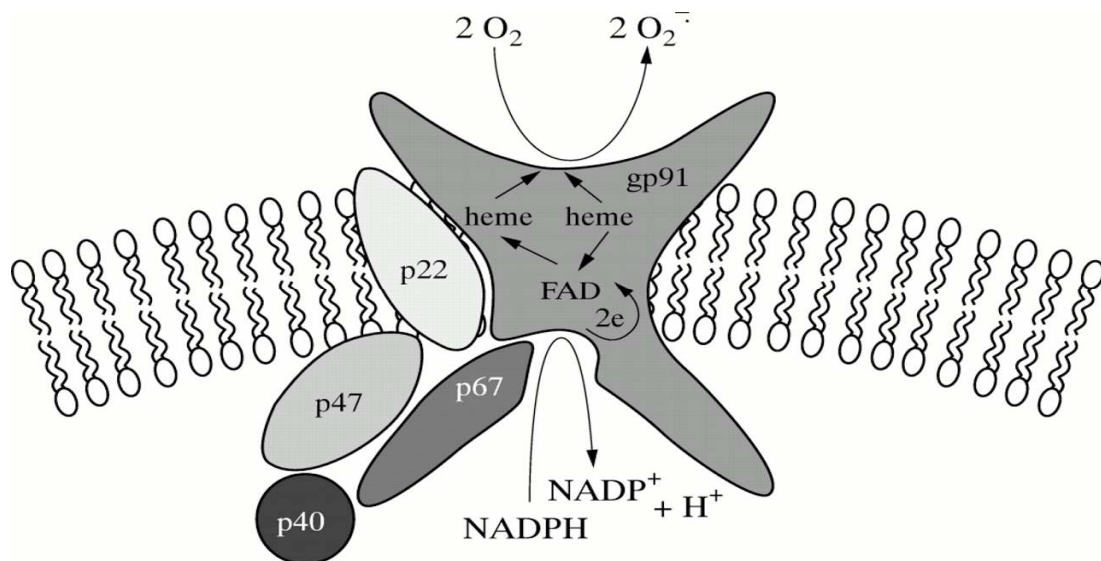


Figure 7: Structure du complexe NADPH oxydase NOX2 actif.

➤ *La NADPH oxydase NOX1 :*

La NOX1 est le premier homologue de la NOX2, cloné à partir d'une banque d'ADNc issus de cellules épithéliales du colon. C'est une protéine de 564 acides aminés qui présente 60 % d'homologie avec la NOX2. L'activité génératrice d' O_2^- de la NOX1 est induite par deux facteurs cytosoliques, la NOXO1 (NOX organizer 1 = $p47^{\text{phox}}$) et la NOXA1 (NOX activator 1 = $p67^{\text{phox}}$) (Fig7). Le gène qui code pour la NOX1 humaine et murine est localisé sur le chromosome X. Il existe deux variants de la protéine longue NOX1, qui résultent d'un épissage alternatif: le premier est dépourvu de l'exon 11 et code pour une protéine non fonctionnelle (Banfi et coll, Geiszt et coll, 2003, Harper et coll, 2005), le second variant semble être un produit artefactuel. La NOX1 possède un spectre d'expression très large, elle est retrouvée entre autre dans les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales, l'utérus, le placenta ainsi que dans de nombreuses lignées cellulaires comme les HT29, les CaCo2 (cancer du côlon), et dans des lignées de cellules pulmonaires. L'expression

de la NOX1 peut être induite dans d'autres tissus par le PDGF (platelet derived growth factor), les prostaglandines, ou encore l'angiotensine II.

➤ *La NADPH oxydase NOX4*

La NOX4 a été identifiée pour la première fois dans le rein (Geiszt 2000), et ne présente que 39% d'homologie avec la NOX2 humaine. Le gène qui code pour la NOX4 humaine est localisé sur le chromosome 11. La NOX4 est bien exprimée dans le rein, les ostéoclastes, les cellules endothéliales, les muscles lisses, les cellules hématopoïétiques, et dans les fibroblastes. Des études menées en 2009 ont montré l'expression de la NOX4 dans la thyroïde (Weyemi, Caillou et coll, 2009). L'ARN messager de la NOX4 peut être induit par le TGF β (Transforming Growth Factor β), le TNF α (Tumor Necrosis Factor α) (Sturrock et coll, 2006) et l'angiotensine II. Par des techniques d'immunofluorescence et de microscopie confocale, la NOX4 a été observée dans le réticulum endoplasmique et dans la membrane. L'activité de la NOX4 est dépendante de la p22^{phox}, mais contrairement à la NOX1 et la NOX2, elle ne nécessite aucun facteur cytosolique (Fig7). Cependant un nouveau partenaire de la NOX4 appelé poldip2 a été montré récemment dans les cellules vasculaires du muscle lisse (Lyle et coll, 2009).

➤ *La NADPH oxydase NOX3 :*

La NOX3 possède 56% d'acides aminés en commun avec la NOX2, et comprend 568 acides aminés. Le gène qui code pour la NOX3 est localisé sur le chromosome 6. Chez le fœtus la NOX3 est bien exprimée dans le rein, la rate, et le poumon. Par contre chez l'adulte son expression est réduite à l'oreille interne, et joue un rôle majeur dans la formation des otoconies. L'activité de la NOX3 est dépendante de la p22^{phox}, et déclenchée par l'association avec NOXO1, NOXA1, la p47^{phox} et la p67^{phox} (Cheng et coll, 2001, Banfi et coll, 2004, Ueno et coll, 2005) (Fig7) .

➤ *La NADPH oxydase NOX5 :*

La NOX5 a été identifiée en 2001 par Cheng et collaborateurs et Banfi et collaborateurs (Cheng et coll 2001, Banfi et coll, 2001). Elle comprend 737 acides aminés, et ne présente que 27% d'homologie avec la NOX2. Le gène qui code pour la NOX5 est localisé sur le chromosome 15. Les isoformes identifiées par le groupe de Banfi possèdent une longue boucle intracellulaire porteuse de domaine liaison

au Calcium (EF-Hands) (Banfi et al 2001, 2004). L'ARN messager de la NOX5 a été décrit dans le testicule, la rate, le pancréas, l'ovaire, l'utérus, l'estomac et de nombreux tissus fœtaux (Banfi et coll, 2001, Cheng et coll, 2001). Des techniques de transfection par des petits ARN interférants ont permis de montrer que l'activité de la NOX5 est indépendante de la $p22^{\text{phox}}$ contrairement aux autres NOXs, et quelle ne nécessite aucune sous unité cytosolique. La NOX5 est régulée par le calcium intracellulaire via les 4 domaines « EF hands » (Fig7). Cette NADPH oxydase est absente chez les rongeurs.

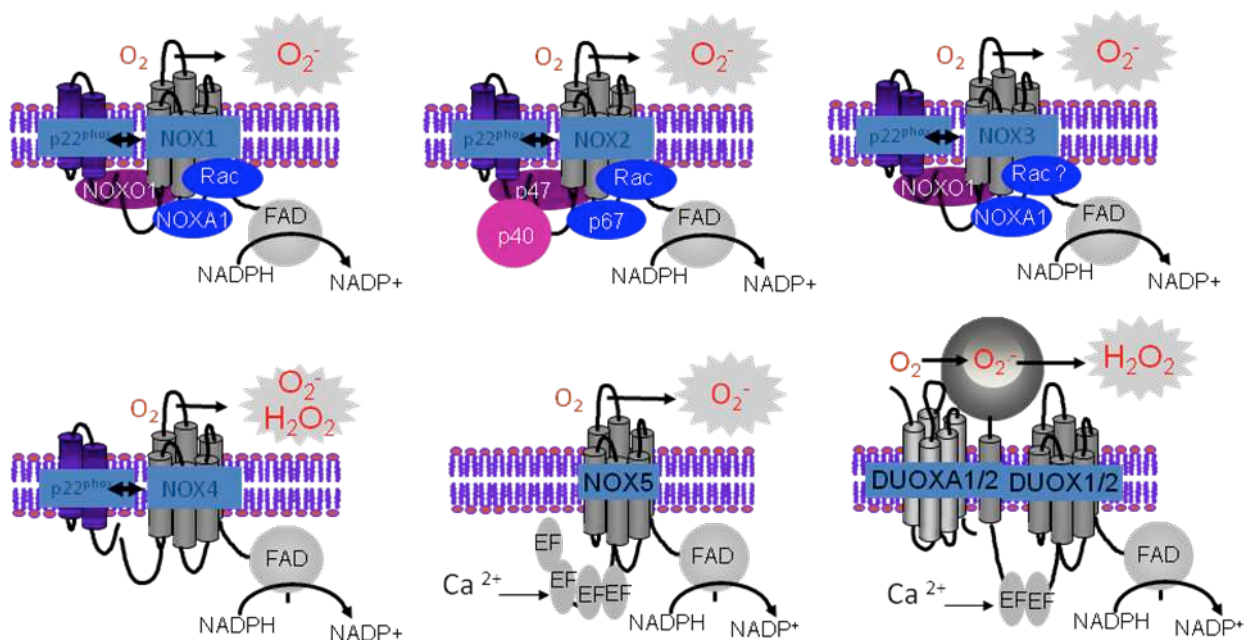


Figure 8: Structure des différents membres de la famille des NADPH oxydases

2) LES TUMEURS THYROÏDIENNES :

Les tumeurs thyroïdiennes sont les tumeurs endocrines les plus fréquentes, elles représentent à peu près 1% de l'ensemble des tumeurs. Les nodules thyroïdiens sont 2 à 3 fois plus fréquents chez la femme que chez l'homme, chez le sujet âgé, et chez les sujets vivants en zone de carence iodée ou ayant subi une irradiation de la région cervicale durant l'enfance. Ils sont mis en évidence par palpation, mais l'échographie permet de déceler des nodules dont le diamètre est inférieur à 5 mm. Parmi ces nodules, environ 95% sont bénins et 5 % sont des cancers. Le nombre de cancer de la thyroïde découvert en France chaque année est d'environ 4000, ce

nombre est en croissance depuis 1970. Cette augmentation est essentiellement due à l'amélioration des techniques de détection pratiquées en clinique.

La grande majorité des tumeurs de la thyroïde se développe à partir des cellules folliculaires. Cependant 5% des cancers de la thyroïde sont des cancers médullaires et se développent à partir des cellules C qui sécrètent la Calcitonine.

Les tumeurs d'origine folliculaires, sont classées en tumeurs bénignes (adénomes) et tumeurs malignes (carcinomes). Il existe deux types de carcinomes, ceux dont le diamètre est supérieur à 1 cm, et les microcarcinomes dont le diamètre est inférieur à 1 cm. Ces derniers sont les plus fréquents avec un potentiel évolutif très faible. Des altérations géniques caractérisent les différents types de cancers thyroïdiens. Il s'agit de mutations ou de réarrangements chromosomiques qui confèrent un potentiel prolifératif à la cellule devenue cancéreuse. Les patients présentant des tumeurs malignes (sauf lorsqu'il s'agit d'un cancer médullaire ou anaplasique c'est à dire indifférencié) sont souvent soignés par ablation totale de la thyroïde associée à un traitement à l'iode radioactif (I^{131}). Parmi les cancers de la thyroïde, 90 % sont de type papillaire ou folliculaire et peuvent être traités de façon très efficace. Les métastases à distance de cancer de la thyroïde surviennent souvent au niveau des poumons et des os.

a) Facteurs de risque :

Le seul cas où une origine du cancer de la thyroïde a été clairement établie est celui d'une exposition à des radiations ionisantes au niveau du cou pendant l'enfance, de manière accidentelle ou lors d'un traitement radiothérapeutique. En effet, une augmentation très importante du nombre de cancers de la thyroïde a été enregistrée chez les enfants contaminés en Biélorussie, en Ukraine et en Russie suite à l'accident de Tchernobyl (Schlumberger et coll, 2011).

Le contexte familial peut également être considéré comme facteur de risque dans certains cas. 3 à 5 % des patients atteints d'un cancer de la thyroïde ont un parent atteint de ce même type de cancer. Ceci peut être lié à des facteurs environnementaux ou à des prédispositions génétiques.

b) Les différents types de tumeurs de la thyroïde d'origine

vésiculaire

Dans les tumeurs issues des thyrocytes on distingue deux groupes : les tumeurs bénignes ou adénomes, et les tumeurs malignes qui regroupent les cancers différenciés, les cancers peu différenciés et les cancers indifférenciés.

b-1) Les tumeurs bénignes ou adénomes:

L'adénome est la pathologie la plus fréquente dans la thyroïde (80 % des nodules opérés). Il s'agit d'un nodule unique, bien limité par une capsule fine. Ce nodule déforme le lobe thyroïdien. On distingue deux types d'adénomes en fonction de leur capacité à fixer l'iode radioactif, les adénomes froids et les adénomes chauds. Les nodules chauds se caractérisent par une hyperactivité associée à une activation constitutive de la cascade de l'AMPc. Les nodules chauds sont souvent bénins. Les nodules froids en revanche sont caractérisés par une diminution d'activité. Environ 5% d'entre eux peuvent évoluer en carcinomes folliculaires. Ils sont principalement caractérisés par des mutations activatrices de RAS et des réarrangements chromosomiques PAX8-PPAR γ (30%) (Krohn et coll, 2002) (Schlumberger et Pacini, 1997).

b-2) les cancers différenciés d'origine vésiculaire :

Deux formes de cancers différenciés de la thyroïde ont été décrites : les cancers papillaires et les cancers folliculaires.

➤ Cancer papillaire :

Ce sont les tumeurs les plus fréquentes, elles représentent 60% des cancers thyroïdiens, et 1% des cancers humains. Les cancers papillaires (PTC) ont un bon pronostic avec un taux de survie de 80% à 90% sur 5 à 10 ans. Microscopiquement, ce type de cancer est caractérisé par des structures en papille à distribution focale ou diffuse. Les tumeurs papillaires métastasent souvent dans les ganglions et peu dans les poumons et les os. Il existe différents sous-types de cancers papillaires : la variante classique (la plus courante), la variante folliculaire, la variante à grandes cellules retrouvée le plus souvent chez les patients plus âgés, est de mauvais pronostic, et la variante solide la plus agressive (Furmanchuk et coll 1992, Schlumberger et coll, 1987). Les PTC sont caractérisés par une activation de la voie

des MAPkinase qui induit la prolifération et la dédifférenciation des cellules thyroïdiennes.

Sur un plan moléculaire, les cancers papillaires thyroïdiens se caractérisent essentiellement par des mutations activatrices :

de la protéine BRAF : (dans 40% des cas) Le gène codant pour la sérine/thréonine kinase B-Raf ($\pm$ 70kDa), qui est une des MAP3Ks dans la voie ERK, est situé sur le chromosome 7 (Sithanandam et coll, 1992). Les gènes A-raf et C-raf, localisés respectivement sur les chromosomes X et 3, possèdent tout comme B-raf, une région amino-terminale régulatrice très conservée et un domaine catalytique carboxy-terminal (Storm et Rapp, 1993). Des mutations du gène B-raf ont été découvertes dans plusieurs types de cancers, principalement dans les mélanomes où la mutation est retrouvée dans 66% des cas, dans les naevi bénins où elle est retrouvée chez 80% des patients, mais également dans les cancers du colon et des ovaires (Davies et coll, 2002). La fréquence mutationnelle de B-Raf dans les carcinomes papillaires thyroïdiens est d'environ 44%, et de 24% dans les carcinomes anaplasiques (Cf, paragraphe « cancers anaplasiques ») (Salvatore et coll, 2006). La mutation somatique T1796A où la thymine en position 1796 dans l'exon 15 est remplacée par une adénine, génère une substitution de la valine en position 600 par un acide glutamique chargé négativement (V600E) dans la protéine, ce qui mime la phosphorylation de la sérine 598 de B-Raf activée et rend ainsi B-Raf constitutivement active (Davies et coll, 2002; Salvatore et coll, 2006). Une autre mutation K600E, a récemment été découverte dans certains variants folliculaires des carcinomes papillaires (Soares et coll, 2003). Une insertion au niveau protéique V599 (V599Ins) a également été identifiée dans de rares cas de carcinomes papillaires (Carta et coll, 2006).

Les mutations B-Raf apparaissent plus fréquemment dans les variants classiques et à cellules hautes des cancers papillaires où on retrouve généralement peu de réarrangements RET/PTC (9,1%) (Frattini et coll, 2004, Nikiforova et coll, 2003) et également dans certains cancers anaplasiques dérivés des PTCs (10-35%). La présence de la mutation B-Raf dans les variants les plus agressifs des PTCs renforce l'idée du rôle important joué par cette protéine dans l'agressivité de ce type de cancer qui est souvent associée à une invasion extrathyroïdienne, des métastases ganglionnaires. B-Raf induit de l'instabilité génomique dans la lignée de

thyrocytes (PCCL3) (Mitsutake et coll, 2005) et chez les souris transgéniques exprimant la forme mutée B-RafV600E, les thyrocytes se différencient et développent des métastases (Knauf et coll, 2005).

de l'oncogène RET/PTC : il résulte de la fusion du domaine tyrosine kinase intracellulaire de RET avec la région 5' d'un gène ubiquitaire possédant un domaine de dimérisation. Le gène RET code pour un récepteur membranaire à activité tyrosine kinase. Ce gène est exprimé dans la thyroïde au niveau des cellules C mais pas dans les thyrocytes. La protéine de fusion RET/PTC possède une activité tyrosine kinase constitutive. Il existe au moins 15 partenaires différents de RET.

α) L'oncogène RET :

La forme active du proto-oncogène RET, a été isolée pour la première fois par Takahashi et collaborateurs en 1985 (Takahashi et coll, 1985) après transfection de cellules NIH 3T3 avec de l'ADN de cellules issues d'un lymphome humain. La transformation des cellules s'est produite par la perte de la région 5', et la fusion de la région 3' avec un segment d'ADN non apparenté. D'où le nom de RET pour *REarranged during Transfection*. Le proto-oncogène RET est localisé sur le bras long du chromosome 10 en position 10q11.2 (Pasini et coll 1995) (Fig 8). Il a une taille génomique de plus de 60 Kb, et composé de 21 exons, d'une taille allant de 60 à 287 pb, distribués le long d'une région de 30 kb (Caccherini et coll 1993, 1994, kwok et coll 1993). Des homologues de RET ont été retrouvés chez d'autres vertébrés, et même chez la drosophile. RET code pour un récepteur membranaire à activité tyrosine kinase, constitué de trois domaines : 1) un domaine extracellulaire de liaison du ligand avec quatre séquences répétées cadherine like et une région riche en cysteine, 2) un domaine transmembranaire hydrophobique, 3) un domaine cytoplasmique porteur de la séquence tyrosine kinase séparée au milieu par 27 acides aminés. Les deux domaines extracellulaire et cytoplasmique sont codés respectivement par les dix premiers et les neuf derniers exons, le domaine transmembranaire est codé par un seul exon qui est l'exon 11 (Fig 9, 10).

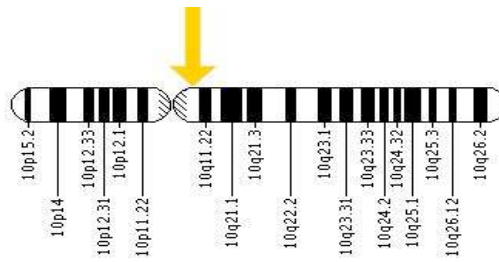


Figure 9 : Localisation du gène RET sur le chromosome 10 (d'après le *Genetics Home Reference*)

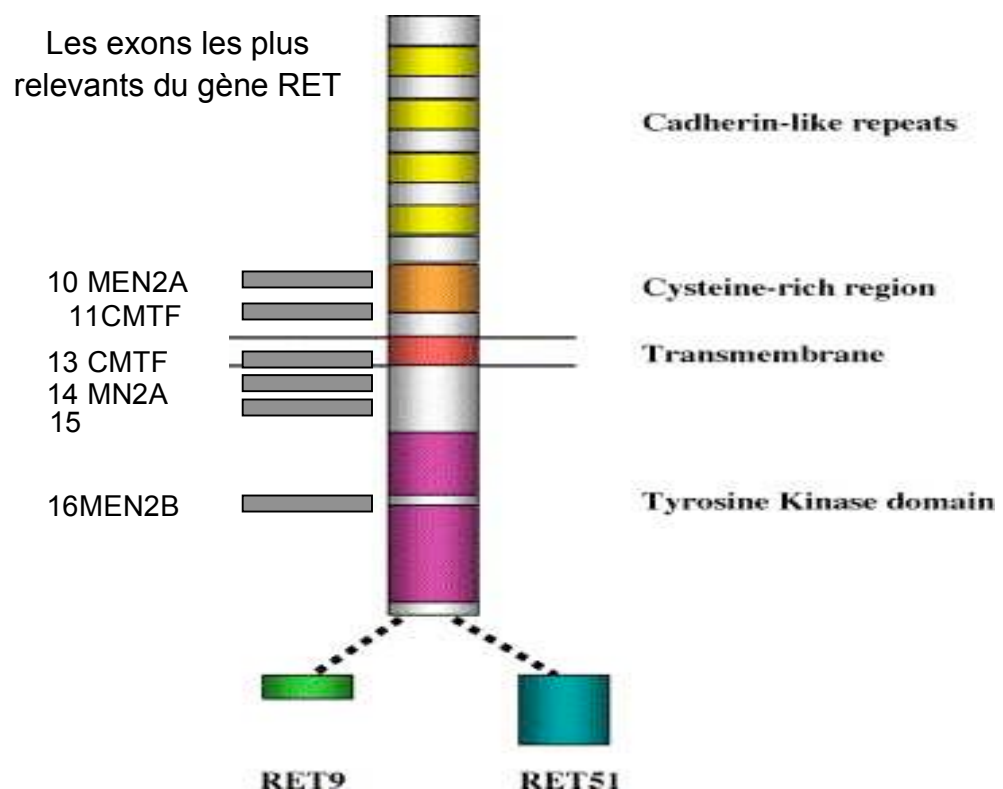


Figure 10 : représentation schématique de la protéine RET avec les exons les plus pertinents du gène (Arighi et coll, 2005).

L'organisation particulière de RET avec les motifs cadherine-like et son habilité à fixer le calcium définit RET comme un membre éloigné de la famille des cadhérines. Le poids moléculaire de la forme mature de RET est de 170 KDa, et celui de la forme localisée dans le réticulum endoplasmique non glycosylée, est de 150 KDa .

Un épissage alternatif de RET en 3' génère trois isoformes : une forme longue, une forme intermédiaire, et une forme courte. Les trois isoformes diffèrent dans leur région carboxy-terminal par la présence de 51, 43 ou 9 acides aminés (Myers et coll 1995). Les deux isoformes majoritaires sont RET 51 et RET 9. Des épissages alternatifs dans la région 5' du transcrit de RET codant pour le domaine extracellulaire ont été décrits en 1997 (Lorenzo et coll, 1997). Cet épissage donnerait naissance à trois nouvelles isoformes dont l'exon 3, l'exon 3 et 4, ou les exons 3, 4 et 5 font défaut.

β) RET et son ligand GDNF

Le gène RET joue un rôle critique dans le développement du système nerveux entérique et du système rénal. L'étude de l'expression du gène RET dans des modèles animaux a confirmé le rôle de RET dans le développement du système nerveux central et périphérique ainsi que dans le système excrétoire rénal (canal de Wolff et épithélium du bourgeon urétéral)(Schuchardt et coll 1994; Pachnis et coll, 1993). Ceci semble se confirmer chez l'homme par l'expression précoce de RET chez l'embryon.

Le GDNF est le « membre fondateur » de la famille des ligands GDNF. Le GDNF (Glial cell line-derived neurotrophic factor) est connu pour son rôle important dans le développement et le maintien de certaines populations neuronales au sein du système nerveux central et périphérique. Comme tous les membres de la famille du GDNF, la protéine est synthétisée sous la forme d'un précurseur de 211 acides aminés, qui après clivage protéolytique génère une protéine mature de 134 acides aminés. Le produit ainsi généré, biologiquement actif, est un dimère composé de deux molécules reliées entre elles par des ponts dissulfures. Les souris *Knock out* GDNF et RET présentent des phénotypes très proches ce qui suggère un lien très étroit entre la protéine RET et le GDNF. La grande affinité du GDNF pour RET est médiée par une protéine clonée en 1996 (Treanor et coll 1996) (Jing et coll 1996), appelée GFR α . Cette dernière se fixe sur la protéine RET, l'active via des tyrosine kinases et induit la phosphorylation de 4 tyrosines (Tyr 905, Tyr 1015, Tyr 1062, Tyr 1096) permettant ainsi la fixation du ligand sur son récepteur (figure 11).

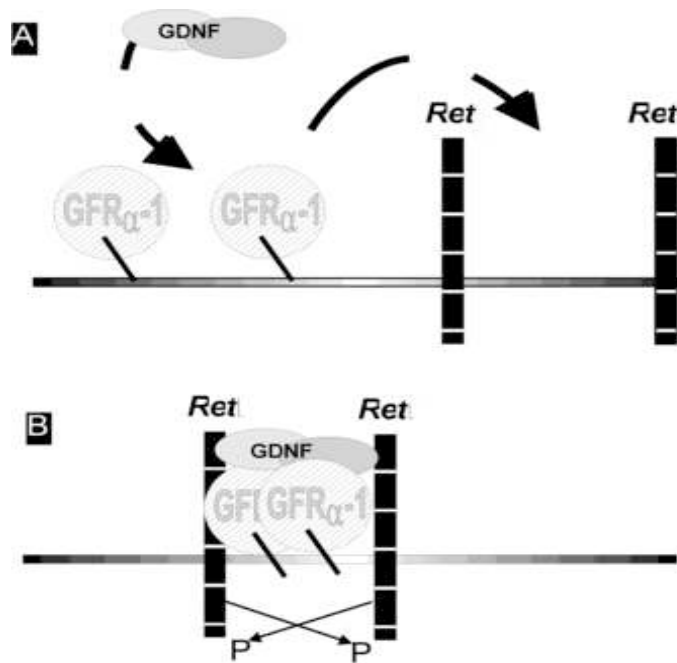


Figure 11 : La fixation du GDNF sur le récepteur RET (d'après Jing et coll, 1996; Treanor et coll, 1996)

γ) Mécanismes d'activation oncogénique du gène RET :

RET est activé selon deux mécanismes distincts : activation par mutation ponctuelle, ou activation par un réarrangement chromosomique. L'activation du proto-oncogène RET par mutation ponctuelle est observée dans les néoplasies endocrines multiples de type 2A (NEM2A) ou 2B (MEN2B), ainsi que dans les cancers médullaires de thyroïde sporadiques ou familiaux. Les réarrangements somatiques chromosomiques impliquant RET représentent la majorité des altérations géniques observées dans les cancers papillaires de la thyroïde. Ces réarrangements ont été recensés dans 70% des cas de cancers radioinduits de la thyroïde.

γ 1) Activation par mutation :

Les NEM II et les formes familiales du cancer médullaire de la thyroïde affectent les cellules productrices de calcitonines (cellules C) et sont associés à la présence d'une mutation ponctuelle sur le proto-oncogène *RET* altérant la fonction du récepteur tyrosine kinase RET. Dans les formes familiales du cancer médullaire de la thyroïde (F-MTC) : plus de 60 % des familles ont une mutation dans des localisations diverses : exons 10-11-13 ou 14. Dans le cas des NEM 2B: pratiquement 100 % des cas, qu'ils aient ou non une histoire familiale connue sont porteurs d'une mutation unique,

localisée dans l'exon 16, sur le codon 918. Dans les NEM2A: plus de 95 % des mutations présentes dans les familles se situent sur le codon 634 de l'exon 11.

γ2) Réarrangement RET :

L'oncogène RET/PTC résulte d'un réarrangement chromosomique (translocation ou inversion) du domaine intracellulaire (C-terminal) à activité tyrosine kinase du gène RET avec le promoteur et la partie N-terminale d'un autre gène dont la protéine est exprimée dans le cytosol du thyrocyte de manière constitutive. RET/PTC peut exercer une activité oncogénique via divers mécanismes. Son expression est donc modifiée, et indépendante du ligand avec une relocalisation sub-cellulaire. L'expression de la forme sauvage de RET est strictement régulée (Airaksinen et coll 2002), tandis que ses partenaires lors de la fusion sont exprimés de façon ubiquitaire (Celletti 2004). Par conséquent, le réarrangement RET/PTC peut conduire à une expression imprévue de RET dans les cellules thyroïdiennes. Le réarrangement supprime le domaine extracellulaire de liaison du ligand et les domaines transmembranaires du récepteur. La translocation RET/PTC permet les interactions entre les domaines nécessaires à la dimérisation et à l'activation de la kinase. Par conséquent, le réarrangement forme des dimères qui sont essentiels pour l'activation oncogénique (Monaco et coll 2001). La conséquence de la suppression du domaine extracellulaire de RET est que l'oncoprotéine RET/PTC ne peut plus d'interagir avec les régulateurs négatifs situé au niveau de la membrane plasmique, comme la protéine tyrosine phosphatase de type récepteur-J (PTPRJ) (Iervolino A et coll 2006, Pierotti et coll, 1996). Après dimérisation, les protéines réarrangées peuvent s'autophosphoryler pour induire la cascade de signalisation en l'absence de ligand activateur (activation constitutive de la voie ERK et de la voie PI3K) (Jhiang, 2000). La délétion de la séquence transmembranaire et extracellulaire suite à la translocation ne permet plus l'ancrage de RET à la membrane, et l'oncoprotéine RET/PTC est donc exprimée de façon constitutive dans le cytosol. A l'heure actuelle, 12 translocations RET/PTC différentes ont été identifiées (RET/PTC1-9, ELKS/RET, PCM1/RET et RFP/RET) (Murakumo et coll, 2006) (Fig 12).

Les réarrangements RET/PTC, en plus de l'activation de RET, peuvent également altérer la fonction des partenaires de fusion. Le meilleur exemple d'un partenaire de fusion de RET, dont la modification de la fonction peut contribuer à une transformation néoplasique est la sous-unité régulatrice I- α de la protéine

kinase A (PRKAR1A) qui est impliqué dans RET/PTC2. PRKAR1A est, en effet, un suppresseur de tumeur et son extinction chez la souris induit la formation de tumeurs de la thyroïde (Griffin et coll 2004).

Étant donné les nombreuses données de la littérature et la fréquence des translocations de type 1 et 3 dans les cancers papillaires de la thyroïde, nous avons choisis de décrire ces deux variants du gène de fusion RET/PTC. Notons que RET/PTC3 a un pouvoir transformant plus important que la variante RET/PTC1 dans les thyrocytes en culture primaire (Basolo et coll 2000).

- **RET/PTC1**

Le réarrangement RET/PTC1 survient suite à une inversion intrachromosomique paracentrique des gènes RET et CCDC6 localisé en position 10q21. Le gène CCDC6 est composé de deux exons séparés par un intron de plus de 60Kb (Grieco et coll 1994), et contient à son extrémité 5' un site promoteur qui serait responsable de son expression dans différents tissus y compris dans la thyroïde, et un domaine à leucine zipper qui serait responsable de l'oligodimérisation (Tong et coll, 1997). La survenue fréquente de réarrangements RET/PTC1 lors d'une irradiation est favorisée par la proximité spatiale des gènes partenaires (RET et H4) pendant l'interphase (Nikiforov et coll, 1999; Nikiforova et coll, 2000). Le gène chimérique RET/PTC1 code pour deux protéines isoformes à activité tyrosine kinase : p59 et p64 (Lanzi et coll 1992). Comme la dimérisation des récepteurs tyrosine kinase est une étape majeure pour leur activation, en 1995 des études ont montré que l'oligomérisation constitutive de RET/PTC1 dont l'expression a échappé au contrôle du ligand, serait responsable du pouvoir transformant de RET/PTC1 dans la thyroïde.

- **RET/PTC 3**

Le gène avec lequel RET fusionne par inversion intrachromosomique pour former RET/PTC3, est le gène ELE1. Il code pour un coactivateur des récepteurs aux androgènes. Ce serait le domaine coil-coiled de ELE1 (RFG, NCOA4 ou ARA70) qui permettrait la dimérisation des récepteurs. La formation de RET/PTC3 est compatible avec une cassure double brin suivie d'une recombinaison réciproque de gènes

RFG/ELE1 et RET. Les gènes formant RET/PTC3 sont très proches dans le chromosome, la recombinaison réciproque est donc facile (Nikiforov, 1999). L'expression chronique de RET/PTC3 induit une prolifération indépendante de la TSH et empêche l'expression des marqueurs de la différenciation folliculaire de la thyroïde dans la lignée de rat PCCL3 (Melillo et coll 2005), en revanche une expression aiguë de l'oncogène RET/PTC3 induit l'apoptose (Wang et coll 2003, Castellone et coll 2003), ce phénomène est souvent observé lorsqu'un oncogène est introduit dans des cellules normales. L'expression de RET/PTC dans des thyrocytes humains en culture primaire induit des changements de morphologie nucléaire ressemblant à celles des thyrocytes humains issues d'un cancer papillaire (Fisher et coll 1998). De même, les souris porteuses de tumeurs thyroïdiennes avec la translocation RET/PTC3, ont un phénotype ressemblant à celui associé à l'activation de cette variante de RET/PTC chez l'Homme (Nikiforov et coll 1997, Jhiang et coll 1998).

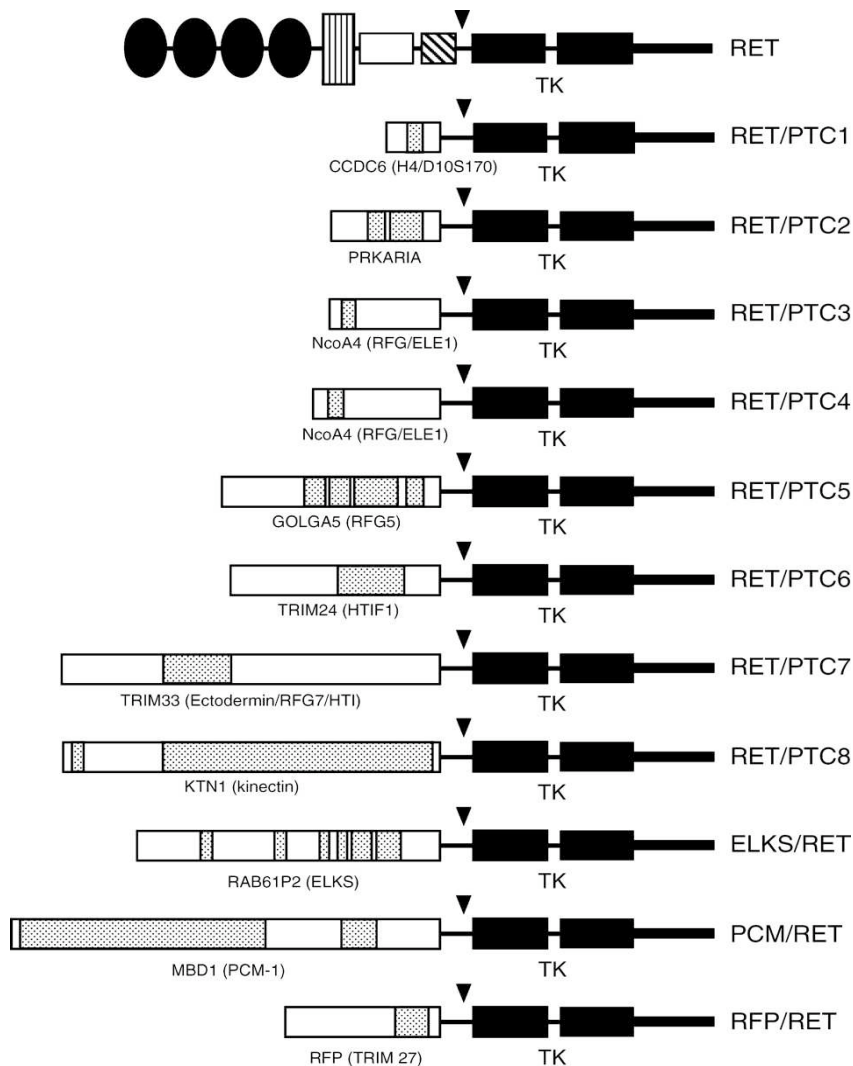


Figure 12 : Représentation schématique des différents types de translocations RET/PTC (Santoro et coll 2006). Dans les PTCs, RET est réarrangé avec des gènes différents, qui interviennent dans la dimérisation de la protéine indépendante du ligand. Les flèches indiquent les points de cassures du gène RET.

Le réarrangement TRK : il résulte de la fusion du proto oncogène NTRK1 avec la région 5' promotrice d'un gène ubiquitaire, ce qui induit une activité tyrosine kinase constitutive.

Le réarrangement AKAP9-BRAF: il résulte d'une inversion paracentrique du chromosome 7, qui induit une fusion de AKAP9 avec le domaine C-terminal du proto-oncogene BRAF. Cette fusion est à l'origine d'une activité tyrosine kinase constitutive.

Les mutations RAS et les réarrangements PAX8-PPAR γ ont également été décrits dans les cancers papillaires (Nikiforov et coll, 2011). Toutes ces mutations sont détectées dans 70% des cas de cancer papillaires, et sont exclusives.

➤ **Les cancers folliculaires :**

Ils sont bien différenciés ou peu différenciés. Ils représentent 30% des cancers thyroïdiens, et sont fréquents à partir de quarante ans. Ces tumeurs sont encapsulées, elles donnent peu de métastases ganglionnaires locales mais diffusent par voie sanguine ce qui engendre, contrairement aux PTCs, des métastases à distance dans les poumons et les os. Dans les formes de cancer folliculaire bien différencié, le diagnostic de malignité est bien difficile à établir. Par contre dans les formes invasives le diagnostic est plus simple à effectuer (Martin et Hedinger et coll 1988). Concernant le statut mutationnel des cancers folliculaires, les mutations les plus fréquentes dans ce type de cancer de la thyroïde affectent le codon 61 de N-RAS et H-RAS. La famille des gènes RAS qui comprend H-RAS, K-RAS, N-RAS, codent pour des petites protéines G, impliquées dans la transmission du signal de nombreuses voies comme la voie ERK, et la voie phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt. En effet, la protéine RAS peut stimuler la PI3K qui appartient à une famille d'enzymes qui phosphorylent les lipides inositols des membranes (Wymann, et Pirola, 1998), qui activent la kinase Akt. Une fois phosphorylée Akt active mTOR qui participe à la progression du cycle cellulaire et à la prolifération. La phosphorylation des inositols peut rapidement être dégradée par des phosphatases comme PTEN, ce qui inhibe la voie de signalisation PI3K/Akt.

Les mutations RAS sont retrouvées dans 40 à 50% des carcinomes folliculaires, et dans 20 à 40% des adénomes folliculaires (Zhu et coll, 2003) (Lemoine et coll, 1988). Des travaux réalisés *in vivo* ont montré que l'activation de RAS induit le développement de nodules, d'adénomes et de carcinomes chez les souris transgéniques, et une augmentation de la prolifération cellulaire, mais elle reste insuffisante pour une transformation totale de cellules en culture. Les mutations activatrices de RAS sont également accompagnées d'une instabilité chromosomique, de la formation de micronoyaux, d'une amplification des centrosomes, et une désorganisation des chromosomes durant la mitose (Abulaiti et coll, 2006).

De nombreuses études ont montré que les mutations RAS dans les carcinomes thyroïdiens sont corrélées à une dédifférenciation et un pronostic moins favorable (Basolo et coll, 2000) (Garcia–Rostan et coll, 2003). D'après certains auteurs les mutations RAS dans le cancer de la thyroïde seraient associées à un comportement métastatique des cellules (Liu et coll, 2006). Les mutations RAS constituent donc un marqueur métastases et de dédifférenciation, mais ne peuvent être utilisées comme marqueur pronostic de tous les types de cancers de la thyroïde (Fig13).

b-3) Les cancers peu différenciés :

Les cancers pauvrement différenciés (PDC) regroupent les carcinomes intermédiaires entre les tumeurs différenciées et les tumeurs anaplasiques. Les mutations du gène RAS, BRAF, p53 et β caténine sont souvent retrouvées dans ce type de cancer (Fig13).

b-4) Les cancers indifférenciés ou anaplasiques :

Le cancer anaplasique (ATC) représente 5 à 15% des cancers de la thyroïde. Il s'agit de l'un des cancers humains les plus agressifs avec 40% de mortalité. Les ATC sont réfractaires à de nombreux traitements. Les cancers anaplasiques présentent une évolution rapide avec des métastases dans le foie, les os et le cerveau. Ils sont subdivisés en cancers à cellules fusiformes, à cellules géantes ou à petites cellules. Ces tumeurs sont souvent considérées comme une évolution naturelle des cancers différenciés. 60% des ATC sont caractérisés par une perte de fonction du gène suppresseur de tumeur la p53, entre 20 et 50% des ATC présentent une mutation RAS et 15 à 26% d'entre eux présentent une mutation BRAF. Une dérégulation de la voie PI3K/Akt est également observée dans 58% des ATC (Fig13).

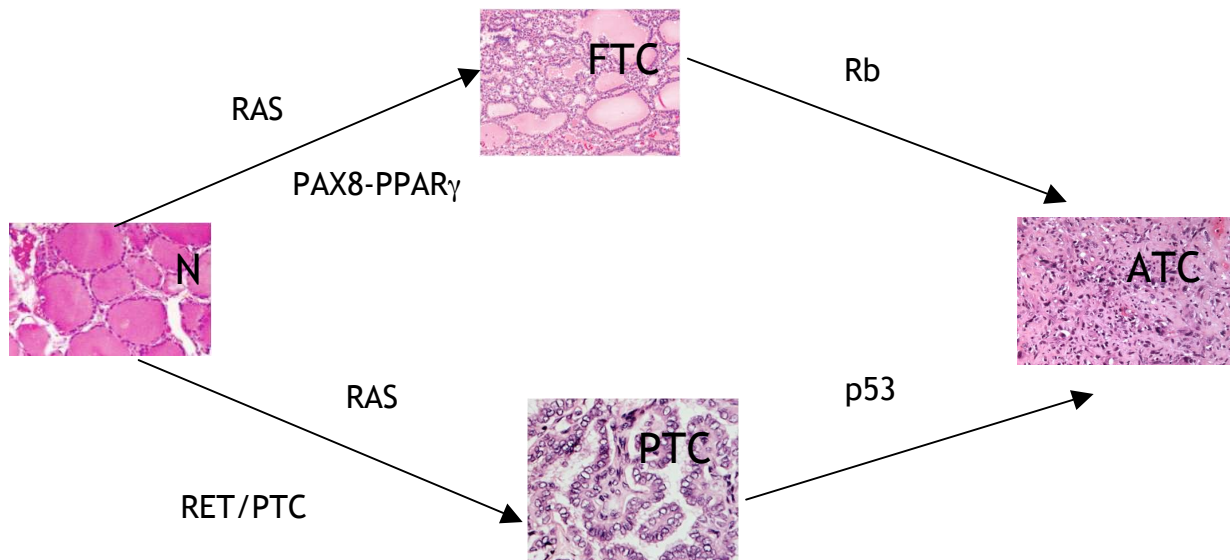


Figure 13: Modèle de la tumorigenèse épithéliale thyroïdienne. N: thyrocyte normal ; FTC : cancer folliculaire. PTC : cancer papillaire. ATC : cancer anaplasique (adapté de Lacroix et coll, 2005).

II) LES PATHOLOGIES RADIOINDUITES :

1) LES RADIATIONS IONISANTES:

a) Définition :

Les rayonnements ionisants trouvent leur origine dans un phénomène physique naturel : la radioactivité. Elles sont capables de produire des ions au contact de la matière. Elles comprennent les rayons X provenant de sources artificielles et les radiations alpha, bêta et gamma provenant de matériaux radioactifs.

a-1) Les rayonnements électromagnétiques

Les radiations électromagnétiques d'origine atomique (X) ou nucléaire (γ ou gamma) possèdent une énergie variable (quelques Kev à quelques Mev, celle des X est souvent inférieure à celle des γ), avec un pouvoir ionisant faible. Les rayonnements X et gamma sont exploités dans le domaine clinique et principalement en radiothérapie. Ces deux rayonnements ont comme caractéristique d'avoir une grande capacité de pénétration dans la matière biologique qui peut conduire à deux types de réaction : l'excitation ou l'ionisation.

L'excitation se produit lorsqu'un électron de l'atome ou de la molécule s'élève à une énergie supérieure sans être éjecté. Si les radiations ont une énergie suffisamment élevée pour éjecter un électron, il s'agit d'une ionisation.

a-2) Les rayonnements particuliers

- **Rayonnements alpha (α):** constitués de particules chargées positivement, qui sont des noyaux d'hélium (2 neutrons et 2 protons). Ce type de rayonnement est émis lors de la désintégration d'un noyau radioactif lourd qui émet un noyau d'hélium afin de devenir plus stable. Les rayonnements α sont très énergétiques (plusieurs Mev), avec un fort pouvoir ionisant, mais un pouvoir de pénétration très faible, ils ont une trajectoire linéaire car ils possèdent une masse importante (7000 x plus lourde qu'un électron).
- **Rayonnements Bêta (β):** est constitué d'électrons chargés négativement (β^-), ou de positons chargés positivement (β^+). Ils possèdent une énergie très variable (de 0 à plusieurs Mev), avec un pouvoir ionisant intermédiaire et un pouvoir de pénétration faible.
- **Les neutrons :** sont des particules non chargées, leur pouvoir de pénétration dépend de leur énergie. Ils interagissent uniquement avec les noyaux des atomes de la matière qu'ils traversent. Les neutrons possèdent un pouvoir de pénétration très important.
- **Les protons :** sont chargés positivement. Ils sont utilisés en thérapie anticancéreuse appelée protonthérapie. Ils agissent en cédant leur énergie pendant la collision avec les noyaux et les électrons des tissus traversés.

b) Les unités de mesure des radiations ionisantes:

Le rayonnement ionisant est mesuré selon, l'intensité ou la radioactivité de la source de rayonnement, l'énergie du rayonnement, le niveau de rayonnement dans l'environnement, la dose de rayonnement ou la quantité d'énergie de rayonnement absorbée par le corps humain. L'activité radioactive ou intensité d'une source est mesurée en becquerels (Bq). 1 Bq = 1 désintégration d'un atome radioactif par seconde. Un becquerel est une quantité extrêmement faible d'activité radioactive. Un rayonnement ionisant qui interagit avec le corps humain cède son énergie aux tissus du corps. La quantité d'énergie absorbée par unité de poids d'un organe ou

d'un tissu est appelée la dose absorbée et elle s'exprime en grays (Gy). Une dose d'un gray correspond à une énergie de rayonnement d'un joule absorbé par kilogramme (poids) d'organe ou de tissu. Des doses égales de différents types de rayonnement ionisant n'ont pas toutes le même degré de nocivité.

L'effet biologique quant à lui est mesuré avec le sievert (Sv), unité nommée en hommage à Ralf Sievert. Le Sv évalue les effets des rayonnements ionisants sur la matière vivante. A dose égale, les effets de la radioactivité sur les tissus vivants dépendent de la nature du rayonnement (alpha, bêta, gamma, etc), de l'organe concerné et bien sûr du temps d'exposition.

Le Transfert d'Énergie Linéique (TEL) est une quantité qui décrit l'énergie transférée par une particule ionisante traversant la matière. Il rend compte de la distribution spatiale des ionisations, et permet de caractériser la quantité d'un rayonnement par un nombre indépendamment du type de particule et de son énergie, de l'organe concerné et bien sûr du temps d'exposition.

2) DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES :

De nombreuses études épidémiologiques ont montré que l'exposition aux radiations ionisantes pendant l'enfance était associée à une augmentation de la fréquence des tumeurs thyroïdiennes (Shore et coll,1992). L'étude des patients ayant reçu des doses importantes de rayonnements ionisants lors du traitement de la maladie d'Hodgkin pendant l'enfance rapporte des risques significatifs de cancers de la thyroïde (De Vathaire et coll 1999).

a) Irradiation accidentelle :

L'accident de Tchernobyl dans le nord de l'Ukraine est survenu le 26 avril 1986. Pendant les 10 jours qui ont suivi, des quantités considérables de radionucléides ont été rejetées dans l'atmosphère. Plusieurs études ont été menées en Europe et dans le monde afin d'en évaluer les conséquences sanitaires et, notamment, de déterminer si les rejets radioactifs ont provoqué certaines pathologies telles que cancer de la thyroïde, les affections thyroïdiennes bénignes, des leucémies, des tumeurs cancéreuses solides et des malformations congénitales.

Le principal effet des rejets radioactifs est l'augmentation des cancers de la thyroïde, en particulier, chez les enfants et chez les adolescents. Des études menées en 1990 ont montré dans différentes régions, soit 4 ans après l'explosion, une multiplication

par 10 à 100 le nombre de cancer de la thyroïde, maladie normalement très rare chez l'enfant (Fig14). Les deux familles de radionucléides les plus importantes dans ces rejets étaient les iodes (iode 131, iode 132/tellure 132, iode 133) et les césiums (césium 137, césium 134). La thyroïde est l'unique organe capable de concentrer et de fixer l'iode radioactif. Il existe une forte relation dose-effet entre l'exposition aux radiations et le risque de développer un cancer de la thyroïde avec un ratio de 5,5 par Gray, similaire à ce qui a été observé dans les radiations externes (Cardis et coll, 2005). Des études menées sur la population Biélorusse a montré un lien direct entre l'âge des individus irradiés et le risque de développer un cancer de la thyroïde. En effet plus les enfants sont jeunes au moment de l'accident plus le risque est accru, suggérant que le risque de développer un cancer de la thyroïde chez les individus adultes est pratiquement nul (Williams et coll, 1996). Ces résultats sont conformes à d'autres études qui montrent que la sensibilité de la thyroïde aux rayons gamma ou aux rayons X est fonction de l'âge au moment de l'exposition.

Une augmentation de l'incidence du cancer de la thyroïde, de l'ordre de 3 à 4, a également été constatée chez les individus adultes dans les pays voisins les plus affectés par les retombées radioactives. Les études menées ne montrent pas d'augmentation significative du taux de leucémies ni de cancers solides (cancers du côlon, du sein, du poumon, etc.) par rapport à la période antérieure à l'accident y compris dans les zones les plus contaminées. L'incidence de cette pathologie chez les enfants nés après le drame est normale.

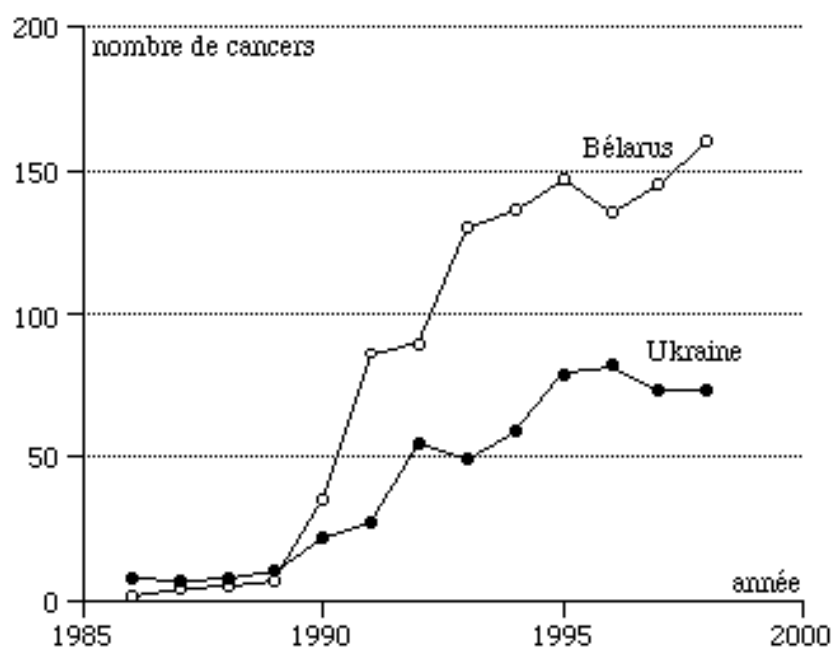


Figure 14: Cancers thyroïdiens différenciés chez des enfants de moins de 17 ans lors de l'accident. (d'après le rapport de l'assistance publique des Hôpitaux de Paris).

En 1954, l'Accident de l'Atoll de Bikini, suite à des essais nucléaires a été à l'origine de retombées de cendres sur les îles Marshall. L'irradiation externe a duré près de 48 heures accompagnée d'une contamination interne. Le principal isotope libéré était l'iode radioactif. Des augmentations très importantes de cas d'hyperthyroïdie ainsi que de cancers thyroïdiens ont été enregistrées.

Plusieurs études ont été menées concernant les retombées sanitaires de l'attaque nucléaire à Hiroshima et Nagasaki. En effet, l'étude la plus complète réalisée par le groupe de Imaizumi en 2006 (Imaizumi et coll, 2006) sur une cohorte de 4091 individus a montré qu'il existe une relation linéaire entre la dose reçue et l'incidence des nodules thyroïdiens après l'explosion. Comme dans le cas de Tchernobyl, la majorité des cancers étaient de type papillaire, avec une sensibilité accrue chez les jeunes enfants.

Et plus récemment, en avril dernier l'accident de la centrale nucléaire de Fukushima au Japon, a été placé selon les spécialistes sur une échelle des événements nucléaires au même degré de gravité que l'accident de la centrale de Tchernobyl. Toutefois les rejets radioactifs ne représentent que 10% de ce qui a été mesuré en Ukraine en 1986. En se basant sur les données épidémiologiques des accidents nucléaires précédents, on pourrait s'attendre dans les prochaines décennies à observer une augmentation des cancers thyroïdiens chez les individus qui auront été exposés pendant l'enfance.

b) Irradiation thérapeutique :

La radiothérapie est utilisée seule ou en association avec la chirurgie ou la chimiothérapie dans le traitement de nombreux cancers, elle est associée à la survenue d'effets secondaires aigus et tardifs (Wang et coll 2007). Ces effets secondaires sont étroitement liés aux lésions provoquées dans le tissu sain adjacent et présent dans le champ exposé au traitement. Il existe actuellement 3 types de radiothérapie :

La radiothérapie externe : la plus fréquemment utilisée. Elle consiste en l'utilisation d'accélérateurs de particules de rayonnement X à haute énergie.

La radiothérapie métabolique : utilise des sources radioactives liquides injectables, non scellées qui vont se fixer sur les cellules cibles et induire une toxicité plus ciblée. Les tumeurs thyroïdiennes sont traitées par des injections d'iode radioactif qui se fixe avec une grande affinité dans la mesure où les mécanismes de captation de l'iode sont toujours fonctionnels, ce qui peut induire la mort des cellules malignes.

La radio-immunothérapie : est basée sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux associés à des radionucléides, le plus souvent il s'agit de l'iode 131. Les anticorps sont dirigés contre un antigène exprimé par les cellules tumorales.

L'utilisation de la radiothérapie dans le traitement des cancers vise à tirer profit de la radiosensibilité des cellules tumorales. Les paramètres de la radiothérapie à savoir le champ d'irradiation, la dose totale et le fractionnement tiennent compte aussi bien de la taille, de la radiosensibilité, du grade, du stade et de la localisation tumorale, que de la présence de tissus sains à risque à proximité des tissus malins. La mise en place d'un protocole de radiothérapie est un compromis entre les bénéfices liés au traitement de la tumeur et les risques associés à l'irradiation des tissus sains. Un protocole de radiothérapie conventionnelle délivre des fractions de 1,8 gray/jour et ce, durant 5 jours par semaine avec des doses variables permettant d'obtenir un rapport efficacité anti-tumorale/ tolérance des tissus sains optimal (Denham et Hauer-jensen, 2002).

Après une irradiation de la région cervicale chez l'enfant, l'augmentation de l'incidence des cancers de la thyroïde apparaît 5 à 10 ans après le traitement, elle est maximale entre la 15^{ème} et la 19^{ème} année et se poursuit jusqu'à plus de 40 ans après l'irradiation.

L'augmentation du risque est importante pour des doses reçues de l'ordre de 100mGy. La relation dose-effet est linéaire jusqu'à 10 Gy. Pour des doses plus importantes la linéarité disparaît, sans doute à cause de la mort cellulaire. Là encore, plus l'enfant est jeune au moment de l'irradiation plus le risque est grand de développer un cancer thyroïdien. Des données épidémiologiques suggèrent l'existence de facteur de prédisposition et de susceptibilité individuelle.

3) LES EFFETS DIRECTS ET INDIRECTS DES RADIATIONS IONISANTES :

Les effets des rayonnements ionisants et leurs conséquences biologiques résultent principalement des dommages causés sur la cible critique qui est la molécule d'ADN. En effet les atomes de la molécule d'ADN peuvent directement être excités par le rayonnement, ce qui peut être à l'origine de l'initiation d'un effet biologique. Ce processus est appelé effet direct des radiations (Fig15). Les radiations ionisantes peuvent interagir avec d'autres molécules de la cellule particulièrement la molécule H_2O , qui représente 80% des constituants cellulaires. La radiolyse de l'eau engendre la production de radicaux libres, qui peuvent endommager la molécule de l'ADN : ce processus est appelé effet indirect de l'irradiation (Fig15).

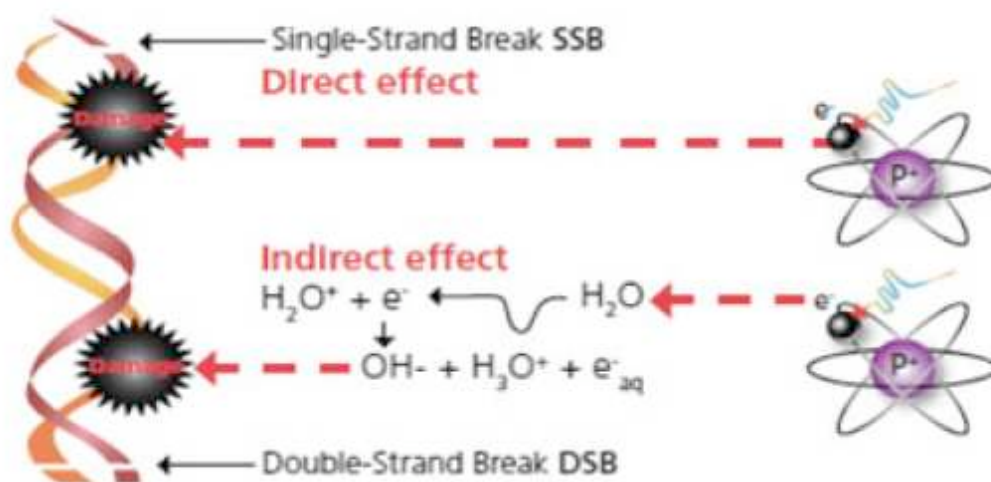


Figure 15 : Effets directs et indirects des radiations ionisantes (D'après Sjostedt S, revue, 2010)

a) Les effets directs de l'irradiation :

L'effet direct de l'irradiation consiste en une collision entre les rayonnements ionisants et les électrons des atomes constituant la molécule cible.

Les effets directs de l'irradiation sur la molécule d'ADN concernent essentiellement les rayonnements ayant un TEL élevé. Cet effet direct peut affecter les sucres qui composent le squelette de la molécule d'ADN ou encore les bases d'ADN. Les lésions occasionnées par ce mécanisme sont identiques à celles qui sont engendrées par les effets indirects, seules les proportions sont différentes.

b) Les effets indirects de l'irradiation :

Les radiations peuvent ioniser directement la molécule d'eau (Fig15,17). Le rayonnement transfère suffisamment d'énergie pour éjecter un électron du cortège

de la molécule d'eau. Cette réaction est fréquente et ne dure que quelques nanosecondes. La radiolyse de l'eau démarre par une ionisation. Cette réaction engendre la formation de deux radicaux hautement réactifs, mais avec une durée de vie très courte : $\text{OH}^\cdot$ et $\text{H}^\cdot$. L'ion hydroxyle peut réagir avec son semblable et générer un composé non-radicalaire; la molécule du peroxyde d'hydrogène qui est beaucoup plus stable. Les espèces réactives de l'oxygène ainsi générées sont à l'origine d'un stress oxydant.

Les espèces réactives de l'oxygène sont de petites molécules qui dérivent de l'oxygène. Ce groupe comprend l'anion superoxyde (O_2^-), radical hydroxyl, ($\text{OH}^\cdot$), le peroxy ($\text{RO}_2^\cdot$), et l'alkoxyl ($\text{RO}^\cdot$), ainsi que certains composés non-radicalaires considérés comme des agents oxydants comme l' O_2 et l' H_2O_2 . La production de ROS est le résultat d'une cascade de réactions qui débute par une production de superoxyde. Ce dernier est rapidement dismuté par la superoxyde dismutase (SOD). L' O_2^- peut s'associer à l'oxyde nitrique et former le peroxynitrique. Une réaction catalysée par une peroxydase permet la production d'acide hypochlorique à partir du peroxyde d'hydrogène. Deux principales réactions avec les métaux font partie de la cascade de production de ROS, il s'agit des réactions d'Haber Weiss et de Fenton qui permettent la dégradation de l' H_2O_2 selon les mécanismes suivants:



Réaction de Fenton



Réaction de Haber weiss

Figure 16 : réactions radicalaires avec des métaux

- l'anion superoxyde O_2^- ($\text{O}_2 + 1 \text{ e}^-$), non réactif, produit dans la mitochondrie au niveau des complexes I et III ou via le co-Enzyme Q au niveau du complexe II de la chaîne respiratoire, ou par des réactions enzymatiques comme les NADPH oxydases membranaires.

- Le peroxyde d'Hydrogène H_2O_2 , non-réactif, provient de la dismutation de l'anion superoxyde par la superoxyde dismutase. La molécule d' H_2O_2 a une durée de vie plus longue.

- Le radical hydroxyle $\text{OH}^\cdot$ est le radical le plus réactif, produit essentiellement par la réaction d'Haber Weiss et de Fenton catalysées par les métaux de transition (Fig16).

Contrairement aux espèces réactives de l'oxygène produites naturellement dans la cellule, celles produites après irradiation ont une distribution qui n'est pas homogène dans le milieu. Les excitations et les ionisations sont produites tout le long du parcours du rayonnement. Les rayonnements à fort TEL produisent des ionisations moins dispersées et plus denses (Goodhead 1989, 1994, Prise et coll , 1994).

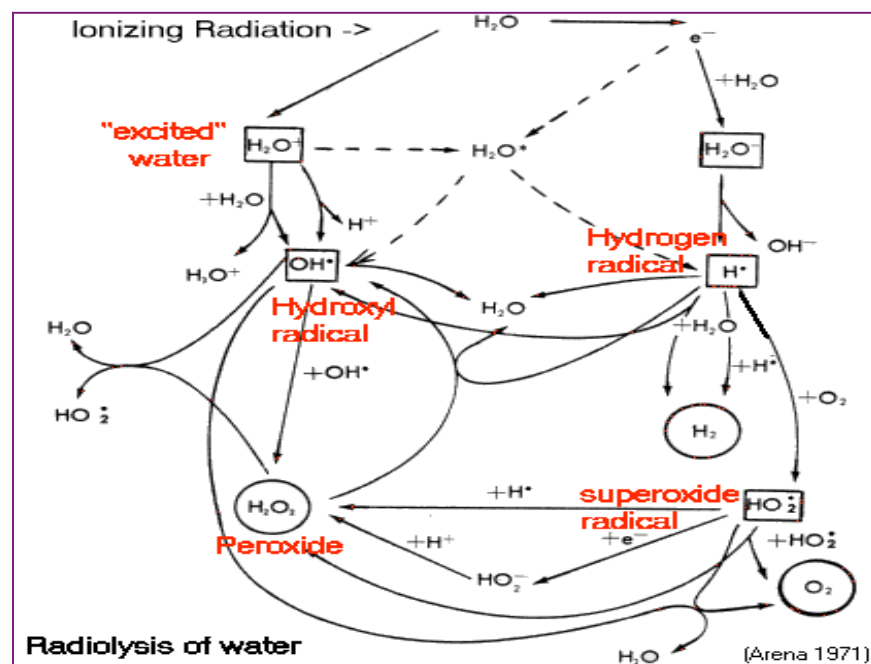


Figure 17: Effets des radiations ionisantes sur la molécule H_2O et la production des différentes espèces réactives de l'oxygène.

Les espèces réactives de l'oxygène interagissent avec un large panel de molécules organiques à savoir les protéines, les lipides, les carbohydrates, et les acides nucléiques. Les ROS peuvent altérer la fonction biologique des molécules cibles. En effet ils sont considérés comme des éléments majeurs dans le phénomène du

vieillessement et dans de nombreux dommages occasionnés au niveau des organismes biologiques.

4) LES DOMMAGES RADIOINDUITS AUX TISSUS SAINS :

Alors que les effets secondaires de la chimiothérapie sont systémiques ceux de la radiothérapie sont locaux ou loco-régionaux. Les lésions radioinduites aux tissus sains ont été classées en dommages aigus, subaigus, et tardifs en fonction de l'apparition des symptômes cliniques. Le processus pathologique des dommages radio-induits commence pendant le traitement mais les lésions morphologiques et les symptômes ne surviennent que beaucoup plus tard, des jours et des mois voire des années après l'exposition aux radiations ionisantes.

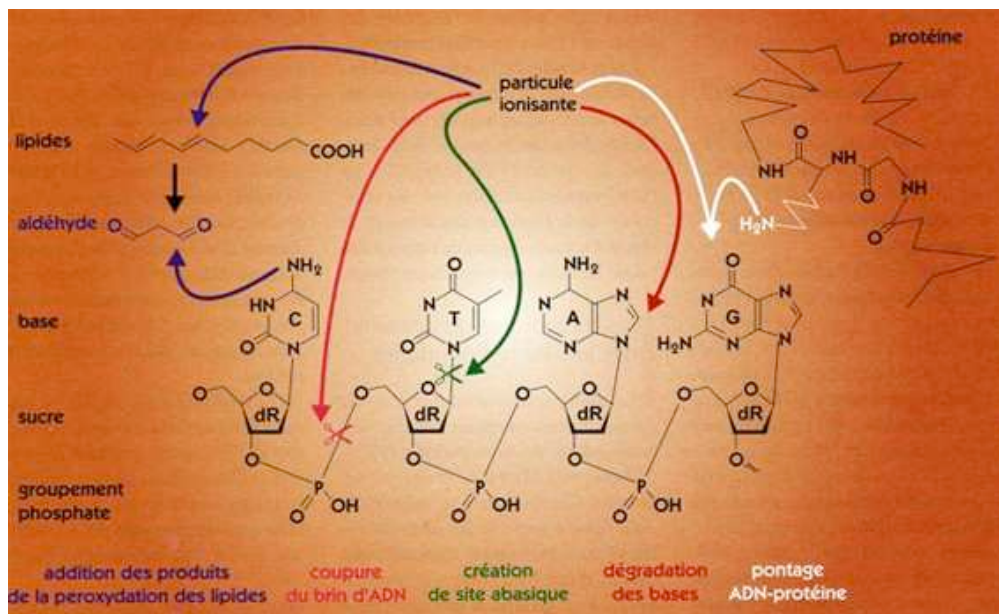


Figure 18: différentes lésions affectant la cible biologique après exposition aux radiations ionisantes (D'après J.CADET / CLEFS CEA)

a) Les lésions radioinduites de l'ADN :

Depuis de très nombreuses années, l'ADN est connu comme étant la cible critique des rayonnements ionisants. Les lésions primaires de l'ADN peuvent être induites par l'énergie déposée par le radioélément (effet direct) ou indirectement par excitation ou ionisation des molécules d'eau les plus proches (radiolyse de l'eau). Les dommages ainsi générés peuvent avoir des conséquences létales (mort

cellulaire ou blocage de la réplication) ou pro-mutagènes (lésions non réparées induisant des erreurs de la réplication) pour la cellule (Fig17, 18).

On distingue dans les dommages radioinduits de l'ADN, les dommages oxydatifs du désoxyribose et des bases puriques ou pyrimidiques, les pontages ADN-ADN, ou ADN-protéines, et les cassures simple ou double brin de la chaîne polynucléotidique. Une dose de 1 Gray produit dans chaque cellule à peu près 2000 dommages de bases, 1000 cassures simple brins (CSB), 150 pontages ADN-protéines, 40 cassures double brin (CDB), et 30 pontages ADN-ADN. Les cassures double brins sont les plus difficiles à réparer et peuvent avoir un effet létal. Il existe une bonne corrélation entre l'incidence des cassures doubles brins et la radiosensibilité (Iliakis et coll 1991).

Les cassures simple brin : Les cassures simple brin sont souvent associés à des rayonnements de faible TEL. 1000 cassures simples brin (CSB) sont produites dans une cellule d'eucaryotes supérieures par gray (Goodhead et coll, 1994). Ces lésions sont souvent réparées dans les minutes qui suivent l'exposition aux rayonnements, elles auraient également peu d'impact létal sur les cellules irradiées (Fig18).

Les cassures double brin (CDB) : Ces lésions sont beaucoup plus délétères. Elles illustrent la formation de réactions radioinduites sur chacun des deux brins de la molécule d'ADN à une distance inférieure à 10 paires de bases. Une dose de rayonnement d'un Gray est capable de générer entre 40 et 100 cassures doubles brins. La formation des CDBs est linéaire à partir de 1,2 Gy. Les CDBs peuvent être produites suite à l'action d'un seul radical $\text{OH}\cdot$ sur le 2-désoxyribose (Siddiqi et Bothe, 1987) avec un transfert du radical sur le deuxième brin ou être dues à l'attaque de plusieurs radicaux dans des zones rapprochées (Ward, 1985) (Fig18).

Les espèces réactives de l'oxygène peuvent interagir avec la molécule d'ADN et induire des modifications chimiques essentiellement par oxydation des bases qui constituent l'ADN (Beckman et coll, 1997, Cadet et coll, 1997). Cette altération a lieu suite à l'arrachage d'un ou de plusieurs atomes d'hydrogène. Les bases pyrimidiques sont plus sensibles que les bases puriques à l'attaque des radicaux libres. Elles peuvent avoir des conséquences létales ou mutagènes sur la cellule.

La cellule a toutefois développé des systèmes de réparation efficaces pour réparer ces dommages, ces lésions sont réparées à 80% dans les 15 minutes suivant

l'irradiation. Dans ce paragraphe, nous avons choisi de ne présenter que les lésions les plus étudiées dans la littérature.

Les dommages sur les bases puriques :

Adénine : la modification 8-Oxo Adénine (8-OxoA), le 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine (FapyA), et la 2-hydroxyadénine (2-Oh-A) sont les modifications majeures dues à l'oxydation de l'adénine. La 8-oxo-A est retrouvée dans les tissus exposés aux radiations ionisantes. Cette lésion est au moins 4 fois moins fréquente que le 8-OxoG (Fig19).

Guanine : est la base la plus sensible aux effets des espèces réactives de l'oxygène notamment celles générées par les radiations ionisantes (Kasai et coll, 1986, Demple et coll, 1994, Cadet et coll, 1997, kawanishi et coll, 2001). Ses principales modifications sont la 8-Oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoG) et la 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (FapyG). La 8-oxoG est générée par l'addition d'un radical hydroxyle en position C8 de la guanine, tandis que la réduction de ce radical par un électron produit le FapyG. Les deux modifications affectant la guanine sont retrouvées dans les cellules exposées aux radiations ionisantes en quantité à peu près égale (Boiteux et coll, 1992, Douki et coll, 1997). La 8-oxoG est une modification mutagène qui peut entraver la transcription. Les effets géotropiques de la fapyG ne sont pas clairement établis, elle serait cytotoxique mais pas mutagène (Fig19).

Les dommages sur les bases pyrimidiques :

La thymine : la lésion la plus fréquente est le glycol de thymine (5,6-dihydroxy-5-dihydrothymine) (Cadet et coll, 1999) formée par une réaction de la thymine avec le radical hydroxyle. Cette lésion en bloquant la réplication de l'ADN peut être létale pour la cellule (Fig19).

La cytosine : Les produits générés par l'oxydation de la cytosine sont des analogues des produits générés par l'oxydation de la thymine. La lésion la plus courante est la 5-Hydroxycytosine (Cadet et coll, 1997) (Fig 19).

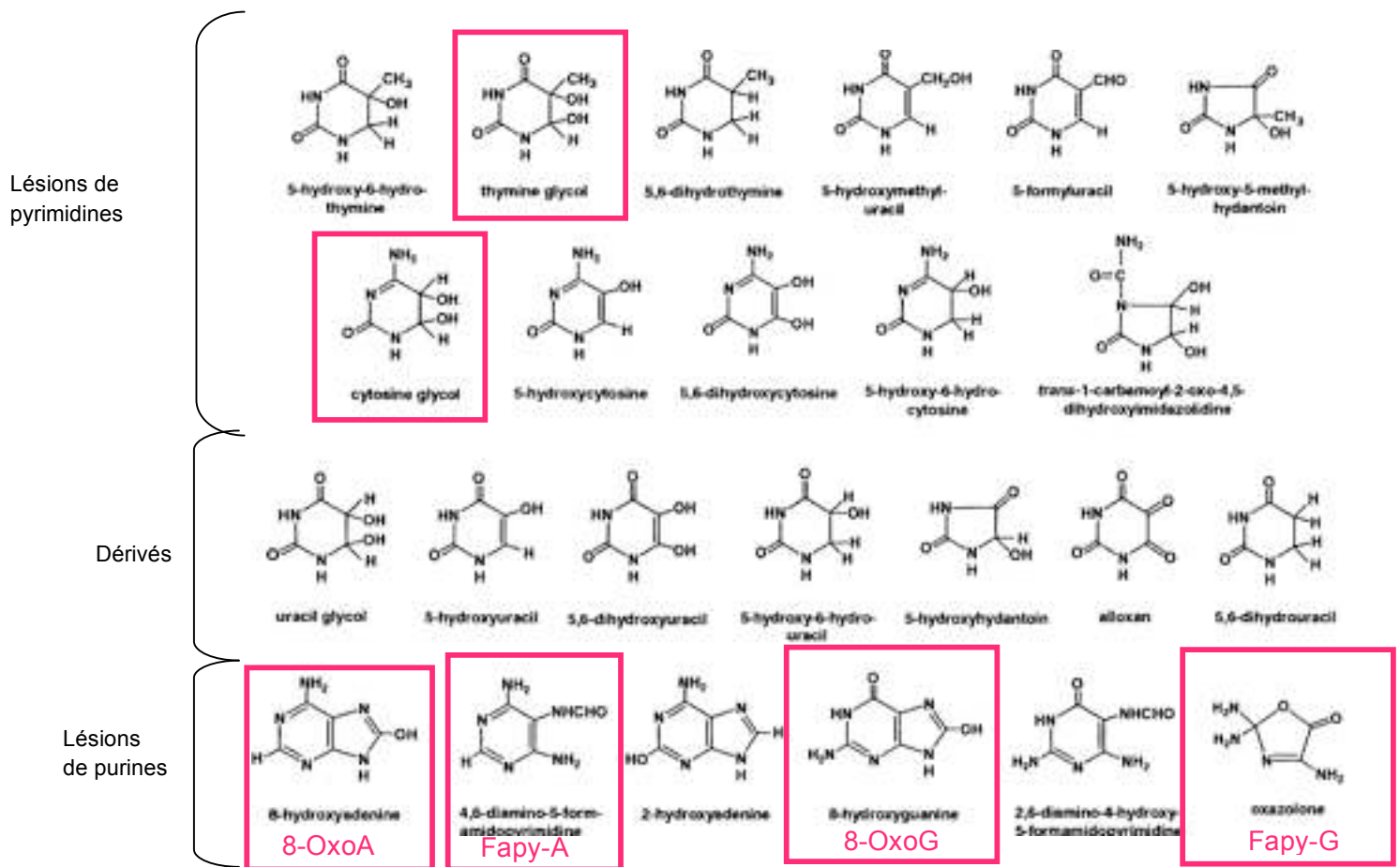


Figure 19: Les lésions oxydatives affectant les bases de l'ADN (D'après Cooke et coll, 2003).

Le stress oxydant peut également s'attaquer aux liaisons bases-sucres et créer des sites abasiques. Ces sites perdent l'information génétique et génèrent des mutations pendant la réplication (Loeb et Preston, 1986)(Fig20).

b) Les pontages radioinduits :

Des pontages interchaînes ou intrachaînes entre l'ADN et les protéines environnantes peuvent aussi se former sous l'effet indirect du rayonnement ionisant. Le nombre de pontages radioinduits est de 150 par cellule et par Gray. Ils peuvent se former lorsque 2 radicaux sont générés à la fois sur l'ADN et sur les acides

aminés constitutifs de protéines proches de l'ADN. Ces pontages impliquent principalement les tyrosines des protéines et les bases pyrimidiques de l'ADN. (Frankenberg–Schwager et coll, 1990). Les dommages indirects peuvent résulter de l'attaque des lipides dont la peroxydation génère des aldéhydes mutagènes formant des adduits sur les bases de l'ADN (Fig18).

c) La peroxydation des lipides :

L'irradiation est susceptible, par l'intermédiaire des diverses espèces réactives de l'oxygène qu'elle génère, d'induire une peroxydation lipidique des phospholipides polyinsaturés, des glycolipides ou du cholestérol contenus dans les membranes. La peroxydation des acides gras polyinsaturés provoque une désorganisation membranaire (Gutteridge et Halliwell, 1990) (perturbations des propriétés physicochimiques des membranes, des communications intercellulaires, etc). L'ensemble de ces effets peut aboutir à la lyse cellulaire. Les hydroxylipides générés sont dégradés en malanediaaldéhyde (MDA) et hydroxynonéanal (4-HNE) (Chen et Chung, 1996). Ces produits sont hautement toxiques puisqu'ils peuvent interagir avec des protéines et les inactiver et également modifier la molécule d'ADN (Fig18).

d) l'oxydation des protéines :

Les radicaux libres produits par l'irradiation peuvent également affecter les protéines impliquées dans les voies de signalisation, et dans le bon fonctionnement de la cellule. Les ROS affectent la structure protéique via l'oxydation des acides aminés, ce qui peut engendrer la fragmentation des chaînes polypeptidiques (Fig18). De nombreuses enzymes comme les tyrosines kinases (TK) ou les tyrosine phosphatases (PTP) sont sensibles au statut REDOX de la cellule. L'oxydation des thiols des PTP engendre leur inhibition tandis que l'oxydation des TKs induit leur activation (Chiarugi et coll, 2005) (Fig18).

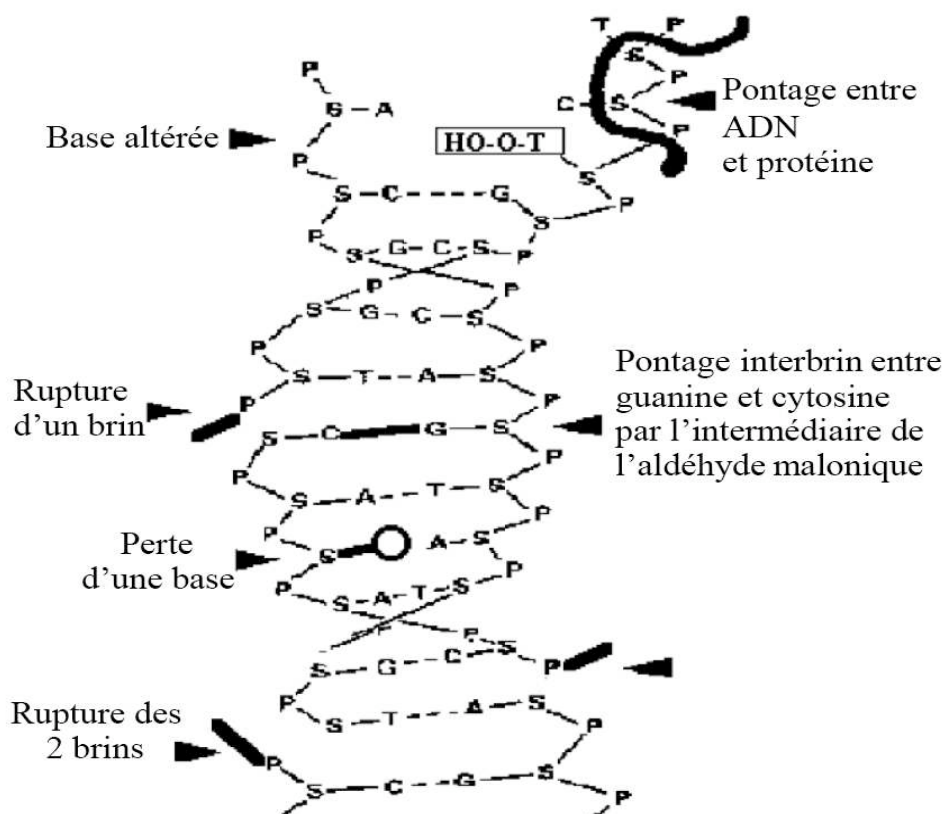


Figure 20 : Les différentes lésions radioinduites de la molécule d'ADN

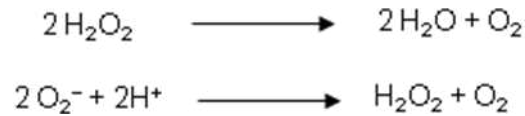
5) LA REPONSE DES CELLULES FACE AUX DOMMAGES RADIOINDUITS :

En réponse aux dommages radioinduits la cellule met en route soit directement des mécanismes de réparation des dommages à l'ADN, soit elle modifie l'homéostasie cellulaire à travers l'activation indirecte de divers mécanismes comme l'activation des systèmes antioxydants.

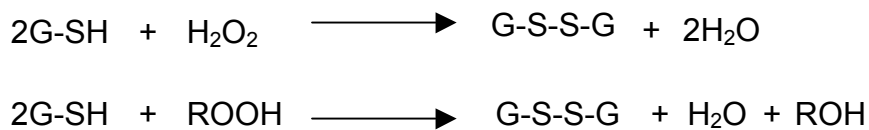
a) Les systèmes antioxydants :

Afin de contre-attaquer l'effet des radicaux libres produits après irradiation, la cellule possède différents systèmes antioxydants qui tentent d'assurer « l'homéostasie d'oxydoréduction ». On distingue deux groupes, le premier est celui des antioxydants non enzymatiques constitué par de petites molécules comme la Vitamine E ou le vitamine C, et le second est constitué par les antioxydants enzymatiques, à savoir :

La superoxyde dismutase (SOD), qui catalyse la dismutation des radicaux O_2^- en H_2O_2 (Deby et coll, 1991). Et la catalase (Cat) : qui catalyse la dégradation d' H_2O_2 en H_2O :



Les Glutathions Peroxydases (GPx) : qui réduisent l' H_2O_2 , en présence de glutathion réduit selon le mécanisme suivant :



b) Mécanismes de réparation des lésions radioinduites :

Les cellules peuvent subir des lésions au niveau de l'ADN qui résultent de facteurs endogènes, des erreurs de la réplication, mais aussi d'agents génotoxiques comme les radiations ionisantes. Les cellules eucaryotes disposent de plusieurs systèmes de réparation des lésions radioinduites de l'ADN. Les principaux mécanismes de réparation impliqués sont les suivants :

- ❖ La réparation des mésappariements de bases (MMR)
- ❖ La réparation par excision de base (BER)
- ❖ La réparation par excision de nucléotides (NER)
- ❖ La réparation par recombinaison homologue (RH)
- ❖ La réparation par religation non homologue (NHEJ)

La plupart de ces processus sont fidèles sauf la religation non homologue qui concerne généralement les cassures doubles brins de l'ADN. Certains composés des mécanismes de réparation sont activés par les dommages eux-mêmes. La formation de mutation radioinduite est la conséquence d'une lésion mal ou non réparée.

Étant donné l'importance des lésions générées au niveau de la molécule d'ADN après une exposition à des radiations ionisantes et leur implication dans les effets tardifs de l'irradiation, nous avons particulièrement développé les différents mécanismes de réparation de l'ADN (Sancar et coll 2004) (Fig22).

➤ *La réparation des mésappariements de bases (MMR) :*

La reconnaissance d'un mésappariement dû au décalage d'une ADN polymérase de synthèse gênée par une base modifiée par un agent génotoxique tel que l'irradiation, est un mécanisme effectué principalement par le complexe protéique hMutS α (constitué par les protéines MSH2 et MSH6). La réparation de mésappariements de bases comporte 4 étapes majeures : reconnaissance de la base mal appariée et assemblage du complexe réparateur, identification du brin parental qui porte l'information génétique correcte, élimination de la base mal appariée, synthèse réparatrice par action d'une DNA polymérase, et enfin intervention d'une ADN ligase pour reconstituer l'intégrité de la séquence d'ADN (Fig21a).

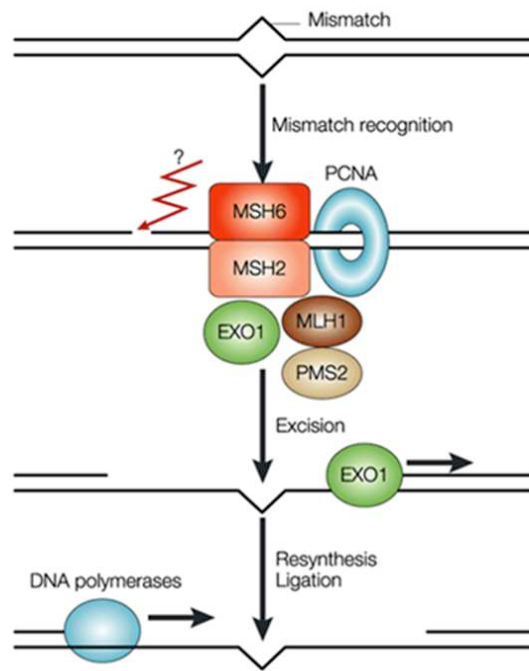


Figure 21a : Représentation schématique de la réparation des mésappariements de bases (MMR) (d'après Martin et coll, 2002)

➤ *Excision de base et resynthèse :*

Il s'agit d'un mécanisme de réparation d'un dommage au niveau d'une seule base de l'ADN oxydée ou réduite, alkylée, déaminée ou encore mésappariée. C'est un mécanisme de réparation fidèle. La base endommagée est retirée par l'ADN glycosylase ; AP nucléase clive la liaison phosphodiester en 3' du site abasique et l'endonucléase APE1 clive la liaison en 5' du site. La coupure est alors retirée par le complexe Lig3/XRCC1. Cependant si deux lésions sont produites sur des sites très proches sur les deux brins d'ADN, elles peuvent générer une cassure double brins (Fig21b, 22).

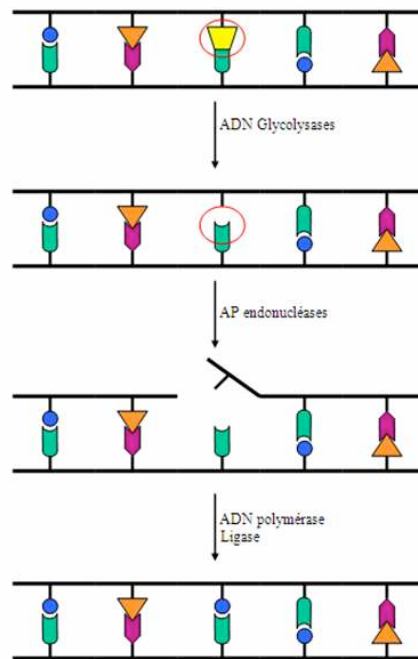


Figure 21b : Mécanisme de réparation par excision de base et les enzymes qui lui sont associées (BER).

➤ *Excision de nucléotide et resynthèse (NER) :*

C'est un mécanisme de réparation activé suite à des lésions occasionnées par une exposition aux radiations UV. Il est toutefois très faiblement impliqué dans la réparation des dommages dus aux radiations ionisantes. Il consiste en quatre étapes majeures : la reconnaissance de la lésion, une double incision, libération de l'oligodimère excisé, synthèse du brin complémentaire et ligation. Parmi les protéines impliquées dans ce mécanisme de réparation chez l'Homme on retrouve: XPA, XPC et ERCC1 (Sancar et coll 2004)(Fig21c, 22).

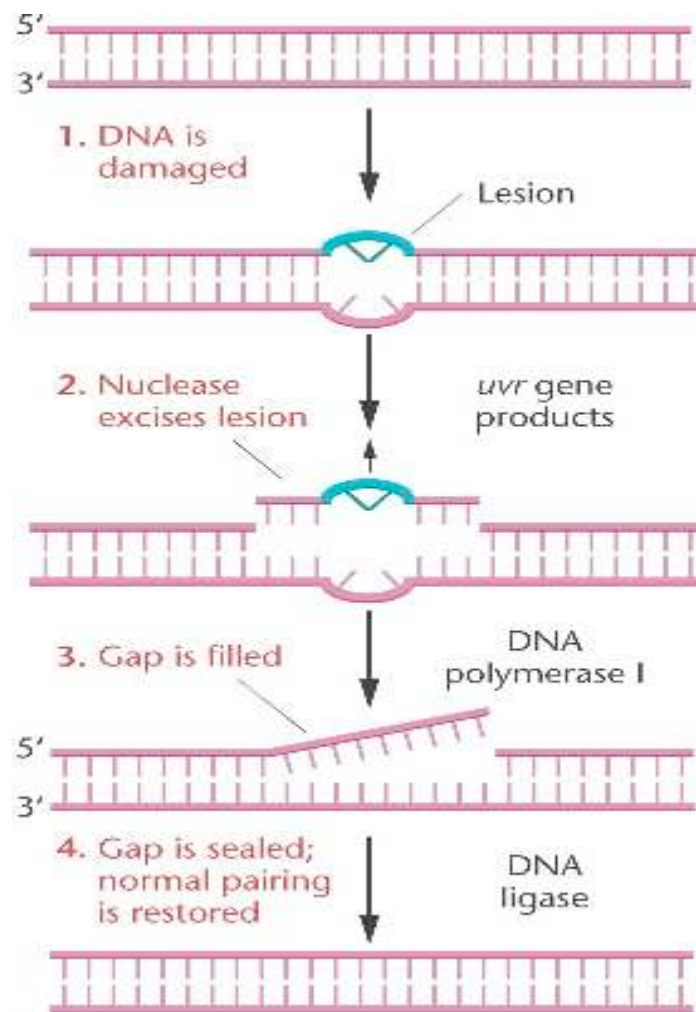


Figure 21c : Les différentes étapes de la réparation par excision de nucléotide (NER).

➤ *Recombinaison homologue (RH) :*

C'est un mécanisme de réparation fidèle des cassures double brins. Il est activé lorsqu'une séquence homologue est disponible sur la chromatide sœur ou sur le chromosome homologue. Il s'agit d'une voie prépondérante en phase G2 du cycle cellulaire (Saleh- Gohari et Helleday, 2004) (Fig21d, 22)



Figure 21d : Les principales étapes de la recombinaison homologue (RH) (Misteli et Soutoglou, 2009).

➤ *Jonction d'extrémités non homologues (NHEJ):*

Le système NHEJ joue un rôle prépondérant dans la réparation des cassures double brin de l'ADN radioinduites (Jeggo et coll, 1998). C'est un mécanisme très complexe à mettre en place par la cellule en phase G1-S. Une des premières étapes initiatrices est l'activation de la protéine ATM (AtaxiaTelangiectasia Mutated) et le complexe DNA Pkc qui favorisent la phosphorylation de l'Histone H2AX (Paull, et coll, 2000). La séquence initiale est ainsi réparée, mais avec des modifications ce qui engendre des pertes de séquences ou des mutations (Fig21e, 22). Le NHEJ permet donc une réparation infidèle prédisposant à l'apparition d'erreurs (Khanna et coll, 2001).

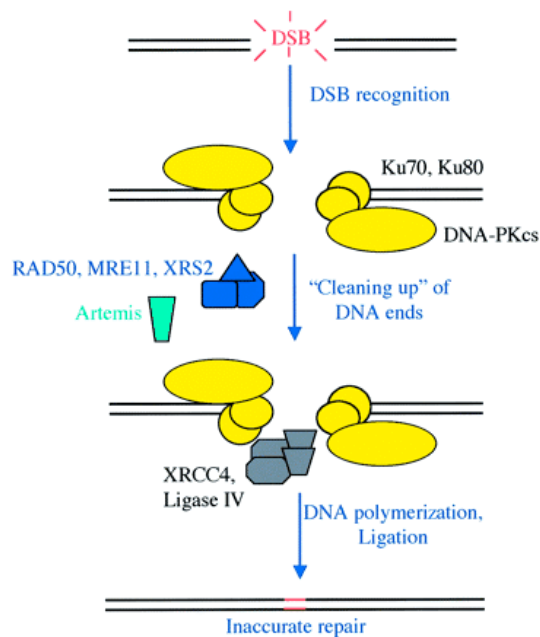


Figure 21e : La réparation par jonction des extrémités non homologues (NHEJ) (D'après le modèle de Steve Jackson)

➤ *La réparation des pontages:*

Les systèmes de réparation qui tentent de corriger les pontages ADN-ADN ou ADN - protéines radioinduits sont très peu étudiés, des études suggèrent l'implication de la recombinaison homologue (RH) et de l'excision de nucléotide (NER) (Barker et coll, 2005) (Fig22).

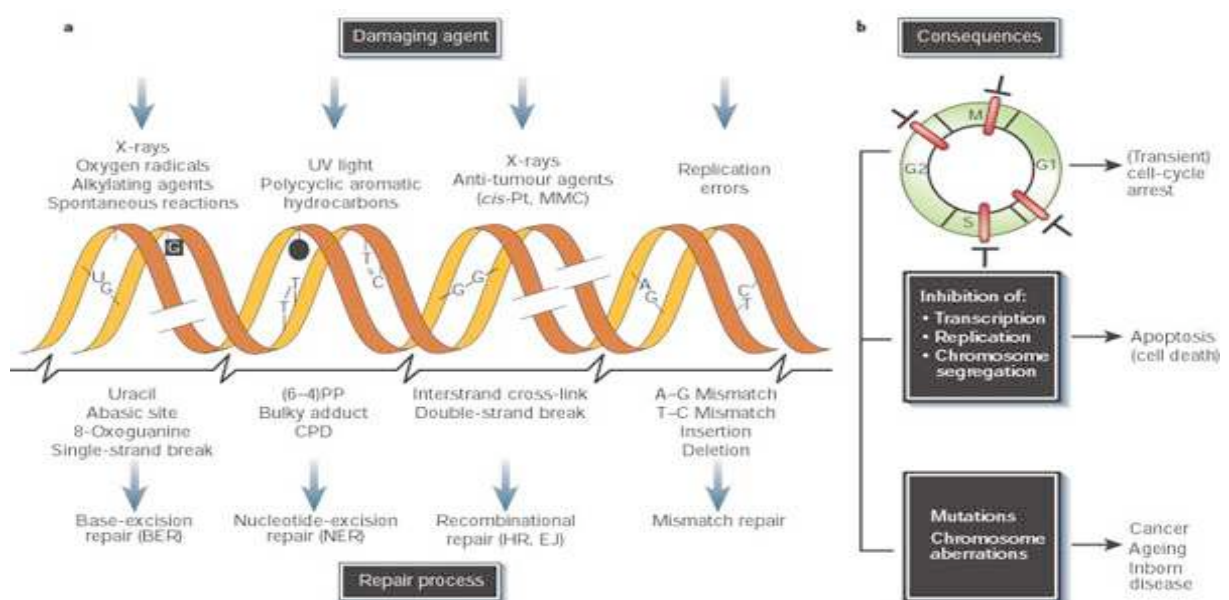


Figure 22: Schéma récapitulatif des différents types de dommages à l'ADN et les mécanismes de réparation radioinduits (Hoeijmakers et coll 2001).

c) Effets des radiations ionisantes sur le cycle cellulaire :

Les radiations ionisantes induisent des dommages à l'ADN qui constituent des signaux activateurs des points de contrôle du cycle cellulaire. Ce qui va enclencher deux voies potentielles. La première consiste en la reconnaissance des lésions en phase G1 ou G2 du cycle cellulaire suivie d'un arrêt du cycle (une heure par Gray) d'une réparation fidèle ou infidèle de l'ADN et donc la survie cellulaire. La seconde voie consiste en un arrêt irréversible du cycle suivi d'une surexpression des protéines pro-apoptotiques et donc la mort cellulaire par apoptose ou par nécrose. La dose d'irradiation est déterminante dans le choix de l'une des deux voies, la première est enclenchée à des fortes doses, tandis que la deuxième a lieu avec de faibles doses (< 5 mGy).

L'irradiation affecte la progression des cellules dans le cycle lors du passage de la phase G1/S, S/G2, et G2/M. La protéine kinase ATM, activée par l'apparition de cassures doubles brins phosphoryle d'autres protéines comme Chk1, Chk2, la P53, BRCA 1, le complexe DNA PKcs (recombinaison non homologue), et le complexe Rad 50 (recombinaison homologue). Ces protéines effectrices ainsi activées assurent la réponse biologique décisive pour le devenir de la cellule (Iliakis et coll, 1997, Shiloh et coll, 1997).

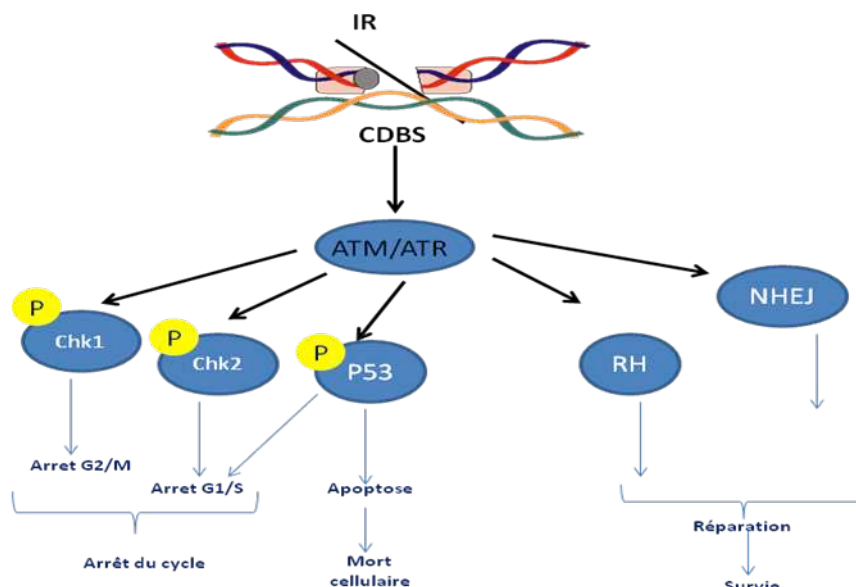


Figure 23 : Signalisation cellulaire après dommages à l'ADN radioinduits (adaptation de Averbeck et coll)

L'apoptose radioinduite est généralement observée seulement si les cellules rentrent en mitose (mort post-mitotique). Les facteurs les mieux associés à cette mort cellulaire sont les taux de cassures double brin, non ou mal réparées, et le taux d'aberrations chromosomiques. Les proportions des cellules qui meurent en apoptose après une exposition à des radiations ionisantes sont très variables selon le type cellulaire. L'activation de la protéine ATM, qui semble être une cible des radiations ionisantes et des ROS induit une activation de la voie MAPKinase SAPK/JNK (qui sera détaillée plus loin) qui à son tour induit la phosphorylation de c-Jun qui active les gènes proapoptotiques comme le $\text{TNF}\alpha$ qui est un effecteur essentiel pour l'apoptose.

L'exposition à des radiations ionisantes ou la soumission à un stress oxydatif peut induire un arrêt du cycle cellulaire en phase G1, qui va évoluer à la sénescence prématurée. Ce mécanisme a été observé dans les fibroblastes irradiés (Gorbunova et coll 2002). L'arrêt en phase G1 après une exposition à des radiations ionisantes est dû à l'augmentation de la p53 qui entraîne la transcription de la p21 inhibant les complexes CDK/cycline et conduisant à l'arrêt de la progression des fourches de réplication.

6) *EFFETS NON CIBLES DES RADIATIONS IONISANTES :*

Il est maintenant admis que les radiations ionisantes induisent non seulement des effets biologiques dans les cellules irradiées mais également dans les cellules avoisinantes. Ces effets sont appelés effets de voisinage ou effets *Bystander* (Fig24). La principale conséquence des effets *Bystander* est l'apparition d'une instabilité génomique se manifestant par une augmentation de micronoyaux, d'aberrations chromosomiques, associées à une réparation infidèle de l'ADN (Mothersill, Seymour et coll 2001, Little et coll 2006). Le transfert du milieu de culture de cellules irradiées sur des cellules non irradiées est à l'origine de dommages à l'ADN, d'aberrations chromosomiques (Lenhert et Goodwin, 1997), des effets cytotoxiques (Mothersill et Seymour, 1997) et d'une augmentation de la prolifération dans les cellules non exposées (Iyer et Lenhert, 2000). Toutes ces altérations constituent des événements essentiels dans l'étude des effets *Bystander*. Plusieurs hypothèses ont été émises concernant la transmission de l'effet de proximité : la première porte sur l'implication des communications intercellulaires via les jonctions Gap. Des travaux publiés en 2000, (Zhou et coll, 2000) ont montré que

l'utilisation du Lindane qui est un inhibiteur des jonctions Gaps diminuait considérablement la quantité de mutations dans les cellules voisines. Cependant, les lésions et les dommages radioinduits ne sont pas observés que dans les cellules contiguës, d'où l'apparition de la seconde hypothèse basée sur l'existence de signaux transmetteurs ou « messagers » qui pourraient être des cytokines sécrétées par les cellules irradiées et qui induiraient une production de ROS intracellulaire dans les cellules avoisinantes (Iyer et Lehnert, 2000). Les équipes qui se sont intéressés à l'étude de la molécule signal ont montré que la production de ROS par les cellules irradiées joue un rôle essentiel dans la transmission du signal et l'induction d'une instabilité génomiques dans les cellules *Bystander* (Grososky et coll 1999, Mikkelsen et coll 2004). Les effets *Bystander* ont été mis en évidence *in vivo* et *in vitro* en utilisant des systèmes de co-culture. Ainsi, Il a été montré que les cellules directement irradiées et les cellules *Bystander* diffèrent par le temps d'apparition des dommages à l'ADN. Alors que les cellules exposées aux radiations ionisantes présentent un niveau de phosphorylation de l'histone H2AX à peine quelques minutes après l'irradiation, dans les cellules voisines il faudra attendre plusieurs heures avant d'observer la même chose (Sokolov et coll 2005), indiquant ainsi l'implication de médiateurs produits par les cellules irradiées.



Figure 24: représentations schématiques de l'effet *Bystander*. Cellule à noyau bleu : cellule directement endommagée, cellules à noyau marron : cellules *Bystander*

La radiothérapie est sans aucun doute la thérapie anticancéreuse la plus importante et la plus utilisée. Mais, elle peut également induire des dommages dans les tissus sains mais qui se trouvent dans la région traitée en raison de l'effet *Bystander*. Ces dommages peuvent initier de nouveaux processus carcinogènes et induire des tumeurs secondaires malignes qui vont apparaître plusieurs années après le traitement (Tubiana et coll, 2009). Ces effets résultent de la réponse des cellules aux radiations ionisantes et sont probablement associés aux effets *Bystander*.

Actuellement, le développement des nouvelles techniques radiothérapeutiques prend en compte les risques de dommages et d'instabilité génomiques dans les tissus avoisinants le champ de l'irradiation.

7) LES CANCERS THYROÏDIENS ASSOCIES AUX RADIATIONS IONISANTES :

La thyroïde est l'un des organes les plus sensibles aux radiations ionisantes. L'excès de risque après irradiation externe chez l'enfant et l'adolescent est de 7,7 pour une dose reçue à la thyroïde de 1 Gray. La thyroïde constitue un bon modèle d'étude pour la radiocarcinogénèse.

Les altérations géniques associées aux tumeurs radioinduites :

Les études effectuées du point de vue moléculaire sur les tumeurs de la thyroïde ont été réalisées essentiellement sur les tumeurs dites « spontanées ».

Les tumeurs épithéliales thyroïdiennes, survenant après une irradiation externe, sont les tumeurs radio-induites les plus fréquentes chez l'Homme. Les résultats de différentes études, concernant le(s) mécanisme(s) moléculaire(s) de la tumorigénèse thyroïdienne radio-induite montrent: 1) que la fréquence d'activation des protooncogènes RAS,TRK, et des mutants constitutifs de la sous unité Gs α (gsp) n'est pas significativement différente entre les tumeurs «spontanées» et les tumeurs radio-induites de la thyroïde; 2) que les réarrangements activateurs du proto-oncogène ret de type RET/PTC, jouent un rôle clé dans le développement des tumeurs thyroïdiennes apparues suite à une irradiation thérapeutique (notamment PTC1) ou à l'accident de Tchernobyl (notamment PTC3) 3) l'existence chez les individus ayant développé une tumeur thyroïdienne radio-induite, d'une instabilité génomique se traduisant par un défaut des mécanismes de la réparation de l'ADN.

Il est maintenant admis que les radiations ionisantes génèrent des cassures double brins, et que le cancer papillaire de la thyroïde constitue la tumeur solide dont le lien avec les rayonnements ionisants est le plus étudié. Toutes ces recherches ont permis d'établir l'hypothèse selon laquelle il y aurait un lien direct entre l'exposition aux radiations, la formation des réarrangements RET et la survenue d'un cancer papillaire thyroïdien. Trois observations majeures confortent ce concept : la première est que les rayons X induisent la formation de RET/PTC1 (Ito et coll 1993, Mizuno et coll 2000), la seconde est que la translocation RET/PTC est très fréquente chez les individus ayant été soumis à des radiations externes thérapeutiques ou

accidentelles (Bounacer et coll 1997, Alipov et coll 1999) et également dans la population Biélorusse post Tchernobyl (Nikiforov et coll, 1997, Williams et coll, 1996), et enfin la troisième observation est que RET et son partenaire CCDC6 présentent une proximité particulière dans les cellules thyroïdiennes en interphase ce qui favorise la fusion des deux gènes (Nikiforov et coll, 2000). En effet, après l'accident de Tchernobyl 60% des individus irradiés pendant l'enfance et ayant développé un cancer thyroïdien étaient positifs pour la translocation RET/PTC. Les réarrangements RET/PTC les plus fréquents dans les formes radioinduites sont RET/PTC1 et RET/PTC3. Ils représentent plus de 90% des réarrangements identifiés dans les carcinomes papillaires sporadiques et dans ceux induits par l'irradiation.

Les points de fusion de ces réarrangements sont généralement situés dans la même région intronique de RET, entre les exons 11 et 12. Le réarrangement RET/PTC n'est pas la seule translocation intrachromosomique retrouvée dans les cancers radioinduits. Dans plus de 11% des PTC post Tchernobyl le réarrangement NTRK1 a été retrouvé (Pierotti et coll, 2006, Rabes et coll, 2000). Il s'agit d'une inversion paracentrique du chromosome 1q. le réarrangement AKAP9-BRAF dans le chromosome 7q, a également été décrit dans les formes de cancers radioinduits (Ciampi et coll, 2005).

III)- SIGNALISATION MOLECULAIRE ET IRRADIATION :

L'exposition à des radiations ionisantes active des voies de signalisation responsables de modifications dans la progression des lésions radioinduites. La production d'espèces réactives de l'oxygène et les dommages à l'ADN générés par les radiations ionisantes jouent un rôle majeur dans les modifications des voies de signalisation. Plusieurs travaux ont démontré l'activation après irradiation de voies en réponse aux cytokines proinflammatoires ou encore une signalisation activée par les dommages à l'ADN impliquant les protéines ATM et ATR. Cependant certains groupes suggèrent un dialogue entre ces deux voies.

1) CYTOKINES ET IRRADIATION :

Les radiations ionisantes ont un impact sur les cellules exposées en modulant leur capacité proliférative et les communications cellule-cellule induisant des lésions dans les cellules voisines. Dans ce chapitre, nous évoquerons particulièrement l'impact des cytokines pro-inflammatoires dans la réponse des cellules aux radiations

ionisantes. En effet, une production importante de cytokines est observée à l'issue de l'irradiation et peut persister plusieurs mois après l'exposition.

Les cytokines médient la communication locale de la cellule avec son environnement tissulaire mais également entre différents organes. Une même cytokine peut avoir différentes activités sur différents types cellulaires ; une cytokine peut amplifier l'effet d'une autre molécule, ou encore plusieurs cytokines peuvent fonctionner en synergie et assurer le même rôle.

Durant ces dernières années de nombreux travaux se sont intéressés au rôle des cytokines dans les réactions cellulaires radioinduites. De nouvelles hypothèses ont émergé concernant le rôle des cytokines dans l'induction des dommages radioinduits, ce concept suggère qu'une cascade de cytokines est initiée à l'issue de l'irradiation, persiste longtemps après, et engendre des dommages tardifs (Rubin et coll, 1995) (Langberg et coll, 1994). De nombreuses études ont montré que les principales cytokines impliquées dans la réponse à l'irradiation sont : l'IL1, l'IL6, le TNF α , le TGF β , et l'IL8.

L'interleukine 1 fait partie des cytokines directement induites par l'irradiation (Liu et coll, 2006). Des expériences réalisées dans des fibroblastes et des keratinocytes ont montré que l'IL1 était impliquée dans les effets tardifs de l'irradiation en stimulant la prolifération des cellules et en induisant la synthèse des metalloprotéases matricielles (MMPs). Une augmentation de l'ARN messager de l'IL1 β a été observée dans les lignées HaCat, et HeLa après une dose d'irradiation de 40 Gy (Liu et coll, 2006). Récemment, il a été montré, dans des fibroblastes de hamster, que l'irradiation à faible dose augmente l'expression de l'IL1 dans les heures qui suivent l'exposition.

L'interleukine 6, est un médiateur majeur dans la réponse inflammatoire, partage de nombreuses fonctions biologiques communes avec l'IL1. L'IL1 et le TNF α induisent la synthèse de l'IL6, en revanche l'IL6 inhibe leur sécrétion. Les radiations ionisantes modulent l'expression de l'IL6 dans les fibroblastes et dans les cellules épithéliales (Tabata et coll, 2006) six heures post irradiation (Brach et coll, 1993). Il a également été observé que le transcrit de l'IL6 augmente en fonction de la dose d'irradiation dans les cellules HeLa (Beetz et coll, 1997).

De nombreuses études ont montré que les radiations ionisantes étaient à l'origine d'un relargage important du $\text{TNF}\alpha$ et ce dans différents types cellulaires (Hallahan et coll, 1989) (Beetz et coll, 1997). Une augmentation de l'ARN messager du $\text{TNF}\alpha$ a été observée dans les lignées de keratinocytes HL60. En revanche, aucune modification dans la production de cette cytokine n'a été observée dans des fibroblastes ou dans certaines lignées cellules épithéliales irradiées à 5 Gy (Hallahan et coll 1989). Il est clairement admis maintenant que le $\text{TNF}\alpha$ assure une fonction autocrine mais aussi paracrine sur les cellules irradiées, en induisant la production d'autres cytokines comme l'IL6.

L'IL8 est fortement produite après une exposition à des radiations ionisantes. Le promoteur de l'IL8 possède des éléments de réponse à deux facteurs de transcriptions essentiels qui sont le $\text{NF}\kappa\text{B}$ et AP-1, lesquels sont inductibles par l'irradiation. Dans des travaux effectués sur des fibroblastes normaux humains issus du poumon, il a été montré que cette augmentation survient à des temps très précoces après irradiation (Brach et coll, 1991) (Fujimori et coll 2005).

Le $\text{TGF}\beta$ est la cytokine radioinduite la plus étudiée surtout dans le cas des fibroses radioinduites. De nombreuses études expérimentales ont montré que les fibroses radio-induites pulmonaire intestinales ou encore cutanées, sont associées à une surexpression du $\text{TGF}\beta 1$. Des expériences réalisées *in vitro* dans une lignée de kératinocytes ont montré que l'activation radio-induite du promoteur du $\text{TGF}\beta 1$ était en partie dépendante d'AP-1 (Martin et coll, 1997). Des expériences réalisées dans des cellules endothéliales ont montré une production importante du $\text{TGF}\beta$ après irradiation (Wang et coll 1998). Des travaux récents ont montré que la déplétion du $\text{TGF}\beta$ induisait une diminution de la phosphorylation de la p53 dans des cellules mammaires irradiées, suggérant l'implication du $\text{TGF}\beta$ dans l'induction du stress génotoxique (Ewan et coll, 2002).

Toutes ces cytokines activent, via leurs récepteurs spécifiques, différentes voies de signalisation. L'activation des MAPkinases et du facteur de transcription $\text{NF}\kappa\text{B}$ constitue un élément majeur dans la réponse aux radiations ionisantes.

2) LES VOIES DE SIGNALISATION :

a) Voies des MAPKs

Les MAPkinases (mitogen activated protein kinases) sont retrouvées dans toutes les

cellules eukaryotes. Elles sont exprimées de façon ubiquitaire, régulent différentes réponses biologiques au stress, qui diffèrent selon le type et l'état de la cellule. Les voies des MAPK kinases comportent trois éléments essentiels : Les MAP3K, les MAP2K, et les MAPK. Ces trois types de Kinases constituent des cibles thérapeutiques dans différentes pathologies. Chez l'Homme, il existe 11 MAPK, 7 MAP2K, et 20 MAP3K. Les MAPKs régulent différents processus biologiques en réponse à des stimulations par des cytokines, des facteurs de croissance, des antigènes, des toxines, et des interactions cellule–cellule. Les MAPKs sont des sérines–thréonine kinases intracellulaires qui contribuent une fois activées à la régulation coordonnée de diverses activités cellulaires comme la transcription, la prolifération, le développement, la différenciation, la survie, l'apoptose et dans bien d'autres réponses (Zhang et Liu, 2002) (Kultz et Avila, 2001). Les MAPKs sont hautement conservées au cours de l'évolution (Bohm et coll, 2002; Müller et coll., 2002). La famille des MAPK est impliquée dans 3 grandes voies de signalisation :

- la première fut découverte en 1986 en réponse à la stimulation par l'insuline et par des facteurs de croissance, appelée ERK1/2 (Extracellular signal Regulated kinase 1/2) (Dent et coll 2003).
- Dans les années 1990, des voies de signalisation activées par le stress ont été identifiées, elles furent appelées SAPK (Stress Activated Protein Kinase). Ce groupe comporte la p38MAPK et la protéine JNK (c-Jun N-terminal kinase). Les MAPK sont activées par une cascade de kinases. Chaque cascade consiste en trois enzymes : MAP Kinase Kinase kinase (MAP3K), activées par un signal extracellulaire. Elles phosphorylent les MAP Kinases Kinase (MAP2K) sur leurs résidus Serine /thréonine. MAP2K activent les MAP Kinase (MAPK) en phosphorylant leur résidus Tyrosine/Thréonine (Tyr 185, Thréonine 183 pour ERK 2) (Figure 24).

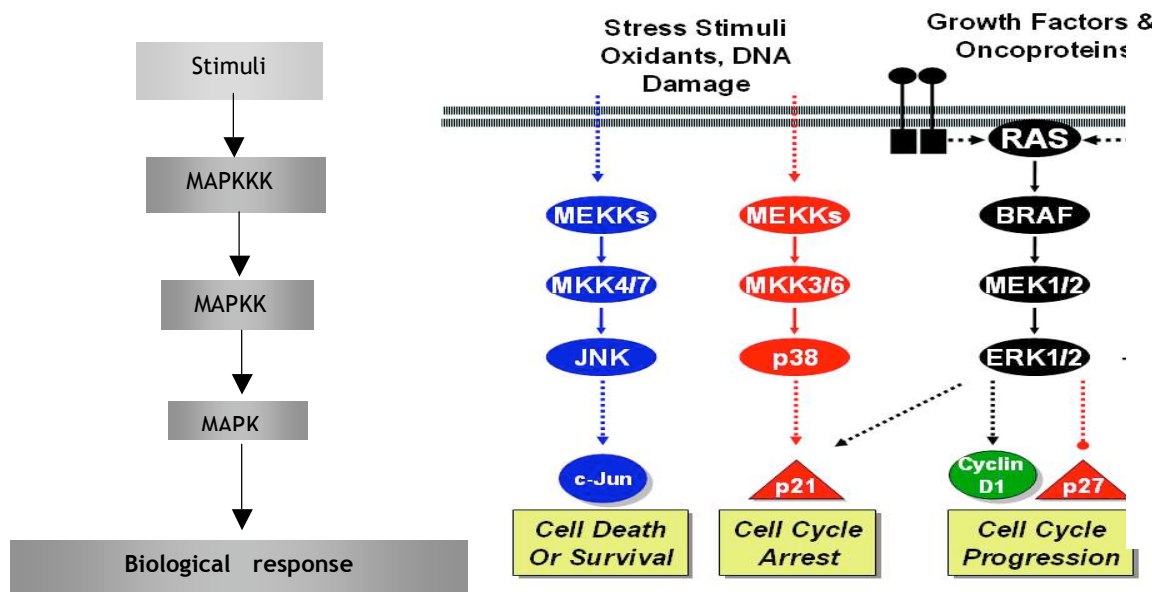


Figure 25 : représentation schématique de la cascade de la voie des MAPKs et son rôle dans différents processus biologiques.

La phosphorylation des MAPkinases entraîne des modifications de leur activité catalytique, de leur localisation cellulaire et de leurs interactions avec d'autres protéines (Pearson et coll 2001). Les MAP kinases phosphorylées sont souvent transloquées du cytoplasme vers le noyau où elles phosphorylent de nombreux substrats, des kinases et des facteurs de transcription aboutissant à la régulation de divers processus cellulaires (Zhang et Liu 2002).

Les MAPkinases sont régulées par un rétrocontrôle négatif. En effet de nombreux agents activateurs des MAPKs sont également des activateurs de phosphatases appartenant à la famille des MKPs (MAPkinases phosphatases) connue également sous le nom de DUSP (Mitogen-activated protein kinase dual-specificity phosphatase).

L'activation des MAPkinases est dépendante du type et de l'état de la cellule, des récepteurs membranaires exprimés, et de la sensibilité des cellules vis à vis des différents stimuli (stress oxydant, UV, radiations ionisantes, choc osmotique, etc).

a-1) Les MAPK de la famille JNK :

Les MAPK de la famille des JNK appartiennent au groupe des SAPK (Stress Activated Protein Kinase). Il existe trois gènes qui codent pour les JNK, les protéines codées par chacun des gènes possèdent plus de 80% d'homologie. Les JNK sont activées en réponse au stress (stress oxydant, radiations ionisantes, altération de l'ADN), aux cytokines et aux facteurs de croissance. Elles sont activées par phosphorylation sur le thréonine 183 et tyrosine 185 par MKK4/MKK7.

Les JNK phosphorylent les facteurs de transcription ATF2 (activating transcription factor 2), Elk1 (ETS-Like gene-1), SAP1, c-Jun, et également d'autres protéines comme les p53 et Bcl2. Ces protéines phosphorylées vont jouer un rôle dans la prolifération, la différenciation cellulaire ou l'apoptose en agissant sur leurs gènes cibles. Les JNK ont été montrés comme étant impliqués dans l'expression de nombreux gènes de la réponse inflammatoire comme l'IL6 et l'IL1 et ce dans différents types cellulaires (Haij et coll, 2005, Krause et coll 1998) (Fig25).

a-2) Les MAPK de la famille P38 :

Cette famille de protéines fait partie du groupe des SAPK. La famille des p38MAPK comporte 4 isoformes avec 40% homologie de séquence. Les p38MAPK sont activées par un large spectre de stimuli, essentiellement le stress oxydant, les radiations UV, l'hypoxie et les cytokines proinflammatoires comme l'IL1 (Fig25). Les p38MAPK phosphorylées et donc activées phosphorylent à leur tour de nombreux facteurs de transcription comme MEF2 (Myocyte enhancer factor 2), ATF2 (Activating Transcription Factor 2) et la p53 impliqués dans la prolifération et la régulation du cycle cellulaire (Karin et coll,2005)(Fig26).

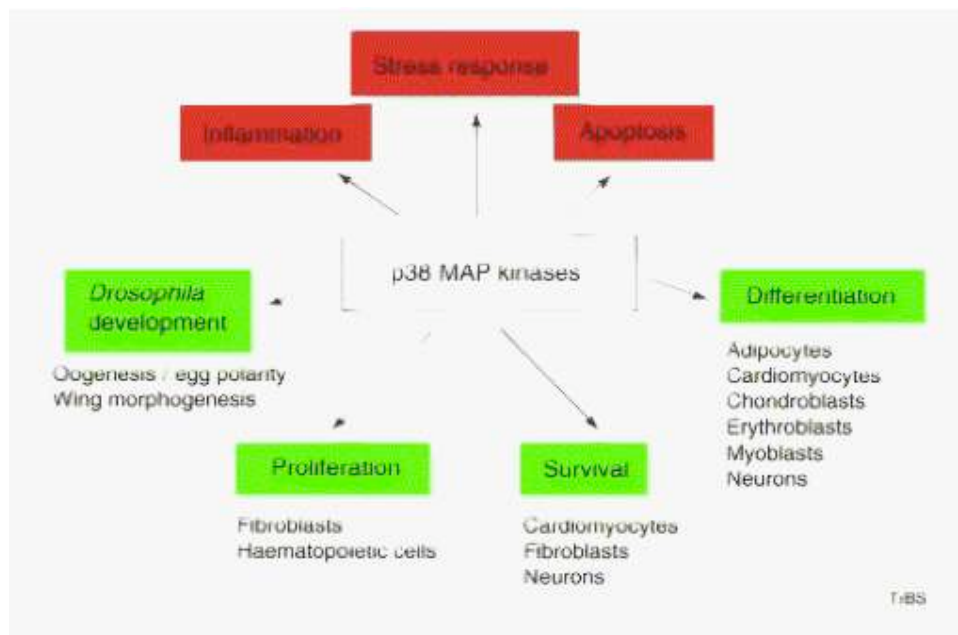


Figure 26 : Fonctions générales des MAPK de la famille P38 (image adaptée du cours de Raigeaud Joël, 2008)

a-3) Les MAPK de la famille ERK :

ERK1 et ERK2 (Extracellular signal-regulated kinases, connus également sous le nom de P42/44) sont les deux isoformes fondatrices de la grande famille des MAPK. Cette voie est activée par différents stimuli tel que la production de cytokines ou de facteurs mitogènes. L'activation d'un récepteur spécifique (EGFR, IL-1R, PDGFR) induit une activation de RAS. RAS entre en interaction avec Raf Kinase qui phosphoryle 2 MAP2K (MEK1/2), qui vont phosphoryler ERK1/ERK2 (Fig25). La protéine ERK ainsi activée entre ensuite dans le noyau cellulaire et ajoute des groupements phosphate aux résidus sérine et thréonine du facteur de transcription Fos, le facteur de transcription Jun étant préalablement phosphorylé par la protéine kinase JNK (une autre protéine de la famille des MAP kinases). Ces deux facteurs de transcription forment alors un hétérodimère nommé complexe transcriptionnel AP-1 (activating protein-1) qui active le gène c-Fos, un gène de réponse précoce (nécessaire pour passer de l'état G0 à G1 du cycle cellulaire).

D'autres facteurs de transcription sont également régulés par ERK1/2 ainsi que d'autres substrats en dehors du noyau.

b) La voie NFκB :

La protéine NFκB a été identifiée pour la première fois dans les cellules B. Elle active un très grand nombre de gènes impliqués dans la réponse au stress, l'inflammation et l'apoptose. Les stimuli de la voie NFκB les plus étudiés sont les infections virales ou bactériennes, l'IL 1, les UV et la production H₂O₂. Dans des conditions non-stimulantes, le complexe NFκB est fixé à IκB (NFκB inhibitor) qui le séquestre dans le cytoplasme. Après activation à la membrane des récepteurs spécifiques, la sérine kinase IKK induit la phosphorylation de IκB, qui va être ubiquitinée et dégradée dans le protéasome. Le NFκB ainsi libéré est transloqué dans le noyau (Karin et coll 1999, 2008) (Fig 27)

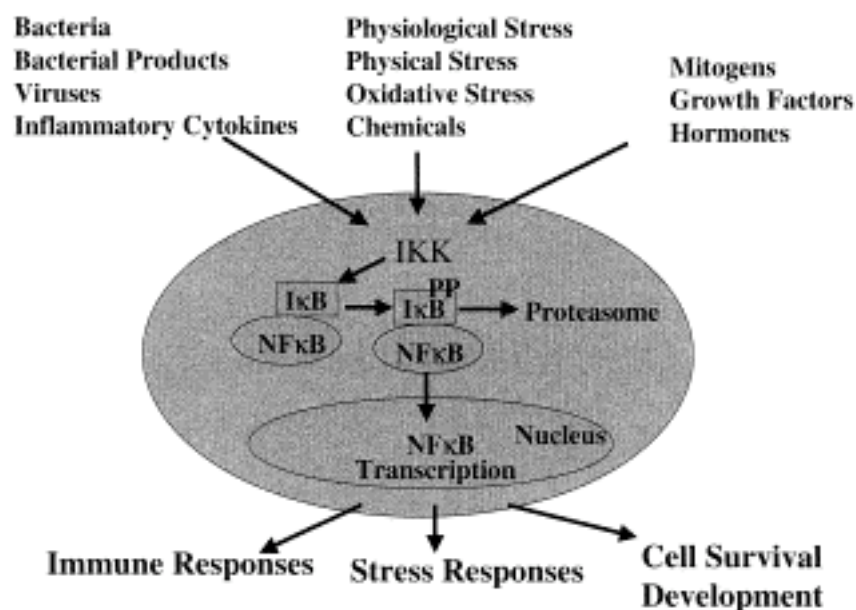


Figure 27 : Activation et translocation du NFκB dans le noyau en réponse à différents stimuli (D'après Xiaoxia Li, 2003).

3) VOIES DE SIGNALISATION ET IRRADIATION :

Les rayonnements ionisants sont capables d'activer différents type de récepteurs qui vont induire des cascades de voies de signalisations comme celles cités dans le précédent paragraphe. En effet, il a été montré que des irradiations à des doses de 1 ou 2 Gy induisait l'activation de la voie ERK1/2 (Dent, 2003). Cette activation semble être liée à une production de radicaux libres dans un premier temps (Leach et coll 2001) suivie par une production de cytokines et de facteurs de croissance (Hagan et coll, 2000).

Des travaux publiés en 1998 ont montré une augmentation de la phosphorylation de JNK quelques heures après irradiation à des doses allant jusqu'à 20 Gy (Verheij et coll, 1998). De nombreux auteurs suggèrent l'implication de la voie JNK/SAPK dans l'apoptose radioinduite, via l'activation des caspases effectrices. De nombreux auteurs suggèrent qu'après exposition à des radiations ionisantes, un équilibre est établi entre la voie ERK dite « de survie » et la voie JNK dite « d'apoptose ». De plus l'inhibition de ERK induirait une augmentation de JNK qui serait dépendante en partie de l'expression de RAS proto-oncogène (Carter et coll, 1998, Vrana et coll, 1999, Reardon et coll, 1999).

Quant à la voie p38MAPK, elle a été montrée comme étant induite par l'irradiation, et favorise l'arrêt des cellules en G2/M. Cet arrêt serait dépendant de la protéine ATM et donc des dommages à l'ADN (Thornton et coll, 2009). Toutefois l'effet de l'irradiation sur la phosphorylation de la p38MAPK reste encore mal connu et très controversé (Dent et coll 2003). Des travaux ont suggéré que les voies JNK et P38 dites pro-apoptotiques sont activées à des temps précoces après irradiation et que ce serait la voie ERK qui prendrait le relais à des temps tardifs allant jusqu'à 72 heures. Toutefois la durée d'activation des protéines des MAPK est spécifique de l'état des cellules (différenciation ou prolifération). Les protéines JNK et p38 ont été longuement considérées comme principalement impliquées dans les voies pro-apoptotiques, cependant elles peuvent également jouer un rôle dans la prolifération. Cette double fonction est dépendante du type cellulaire, de la nature et de l'amplitude du signal activateur.

L'augmentation de l'activité NF κ B observée dans différents types de cancer a été associée à la radorésistance des cellules tumorales (Orlowski et coll, 2002). L'irradiation favorise la fixation du facteur NF κ B sur ses sites spécifiques au niveau de l'ADN (Brach et coll, 1991) et le blocage de l'activité NF κ B est à l'origine d'une diminution de la prolifération de nombreuses lignées de cellules tumorales. En effet de nombreux travaux ont montré que l'inhibition de la voie NF κ B diminuait la radorésistance des cellules (Fan et coll, 2007, Li et coll, 2001). Cette activation de la voie NF κ B à post irradiation serait dû à une augmentation de la production de ROS et également à l'expression de la voie ERK. Ceci favoriserait la translocation du facteur de transcription NF κ B dans le noyau et l'activation de différents gènes qui

codent pour des protéines impliquées dans la prolifération cellulaire et la radiorésistance.

B) CONTEXTE DE LA RECHERCHE:

Une association entre l'effet des radiations ionisantes et les cancers papillaires de la thyroïde a été clairement établi. En effet, la thyroïde est un organe particulièrement sensible aux radiations ionisantes. Les études menées sur différentes cohortes après l'accident de Tchernobyl ont permis d'établir un lien entre l'exposition aux radiations ionisantes et la prévalence des cancers thyroïdiens de type papillaire observés dans la population Ukrainienne et dans les régions voisines. De nombreux travaux ont montré l'expression de la translocation chromosomique RET/PTC dans 70% des cas de cancers radioinduits. Les rayonnements ionisants entraînent des effets directs ou indirects via la radiolyse de la molécule d'eau qui génèrent des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Les ROS produites en quantité élevée sont à l'origine d'un déséquilibre de l'homéostasie REDOX, s'attaquent aux différents constituants de la cellule et essentiellement à la cible critique qui est la molécule d'ADN. Toutes ces données de la littérature nous ont orienté vers une hypothèse selon laquelle les ROS produites après irradiation participeraient à la formation des translocations chromosomiques RET/PTC.

Durant la première partie de ma thèse je me suis intéressée au rôle de l'H₂O₂ produit à l'issue de l'irradiation dans la formation des translocations RET/PTC1 dans la lignée thyroïdiennes non tumorale HthyOri. Nous nous sommes intéressés par la suite aux effets tardifs de l'irradiation, notre hypothèse de travail était basée sur l'implication des NADPH oxydases dans le stress oxydant radioinduit et dans les effets qui lui sont associés.

Nos travaux ont permis de montrer l'implication de la DUOX1 dans les effets tardifs de l'irradiation, qui serait régulée positivement par la voie p38MAPK.

Les résultats obtenus durant cette thèse ont permis de mettre en évidence l'implication des espèces réactives de l'oxygène et des NADPH oxydases dans les dommages radioinduits. Ce travail ouvre d'autres perspectives pour étudier l'implication du stress oxydant et des systèmes générateurs de ROS dans d'autres pathologies radioinduites permettant ainsi de mettre la lumière sur de nouvelles cibles thérapeutiques.

Résultats: article1 & article2

Résumé article1:

La thyroïde est l'un des organes les plus sensibles aux radiations ionisantes, qui génèrent les translocations RET/PTC observées dans près de 80% des cancers papillaires radioinduits. Etant donné l'impact de l'H₂O₂ sur la molécule d'ADN, nous nous sommes intéressés au rôle de l'H₂O₂ produit par la radiolyse de l'eau dans la formation du gène de fusion RET/PTC1. La détection des translocations RET/PTC1 dans les cellules thyroïdiennes irradiées ainsi que dans les cellules traitées à l'H₂O₂, dans des proportions comparables a permis d'appuyer notre hypothèse. De plus, le prétraitement à la catalase des cellules Nthy Ori avant l'exposition aux rayonnements ionisants diminue l'H₂O₂ intracellulaire et protège contre la formation des translocations RET/PTC1. Ces résultats nous ont permis de montrer l'implication des ROS dans la génération des réarrangements activateurs du protooncogène RET.

Role of H₂O₂ in *RET/PTC1* chromosomal rearrangement produced by ionizing radiation in human thyroid cells.

Rabii Ameziane-El-Hassani^{¶1,2}, **Myriem Boufraquech**^{¶1,2,3}, Odile Lagente-Chevallier^{2,3}, Urbain Weyemi^{2,3}, Monique Talbot^{2,3}, Didier Métivier^{3,4}, Françoise Courtin^{2,3}, Jean-Michel Bidart^{2,3}, Mohammed El Mzibri¹, Martin Schlumberger^{2,3}, and Corinne Dupuy^{2,3}

¶ Rabii Ameziane El Hassani and Myriem Boufraquech contributed equally to this study

1- UBRM, Centre National de l'Energie, des sciences et des techniques nucléaires, Rabat, M-10001, Maroc; 2- CNRS UMR8200, Institut Gustave Roussy, Villejuif, F-94805, France; 3- University Paris-Sud 11, Orsay, F-91400 France; 4- INSERM U848, Institut Gustave Roussy, Villejuif F-94805, France.

Running title: Role of H₂O₂ in RET/PTC1 rearrangement formation.

Key words: Oxidative stress; Ionizing radiation; H₂O₂; *RET/PTC1* chromosomal rearrangement; thyroid

Footnotes :

The authors declare no conflict of interest.

Funding and Acknowledgements

This work was supported by grants from Electricité de France (EDF), Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), Ligue Contre le Cancer (comité du Val-de Marne) and Agence Nationale de la Recherche (ANR).

Corresponding author: Corinne Dupuy, PhD; Institut Gustave Roussy, FRE2939 CNRS, 39 rue Camille Desmoulins, 94805, Villejuif, France. Tel +33 1 42 11 40 74, Fax +33 1 42 11 52 44, email : dupuy@igr.fr

Abstract

During childhood, the thyroid gland is one of the most sensitive organs to the carcinogenetic effects of ionizing radiation (IR) that may lead to papillary thyroid carcinoma (PTC) associated with *RET/PTC* oncogene rearrangement. IR exposure induces a transient “oxidative burst” through radiolysis of water, which can cause DNA damage and mediates part of the radiation effects. H_2O_2 is a potent DNA damaging agent that induces DNA double-strand breaks (DSBs) and consequently chromosomal aberrations. Irradiation by 5 Gy X-ray increased extracellular H_2O_2 . So, we investigated the implication of H_2O_2 in the generation of *RET/PTC1* rearrangement after X-Ray exposure. We developed a highly specific and sensitive nested RT-PCR method. By using the human thyroid cell line HTori-3, previously found to produce *RET/PTC1* after γ -irradiation, we showed that H_2O_2 , generated during a 5 Gy X-ray irradiation, causes DNA DSBs and contributes to *RET/PTC1* formation. Pretreatment of cells with catalase, a scavenger of H_2O_2 , significantly decreased *RET/PTC1* rearrangement formation. Finally, *RET/PTC* chromosomal rearrangement was detected in HTori3.1 cells after exposure of cells to H_2O_2 (25 μ M), at a dose that did not affect the cell viability.

This study demonstrates for the first time that H_2O_2 is able to cause *RET/PTC1* rearrangement in thyroid cells and consequently highlights that an oxidative stress can be responsible for the occurrence of *RET/PTC1* rearrangement found in thyroid lesions even in the absence of radiation exposure.

Introduction

Chromosomal rearrangements involving the *RET* gene (REarranged during Transfection) are highly prevalent in papillary thyroid carcinomas (PTC) occurring after childhood exposure either to environmental radiation after the Chernobyl accident or to medical external radiation (1-4). In the normal thyroid gland, *RET* which encodes the tyrosine kinase receptor for growth factors belonging to the glial-derived neurotrophic factor (GDNF) family, is expressed only in parafollicular thyroid cells. The recombination of the intracellular kinase encoding domain of the *RET* gene with a heterologous gene expressed ubiquitously generates *RET/PTC* chimeric oncogene proteins that are expressed in follicular thyroid cells. These chimeric proteins are constitutively active (1, 2). *RET/PTC1*, which is the most frequent rearrangement is the result of the fusion of *RET* and *CCDC6* genes from a paracentric inversion of the long arm of chromosome 10 with breakpoints in q11.2 and q21 (*inv(10) (q11.2q21)*) (5). Despite the fact that *RET* and *CCDC6* genes are 30 megabases apart, their high spatial proximity in interphase nuclei in normal thyroid cells was thought to promote their recombination (6, 7).

External radiation during childhood increases the risk of thyroid tumors, either benign or malignant (1-4, 8). More than 90 % of these cancers are papillary presenting in 70% of cases a *RET/PTC* rearrangement. Several *in-vitro* and *in-vivo* studies have shown that exposure to ionizing radiation induces *RET/PTC* rearrangement. Thus, using a nested PCR assay *RET/PTC1* transcripts were detected in a human undifferentiated thyroid carcinoma cell line (8505C) after exposure to 50-Gy X-rays (9). *RET/PTC1* and *RET/PTC3* were detected in human thyroid tissues transplanted in scid mice and submitted to X-ray irradiation (10). More recently, *RET/PTC* rearrangements were induced in immortalized human thyroid cells (HTori-3) after exposure to α -radiation in a dose-dependent manner (11). These results strongly support the direct role of radiation exposure in *RET/PTC* generation.

Ionizing radiation exposure induces a transient “oxidative burst” through water radiolysis (12) that generates H_2O_2 and in turn H_2O_2 can cause DNA damage and mediate part of the radiation effects (12). H_2O_2 can induce DNA double-strand breaks (DSBs) and consequently chromosomal aberrations (13-16).

In this study, we show for the first time that H_2O_2 produced during irradiation but also when it is added to the cell medium, causes *RET/PTC1* chromosomal rearrangements in human thyroid cells. Consequently, an oxidative stress can be responsible through the generation of H_2O_2 for the occurrence of *RET/PTC1* rearrangements that may lead to thyroid tumors, even in the absence of radiation exposure.

Materials and Methods

Cell cultures conditions

The human thyroid epithelial cell line (HTori-3), purchased from the European Tissue Culture collection, was grown in red phenol free RPMI 1640 medium (Invitrogen), supplemented with 1% (v/v) antibiotics-antimycotics (Invitrogen), 2mM L-glutamine (Invitrogen) and 10% (v/v) fetal-calf serum (PAA laboratories). The human thyroid papillary carcinoma cell line (TPC-1) was cultured in the same medium. The human embryo lung fibroblasts MRC5 cell line, kindly given by Dr Fillippo Rosselli (FRE 2939CNRS, Villejuif, France), was cultured in red phenol free DMEM medium (Invitrogen) supplemented with 1% (v/v) antibiotics antimycotics, 2 mM L-Glutamine, 1 mM sodium pyruvate (Invitrogen), 10% fetal -calf serum. Normal human thyroid tissue specimens were collected at Institut Gustave Roussy in accordance with local and national ethics laws. Informed consent was obtained from all patients. Primary human thyrocytes were cultured as previously described (17)

Expression of thyroid differentiation markers

Total RNA from cells was extracted using Trizol reagent (Invitrogen, Inc) according to the manufacturer's instructions and reverse transcript as previously described (17). cDNA was then amplified by 40 temperature cycles (95°C, 30 sec; 60°C, 30 sec; 72°C, 1 min) in a GeneAmp 9600 apparatus and AmpliTaq Gold's protocol (Applied Biosystems). The housekeeping gene Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) cDNA was amplified as control. Selected primers are listed in Table 1.

Transient cell transfection.

HTori-3 cells reaching 50%-60% confluence were transfected using JetPEI™ transfection reagent and the Polyplus transfection protocol (Ozyme, St Quentin Yvelines, France) with pHyPer-nuc or pHyPer-Cyto vector (Evrogen JSC, Moscow, Russia). After 48 h the cells were visualized by confocal microscopy.

Confocal fluorescence microscopy

pHyPer transfected cells were plated to glass bottom dishes, exposed to 5 Gy X-ray irradiation or to 25 μ M H₂O₂ and immediately analyzed by confocal microscopy. The fluorescence (excitation/emission: 488/530 nm) was examined under an LSM 510 confocal microscope (Zeiss, Jena, Germany).

Cell treatment

X-Ray irradiation

In most experiments, 5×10^6 cells were plated in a 175-cm² flask and 16 hours later exposed to a single dose of X-irradiation from a X-Ray Generator operating at 200 KVe and 15 mA at

a dose rate of 1 Gy/min. Just before irradiation at room temperature, the cell medium was replaced by a fresh medium. Four hours after irradiation, cells were collected by trypsinization and split into ten 6-well plates at a density of approximately 2.2×10^4 cells per well, grown for 15 days and harvested.

Hydrogen peroxide

For *RET/PTC1* detection, 5×10^6 cells were plated in a 175-cm² flask and 16 hours later exposed to 25 μ M H₂O₂ in serum-free medium for 1 hour at 37°C. Four hours later, cells were collected by trypsinization and split into ten 6-well plates at a density of approximately 2.2×10^4 cells per well, grown for 15 days and harvested.

Detection of RET/PTC1 rearrangements

The Total RNA from irradiated cells cultured in 6-well plates was extracted using a NucleoSpin RNA II kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's protocol. The integrity and purity of each RNA samples were verified by the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Biotechnologies). The *RET* specific reverse transcription was achieved by using a gene specific primer (RT-*RET*-994) in the presence of Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase (Invitrogen). The first and the nested PCR were carried out with 35 cycles in the respective conditions (95°C, 30 sec; 58°C, 1 min; 72°C, 1 min) and (95°C, 30 sec; 60°C, 30 sec; 72°C, 30 sec) in a GeneAmp 9600 temperature using AmpliTaq protocol (Applied Biosystems). For optimization of the first round PCR conditions, three target reverse transcriptions from each sample were followed by three first PCR. Briefly, 6 μ g of RNA from each sample were divided into 2- μ g aliquots, dispensed in 10 μ l of reverse transcription buffer and incubated for 120 min at 37°C according to the manufacturer's protocol. Each reaction mixture was then diluted with 14 μ l of PCR buffer containing 0.5 units of Taq DNA polymerase (Applied Biosystems, Roche). The first round RT-PCR products were pooled, diluted 1:5 and then 5 μ l were used for one nested PCR. The PCR amplification products

were analysed by 1.5% agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining. The specificity of the amplification product with predicted size is confirmed by *EcoRI* digestion. The primers used are listed in Table 1.

Measurement of H₂O₂ generation

Production of H₂O₂ was determined by reaction with cell-impermeable 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (Amplex Red reagent, Invitrogen) in the presence of excess peroxidase, producing fluorescent resorufin. Briefly, HTori-3 cells were plated into 6- well plates at a density of 2.5×10^5 per well in a complete medium. 16 hours later, the cells were washed twice with warm Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS) without CaCl₂ and MgCl₂ (Invitrogen) and irradiated by 5 Gy X-ray in D-PBS with CaCl₂ and MgCl₂ (Invitrogen). Cell free-assay was also performed in D-PBS with CaCl₂ and MgCl₂. At regular time intervals, 100 µl -irradiated medium aliquots were removed and kept on ice and dark up to H₂O₂ quantification. For H₂O₂ quantification, 100 µl aliquots were mixed with 100 µl working solution of D-PBS with CaCl₂ and MgCl₂ containing 1 U/ml horseradish peroxidase, 2 mg/ml D-glucose and 100 µM Amplex-Red and incubated for 30 min at room temperature. Relative fluorescence units (excitation/emission: 544/595 nm) measured in a multiwell fluorescence plate reader (Wallac 1420 Victor2, PerkinElmer) were converted into H₂O₂ concentrations using a calibration curve.

Detection of intracellular ROS

The peroxide-sensitive fluorescent probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCFDA) (Molecular Probes) was used to assess the generation of intracellular ROS. This compound is converted by intracellular esterases to 2',7'-dichlorodihydrofluorescein, which is then oxidized by intracellular ROS to the highly fluorescent 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCF). HTori-3 cells were plated at a density of 2.5×10^5 cells per well into 6-well plates in a

complete culture medium. 16 hours later, the cells were harvested by trypsinization, resuspended in 0.5 ml of serum-free medium and incubated with 10 μ M DCFH-DA and with increased concentration of H_2O_2 for one hour at 37°C in a serum-free medium in the dark. Fluorescence was recorded on FL-1 channel of FACSVantage SE (Becton Dickinson). The cellular viability was assessed by the propidium iodide staining. For experiments with catalase, HTori-3 cells were plated at a density of 10^5 cells per well into 24-well plates in a complete culture medium as described above. 16 hours later, the cell culture medium was removed and the cells were treated or not with 100 U/ml catalase for 2 and 4 hours at 37°C in a serum-free medium. The cell were then washed twice with warm D-PBS without $CaCl_2$ and $MgCl_2$ to remove residual catalase and incubated with 10 μ M CM- H_2 DCFDA for 1 hour at 37°C in a serum-free medium in the dark before to be treated with 25 μ M H_2O_2 . Relative fluorescence units (excitation/emission: 485/535 nm) were measured in a multiwell fluorescence plate reader (Wallac 1420 Victor2, PerkinElmer).

Cell survival test

Cell proliferation/viability of HTori-3 cells (96-well plates; 3×10^4 cells/well) was quantified by means of a colorimetric assay based on the reduction of the colorless tetrazolium salt 4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate (WST-1®, Roche Applied Science) to formazan, according to the manufacturer's instructions

SDS-PAGE and Western blotting procedures

Western blot analysis was performed with lysates prepared as described (17) Primary antibody against phosphorylated Ser¹³⁹ of histone H2AX (γ H2AX) was purchased from Millipore and total histone H2AX was purchased from AbCam. The secondary antibodies used were respectively: HRP conjugated anti-mouse (Santa Cruz) and HRP-conjugated goat

anti-rabbit (Southern Biotech). Specific binding was detected by the Enhancer Chemiluminescence system.

Statistical analysis

Data are means $\pm$ standard error of the means. Student's *t*-test was used with $P < 0.05$ as the significant threshold.

Results

***In-vitro* irradiation of the HTori-3 cells induced *RET/PTC1* formation.**

The human thyroid epithelial cell line (HTori-3)

The human thyroid epithelial cell line (HTori-3) has been successfully used (11) to study the occurrence of *RET/PTC* rearrangement after *in vitro* radiation exposure. In spite of the presence of multiple numerical and structural chromosomal abnormalities these cells present some advantages: they have three intact copies of chromosome 10 with undisrupted *RET* locus and a high proliferation rate, both increasing the probability of *RET/PTC* formation after radiation exposure (11, 18). As previously shown, the HTori-3 cell line expresses mRNA of thyroid differentiation markers such as Thyroglobulin (Tg), Thyroperoxidase (TPO) and TSH receptor, which are positively regulated by TSH (Fig.1A). Primary culture of human thyrocytes was used as control. Unlike thyrocytes, HTori-3 cells did not produce extracellular H₂O₂ under stimulated and non-stimulated conditions (data not shown).

*Detection of *RET/PTC1* rearrangement*

In order to detect *RET/PTC1* we developed a highly specific and sensitive nested RT-PCR method by using first a gene specific primer for reverse transcription and second two couples of primers designed respectively from *CCDC6* exon 2 and *RET* exon 12 (table 1). Dilution

experiments were carried out mixing TPC-1 cells bearing the *RET/PTC1* rearrangement with untreated HTori-3 cells in which *RET/PTC1* rearrangement was undetectable (Table 2) to evaluate the sensitivity of the method. RNA was extracted from the mixture and subjected to nested RT-PCR. A 212-base pair (bp) product could be detected from the TPC-1 cells when mixed with HTori-3 cells at a ratio of 1:10⁶ (Fig 1B). The specificity of *RET/PTC1*-positive amplified product was ascertained by *EcoRI* digestion of the PCR products that resulted in the predicted fragments (Fig 1C). Then, *RET/PTC1* rearrangement was sought in HTori-3 cells after X-ray exposure. Representative ethidium bromide-stained gels of RT-PCR products are shown in Figure 1D. To exclude the possibility of degradation of extracted RNA, G3PDH was amplified from each sample by RT-PCR as control. Because the highest number of *RET/PTC1* was observed after 5Gy γ -radiation in cells grown for 9 days after irradiation (11), the cells were irradiated with a single dose of 5 Gy X-ray, 4 hours later seeded in 6 well-plates and collected after 15 days. In these conditions, *RET/PTC1* rearrangement was detected in approximately 20% of cell- containing wells (mean 20.53 $\pm$ 1.98) (Table 2). Thus, we confirmed that the HTori-3 cell line is a valuable *in vitro* model for studying the mechanisms of *RET/PTC1* generation. The *RET/PTC1* signal intensity in the positive wells appeared comparable to the signal in TPC1 lanes because the nested PCR conditions were not compatible with quantification. Indeed, the initial, outer primer PCR phase was not conducted in the exponential phase. No transcripts of *RET/PTC1* rearrangement were detectable in the non-thyroid irradiated MRC5 cell line and analyzed in the same experimental conditions of radiation exposure (Table 2), showing that *RET/PTC1* rearrangement does not occur in fibroblasts.

Ionizing radiation exposure produces H₂O₂ in the extracellular medium through radiolysis of water.

Ionizing radiation exposure is known to induce a transient “oxidative burst” through radiolysis of water (12). The concentration of H₂O₂ produced in the medium through radiolysis of water after irradiation by 5 Gy X-ray was measured at different time intervals. In the absence of

cells, the concentration estimated at 12 μ M remained unchanged 30 min after irradiation (Fig. 2A). On the other hand, in the presence of cells, H_2O_2 rapidly disappeared and only 50% remained at 10 min after irradiation. Addition of 100 U/ml Catalase, a scavenger of H_2O_2 , suppressed radiation-induced H_2O_2 formation in cell medium.

Pre-treatment of thyroid cells by catalase decreases the occurrence of DNA double strand breaks (DSBs) and of *RET/PTC1* rearrangement after exposure to ionizing radiation.

Ionizing radiation exposure is known to induce several kinds of DNA damage. DNA DSBs is the main cytotoxic lesion induced by ionizing radiation. The phosphorylated form of histone H2AX (γ H2AX) at serine 139 is generally used as a marker of DNA DSBs (19, 20). As shown in Figure 2B, HTori-3 cells displayed phosphorylation of histone H2AX at 5 min after exposure to 5 Gy X-ray irradiation that increased up to 1 hour. A genetically encoded highly specific fluorescent probe has been recently developed for detecting H_2O_2 inside living cells (21). This indicator, named HyPer, has been shown to have submicromolar affinity to H_2O_2 and to be insensitive to other oxidants. Using the mammalian expression vectors encoding respectively cytosolic- and nuclear-targeted HyPer we visualized changes in the fluorescence of HyPer in both cytosol and nucleus upon irradiation of the cells suggesting that an increase of the H_2O_2 level occurred following radiation exposure and may be responsible of some effects of radiation (Fig. 2C). To confirm the potential role of H_2O_2 , protection of DNA from oxidative damage was evaluated by pretreating HTori-3 cells with catalase at different times before irradiation. Whereas the presence of catalase in the culture medium during irradiation partially protected the cells from DNA damage, pre-incubation of cells for 4 hours with catalase significantly decreased the level of phosphorylated H2AX as shown by western-blotting (Fig. 2D). This result confirmed by pulse-field gel electrophoresis (PFGE), a sensitive assay for DNA DSBs, showed that pre-incubation of HTori-3 cells for 4 hours with catalase protected DNA from DSBs occurrence and significantly decreased the occurrence of *RET/PTC1* rearrangements (Table 2).

Extracellular H₂O₂ is able to cause *RET/PTC1* rearrangements in thyroid cells.

The effect of H₂O₂ concentrations from 1 to 25 µM on the intracellular ROS level was determined by flow cytometry analysis of DCFHDA oxidation. One hour after the treatment with H₂O₂, we measured a concentration-dependent increase of fluorescence, reflecting an increased level of intracellular ROS (Fig 3A). Preincubation of HTori-3 cells with catalase for at least 4 hours was necessary to produce a significant decrease in intracellular level of ROS induced after 25 µM H₂O₂ treatment (Fig. 3B). Using confocal microscopy, we followed after addition of 25 µM of H₂O₂ in the cell culture medium, changes in fluorescence of Hyper expressed in the nucleus. After 2 min we observed an increase in fluorescence indicating an H₂O₂-induced signal in the nucleus (Fig. 3C). Preincubation of cells for 4 hours with catalase decreased significantly the nuclear fluorescence.

As shown in figure 4A, H₂O₂ concentrations equal or below 25 µM did not induce any significant cell death after 24 hours. Time course analysis of γH2AX in response to 12 µM and 25 µM H₂O₂ in HTori-3 cells showed that H2AX was highly phosphorylated after one hour (Fig. 4B). The phosphorylation of H2AX at serine 139, which was correlated to the H₂O₂ concentration, confirmed that 12 µM H₂O₂, corresponding to the concentration measured after radiation exposure, was able to cause DNA damages. As observed for 5 Gy X-ray irradiation, preincubation of cells with catalase for 4 hours protected DNA from DSBs produced after exposure to 12 µM H₂O₂ during one hour (Fig 4C).

In the light of these findings, we treated the cells with 25 µM H₂O₂ for 1 hour, which was found to cause the highest level of DNA DSBs without affecting the cell viability and evaluated the occurrence of *RET/PTC1* rearrangements in HTori-3 cells two weeks later by nested RT-PCR. As shown in table 2 and Figure 4D, 25 µM H₂O₂ was able to produce *RET/PTC1* chromosomal rearrangements.

Discussion

To our knowledge, this is the first report showing that H_2O_2 promotes *RET/PTC1* rearrangements in thyroid cells and consequently, these data confirm that H_2O_2 might play an important role in the initiation of papillary thyroid cancer (PTC). The direct link between ionizing radiation, *RET/PTC* rearrangements and PTC occurrence has been supported by the observation that *RET/PTC* rearrangements are frequently found in PTC samples from patients who had been exposed during childhood to external radiation or who lived in highly contaminated regions after the Chernobyl accident (22). In addition, several studies have shown that *in vitro* irradiation of thyroid cells is able to cause *RET/PTC1* rearrangements (9, 10). In a recent study, *RET/PTC* rearrangements were induced in differentiated human thyroid cells by a range of γ -radiation doses (0.1–10 Gy), that were equivalent to those received by patients who developed a thyroid cancer (11). By using the same experimental model, we also identified *RET/PTC1* rearrangements in thyroid cells grown for 15 days after *in vitro* exposure to a single X-radiation dose of 5Gy.

Chronic oxidative stress may disrupt the genomic integrity of cells and may induce chromosomal instability (14-16, -23). For many years H_2O_2 , considered as a DNA genotoxic agent, was suspected to play a mutagenic role in the thyroid gland and to be responsible for thyroid nodules that are frequently found (24). Several observations strengthen this hypothesis: in mice the spontaneous mutation frequency is higher in the thyroid gland than in any other organ (25), somatic mutations of the TSH receptor are frequent in the human thyroid tissue (24) and thyroid glands of mice transgenic for the mutant α_{1B} -adrenergic receptor (Tg- α_{1B} AR mice) that have increased H_2O_2 generation develop malignant nodules with a high frequency (26). H_2O_2 causes DNA damage, such as guanine oxidation, single- and double-strand breaks (SSBs and DSBs) leading to mutagenesis and genomic instability. DNA DSBs (27) that can lead to chromosomal aberrations (28) result from both a direct effect of irradiation on DNA and from the generation of ROS by radiolysis of water (12). Although DSBs induced by H_2O_2 are considered rare events, it has been shown that H_2O_2

induces DSBs with a ratio of DSBs to SSBs similar to that caused by X-rays (13,29). This induction of DSBs by H_2O_2 was also observed in rat thyroid cell line (PCCl3), in human thyroid primary culture and pig thyroid slices (13). However, in these experiments, H_2O_2 concentrations used were at least five times higher than those used herein to generate DSBs in the human thyroid cell line HTori-3. This difference is probably due to the models used that have different cell membrane permeability and antioxydant capacities. HTori-3 cells seem to be particularly sensitive to H_2O_2 , since 50 μ M H_2O_2 treatment affected the viability of these cells. Our results showed that extracellular H_2O_2 produced through water radiolysis significantly contributes to the appearance of DSBs and importantly, to *RET/PTC1* generation. The extracellular concentration of H_2O_2 measured after 5 Gy-irradiation was estimated at 12 μ M and was shown to cause DNA damage. This result was in disagreement with the recent report of very low H_2O_2 concentrations after irradiation of the cell medium by similar X-ray doses and of the absence of a potentiating effect of BSO on DNA damage, a drug that decreases intracellular glutathione and consequently, induces a protective effect for H_2O_2 against degradation (13). This discrepancy could be due to our experimental conditions, because serum was withdrawn from the cell medium before irradiation in order to avoid H_2O_2 produced during radiation exposure to be degraded by the catalase activity of the serum (30).

It was previously observed that extracellular H_2O_2 rapidly disappeared (13, 31). We also found that 90 percent of the extracellular H_2O_2 measured in the cell medium after irradiation has disappeared after 20 min. As measured by DCF fluorescence in the cells, the intracellular production of ROS was correlated to the concentrations of exogenous H_2O_2 added in the medium. Importantly, these H_2O_2 concentrations ranged from 1 to 25 μ M and were of the same order as those measured in the medium after radiation exposure, and were shown to produce DNA damage. Using HyPer, a specific probe for H_2O_2 , we detected temporal increase in H_2O_2 in the nucleus of cells treated by exogenous H_2O_2 . This result confirms that extracellular H_2O_2 diffuses into the cells, reach the nucleus and consequently may cause DNA damage. Catalase was able to protect the cells from the toxic effect of H_2O_2

demonstrating for the first time that H_2O_2 produced during irradiation contributes to the *RET/PTC1* generation in thyroid cells. In the present study, we observed that pretreatment of the cells with catalase for at least 4 hours produced a significant inhibition of DNA DSBs induced by irradiation as shown by phosphorylation of histone H2AX. The protective effect of pretreatment with catalase was associated with a significant decrease in intracellular and in intranuclear level of H_2O_2 . As the oxidative-sensitive fluorescence dye (DCF) is not specific for H_2O_2 and could also be oxidized by other radicals produced in these conditions, the decrease observed was partial (32-33). Thus, as observed in other studies (34), exogenous catalase could enter the cells by endocytosis, scavenge intracellular H_2O_2 and protect the cells from oxidative damages. But it could also interact with the cell membranes in a time-dependent manner and scavenge extracellular H_2O_2 before its diffusion in the cells. This result corroborates previous results showing a protective effect of antioxidant treatments from IR-induced malignant transformation and tumorigenicity of HTori-3 cells (35-36).

The thyroid gland in normal conditions produces large amounts of H_2O_2 (37), that was estimated in stimulated rat thyroid cell lines and in rat thyroid cells in primary cultures to be around 10 nmoles/100 mg/h (38). The thyrocytes have two H_2O_2 generating systems located at the apical membrane: DUOX1 and DUOX2 that are NADPH oxidases (39, 40). Besides being important for hormone synthesis, DUOX could be a major source of free radicals and ROS that could cause substantial DNA damage. Recently, we demonstrated that NOX4, another NADPH oxidase, is expressed in normal and cancer thyroid tissues and may be a H_2O_2 generator located inside the thyroid cell (17).

In this study, we demonstrate that H_2O_2 is able to cause *RET/PTC1* chromosomal rearrangement, the most prevalent mutation detected in PTC. However, we cannot exclude that H_2O_2 could also cause other specific mutations found in the thyroid cancers as BRAF, Ras and PAX8/PPAR γ .

References

1. Suarez HG. Molecular basis of epithelial thyroid tumorigenesis. C R Acad Sci III 2000; 323: 519-28.
2. Ciampi R, Nikiforov YE. RET/PTC rearrangements and BRAF mutations in thyroid tumorigenesis. Endocrinology 2007; 148: 936-41.
3. Bounacer A, Wicker R, Caillou B, et al. High prevalence of activating ret proto-oncogene rearrangements, in thyroid tumors from patients who had received external radiation. Oncogene 1997; 15: 1263-73.
4. Smida J, Salassidis K, Hieber L, et al. Distinct frequency of ret rearrangements in papillary thyroid carcinomas of children and adults from Belarus. Int J Cancer 1999; 80: 32-8.
5. Pierotti MA, Santoro M, Jenkins RB, et al. Characterization of an inversion on the long arm of chromosome 10 juxtaposing D10S170 and RET and creating the oncogenic sequence RET/PTC. Proc Natl Acad Sci U S A 1992; 89: 1616-20.
6. Nikiforova MN, Stringer JR, Blough R, Medvedovic M, Fagin JA, Nikiforov YE. Proximity of chromosomal loci that participate in radiation-induced rearrangements in human cells. Science 2000; 290: 138-41.
7. Gandhi M, Medvedovic M, Stringer JR, Nikiforov YE. Interphase chromosome folding determines spatial proximity of genes participating in carcinogenic RET/PTC rearrangements. Oncogene 2006; 25: 2360-6.
8. Unger K, Zurnadzhy L, Walch A, et al. RET rearrangements in post-Chernobyl papillary thyroid carcinomas with a short latency analysed by interphase FISH. Br J Cancer 2006; 94: 1472-7.
9. Ito T, Seyama T, Iwamoto KS, et al. *In vitro* irradiation is able to cause RET oncogene rearrangement. Cancer Res 1993; 53: 2940-3.
10. Mizuno T, Iwamoto KS, Kyoizumi S, et al. Preferential induction of RET/PTC1 rearrangement by X-ray irradiation. Oncogene 2000; 19: 438-43.
11. Caudill CM, Zhu Z, Ciampi R, Stringer JR, Nikiforov YE. Dose-dependent generation of RET/PTC in human thyroid cells after *in vitro* exposure to gamma-radiation: a model of carcinogenic chromosomal rearrangement induced by ionizing radiation. J Clin Endocrinol Metab 2005; 90: 2364-9.
12. Narayanan PK, Goodwin EH, Lehnert BE. Alpha particles initiate biological production of superoxide anions and hydrogen peroxide in human cells. Cancer Res 1997; 57: 3963-71.
13. Driessens N, Versteyhe S, Ghaddab C, et al. Hydrogen peroxide induces DNA single- and double-strand breaks in thyroid cells and is therefore a potential mutagen for this organ. Endocr Relat Cancer 2009; 16: 845-56.
14. Dayal D, Martin SM, Limoli CL, Spitz DR. Hydrogen peroxide mediates the radiation-induced mutator phenotype in mammalian cells. Biochem J 2008; 413: 185-91.
15. Limoli CL, Giedzinski E. Induction of chromosomal instability by chronic oxidative stress. Neoplasia 2003; 5: 339-46.

16. Roy K, Kodama S, Suzuki K, Fukase K, Watanabe M. Hypoxia relieves X-ray-induced delayed effects in normal human embryo cells. *Radiat Res* 2000; 154: 659-66.
17. Weyemi U, Caillou B, Talbot M, et al. Intracellular expression of ROS-generating NADPH oxidase NOX4 in normal and cancer thyroid tissues. *Endocr Relat Cancer* 2009.
18. Lemoine NR, Mayall ES, Jones T, et al. Characterisation of human thyroid epithelial cells immortalised *in vitro* by simian virus 40 DNA transfection. *Br J Cancer* 1989; 60: 897-903.
19. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 1998; 273: 5858-68.
20. Rothkamm K, Lobrich M. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 5057-62.
21. Belousov VV, Fradkov AF, Lukyanov KA, et al. Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nat Methods* 2006; 3: 281-6.
22. Detours V, Delys L, Libert F, et al. Genome-wide gene expression profiling suggests distinct radiation susceptibilities in sporadic and post-Chernobyl papillary thyroid cancers. *Br J Cancer* 2007; 97: 818-25.
23. Clutton SM, Townsend KM, Walker C, Ansell JD, Wright EG. Radiation-induced genomic instability and persisting oxidative stress in primary bone marrow cultures. *Carcinogenesis* 1996; 17: 1633-9.
24. Krohn K, Maier J, Paschke R. Mechanisms of disease: hydrogen peroxide, DNA damage and mutagenesis in the development of thyroid tumors. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2007; 3: 713-20.
25. Maier J, van Steeg H, van Oostrom C, Karger S, Paschke R, Krohn K. Deoxyribonucleic acid damage and spontaneous mutagenesis in the thyroid gland of rats and mice. *Endocrinology* 2006; 147: 3391-7.
26. Ledent C, Denef JF, Cottecchia S, et al. Costimulation of adenylyl cyclase and phospholipase C by a mutant alpha 1B-adrenergic receptor transgene promotes malignant transformation of thyroid follicular cells. *Endocrinology* 1997; 138: 369-78.
27. Sarasin A, Bounacer A, Lepage F, Schlumberger M, Suarez HG. Mechanisms of mutagenesis in mammalian cells. Application to human thyroid tumours. *C R Acad Sci III* 1999; 322: 143-9.
28. Richardson C, Jasin M. Frequent chromosomal translocations induced by DNA double-strand breaks. *Nature* 2000; 405: 697-700.
29. Bradley MO, Kohn KW. X-ray induced DNA double strand break production and repair in mammalian cells as measured by neutral filter elution. *Nucleic Acids Res* 1979; 7: 793-804.
30. Korystov YN, Shaposhnikova VV, Korystova AF, Emel'yanov MO. Detection of reactive oxygen species induced by radiation in cells using the dichlorofluorescein assay. *Radiat Res* 2007; 168: 226-32.
31. Song Y, Driessens N, Costa M, et al. Roles of hydrogen peroxide in thyroid physiology and disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 3764-73.

32. Walrand S, Valeix S, Rodriguez C, Ligot P, Chassagne J, Vasson MP. Flow cytometry study of polymorphonuclear neutrophil oxidative burst: a comparison of three fluorescent probes. *Clin Chim Acta* 2003; 331: 103-10.
33. Mikkelsen RB, Wardman P. Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene* 2003; 22: 5734-54.
34. Shin MH, Rhie GE, Kim YK, et al. H₂O₂ accumulation by catalase reduction changes MAP kinase signaling in aged human skin *in vivo*. *J Invest Dermatol* 2005; 125: 221-9.
35. Kennedy AR, Ware JH, Guan J, et al. Selenomethionine protects against adverse biological effects induced by space radiation. *Free Radic Biol Med* 2004; 36: 259-66.
36. Kennedy AR, Zhou Z, Donahue JJ, Ware JH. Protection against adverse biological effects induced by space radiation by the Bowman-Birk inhibitor and antioxidants. *Radiat Res* 2006; 166: 327-32.
37. Bjorkman U, Ekholm R. Accelerated exocytosis and H₂O₂ generation in isolated thyroid follicles enhance protein iodination. *Endocrinology* 1988; 122: 488-94.
38. Corvilain B, Collyn L, van Sande J, Dumont JE. Stimulation by iodide of H₂O₂ generation in thyroid slices from several species. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 278: E692-9.
39. Dupuy C, Ohayon R, Valent A, Noel-Hudson MS, Deme D, Virion A. Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cdnas. *J Biol Chem* 1999; 274: 37265-9.
40. De Deken X, Wang D, Many MC, et al. Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J Biol Chem* 2000; 275: 23227-33.

Figure Legends

Fig1. Expression of thyroid-specific gene transcripts in human HTori-3 cells and *RET/PTC1* molecular method detection. A: RT-PCR analysis demonstrating the expression of thyroid differentiation genes Tg, TPO, TSH receptor and control gene G3PDH in the human HTori-3. The cells were cultured for 24 h in the presence or in the absence of 1 mU/ml TSH. Primary human thyrocytes were used as positive control. B: Detection of *RET/PTC1* rearrangements in serial dilutions of cell positive for the rearrangement (TPC-1) in non-irradiated HTori-3 cells. C: The specificity of PCR amplification product was ascertained by *EcoRI* digestion. D: The inducibility of *RET/PTC1* rearrangements by X-irradiation at a dose of 5 Gy in human HTori-3 cells. TPC1 cells were used as positive control. RT: reverse transcription. P1: first PCR. P2: nested PCR indicates negative controls done during the different steps without cDNA. ★ Indicates specific amplification product verified by *EcoRI* digestion. G3PDH was used for normalization. Number of lanes referred to cell wells.

Fig.2. A: Measurement of H₂O₂ production after 5 Gy X-irradiation at different time intervals. The H₂O₂ quantification was performed in the serum-free D-PBS medium by using an H₂O₂ (0-2 µM) standard curve as described in Material and Method. 100 U/ml Catalase was added in the cell medium during irradiation. B: DNA double-strand breaks (DSBs) evaluation by phosphorylation of histone H2AX in HTori-3 cells irradiated with 5 Gy X-rays. γH2AX and total H2AX were detected by Western blotting with specific antibodies. This western blot is representative of 4 independent experiments. C: HyPer response to 5 Gy X-ray irradiation. Confocal analysis of H₂O₂-dependent fluorescence in HTori-3 cells expressing pHyper-cyto or pHyPer-nuc. D: Effect of pretreatment of 100 U/ml catalase on DNA DSBs formation. Catalase was also added in the cell medium during 5 Gy-irradiation.

Fig.3. Effect of extracellular H₂O₂ exposure on intracellular ROS levels. A: Effect of H₂O₂ on ROS levels measured as DCF fluorescence by flow cytometry in HTori-3 cells incubated after 1 hour with different concentrations of H₂O₂. B: Effect of catalase on ROS levels in HTori-3 cells treated with 25 µM H₂O₂. 100 U/ml catalase was pre-incubated for 2 and 4 hours before

irradiation. ROS levels were measured as DCF fluorescence in a multiwell fluorescence plate reader as described in Material and Method. C: Nuclear fluorescence intensities of HyPer in cells exposed to 25 μM H_2O_2 as measured by confocal microscopy.

Fig.4. Effect of extracellular H_2O_2 exposure on cell viability and DNA DSBs formation.

A: Cell survival was evaluated by WST-1 assay as described in Material and Method. B: DNA DSBs evaluation by phosphorylation of histone H2AX in HTori-3 cells exposed to 12 μM and 25 μM H_2O_2 for 1 hour. C: Effect of catalase on DNA DSBs induced by 12 μM H_2O_2 incubation. HTori-3 cells were preincubated with 100 U/ml catalase for 4 hours before being exposed to 12 μM H_2O_2 . Phosphorylation of histone H2AX was detected after 1 hour. D: The inducibility of *RET/PTC1* rearrangements by H_2O_2 exposure in human HTori-3 cells. TPC1 cells were used as positive control. Specificity of *RET/PTC1*-positive amplified product was verified by *EcoRI* digestion. M indicates the DNA size markers. H_2O indicates the negative control without cDNA ★ Indicates specific amplification product. G3PDH was used for normalization. Number of lanes referred to cell wells.

Table legends

Table 1: Sequence of the selected primers and predicted size of PCR product.

+ /- means that the oligonucleotide is sense or antisense in relation to cDNA. Ex: Exon.

Table 2: *RET/PTC1* transcript formation in irradiated and surviving HTori-3 and MRC5 cells.

Effect of the catalase pre-treatment on the *RET/PTC1* incidence in irradiated surviving HTori-3 cells. *RET/PTC1* incidence in HTori-3 cells exposed to H_2O_2 .

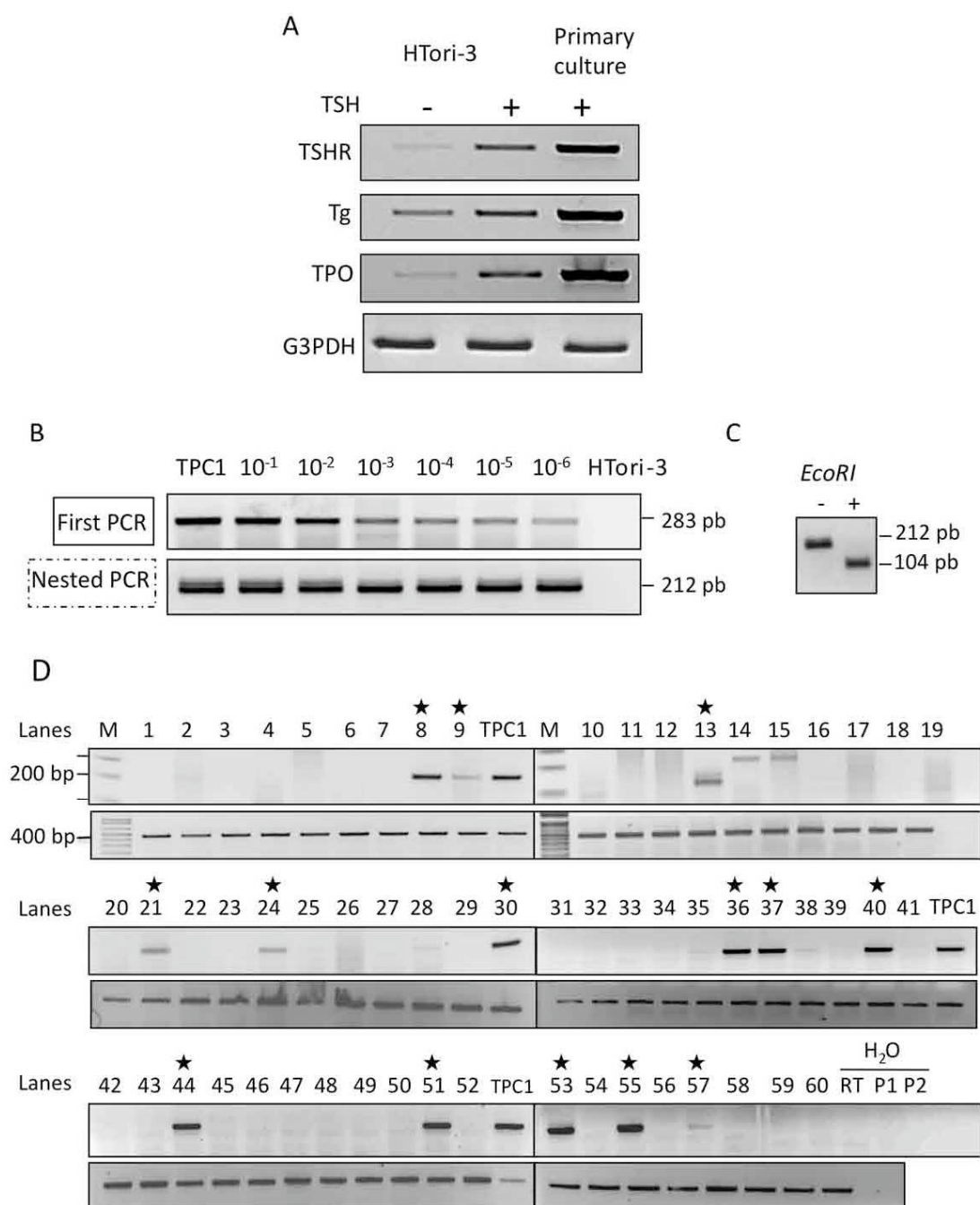


Figure 1

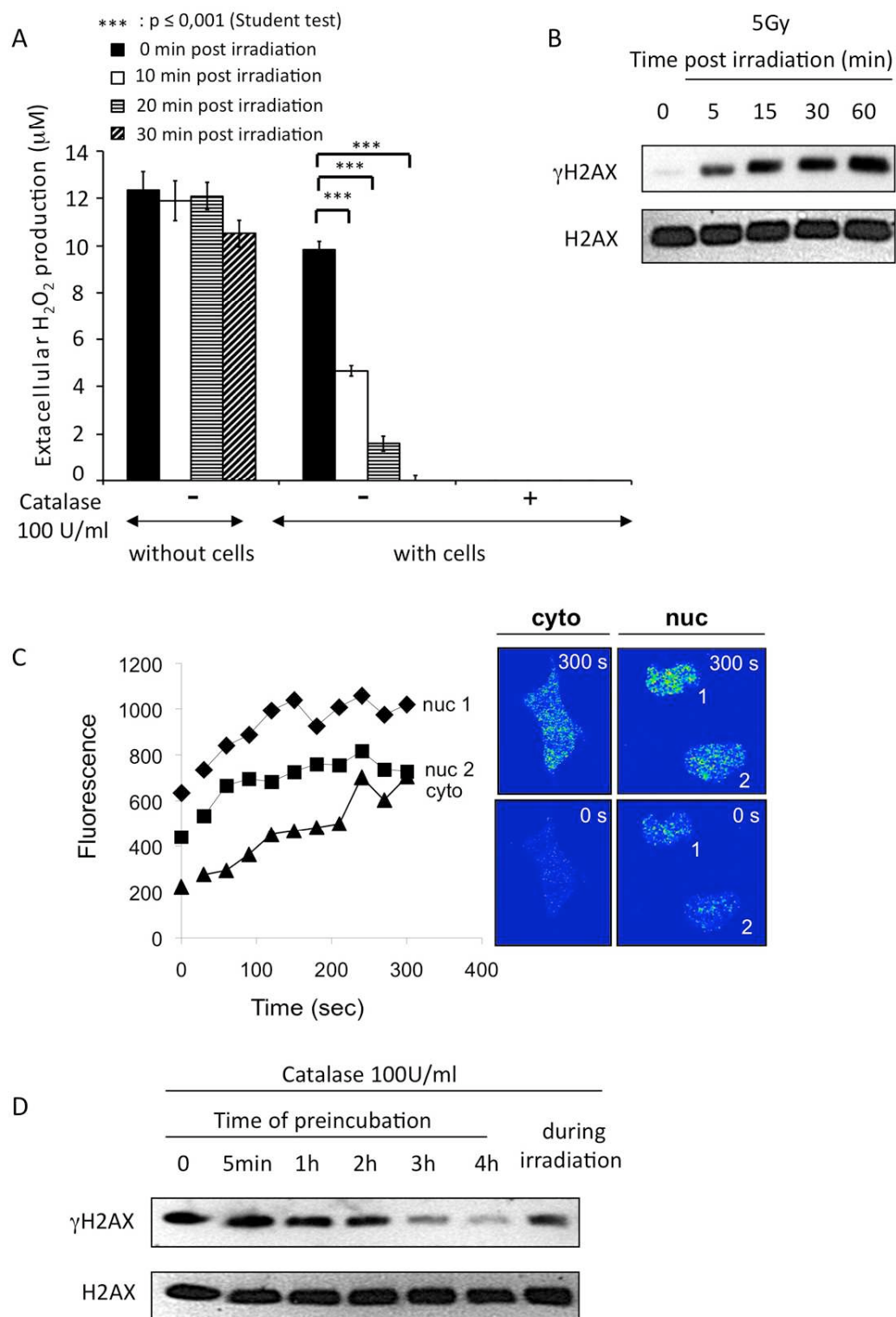


Figure 2

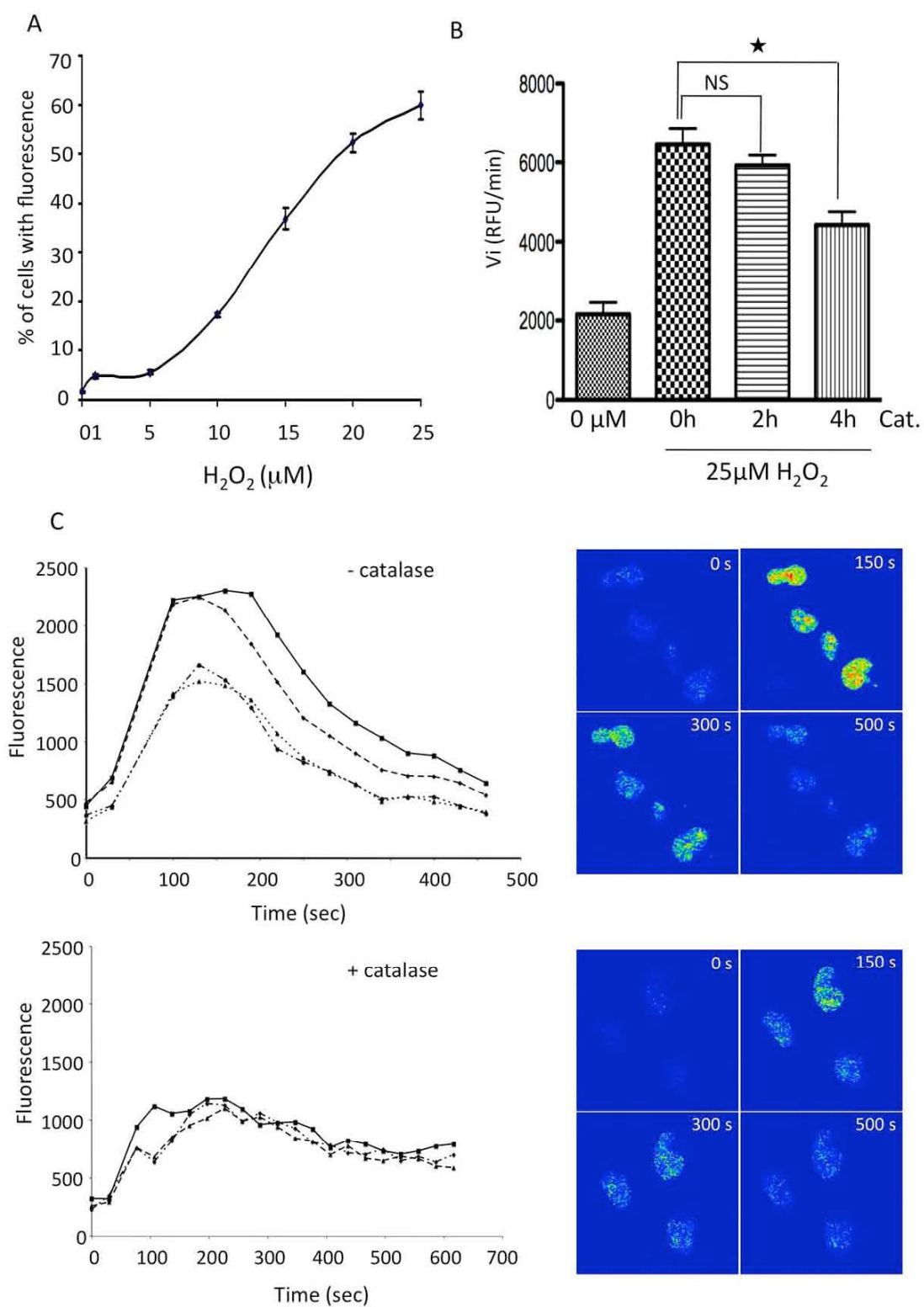


Figure 3

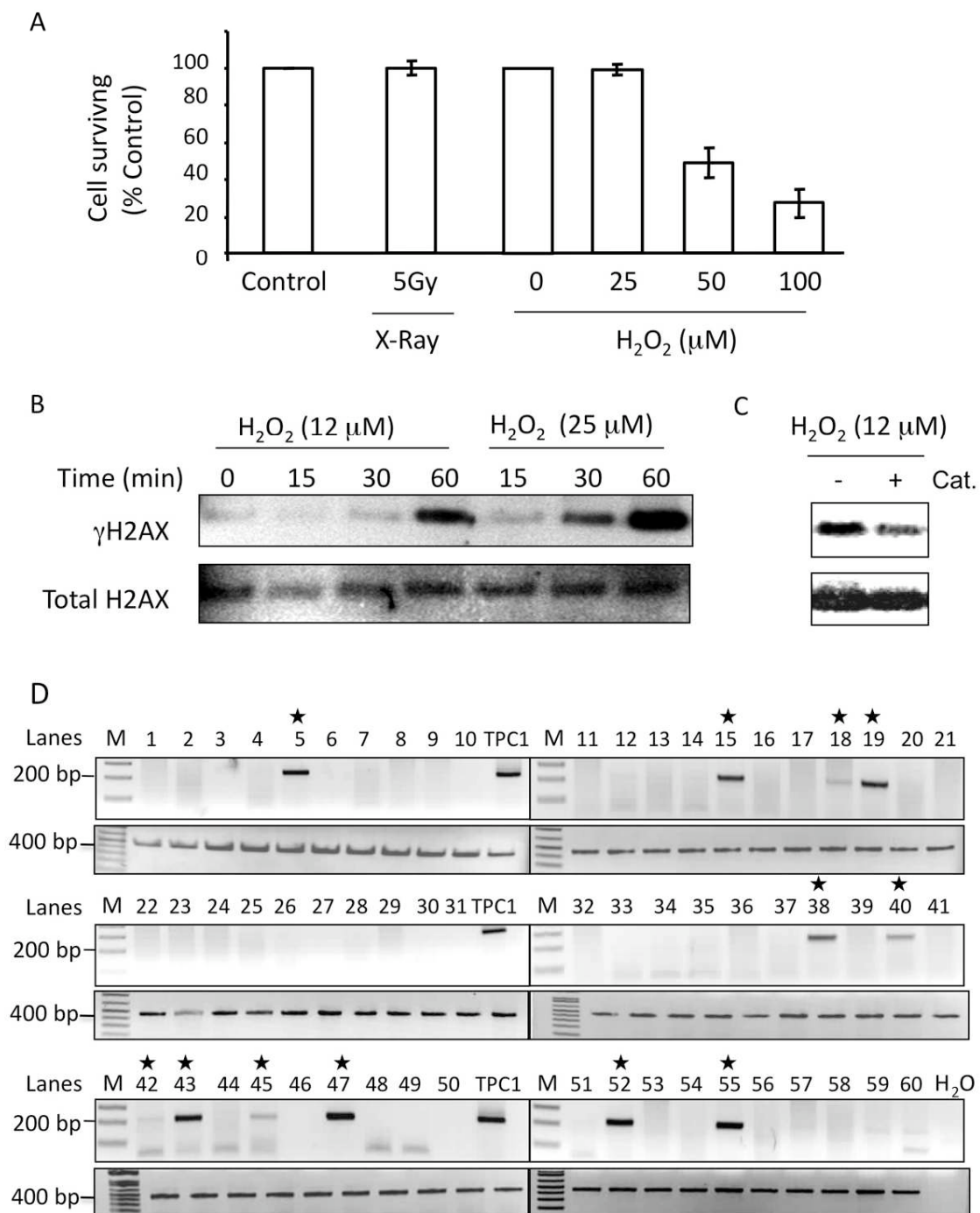


Figure 4

Résumé article 2 (en préparation) :

Après avoir montré l'implication des ROS produites à l'issu de l'irradiation dans la radiocarcinogenèse thyroïdienne, la seconde question abordée a été l'étude du rôle éventuel des NADPH oxydases dans les effets tardifs de l'irradiation. La thyroïde possède trois systèmes générateurs de ROS; la DUOX2 et la DUOX1 qui sont des protéines membranaires, et la NOX4 dont l'expression est intracellulaire. L'étude du profil d'expression de ces enzymes en réponse à des rayonnements ionisants nous a permis de montrer l'implication de la DUOX1 dans les effets tardifs de l'irradiation. L'analyse du profil inflammatoire et des voies de signalisation qui lui sont associé dans les cellules thyroïdiennes irradiées a permis de montrer l'implication de la voie p38MAPK et de l'IL13 dans la régulation de l'expression de la DUOX1 après irradiation. La production de ROS extracellulaire observée après irradiation pourrait induire des dommages à l'ADN dans les cellules irradiées et pourrait également participer aux effets Bystander.

**Radiation-induced reactive oxygen species production:
pivotal role of NADPH oxidase DUOX1 in human thyroid cells.**

Myriem Boufraquech^{1,2,3¶}, Rabii Ameziane-El-Hassani^{4¶}, Fanny Prenois^{1,2,3}, Odile Lagente-Chevallier^{1,2,3}, Monique Talbot^{1,3}, Françoise Courtin^{1,2,3}, Jérémy Cailloux^{1,2,3}, Bernard Caillou³, Abir Al Ghuzlan^{1,3}, Dana Hartl³, Jean-Michel Bidart^{1,2,3}, Martin Schlumberger^{1,2,3} and Corinne Dupuy^{1,2,3}

1 University Paris-Sud, Orsay, F-91405 cedex, France ; 2 UMR 8200 CNRS, Villejuif, F-94805, France; 3 Institut Gustave Roussy, Villejuif, F-94805, France; 4 UBRM, Centre National de l'Energie, des sciences et des techniques nucléaires, Rabat, M-10001, Maroc

Running title: Role of DUOX1 in radiation-induced ROS production

Key words: Ionizing radiation; H₂O₂; NADPH oxidase; DUOX; thyroid

Footnotes :

¶ Myriem Boufraquech and Rabii Ameziane El Hassani contributed equally to this study.

The authors declare no conflict of interest.

Funding and Acknowledgements

This work was supported by grants from Electricité de France (EDF), Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), Ligue Contre le Cancer (comité du Val-de Marne).

Corresponding author: Corinne Dupuy, PhD; Institut Gustave-Roussy, UMR8200 CNRS, 114 rue Edouard Vaillant, 94805, Villejuif, France. Tel: +33 1 42 11 40 74 -Fax: +33 1 42 11 52 44, email: dupuy@igr.fr

Abstract

Ionizing radiation (IR) causes not only acute tissue damage but also late effect. Reactive oxygen species (ROS) are involved in radiation-induced late effects. The thyroid gland is one of the most sensitive organs to the carcinogenic effects of IR and it was recently highlighted that an oxidative stress could be responsible for the occurrence of chromosomal rearrangements found in papillary thyroid cancer samples from patients who had been exposed during childhood to external radiation. Using a thyroid cell line and primary thyrocytes, we investigated the mechanism by which IR induced ROS at late times after irradiation. The results from this study show that IR induces a DUOX1-dependent H₂O₂ production from 3 days after irradiation. IL-13 induced under the same condition is responsible for DUOX1 up-regulation. Moreover, IL-13 and DUOX1 expression coincide with establishment of a persistent DNA damage response (DDR) and ATM, a DDR protein, is required for IL-13 expression and consequently, for DUOX1 expression. p38MAPK, activated at late times after irradiation, cooperates independently of ATM to induce DUOX1 via IL-13 expression. In addition, DUOX1 downregulation by siRNA abrogated γ -H2AX expression, a marker of DNA lesions. Taken together our data indicate that NADPH oxidase DUOX1 induced by irradiation via IL-13 is a critical mediator of persistent DNA damage signalling described to be required for cytokine response.

Introduction

Ionizing radiation (IR) is both a carcinogen and a therapeutic agent depending on doses delivered. It has been established that it induces DNA damage, genomic instability, mutations and chromosomal aberrations. Thyroid gland is one of the most sensitive organs to ionizing radiation. External radiation during childhood increases the risk of thyroid tumours, either benign or malignant (*Suarez HG, CR Acad Sci III, 2000; Bounacer A, Oncogene, 1997; Smida J, Int J cancer, 1999*). Accordingly, increased incidence of thyroid cancer has been noted following radiotherapy for childhood Hodgkin disease, non-Hodgkin lymphoma and neuroblastoma (*Inskip PD, Med Pediatr. Oncol, 2001*). Thyroid cancer risk increases linearly with radiation dose up to approximately 20 Gy (*Bhatti P, Radiation Research, 2011*) and tumours begin to appear 5-10 years after irradiation. More than 90% of these cancers are papillary, presenting a *RET/PTC* chromosomal rearrangement in 70% of cases.

The effect of ionizing radiation is a combination between direct and indirect effect: the former corresponds to ionization of DNA molecule and the latter is mediated by radiolysis of water generating reactive oxygen species (ROS) production. The indirect effects play a major role in the radio-induced DNA damage. However, although ROS generated within milliseconds of IR exposure could induce oxidative damage to critical cellular biomolecules, the amount of ROS thus generated is significantly lower than ROS generated from cellular metabolism (*Ward, JF, Radiat. Res., 1994*). Therefore, the initial production of ROS might not be entirely responsible for the long-term biological effects of IR exposure. A chronic production of ROS resulting from IR effects and causing a state of oxidative stress might promote several pathological conditions. In accordance with this, it has been shown that treatments with antioxidants long after the initial IR exposure suppressed radiation-induced late effects (*Robbins ME, Int. J. Radiat. Biol., 2004*). We have recently shown that H₂O₂, one of ROS, is able to cause *RET/PTC1* rearrangement in thyroid cells emphasizing that an oxidative stress could be responsible for occurrence of *RET/PTC* rearrangement found in thyroid lesions several years after radiation exposure (*Ameziane El Hassani R and Boufraquech M, 2010*).

An increasing body of evidence demonstrates that cells can produce ROS through activation and/or induction of NADPH oxidases, which constitute a new family of enzymes known as NOX/DUOX (*Bedard and Krause, 2007*). ROS produced by NOXs participate in the regulation of many cell functions and have been implicated in various pathological conditions including the late side effects induced by IR and chemotherapy (*Hamada N, J. Radiat. Res. 2007; Lambeth JD, 2007, Collins-Underwood JR, Free Radic. Biol. Med., 2008*). Thyroid cells express three of these NADPH oxidases. Two of them are H₂O₂-generating systems located and active at the apical plasma membrane: DUOX2 that is implied in thyroid hormone biosynthesis and DUOX1 whose role in the thyroid is still unknown (*Dupuy, 1999; de Deken,*

2000), and also NOX4, which was recently found to be expressed inside these cells (*Weyemi U., 2010*).

In addition to ROS, irradiated cells release soluble growth factors and cytokines, among them IL-13, long after the time of exposure (Han G, *Oncol rep.* 2011). It was recently shown that persistent DNA damage signalling observed after high doses of irradiation (10 Gy) and usually associated with senescence, regulates cytokine secretion. ATM and CHK2, two protein kinases that are key components of the DNA damage response were shown to be essential for this secretion (Rodier F, *Nat. Cell. Biol.*, 2009).

Since ROS may contribute to the late effects observed after radiation exposure and may promote development of cancer, we hypothesized that ionizing radiation can induce an oxidative stress in thyroid cells via activation of NADPH oxidase. Our findings demonstrate that DUOX1, induced via the IL-13 pathway in response to high doses of irradiation, is the primary source of sustained extracellular ROS production that cause persistent DNA damage response.

Cell culture and treatment with inhibitors and cytokines

HThy-ori cells (**human SV40 large T antigen-immortalized thyrocytes**) were grown in phenol red-free RPMI 1640 medium supplemented with 1% (v/v) antibiotics/antimicrobics (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1% Glutamax (Invitrogen), 10% (v/v) FCS (PAA Laboratories, Pasing, Austria). Primary human thyroid cells were cultured as previously described (Weyemi U et al, 2010) in Ham's F12 coon medium supplemented with 5% (v/v) FCS, 1% Glutamax, 1% non essential amino acids (PAA Laboratories) and six nutritional factors (6H medium): 1 U/l bovine TSH (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA); 10 mg/l human insulin (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA); 10 µg/l somatostatin (Sigma-Aldrich); 6 mg/l; human transferrin (Roche Applied Science); 10^{-8} M hydrocortisone (Roche Applied Science, Foster City, CA, USA); and 10 µg/l glycyl-histidyl-lysine acetate (Sigma-Aldrich). The cells were cultured at 37°C in a humidified air atmosphere containing 5% CO₂. Primary human cells prepared in these conditions were previously shown to organify iodide (Duthoit *et al.* 2001).

Two days after irradiation thyroid cells were treated for 24 hours with different doses of cytokines and inhibitors. Cytokines analyzed were: IL-1 β and TNF α purchased from Miltenyi biotech (MACS, Miltenyi Biotech, Friedrich, Germany), and IL-13 from R & D systems (R & D, Minneapolis, MN, USA). Inhibitors of MAPK (U0126, SB203580, InSolution JNK inhibitor II) and NF κ B (IKK Inhibitor II) pathway were all purchased from Calbiochem (Merck, Darmstadt, Germany). ATM inhibitor (KU-55933) was purchased from Selleck (Selleck, Strateck Scientific, England).

In co-culture assays, 7.5×10^4 non-irradiated HThy-ori cells were plated in the strip dishes (Corning, 0,4µm) onto monolayers of irradiated HThy-ori cells previously plated on coverslips (Corning) at 2.5×10^5 cells per well, maintained in phenol red-free RPMI 1640 medium supplemented with 3% (v/v) FCS and antibiotics.

In vitro irradiation

Exponentially growing HThy-ori cells were plated 24 hours before irradiation at 2.5×10^5 /well in 6-well plates in RPMI 1640 medium as described in cell cultures. Just before irradiation cell culture medium was replaced by fresh culture medium and cells were exposed to a single dose of γ -irradiation from a generator operating at 200 KVe and 15 mA at a dose rate of 3 Gy/min. Twenty-four hours after irradiation, cells were cultured in 3% serum-containing medium at different time before to be harvested. Human primary thyrocytes were plated at

6.6×10^4 cells/well and, once cells had attached to the wells, cell culture medium was replaced by a TSH-deprived medium for 3 days, followed by 2 days of culture in 0.2% FCS culture medium without TSH and insulin before to be irradiated as described above. All the cells were irradiated at 60 % confluence.

Cell proliferation test

Cell proliferation/viability of irradiated and non-irradiated cells (24-well plates; 2×10^4 cells/well) was assayed using the WST-1 assay according to manufacturer's instructions (Roche Applied Science).

Real-time-PCR

Total RNA from cells was extracted using Trizol reagent (Invitrogen, Inc) according to the manufacturer's instructions. Quality of RNA preparation, based on the 28S/18S ribosomal RNAs ratio, was assessed using the RNA 6000 Nano Lab-On-chip (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Total RNA (1 μ g) was reverse-transcribed using RevertAid™ Premium Reverse Transcriptase (Fermentas, Thermo Fisher Scientific,) and random hexamer primers in 20 μ l of PCR buffer according to the manufacturer's protocol for 120 min at 50°C. Real-time PCR was performed as previously described (Weyemi *et al.*, 2010). Oligonucleotides were purchased from MWG Biotech (Courtaboeuf, France) and their sequences are available on demand.

Measurement of H₂O₂ production

Extracellular H₂O₂ generation was quantified by the Amplex Red/HRP assay (Molecular Probes, Invitrogen), which detects the accumulation of a fluorescent oxidized product. Cells (1×10^5) in Dulbecco's PBS (D-PBS) with CaCl₂ and MgCl₂ were incubated with D-glucose (1 mg/ml), ionomycin (1 μ M; Sigma-Aldrich), SOD (100 U/ml; Sigma-Aldrich), horseradish peroxidase (0.5 U/ml; Roche) and Amplex red (50 μ M) and, immediately, the fluorescence was measured in a microplate reader (Victor3; PerkinElmer, Norwalk, CT) for 45 min using excitation at 530 nm and emission at 595 nm. H₂O₂ released was quantified (nmol. H₂O₂/hour/ 10^5 cells) using standard calibration curves.

Preparation of the cell particulate fraction

Cells were washed with PBS and scraped into the same solution supplemented with a cocktail of protease and phosphatase inhibitors (Calbiochem). After centrifuging at 200 x g for 10 min at 4°C, the cell pellet was homogenized using a motor-driven Teflon pestle homogenizer in 2 ml 50 mM sodium phosphate buffer containing 0.25 M sucrose, 0.1 mM dithiothreitol, 1 mM EGTA (pH 7.2), and the cocktail of protease inhibitors. After centrifuging at 200.000 x g for 30 min, the pellet was resuspended in 0.5 ml 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.2) containing 0.25 M sucrose, 1 mM MgCl₂ and the cocktail of protease and phosphatase inhibitors.

Western blots

Particulate cell fractions were solubilised in 20 mM Tris/HCl buffer pH 7.8 containing 135 mM NaCl, 1mM MgCl₂, 2.7 mM KCl, 1% Triton, 10 % Glycerol and cocktail of protease and phosphatase inhibitors (Calbiochem). Protein samples (30 µg) were then added with NuPAGE LDS sample buffer and reducing agent purchased from Invitrogen, heated at 70°C for 10 minutes before to be subjected to SDS-PAGE. Proteins were electrotransferred to 0.2 µm Protan BA 83 nitrocellulose sheets (Schleicher & Schuell) for immunodetection. Immunodetection was performed as previously described (Weyemi et al, 2010) using as primary antibody anti-DUOX1 (1/1000), kindly given by Dr. Miot (ULB, Bruxelles). Immune complexes were detected with an alkaline phosphatase-coupled anti-rabbit IgG antibody (Promega) (1/4500).

Concerning total cell lysates, cells were washed twice with PBS and directly solubilised in 20 mM Hepes buffer pH 5.5 containing 1mM KCl, Glycerol 1%, EDTA 1mM, PMSF 1mM, NP40 1% and cocktail of phosphatase and protease inhibitors (calbiochem). Protein samples (10-30 µg) were then treated as described above, before to be subjected to SDS-PAGE and electrotransferred for immunodetection. Primary antibodies: p-P38MAPK Thr180/tyr182 XP Rabbit, 1/1000, p-STAT6 rabbit Tyr641, 1/1000, γH2AX Ser 139,mouse 1/1000) or P38αMAP kinase rabbit, 1/1000, STAT6, rabbit, 1/1000, H2AX, rabbit 1/1000). Immune complexes were detected with horseradish peroxidase coupled anti-rabbit or anti-mouse IgG antibody (Southern biotech, Bimongham, AL, USA) (1/15000).

Immunofluorescence Assay

Irradiated or non-irradiated cells were plated at 2.5×10^5 cells on glass-slides. Four days later, they were fixed for 30 min with 4% paraformaldehyde. After washing with PBS, the cells were permeabilized for 10 min in PBS plus Triton 0.1%. The cells were then blocked with 3% bovine serum albumin (BSA) for 30 min and incubated for 1 hour at room temperature with primary antibody diluted in PBS plus 0.1% bovine serum albumin (BSA):

After washing in PBS plus 0.1% BSA and 0.1% Triton, the cells were stained with an Alexa fluor488 or Alexa fluor 568 for 1 hour at room temperature. Finally, the cells were washed in PBS and coverslips were mounted for analysis. Images were acquired on a fluorescence microscope with Axio Vision software (Carl Zeiss, France).

Transfection of small interfering RNAs:

Cells were transfected at 60% confluence 2 days after ionizing radiation exposure with small interference RNA against DUOX1 listed in table 1 or scrambled siRNA control (Dharmacon, Lafayette, CO, USA) by using the INTERFERIN transfection reagent (Polyplus-Ozyme, Saint Quentin en Yvelines Cedex, France) according to the manufacturer's protocol.

Quantification of radiation-regulated cytokines

Conditioned media were prepared by washing cells three times in PBS and incubating them in phenol red-free RPMI 1640 medium supplemented with 0.5% FCS and antibiotics for 24 h. Conditioned media were centrifuged at 300 xg and stored at -80°C . The cell number was determined in every experiment. ELISAs were performed using kits and procedures from Biolegend (IL-1 β and IL-13) (Biolegend, San Diego, CA, USA). The data were normalized to total cell protein. Each sample was assayed in triplicate and the absorbance was measured at 450 nm in a microplate reader (Victor3; PerkinElmer, Norwalk, CT).

Taqman Low Density Array

Quantitative real-time PCR utilized custom made TaqMan[®] Low Density Array (TLDA) from Applied Biosystems and followed the manufacturer's instructions. Thermal cycling was performed using an ABI Prism 7900HT Sequence Detection System. 1000 ng cDNA in 100 μl of Applied Biosystems 1X Universal PCR Master mix was loaded onto each port of the

TLDA plates. Data was analyzed using SDS v2.2 software. The Ct value of each gene is normalized to 18S

FACS analysis :

Mitochondrial membrane potential and viability of irradiated and non-irradiated cells were evaluated 4 days after irradiation using respectively TMRME (tetra methyl rhodamine methyl ester perchlorate) at 150 nM final concentration and DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) from Molecular Probes (Invitrogen). Two dyes were incubated 45 min at 37°C before analysis on a FACScan cytofluorometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Intracellular ROS levels were measured in cells loaded with the redox-sensitive dye DCFH-DA (Invitrogen, Molecular probe) as previously described (Weyemi *et al.*, 2010).

Cell-cycle analysis : exponentially growing HThy-ori cells were plated 24 hours before irradiation at 2.5×10^5 /well. Four days later, cells were collected by trypsinization, washed with sterile cold PBS and fixed by resuspension in 2 ml of 80% EtOH in PBS for overnight at -20°C. Cells were then centrifuged at 300 x g for 5 min at 4°C, washed in cold PBS, resuspended in 0.5 ml of PBS containing 25 µg/ml propidium iodide (Sigma-Aldrich) and 50 µg/ml RNase A (Invitrogen) and incubated at room temperature for 30 min before FACS analysis.

Results

Radiation induces chronic extracellular H₂O₂ production in human thyroid cells

The concentration of extracellular H₂O₂ produced by thyroid cells (HThy-ori) after irradiation with 10 Gy of Y-ray was measured at different day intervals. As shown in Figure 1A, the H₂O₂ production occurred from the third day, increased until the fourth and remained stable until the seventh. This was also accompanied by an increase in intracellular ROS levels as determined by flow cytometry analysis of DCFHDA oxidation at the fourth day after irradiation (Fig 1B). To investigate the mechanism of the extracellular H₂O₂ production, we wondered whether NADPH oxidases might be responsible of this generation. The time-course effect of ionizing radiation (10 Gy) on NOX/DUOX mRNA expression was done by real-time (RT)-qPCR (Fig. 1C). Irradiation of HThy-ori cells preferentially resulted in up-regulation of DUOX1 mRNA level (2-18 fold) compared not only with NOX4 and DUOX2 mRNA levels, two NADPH oxidases expressed in normal thyroid, but also with the remainder of other NOXs (Suppl. Data). The greater variation was seen between the third and fourth day after irradiation. As expected, DUOX1 protein level was also induced in this condition (Fig. 1D)

DUOX1 mediates radiation-induced extracellular H₂O₂ production

As shown in figure 2 A, irradiating HThy-ori cells led to a significant dose-dependent increase in extracellular H₂O₂ production measured 4 days post-irradiation, which was correlated with an increase in DUOX1 protein level. Knocking down DUOX1 with specific siRNA reduced the level of H₂O₂ produced by irradiated cells (Fig 2B) indicating that irradiation induced chronic H₂O₂ production via DUOX1 regulation. DUOX1 needs the maturation factor DUOXA1 to exit the endoplasmatic reticulum and to be active on cell surfaces. The *DUOX1/DUOXA1* genes are aligned head-to-head in a compressed genomic locus on chromosome 15 suggesting that expression of DUOX1 oxidase and its maturation factor are coordinated by a common bidirectional promoter (Grasberger H, 2006). Several alternative splicing variants of DUOXA1 mRNA have been identified and the lack of sixth coding exon was shown to generate inactive forms of DUOXA1 (Morand S., 2009). We designed an oligonucleotide primer set in DUOXA1 mRNA region containing exon 6. RT-PCR analysis performed four days after 10 Gy Y-Ray exposure of HThy-ori cells showed that a spliced variant of DUOXA1 mRNA encoding an active form was selectively increased in this condition (Fig. 2C). This mRNA variant was regulated in a dose-dependent manner (Fig. 2C) and up-regulated from the third day at post-irradiation (Fig. 2D), as evaluated by real-time QPCR.

DUOX1 mediates radiation-induced H₂O₂ production in primary human thyrocytes.

Primary human thyrocytes increased their H₂O₂ production 4 days after exposure to irradiation. This effect appeared more pronounced in the absence of TSH and insulin (4H) and was independent of serum (Fig 3A). As observed with HThy-ori cells, DUOX1 mRNA was selectively increased four days after irradiation and DUOX1 inactivation by RNA interference led to a significant reduction (50%) of radiation-induced H₂O₂ production correlated with a decrease in the content of DUOX1 proteins.

Radiation induced IL-13 in human thyroid cells

To determine the molecular mechanism underlying chronic DUOX1 expression and irradiation we performed TaqMan Human Immune Low Density array to analyse the gene expression profile of immune-related genes in HThy-ori cells at different day intervals after 10 Gy Y-Ray exposure (Supplemental data 2). Among cytokines genes analysed, IL-1 β , IL-13, IL-6, IL-8 and TNF α were found to be up-regulated by irradiation in a time-dependent manner, with a higher induction for the TNF α gene (~30-fold) (Fig. 4A). Dose-response analysis of the effect of recombinant IL-1 β , TNF α and IL-13 on DUOX1 mRNA expression showed that only IL-13 was able to up-regulate DUOX1 mRNA levels in human thyroid cells (Fig. 4B). The induction of IL-13 mRNA in these conditions was correlated with an increase of IL-13 secretion in HThy-ori cells (Fig. 4C). It is commonly admitted that IL13 binds to IL13R α 1, which forms heterodimer with IL4R α . This heterodimer leads to a functional signaling complex that activates STAT6 through phosphorylation process (Kelly-Welch, A and coll 2005). This phosphorylation is known to mediate signal transduction and activation of transcription. To investigate whether the IL-13 signaling pathway was activated under our experimental conditions, we therefore analyzed the phosphorylation state of STAT6 by Western blot. As shown in Fig 4C, thyroid cells displayed phosphorylation of STAT6 from 2 days after irradiation that increased up to 4 days. We next used a neutralizing IL-13 monoclonal antibody (clone # 32116) that blocks the binding of IL-13 to its receptor to inhibit the action of the secreted IL-13. We observed that radiation-induced H₂O₂ production was abrogated when cells were incubated with increasing amounts of monoclonal antibody (4D). Thus IL-13 regulated radiation-induced H₂O₂ production through an increase in DUOX1 expression. According to these results, IL-13 mRNA levels were also found to be increased in primary human thyrocytes 4 days after 10 Gy Y-Ray exposure (Fig. 4D)

p38MAPK kinase regulated radio-induced expression of IL-13 and DUOX1.

To define upstream mechanisms that regulate IL-13-induced DUOX1 expression and H₂O₂ production in irradiated cells, we tested the effect of pharmacologic inhibitors of NF-KB and canonical mitogen-associated protein kinase (MAPK) pathways. HThy-ori cells were treated

for 24 h between the second and third day after irradiation before to be harvested. Of these inhibitors, only SB203580 (SB), which inhibits specifically p38MAPK, attenuated the induction of DUOX1 mRNA expression measured 4 days post-irradiation (Fig 5A). Interestingly, IL-13 and DUOX1 mRNA expression were both inhibited by SB in a dose-dependent manner in irradiated-HThy-ori and irradiated-primary human thyroid cells. As these data supported a role for p38MAP kinase in radiation-induced IL-13 and DUOX1 expression we assessed p38MAPK activation by analysing levels of total and phosphorylated p38MAPK by western-blot for 4 days following or not 10 Gy Y-Ray exposure (Fig 6A). Of interest, p38MAPK phosphorylation rose substantially only from the third day after irradiation and the rise was maintained until fourth day (Fig. 6A). This increase was also observed with primary human thyrocytes at 4 days post-irradiation (Fig. 6B). Treatment of thyroid cells with SB inhibited radio-induced H₂O₂ production (Fig. 6C and 6D) and this was supported by a decrease in DUOX1 protein level (Fig 6C). Taken together, these data indicated that p38MAPK activation plays a key role in radiation-induced up-regulation of IL-13 and DUOX1.

p38MAPK kinase signalling cooperated with the DNA Damage response (DDR) in radio-induced expression of IL-13 and DUOX1.

DNA damage is sensed through a signal amplification cascade known as the DNA damage response (DDR). It was recently shown that at a high dose of irradiation generates persistent DNA damage foci leading to prolonged DNA damage response activation for several days (Rodier F, 2009). DNA double-strand breaks (DSBs) is the main cytotoxic lesion induced by ionizing radiation. The phosphorylated form of histone H2AX (γ H2AX) at Ser¹³⁹ is generally used as a marker of DNA DSBs (Rogakou EP, 1998). As shown in Fig 7A, HThy-ori cells displayed phosphorylation of histone H2AX at first day after exposure to 10 Gy of γ -ray irradiation that increased up to 4 days. Immunofluorescence microscopy of thyroid cells 4 days post-irradiation showed that irradiation induced 53BP1 foci in addition to γ H2AX foci indicating establishment of persistent DNA damage signalling in these cells. It has been shown that DDR induces cells to slow down or arrest their cycle. We performed cell cycle profile analysis of HThy-ori cells at 4 days post-irradiation. As shown in figure 7B, irradiated cells displayed an increase of percentage of cells in G2/M phase indicating that irradiation induced a G2/M arrest in thyroid cells, leading to cell growth inhibition (Fig 7C). The protein p53 is described to be involved in the regulation of G2/M transition through the modulation of cycline-dependent kinase inhibitor p21^{WAF} expression. So, we analyzed the time course of the effects of irradiation on the expression of phospho-p53 (ser15), an activated form of p53, and on the expression of p21. As shown in figure 7D, phospho-p53 displayed biphasic induction following irradiation with higher expression on days 1 and 4, whereas p21, whose gene p53 activates, was induced and maintained at elevated level throughout the same

period. Recent evidences showed that cytokines secretion occurred only after establishment of persistent DNA damage signalling. ATM and its direct substrate CHK2 (checkpoint kinase-2), which are key components of the DDR, were required for the initiation and maintenance of the cytokine response. We first analyzed the expression of phosphorylated CHK2 Thr68, which is predominantly dependent on ATM following irradiation and often used as a marker for CHK2 activity. Figure 7E shows that CHK2T68P increased from the second post-irradiation day and maintained an elevated level until the fourth day. We next examined the effect of irradiation on the phosphorylation of CHK2 on serine 19 residue. Of interest, this residue was shown to be phosphorylated in an ATM-dependent way in response to IR, at higher doses than that required for phosphorylation of T68 and only in response to DNA double-strand breaks (DSBs) (Buscemi, 2006). A similar time course was observed for CHK2S19P (Fig. 7E). Taken together these data indicated that thyroid cells irradiated at a dose of 10 Gy carried unrepaired DSBs leading to persistent DNA damage signalling and prolonged growth arrest that could initiate cytokine response as previously shown (Rodier, 2009). The potential role of ATM as mediator of IL-13 up-regulation in irradiated thyroid cells was examined using a compound, KU-55933, that specifically blocks binding of ATP to the ATM kinase domain (Hickson, 2004). Inhibition of ATM activation resulted in alteration of IL-13 mRNA expression and, consequently in DUOX1 mRNA expression as expected. As irradiation could also activate p38MAPK via ATM (Thornton, 2009), we analyzed the effect of KU-55933 on p38MAPK phosphorylation 4 days after irradiation. There was only a slight inhibitory effect on p38MAPK phosphorylation indicating that p38MAPK activation was not totally dependent of the ATM pathway (Fig. 8C).

Radiation-induced H₂O₂ production is involved in DNA damage in irradiated and bystander cells.

The appearance of genome abnormalities and loss of viability in cells other than those directly exposed to ionizing radiation is a well documented process known as the radioinduced bystander effect (Little, 2006). Bystander effect can be induced in various cells irrespective of the type of radiation and may be more damaging in the longer term than direct radiation exposure. Bystander effect is mediated either through gap-junctions or via soluble factors released such as cytokines and ROS by irradiated cells. To analyse the involvement of DUOX1-dependent H₂O₂ production in radiation-induced DNA damage in irradiated cells and in bystander cells we performed co-culture experiments under different conditions that are summarized in figure 9. Both irradiated and bystander thyroid cells displayed phosphorylation of histone H2AX at 4 days after exposure to 10 Gy of γ -ray indicating that irradiated cells produced factors that induced DNA damage in bystander cells. Addition of catalase, a scavenger of H₂O₂, in the cell co-culture medium 2 days after irradiation significantly

decreased the level of γ H2AX evaluated in irradiated and in bystander cells 3 days later. These data indicated that H_2O_2 produced after irradiation was able to cause DNA damage in both cells and that catalase could protect them from its genotoxic effect. Interestingly, DUOX1 downregulation by RNA interference in irradiated cells significantly counteract radiation-induced γ H2AX expression in these cells but failed to suppress γ H2AX expression in bystander cells. Taken together these data showed that DUOX1-dependent H_2O_2 production was involved in DNA damage produced several days after irradiation but that another factor produced by irradiated cells that might be IL-13, was responsible for H_2O_2 –dependent DNA damage in bystander cells.

Discussion

The development and progression of radiation-induced late effects are driven, in part, by chronic oxidative stress. Although a causal link between chronic oxidative stress and radiation-induced late normal tissue injury remains to be established, a growing body of evidence appears to support the hypothesis that chronic oxidative stress might serve to drive the progression of radiation-induced late effects (Robbins MEC, *Int. J. Radiat. Biol.*, 2004). A radiation-induced increase in reactive oxygen species (ROS) generation and/or an oxidative stress has been observed *in vivo* (Wang Y, *Free Rad. Biol. Med.*, 2009). This was, in particular, highlighted by increases in the formation of oxidized product. The radiation-induced oxidative stress appears to result not from ROS generated at the time of irradiation due to radiolysis of water but from the propagation of ROS occurring from several days post-irradiation.

ROS production induces oxidative damage to critical cellular biomolecules. H_2O_2 causes DNA damage, such as guanine oxidation, single-strand breaks (SSBs) and double-strand breaks (DSBs), leading to mutagenesis and genomic instability. For many years, H_2O_2 was suspected to play a mutagenic role in the thyroid gland. In a recent study we strengthened this hypothesis by showing that H_2O_2 is able to promote RET/PTC1 chromosomal rearrangements in thyroid cells. Of interest, these rearrangements are frequently found in papillary thyroid carcinoma (PTC) samples from patients who had been exposed during childhood to external radiation or who lived in highly contaminated regions after Chernobyl accident.

Despite the evidence for ionizing radiation to induce ROS generation (Morales, 1998; Tominaga, 2004), the cellular processes underlying this event are not fully understood. NADPH oxidases are ROS generating systems belonging to a family of enzymes called now NOX/DUOX. The majority of the members of this family was discovered 10 years ago and was shown having different cell location and being involved in specific cellular functions (Bedart Krause, 2007). DUOX1 and DUOX2 were originally identified in the thyroid. While the essential role of DUOX2 in thyroid hormone synthesis has been established, the role of DUOX1 in this tissue is still unknown. In the present study, we show for the first time that both level of DUOX1 and DUOX1 mRNAs were increased in human thyroid cells at late times after irradiation and were correlated with an increase of both DUOX1 protein expression and extracellular H_2O_2 production. These data highlighted that DUOX1 is a radiation-induced H_2O_2 generating system.

Following irradiation of tissues, an acute inflammatory response is observed like activation of stress sensitive kinases and production of inflammatory cytokines. Several studies using anti-inflammatory-based approaches have shown prevention or mitigation of radiation-induced late tissue injury. Here we show that IL-13 mediates radio-induced DUOX1 expression. This Th2 cytokine, in addition to IL-4, has been previously described to up-regulate DUOX1 expression in respiratory tract epithelium (Harper RW, FEBS lett., 2005) and more recently, in human epidermal keratinocytes (Hirakawa S, J. Immunol, 2011). Between these two Th2 cytokines, only IL-13 was found to be induced at post-irradiation in thyroid cells. STAT-6 plays an important role in IL-13 signaling. However, in the present study, inhibition of STAT6 activation by the immunosuppressive drug leflunomide did not affect expression of DUOX1 indicating that an alternate STAT6-independent pathway promoted DUOX1 expression in response to IL-13 (data not shown).

Transcription factor GATA-3 is a critical regulator of Th2 cytokine genes such as IL-13 (Kishikawa H, J. Immunol. 2001). Interestingly, a study investigating the Th2-immune response in the development and progression of chronic radiation pulmonary fibrosis highlighted an increase of GATA-3 and IL-13 in lung tissue and serum of mice after irradiation strengthening a potential role of these factors in radiation-induced late effects.

TGF- β is another radio-inducible cytokine that play a critical role in the initiation and development of radiation-induced pathological effects as fibrosis (Barcellos-Hoff MH, cancer Res. 1993). It is involved in the early cascade of cytokines initiated immediately after irradiation. In a previous study, its expression was shown to decrease to basal values by 24 hours post-irradiation (Martin M, 2000). In agreement with these data, we detected no induction of TGF- β at the mRNA level several days after irradiation (TLDA, suppl. Data 2). However, we cannot exclude a potential regulation of TGF- β expression at early times after irradiation in thyroid cells. The NADPH oxidase NOX4 is induced by TGF- β via SMAD-3 and mediates fibrogenic response to lung injury (Hecker L, 2009). Recent data show that NOX4 is induced by irradiation in lung fibroblasts and in hematopoietic stem cells indicating a role of this NADPH oxidase in radiation-induced chronic oxidative stress (Park S, 2010; Wang Y, 2010). Although well expressed in the human thyroid cells (Weyemi, 2010) NOX4 was not induced in human thyroid cells at late times after irradiation.

Exposure to genotoxic agents as γ -irradiation results in the generation of DNA damage that lead to accumulation of characteristic foci of DNA Damage Response (DDR) factors, such as ATM, CHK2 and γ H2AX. At low dose of irradiation, these foci disappear within hours. By contrast, at higher doses of irradiation, a few clearly detectable DDR foci persist for many days (Rodier F, 2009). In agreement with these data, we observed four days after irradiation persistent DNA damage foci containing γ H2AX and p53BP1 in human thyroid cells indicating

DDR activation. This was confirmed by the phosphorylation of the DDR kinase CHK2 at threonine 68 and serine 19 residues, respectively. Of interest, S19 was identified as serine residue that became phosphorylated *in vivo* rapidly and exclusively to ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks in an ATM-dependent manner. Cytokine secretion occurring after establishment of persistent DNA damage signalling requires DDR proteins such as ATM (Rodier F, 2009). Accordingly, expression of IL-13 and consequently, the one of DUOX1 were partly affected by ATM inhibition indicating that persistent DNA damage signalling contributes to the regulation of DUOX1 expression via IL-13. DDR activation correlated with a state of permanent cell arrest as supported by an increase in G2/M phase cells and by an upregulation of p21.

p38MAPK activated at late times after irradiation of human thyroid cells was found to be also a critical mediator for both IL-13 and DUOX1 expression. In response to DSBs, p38MAPK is activated and leads to establishment of a G2/M cell cycle checkpoint, in particular by phosphorylating and stabilizing p53 (Bulavin et al, 1999; Bulavin et al, 2002). The activation of p38MAPK can be dependent on the activation of ATM (Reinhardt HC, 2007). However, ATM cannot directly phosphorylate p38 and other kinases, such as TAO kinases, could be intermediates in the activation of p38 by ATM in response to DNA damage (Raman M, 2007). In addition to the ATM-dependent pathway other not yet mechanism may activate p38MAPK in response to DNA damage. Indeed, recently it has been shown that p38MAPK induces the senescence growth arrest and cytokine secretion in response to X-ray exposure, independently of the canonical DDR (Freund, 2011). Thus, the specific pathways connecting DNA damage to p38MAPK activation may vary by cell type, specific DNA damage stimuli and extend of DNA damage. In the present study, phosphorylation of p38MAPK was only slightly affected by ATM inhibition suggesting that p38MAPK and DDR signalling pathways cooperate independently to induce DUOX1 via IL-13 expression.

As p38MAPK was shown to phosphorylate the transcription factor GATA-3 (Chen CH, 2000) it might be possible that p38MAPK regulates IL-13 expression by this way after irradiation.

The DDR-ROS feedback loop was recently shown to maintain a subset of DNA damage foci that was sufficient to maintain proliferation arrest (Passos, 2010). Accordingly, we observed that inactivation of DUOX1 affected phosphorylation of H2AX suggesting that DUOX1, as ROS generating system, might be required for the establishment of an irreversible growth arrest in irradiated cells.

Damage signals may be transmitted from irradiated to non irradiated cells, leading to the induction of genetics changes in bystander cells, including double strand break (Nagasawa H, 1992). H₂O₂ was shown to be involved in DNA damage in irradiated and in bystander

cells. However, while the role of DUOX1 in DNA damage is demonstrated in irradiated cells, its implication in bystander effect is not clearly shown. It is possible that IL-13 produced by irradiated cells might induce DUOX1 expression in bystander cells, which might be responsible of H₂O₂-dependent DNA damage observed in these cells.

In conclusion, our findings demonstrate that chronic extracellular H₂O₂ production in human thyroid cells in response to irradiation is mediated by DUOX1 via IL13 pathway. Thus, besides being important for thyroid function, DUOX1 as a major source of radio-induced H₂O₂ might cause substantial DNA damage and take part in late radiation side effects in thyroid such as initiation and development of tumours. Therefore, DUOX1 constitutes a potential target of specific inhibitors to reduce the side effects of radiotherapy.

Conflict of interest

The Authors declare no conflicts of interest.

Funding and Acknowledgements

Myriem Boufraquech is the recipient of a grant from the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC). We are indebted to Didier Méthivier from Unité U848 INSERM, Villejuif, F-94805, France for his assistance in flow cytometry. This work was supported by grants from Electricité de France (EDF), Ligue Contre le Cancer (comité du Val-de Marne) and Agence Nationale de la Recherche (ANR).

References

Ameziane-El-Hassani, R., M. Boufraquech, et al. (2010). "Role of H₂O₂ in RET/PTC1 chromosomal rearrangement produced by ionizing radiation in human thyroid cells." *Cancer Res* **70**(10): 4123-4132.

Barcellos-Hoff, M. H. (1993). "Radiation-induced transforming growth factor beta and subsequent extracellular matrix reorganization in murine mammary gland." *Cancer Res* **53**(17): 3880-3886.

Bedard, K. and K. H. Krause (2007). "The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology." *Physiol Rev* **87**(1): 245-313.

Bhatti, P., L. H. Veiga, et al. (2010). "Risk of second primary thyroid cancer after radiotherapy for a childhood cancer in a large cohort study: an update from the childhood cancer survivor study." *Radiat Res* **174**(6): 741-752.

Bounacer, A., R. Wicker, et al. (1997). "High prevalence of activating ret proto-oncogene rearrangements, in thyroid tumors from patients who had received external radiation." *Oncogene* **15**(11): 1263-1273.

Buscemi G, Carlessi L, et al (2006). « DNA damage-induced cell cycle regulation and function of novel **Chk2** phosphoresidues » *Mol Cell Biol.***26**(21):7832-45.

Bulavin, D. V., S. A. Amundson, et al. (2002). "p38 and Chk1 kinases: different conductors for the G(2)/M checkpoint symphony." *Curr Opin Genet Dev* **12**(1): 9

Bulavin, D. V., S. Saito, et al. (1999). "Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation." *EMBO J* **18**(23): 6845-6854.

Chen, C. H., D. H. Zhang, et al. (2000). "Cyclic AMP activates p38 mitogen-activated protein kinase in Th2 cells: phosphorylation of GATA-3 and stimulation of Th2 cytokine gene expression." *J Immunol* **165**(10): 5597-5605.

Collins-Underwood, J. R., W. Zhao, et al. (2008). "NADPH oxidase mediates radiation-induced oxidative stress in rat brain microvascular endothelial cells." *Free Radic Biol Med* **45**(6): 929-938.

De Deken, X., D. Wang, et al. (2000). "Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family." *J Biol Chem* **275**(30): 23227-23233.

Dupuy, C., R. Ohayon, et al. (1999). "Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cdnas." *J Biol Chem* **274**(52): 37265-37269.

Duthoit C, Estienne V et al (2001). « Hydrogen peroxide-induced production of a 40 kDa immunoreactive thyroglobulin fragment in human thyroid cells: the onset of thyroid autoimmunity? » *Biochem J.* **360**:557-62.

Freund, A., C. K. Patil, et al. "p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype." *EMBO J* **30**(8): 1536-48.

Grasberger, H. and S. Refetoff (2006). "Identification of the maturation factor for dual oxidase. Evolution of an eukaryotic operon equivalent." *J Biol Chem* **281**(27): 18269-18272.

Hamada, N., H. Matsumoto, et al. (2007). "Intercellular and intracellular signaling pathways mediating ionizing radiation-induced bystander effects." *J Radiat Res_(Tokyo)* **48**(2): 87-95.

Han, G., H. Zhang, et al. (2011). "Th2-like immune response in radiation-induced lung fibrosis." *Oncol Rep* **26**(2): 383-388.

Harper, R. W., C. Xu, et al. (2005). "Differential regulation of dual NADPH oxidases/peroxidases, Duox1 and Duox2, by Th1 and Th2 cytokines in respiratory tract epithelium." *FEBS Lett* **579**(21): 4911-4917.

Hecker, L., R. Vittal, et al. (2009). "NADPH oxidase-4 mediates myofibroblast activation and fibrogenic responses to lung injury." *Nat Med* **15**(9): 1077-1081.

Hickson I, Zhao Y, et al (2004) « Identification and characterization of a novel and specific inhibitor of the ataxia-telangiectasia mutated kinase ATM » *Cancer Res.* **64**(24):9152-9.

Hirakawa, S., R. Saito, et al. (2011). "Dual oxidase 1 induced by Th2 cytokines promotes STAT6 phosphorylation via oxidative inactivation of protein tyrosine phosphatase 1B in human epidermal keratinocytes." *J Immunol* **186**(8): 4762-47

Inskip, P. D. (2001). "Thyroid cancer after radiotherapy for childhood cancer." *Med Pediatr Oncol* **36**(5): 568-573.

Kelly-Welch, A., E. M. Hanson, et al. (2005). "Interleukin-13 (IL-13) pathway." *Sci STKE* **2005**(293): cm8.

Kishikawa, H., J. Sun, et al. (2001). "The cell type-specific expression of the murine IL-13 gene is regulated by GATA-3." *J Immunol* **167**(8): 4414-4420.

Lambeth, J. D. (2007). "Nox enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy." *Free Radic Biol Med* **43**(3): 332-347.

Little JB. (2006) « Cellular radiation effects and the bystander response ». *Mutat Res.* **597**(1-2):113-8. Review.

Martin M, Lefaix J, Delanian S. (2000) « TGF-beta1 and radiation fibrosis: a master switch and a specific therapeutic target? » *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* **47**(2):277-90. Review.

Morales, A., M. Miranda, et al. (1998). "Oxidative damage of mitochondrial and nuclear DNA induced by ionizing radiation in human hepatoblastoma cells." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **42**(1): 191-203.

Morand, S., T. Ueyama, et al. (2009). "Duox maturation factors form cell surface complexes with Duox affecting the specificity of reactive oxygen species generation." *FASEB J* **23**(4): 1205-1218.

Nagasawa, H. and J. B. Little (1992). "Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles." *Cancer Res* **52**(22): 6394-6.

Park, S., J. Y. Ahn, et al. (2010). "Sustained expression of NADPH oxidase 4 by p38MAPK-Akt signaling potentiates radiation-induced differentiation of lung fibroblasts." *J Mol Med (Berl)* **88**(8): 807-816.

Passos JF, Nelson G, Wang C et al (2010) « Feedback between **p21** and reactive oxygen production is necessary for cell sénescence ». *Mol Syst Biol*.**6**:347.

Raman, M., S. Earnest, et al. (2007). "TAO kinases mediate activation of p38 in response to DNA damage." *EMBO J* **26**(8): 2005-2014.

Reinhardt, H. C., A. S. Aslanian, et al. (2007). "p53-deficient cells rely on ATM- and ATR-mediated checkpoint signaling through the p38MAPK/MK2 pathway for survival after DNA damage." *Cancer Cell* **11**(2): 175-189.

Robbins, M. E. and W. Zhao (2004). "Chronic oxidative stress and radiation-induced late normal tissue injury: a review." *Int J Radiat Biol* **80**(4): 251-259.

Rodier, F., J. P. Coppe, et al. (2009). "Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion." *Nat Cell Biol* **11**(8): 973-979.

Rogakou, E. P., D. R. Pilch, et al. (1998). "DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139." *J Biol Chem* **273**(10): 5858-5868

Smida, J., K. Salassidis, et al. (1999). "Distinct frequency of ret rearrangements in papillary thyroid carcinomas of children and adults from Belarus." *Int J Cancer* **80**(1): 32-38.

Suarez, H. G. (2000). "Molecular basis of epithelial thyroid tumorigenesis." *C R Acad Sci III* **323**(6): 519-528.

Thornton TM, Rincon M. (2009) « Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival». *Int J Biol Sci.* **5**(1):44-51. Review.

Tominaga, H., S. Kodama, et al. (2004). "Involvement of reactive oxygen species (ROS) in the induction of genetic instability by radiation." *J Radiat Res (Tokyo)* **45**(2): 181-188.

Wang, Y., L. Liu, et al. (2010). "Total body irradiation causes residual bone marrow injury by induction of persistent oxidative stress in murine hematopoietic stem cells." *Free Radic Biol Med* **48**(2): 348-356.

Ward, J. F. (1994). "DNA damage as the cause of ionizing radiation-induced gene activation." *Radiat Res* **138**(1 Suppl): S85-88.

Weyemi, U., B. Caillou, et al. (2010). "Intracellular expression of reactive oxygen species-generating NADPH oxidase NOX4 in normal and cancer thyroid tissues." *Endocr. Relat. Cancer* **17**(1): 27-37.

Figure legends

Figure1: Radiation increases oxidative stress and DUOX1 expression in Hthy-Ori cell line. A) Ionizing radiation induces extracellular H₂O₂ production detected by Amplex Red probe at the indicated days post IR. B) DCFDA probe was used to analyze intracellular ROS in irradiated cells 4 days post-irradiation. C) Comparative expression of *NOX homologues* genes in irradiated Hthy-ori cells, analyzed by real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. Non-irradiated cells are used as negative control. Expression of TBP is reported as endogenous control. D) Time-induction of DUOX1 from particulate fraction of irradiated cells analyzed by western blot. Vinculin was used as loading control.

Figure2: DUOX1 is involved in radio-induced oxidative stress. A) Dose-response activation of DUOX1-dependent H₂O₂ production analyzed by Amplex Red assay 4 days after irradiation. In the lower part is shown the DUOX1 protein expression of this experiment. B) Effect of siDUOX1 vs siCtrl on the extracellular H₂O₂ production activity. In the lower part is shown the DUOX1 protein expression of this experiment. C) mRNA expression of the two isoforms of DUOXA1 analyzed at 4 days post IR by RT-PCR. In the lower part comparative expression of *DUOXA1* isoforms analyzed by real-time quantitative reverse transcription-PCR at 4 days post IR after 5 or 10 Gy of γ -irradiation. D) Time course analysis of DUOXA1 mRNA containing Exon 6 by real-time quantitative reverse transcription-PCR. Non irradiated cells are used as negative control. Expression of TBP is reported as endogenous control.

Figure3: DUOX1 is involved in radioinduced oxidative stress in human primary thyrocytes: A) Extracellular H₂O₂ production measured in irradiated and non irradiated thyrocytes at 4 days post IR after 10 Gy of γ -irradiation. Culture conditions 6H (6 hormones) are described in Materials and Methods, 4H condition is without TSH and Insulin B) Comparative expression of *NOX homologues* genes in irradiated primary thyrocytes, analyzed by real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. Non irradiated cells are used as negative control. C) Effect of siDUOX1 vs siCtrl on the extracellular H₂O₂ production activity. In the lower part is shown the DUOX1 protein expression of this experiment.

Figure4: IL-13 regulates radiation-induced DUOX1 expression. A) Taq man low density array analysis of irradiated Hthy ori cells after 10 Gy of γ -irradiation. 18S was used as endogenous control. B) Analysis of DUOX1 mRNA expression by real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction in Hthy ori cell lines treated with different doses of human recombinant IL13, IL1 and TNF α . TBP was used as endogenous control. C) IL13 releasing in cell supernatants was determined by ELISA test. Results are expressed in pg/ μ g of whole protein. In the lower part, time-course analysis of STAT 6 phosphorylation analyzed by western blotting in irradiated and in non-irradiated cells. D) Hthy Ori cells were incubated with increasing concentration of IL-13 neutralizing antibody from 2 days after 10 Gy of γ -irradiation and measured for H₂O₂ generating activity two days later. E) Expression of IL-13 mRNA analyzed by real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction in irradiated primary thyrocytes at 4 days after 10 Gy of γ -irradiation.

Figure5: p38MAPK regulates radio-induced DUOX1 expression. A) Analysis of DUOX1 mRNA expression from irradiated Hthy Ori cells treated 24 hours (between the second and third day after irradiation) with pharmacologic inhibitors of MAPK (JNKI (25 μ M), SB203580(10 μ M), U0126 (10 μ M) and NF κ B (IKKI (100 μ M)) signaling pathway. Non-irradiated cells were used as negative control. B and C) Dose-dependent inhibition of DUOX1 mRNA expression in Hthy Ori cells (B) and in primary thyrocytes (C) treated with SB for 24 h before to be harvested. mRNA expression of DUOX1 was analyzed by real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction at 3 days post IR after 10 Gy of γ -irradiation. C) Dose-dependent inhibition of IL-13 mRNA expression in Hthy Ori cells treated with SB for 24 h before to be harvested.

Figure 6: p38MAPK is activated at late times after irradiation. A) Time course analysis of p38MAPK phosphorylation in Hthy Ori cells after 10 Gy of γ -irradiation. B) Analysis of p38MAPK phosphorylation in primary thyrocytes at 4 days after 10 Gy of γ -irradiation. Non-irradiated thyrocytes were used as control. C) Effect of SB on extracellular H₂O₂ production of Hthy Ori cells measured by Amplex Red at 4 days after 10 Gy of γ -irradiation. Non-irradiated cells were used as control. In the lower part is shown the DUOX1 protein expression of this experiment. D) Effect of SB on extracellular H₂O₂ production of primary thyrocytes measured at 4 days after 10 Gy of γ -irradiation.

Figure 7: Ionizing radiation induces persistent DNA damage signalling. A) Time course analysis of γ -H2A.X in Hthy Ori cells after 10 Gy of γ -irradiation. On the right, Hthy Ori cells were non-irradiated or irradiated with 10 Gy and allowed to recover. Cells were fixed and analyzed 4 days later for γ -H2A.X (green foci) 53BP1 (red foci). B) FACS analysis of cell cycle progression in non-irradiated and in irradiated Hthy Ori cells at 4 days after 10 Gy of γ -irradiation, using propidium iodide as probe. C) Cell proliferation of non-irradiated and irradiated cells seeded 5 days after 10 Gy of γ -irradiation evaluated by using WST-1 assay. D) Time course analysis of p53 phosphorylation on S15 residue and of p21 in Hthy Ori cells after 10 Gy of γ -irradiation. B-actin was used as loading control. E) Time course analysis of CHK2 phosphorylation respectively on Thr68 and S19 residue in Hthy Ori cells after 10 Gy of γ -irradiation. B-actin was used as loading control

Figure 8: ATM regulates radio-induced IL-13 and DUOX1 expression. A) Effect of the ATM inhibitor (KU55933, 5 μ M) on the p38MAPK phosphorylation in irradiated Hthy Ori cells at 4 days after 10 Gy of γ -irradiation. B and C) Effect of the ATM inhibitor (KU55933, 5 μ M) on DUOX1 and IL-13 mRNA expression analyzed by real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction at 4 days after 10 Gy of γ -irradiation.

Figure 9 : Role of DUOX1 in bystander effect. A) Induction of γ H2AX in irradiated cells and in bystander cells. Non-irradiated cells were co-cultured with irradiated cells 24 hours after exposure to 10 Gy of γ -irradiation and both cells were harvested 3 days later. B) Extracellular H₂O₂ production of irradiated Hthy Ori cells transduced 2 days after 10 Gy of γ -irradiation with different interference RNAs against DUOX1. The measurements were done at 4 days after irradiation. C) Immunoblots for γ H2AX. β -actin and H2A.X were used as loading control. Hthy Ori cells were irradiated with 10 Gy and 2 days later, were transduced with 2 different interference RNAs against DUOX1 or siControl. The next day irradiated cells were co-cultured with non-irradiated cells for additional 3 days before to be harvested. For the treatment with catalase, irradiated cells were co-cultured with non-irradiated cells 3 days after irradiation and catalase (400 U/ml) was added in the co-culture medium for 2 additional days.

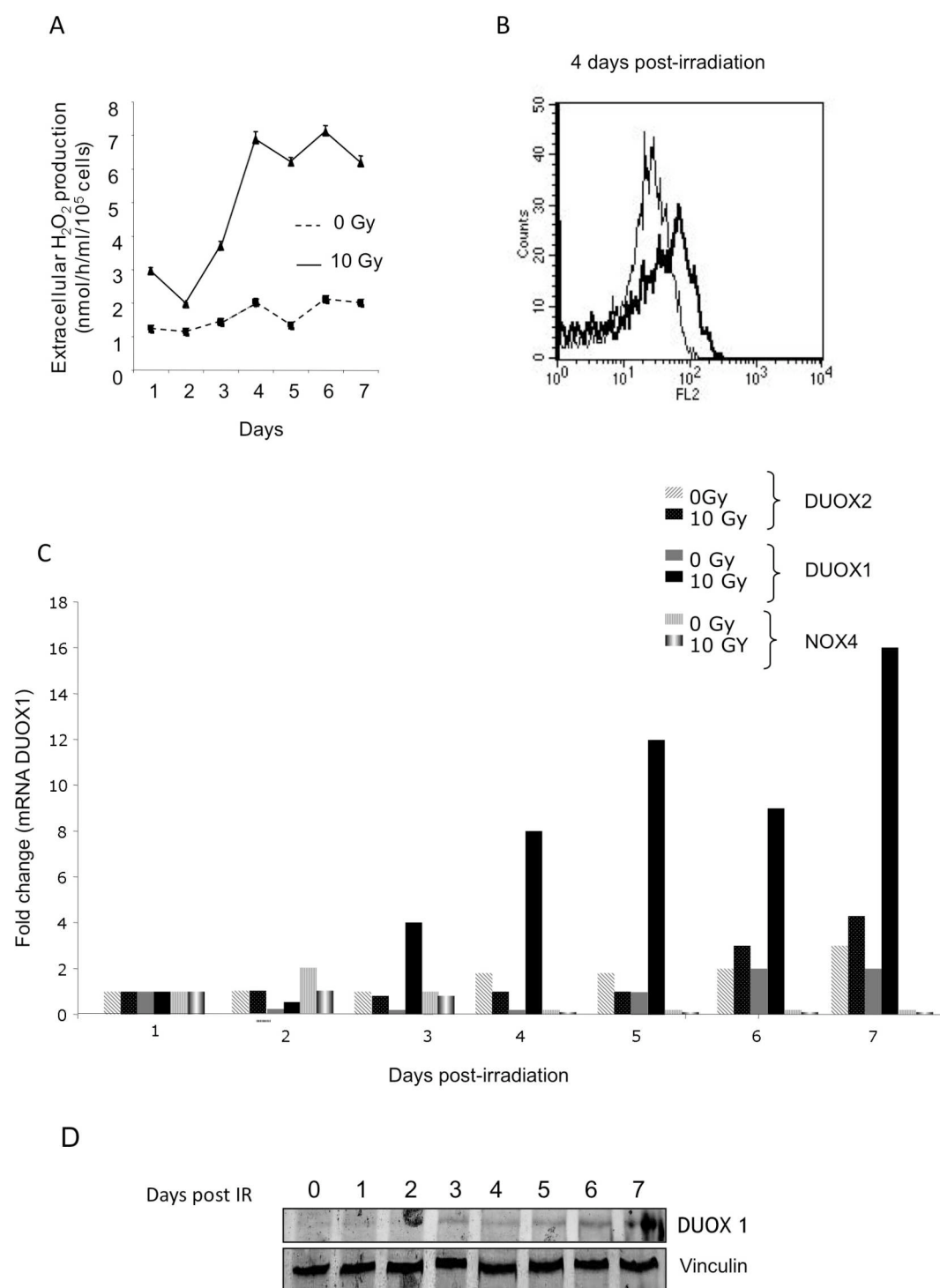


Figure 1

Boufraquech *et al.*

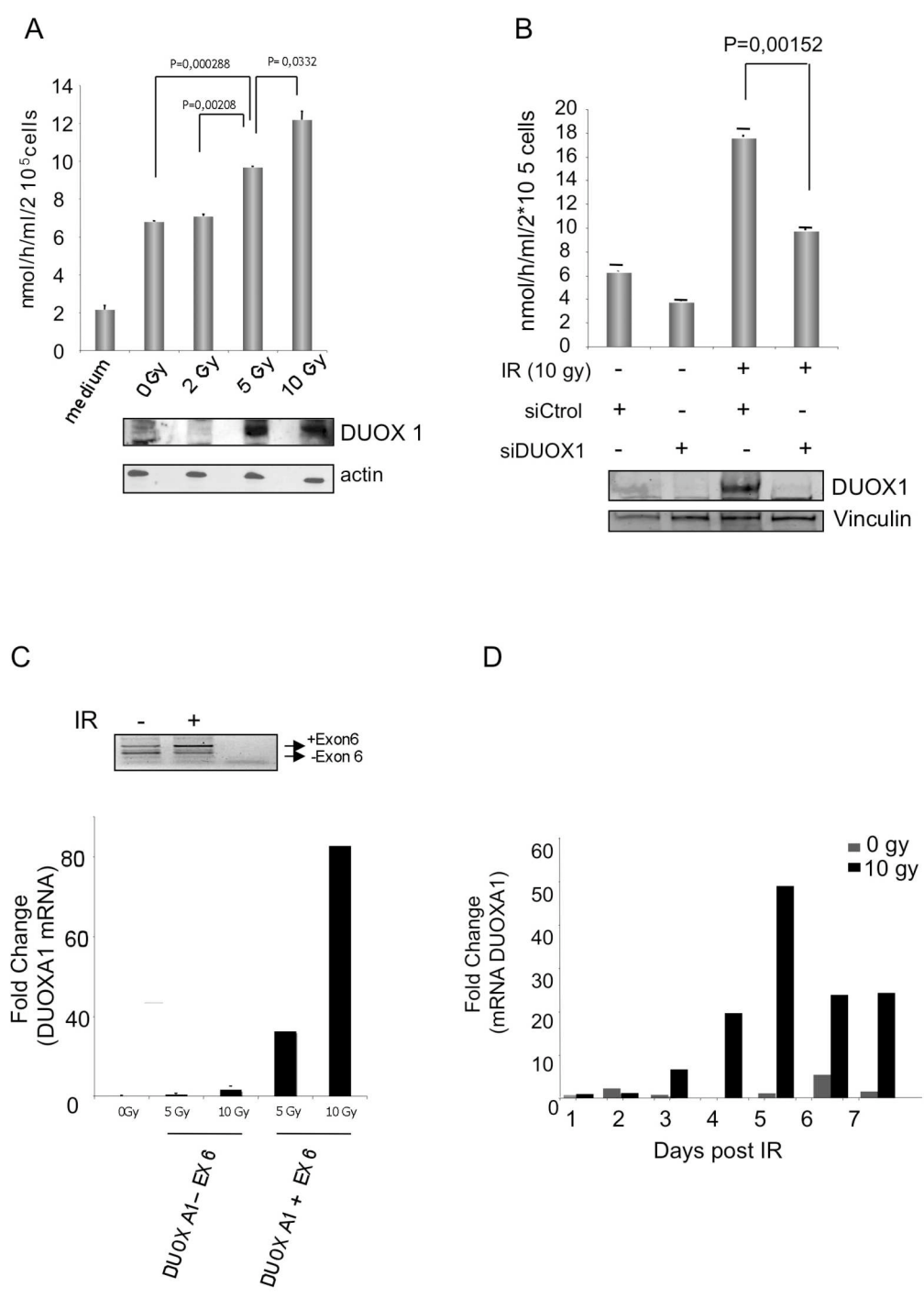


Figure 2

Boufraquech *et al.*

a

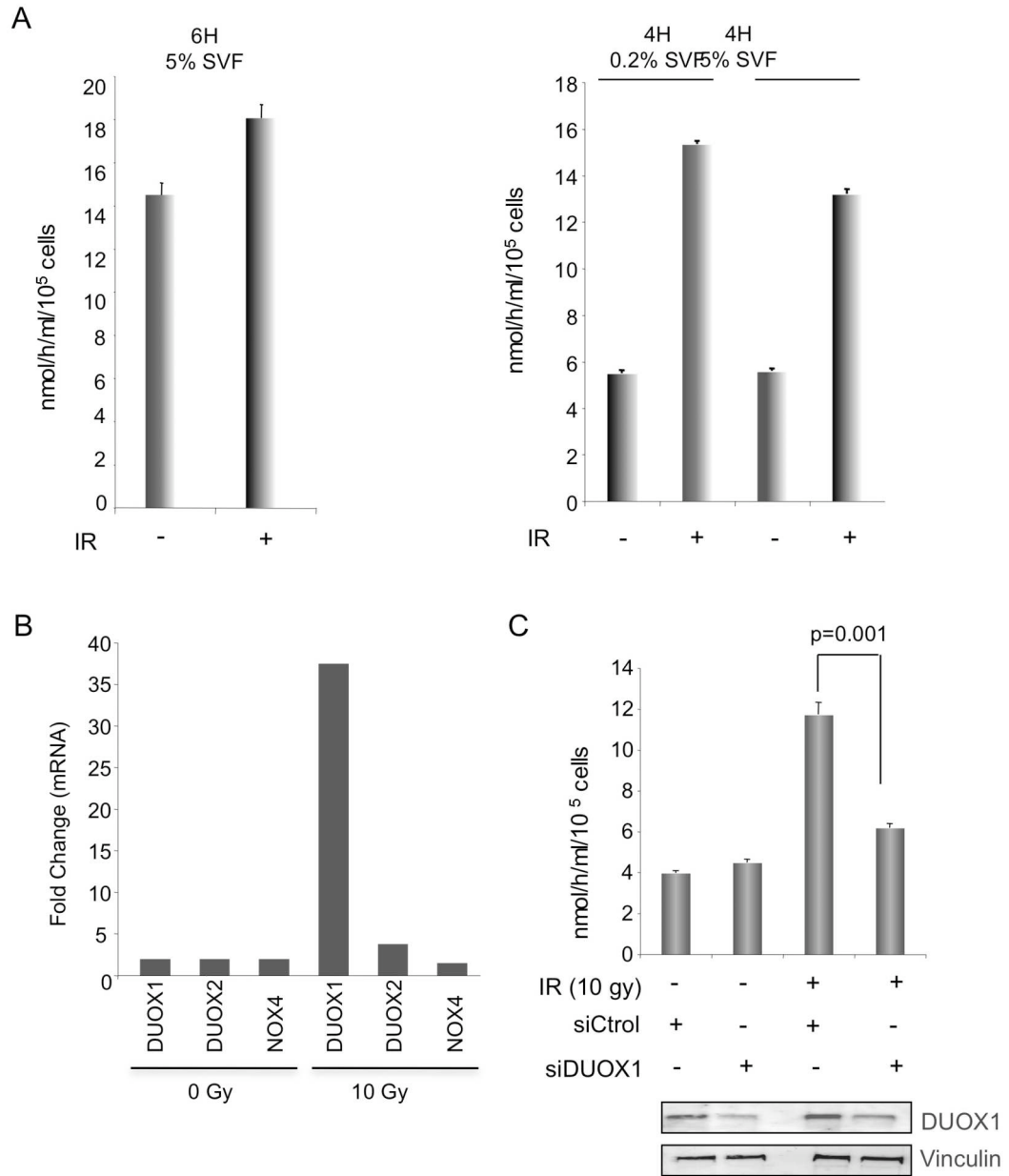


Figure 3

Boufraquech *et al.*

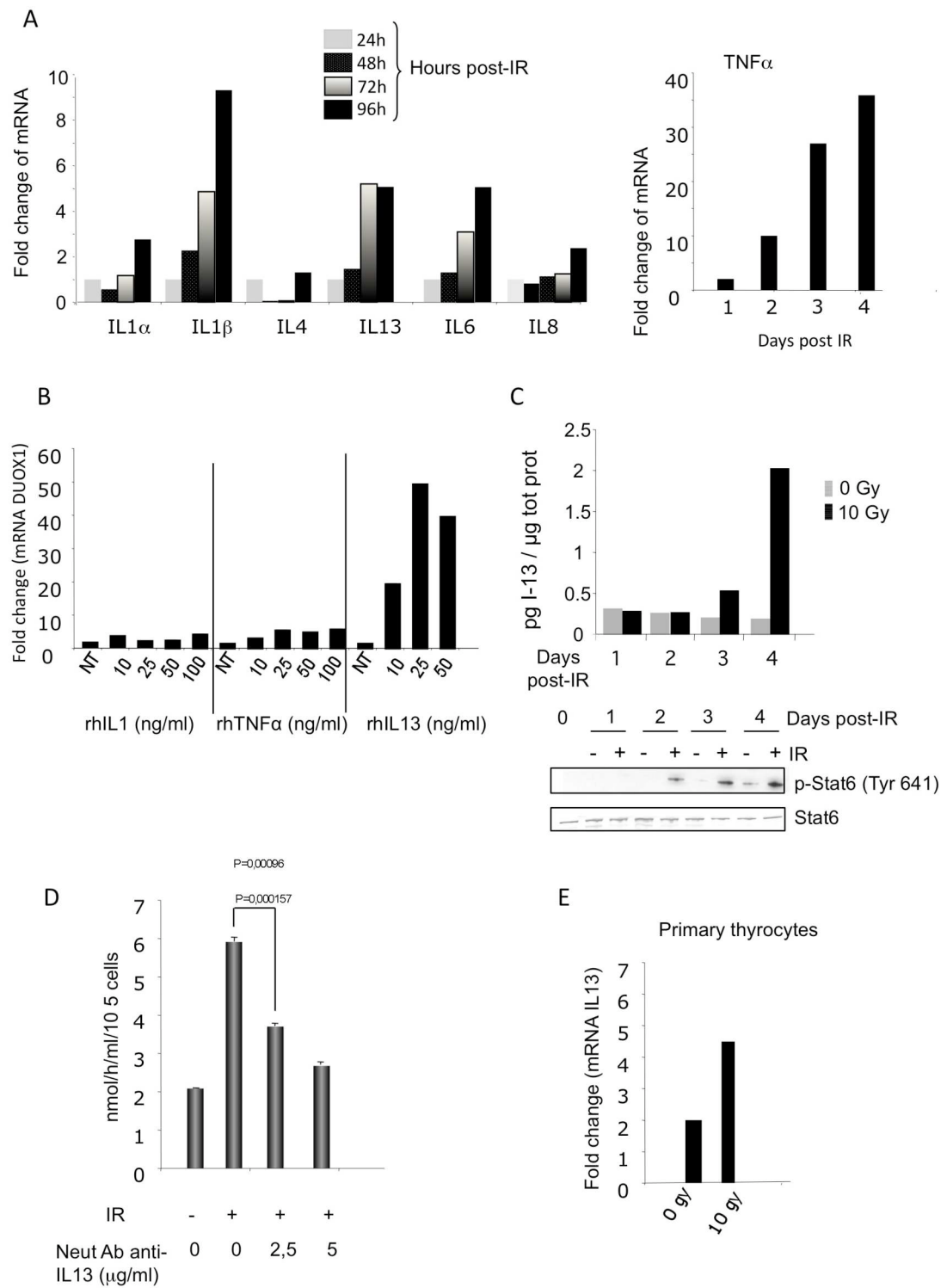
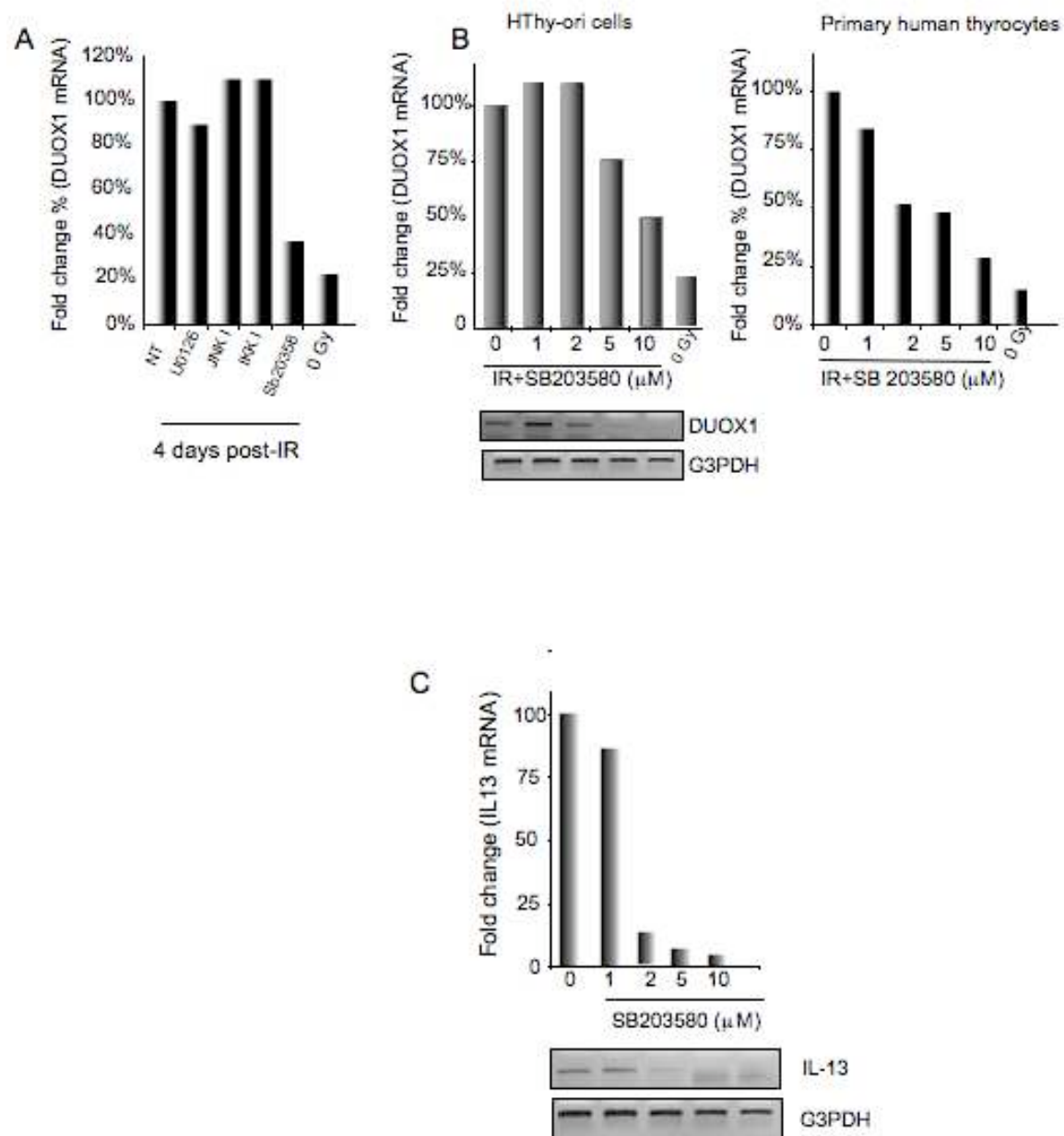


Figure 4

Boufraqueh *et al.*



Boufraquech *et al.*

Figure 5

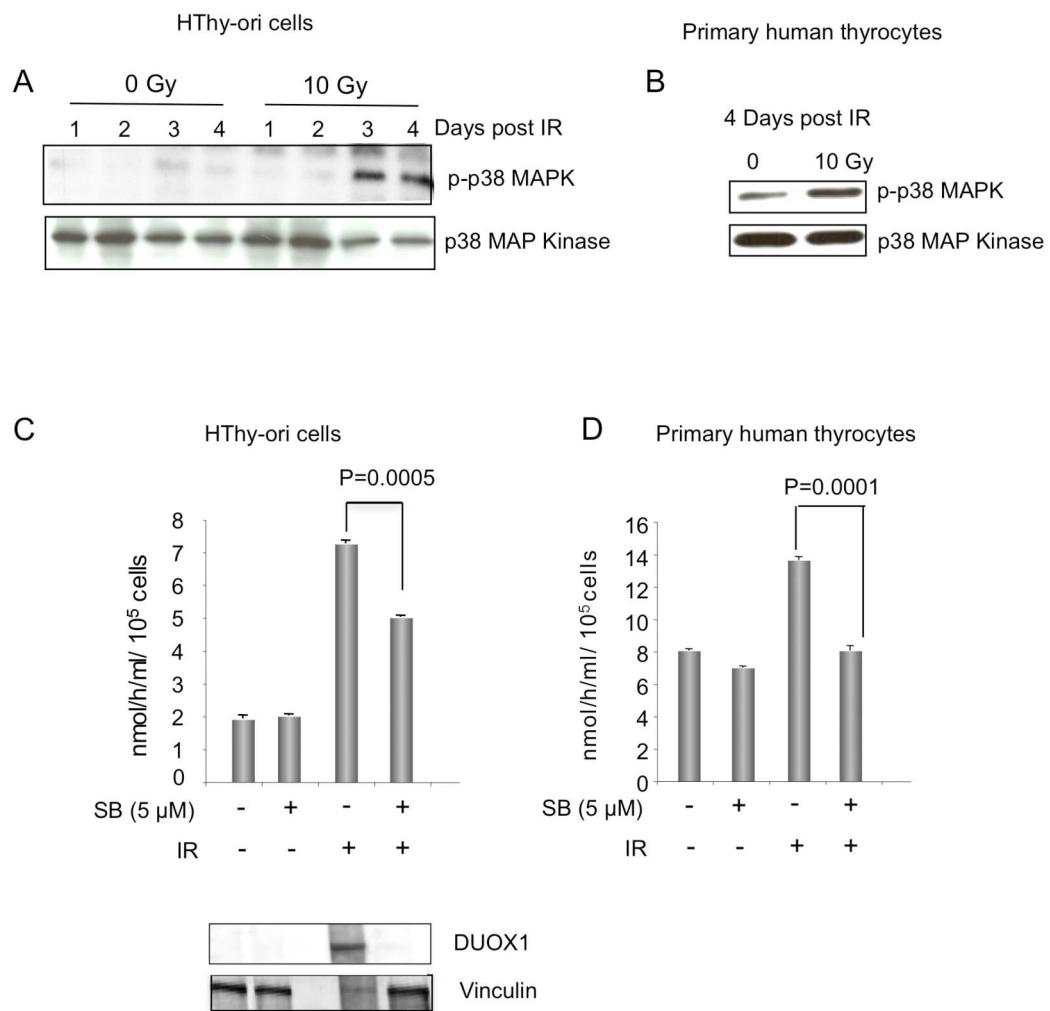


Figure 6

Boufraquech *et al.*

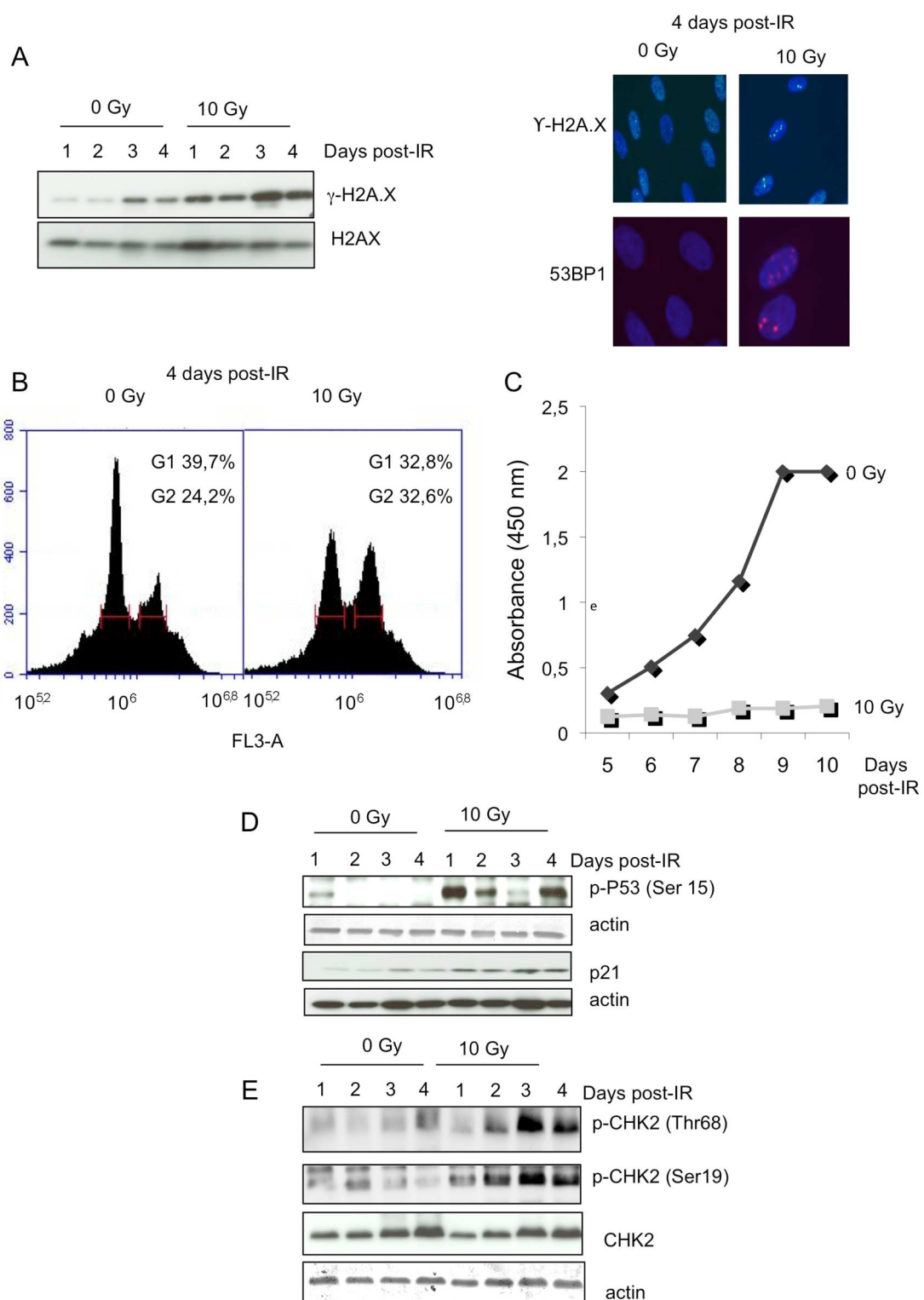


Figure 7

Boufraqueh *et al.*

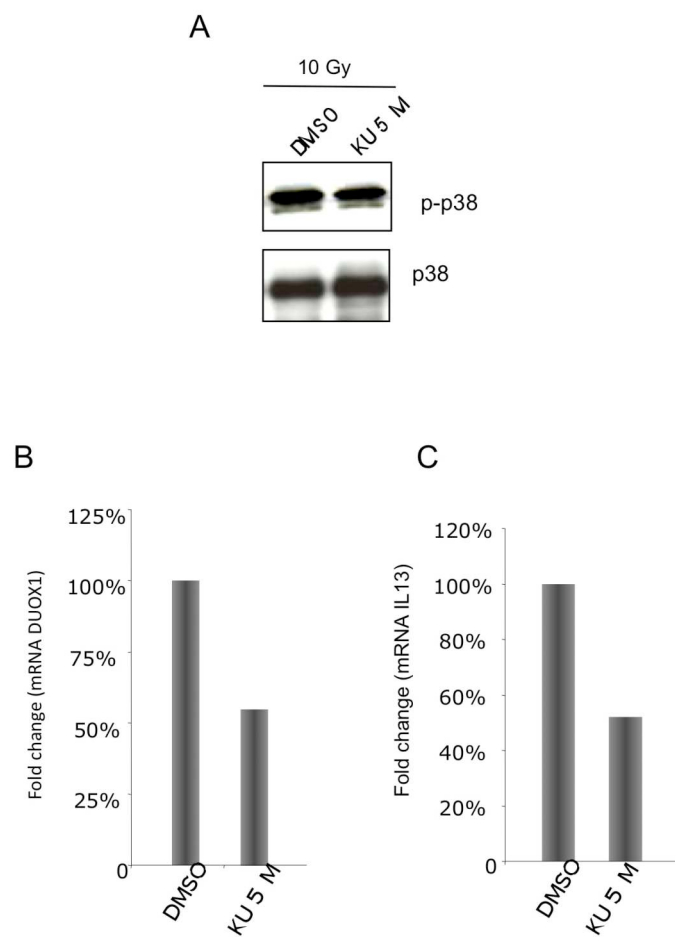


Figure 8

Boufraqueh *et al.*

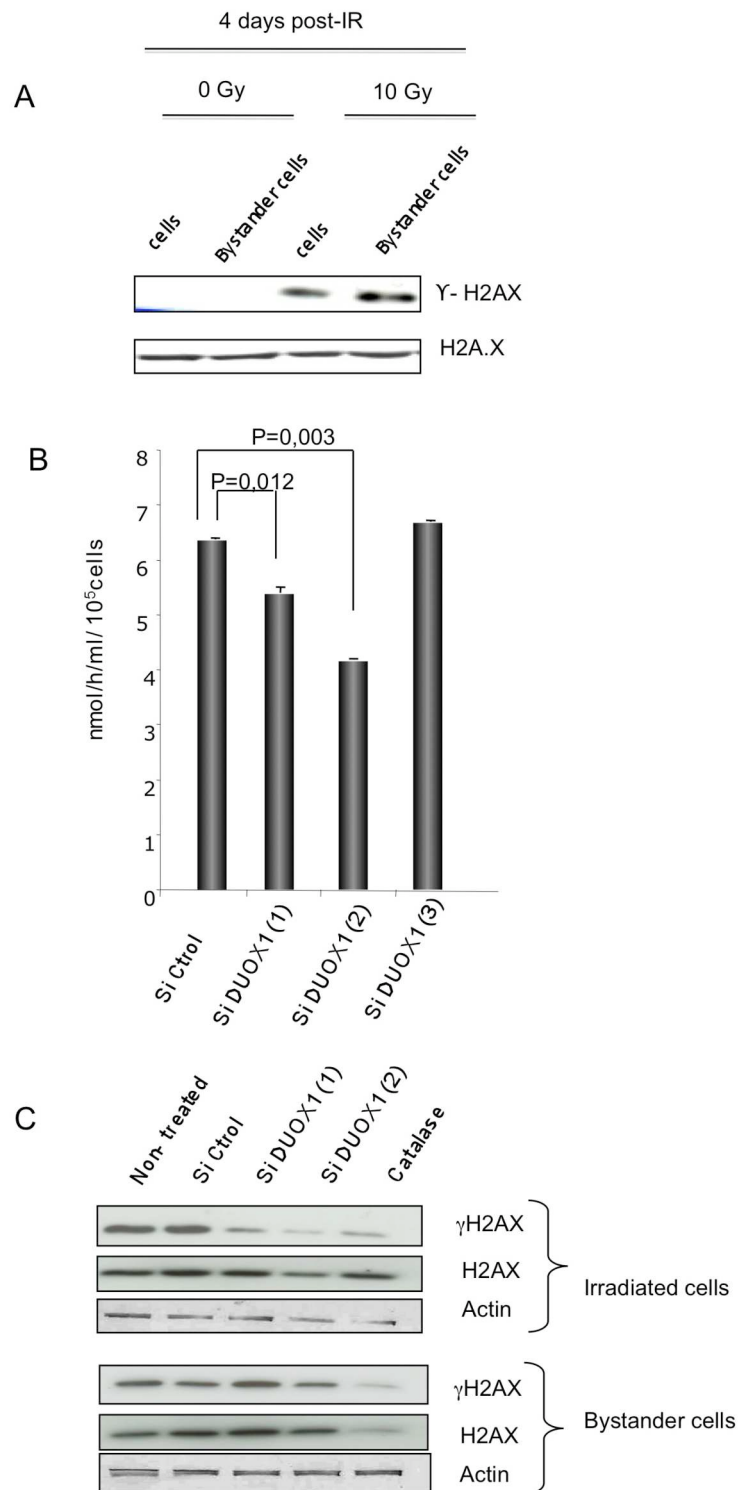


Figure 9

Boufraquech *et al.*

Hthy Ori

	NOX2		NOX3		NOX5		NOX1	
Days Post-IR	0 Gy Ct	10 Gy Ct	0 Gy Ct	10 Gy Ct	0 Gy Ct	10 Gy Ct	0 Gy Ct	10 Gy Ct
1	Und.	Und.	39	41	39	Und.	Und.	Und.
2	Und.	41.8	40	Und.	Und.	Und.	42	Und.
3	Und.	Und.	Und.	Und.	39.8	Und.	Und.	Und.
4	39.9	Und.	Und.	Und.	38.5	39	42	Und.
5	Und.	40	39.7	38.3	Und.	38.3	Und.	40.1
6	40.9	Und.	38.5	Und.	40	39.2	Und.	39.8
7	Und	39.9	Und.	Und.	Und.	41	Und.	Und.

Primary thyrocytes (4 days post IR)

	0 Gy	10 Gy
NOX1	38,9	Ind
NOX2	Und	39,2
NOX3	Und	Und
NOX5	38,31	Und

Supplemental data 1

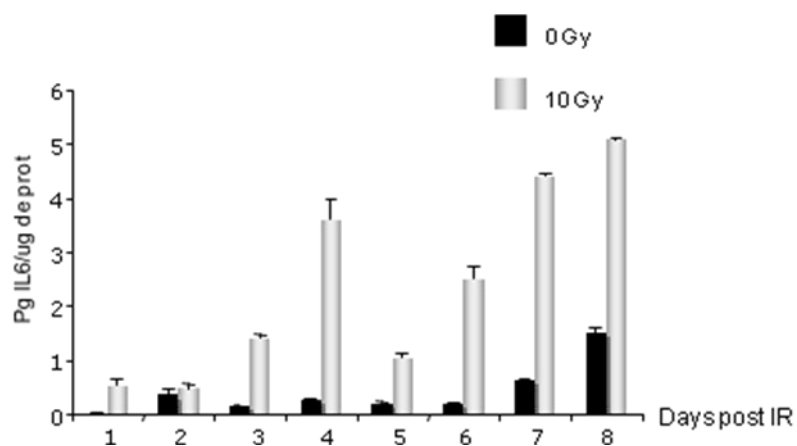
	RQ	RQ	RQ	RQ
	J1	J2	J3	J4
IL1A-Hs00174092_m1	1	0,59563506	1,1637064	2,7601388
IL1B-Hs00174097_m1	1	2,3036025	4,8480444	9,298765
IL2-Hs00174114_m1				
IL3-Hs00174117_m1		333,17062	1003,15	318,87704
IL4-Hs00174122_m1	1	0,05021816	0,05352893	1,3102404
IL5-Hs00174200_m1	1	1,2027656	0,00354739	3,8217027
IL6-Hs00174131_m1	1	1,333638	3,0873754	5,0580425
IL7-Hs00174202_m1	1	0,21608673	0,6698178	0,7516847
IL8-Hs00174103_m1	1	0,9509948	1,2484293	2,3788278
IL9-Hs00174125_m1			126,890656	
18S-Hs99999901_s1				
IL10-Hs00174086_m1		295,8017		1021,7903
IL12A-Hs00168405_m1	1	0,79822725	1,343401	1,6462843
IL12B-Hs00233688_m1	1	2,1071103	4,1792054	4,842644
IL13-Hs00174379_m1	1	1,4736997	5,1923532	5,081898
IL15-Hs00174106_m1	1	1,6987875	1,5840648	2,1005156
IL17-Hs00174383_m1				
IL18-Hs00155517_m1	1	4,5353904	11,992501	10,332747
CCL3-Hs00234142_m1	1	0,7081087	0,32032764	1,9271085
CCL19-Hs00171149_m1			250,46544	366,10394
CCL2-Hs00234140_m1	1	2,5641563	5,3058057	7,468319
CCL5-Hs00174575_m1	1	1,4144417	5,948929	14,366122
CCR2-Hs00174150_m1				
CCR4-Hs99999919_m1	1	0,69331753	1,4187999	2,4786115
CCR5-Hs00152917_m1				
CCR7-Hs00171054_m1	1	3,0768096	3,4890113	3,536941
CXCR3-Hs00171041_m1			2825,9636	1020,5779
CXCL10-Hs00171042_m1		153,9198	543,8463	1957,0067
CXCL11-Hs00171138_m1	1	3,691948	12,707919	18,541384
CSF1-Hs00174164_m1	1	1,0483503	1,6602643	2,3109524
CSF2-Hs00171266_m1	1	2,8876002	5,1246667	9,377307
CSF3-Hs00357085_g1	1	0,21271202	0,5759585	2,7726102
STAT3-Hs00234174_m1	1	0,8358643	1,2656145	1,4304783
NFKB2-Hs00174517_m1	1	1,3517834	1,6338578	2,1107392
IKBKB-Hs00395088_m1	1	1,2839407	1,7980578	2,0679462
CD3E-Hs00167894_m1			244,25677	
CD4-Hs00181217_m1	1	2,908166	6,4239483	11,485546
CD8A-Hs00233520_m1	1	2,061207	2,8896394	2,9323847
CD19-Hs00174333_m1			120,99505	
IL2RA-Hs00166229_m1				122,83505
CD28-Hs00174796_m1		233,50468	789,97534	504,04654
CD38-Hs00233552_m1	1	2,5645564	8,189878	9,524908
CD40-Hs00374176_m1	1	1,3971813	2,0734215	2,166332
PTPRC-Hs00365634_g1				
CD68-Hs00154355_m1	1	2,3977807	2,508731	2,4432366
CD80-Hs00175478_m1			126,00564	201,54428
CD86-Hs00199349_m1		239,8107	402,78064	278,80188
CTLA4-Hs00175480_m1		991,1968	626,5072	973,2343
CD40LG-Hs00163934_m1				
HLA-DRA-Hs00219575_m1	1	0,35680798	1,0735223	2,2236464
HLA-DRB1-Hs99999917_m1	1	1,2976079	3,494417	4,9712615
TBX21-Hs00203436_m1	1	0,95704514	4,5778666	4,042413
TNFRSF18-Hs00188346_m1	1	0,59095234	1,5116006	1,1249589
ICOS-Hs00359999_m1			62,996323	62,101257
NOS2A-Hs00167248_m1	1	1,6476561	3,638395	3,5341177
BCL2-Hs00153350_m1	1	0,7196702	0,7992495	0,85262614
BCL2L1-Hs00169141_m1	1	1,1894776	2,2299023	1,9907774
BAX-Hs00180269_m1	1	0,86544234	1,0199468	1,1456376
ICAM1-Hs00164932_m1	1	1,9669597	4,001259	7,6095977
SELP-Hs00174583_m1				
SELE-Hs00174057_m1			250,13055	507,02206
HMOX1-Hs00157965_m1	1	0,89923096	1,0030268	1,0741583
PTGS2-Hs00153133_m1	1	0,13526952	1,9142041	1,2084638
REN-Hs00166915_m1		456,9443		
LRP2-Hs00189742_m1	1	0,00323179	5,1839304	7,508772
MYH6-Hs00411908_m1			307,4138	972,36487
RPL3L-Hs00192564_m1	1	1,2531604	4,6930876	3,460017
CYP1A2-Hs00167927_m1	1	8,41E-04	1,3702663	2,2786918
CYP7A1-Hs00167982_m1			496,82715	
IFNG-Hs00174143_m1				
PRF1-Hs00169473_m1	1	1,4765118	5,622571	10,688869
GZMB-Hs00188051_m1				255,18091
GNLY-Hs00246266_m1	1	1,927055	2,7132492	2,9198508
FAS-Hs00163653_m1	1	0,7196274	1,0514652	1,6702154
FASLG-Hs00181225_m1	1	1,7467327	1,8733798	0,74808
TGFB1-Hs00171257_m1	1	0,7861206	0,7306241	0,89648
SMAD3-Hs00232219_m1	1	1,1949359	1,187501	1,0634447
SMAD7-Hs00178696_m1	1	0,3596401	0,24759752	0,24012703
SKI-Hs00161707_m1	1	0,6772961	0,6413901	0,69844747
FN1-Hs00365052_m1	1	1,2475038	1,3134525	1,5805807
COL4A5-Hs00166712_m1	1	0,00147143	3,7084975	1,6975235
C3-Hs00163811_m1	1	1,088687	2,372899	4,1582594
TNF-Hs00174128_m1	1	11,034207	27,156103	38,89388
LTA-Hs00236874_m1	1	3,0207121	5,652765	7,722552
ACE-Hs00174179_m1	1	2,2370214	3,262333	3,9991434
VEGF-Hs00173626_m1	1	1,0353752	1,403062	1,454406
CD34-Hs00156373_m1	1	2,7226098	5,2426386	6,3006406
AGTR1-Hs00241341_m1	1	0,7678226	1,0592017	0,9718857
AGTR2-Hs00169126_m1				
EDN1-Hs00174961_m1	1	0,44484985	0,3787184	0,2864342
ECE1-Hs00154837_m1	1	1,0716462	1,3934733	1,2541093
GAPDH-Hs99999905_m1	1	1,0713098	1,0435299	0,74025506
ACTB-Hs99999903_m1	1	0,8048439	0,8238961	0,5070624
TFR3-Hs99999911_m1	1	1,0668244	1,0098287	0,9530457
GUSB-Hs99999908_m1	1	1,041782	1,462079	1,444392
PGK1-Hs99999906_m1	1	1,5778009	1,0766891	0,9216378

Supplemental data 2

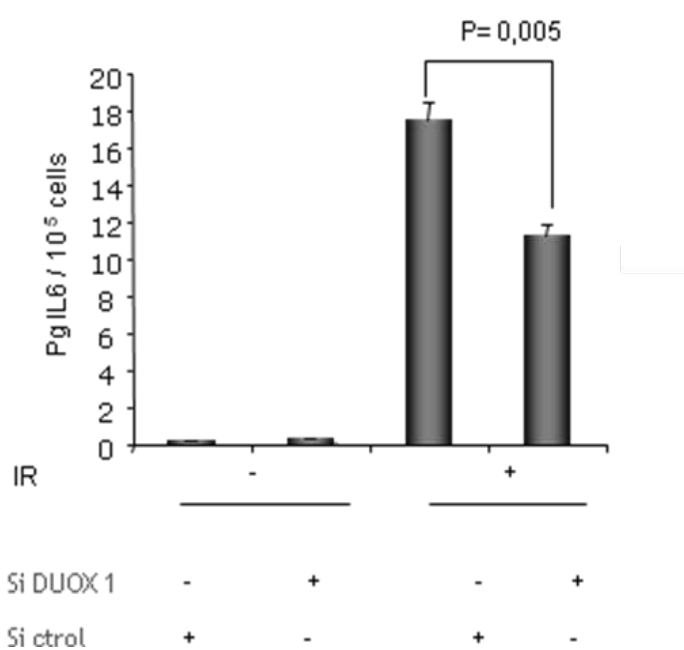
Résultats supplémentaires

3) RESULTATS SUPPLEMENTAIRES

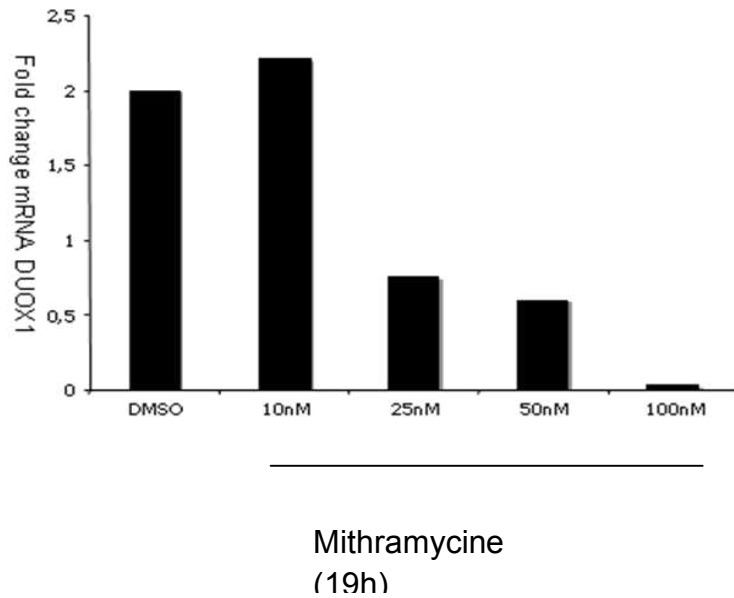
- La Production d'Interleukine 6 par les cellules Hthy Ori irradiées



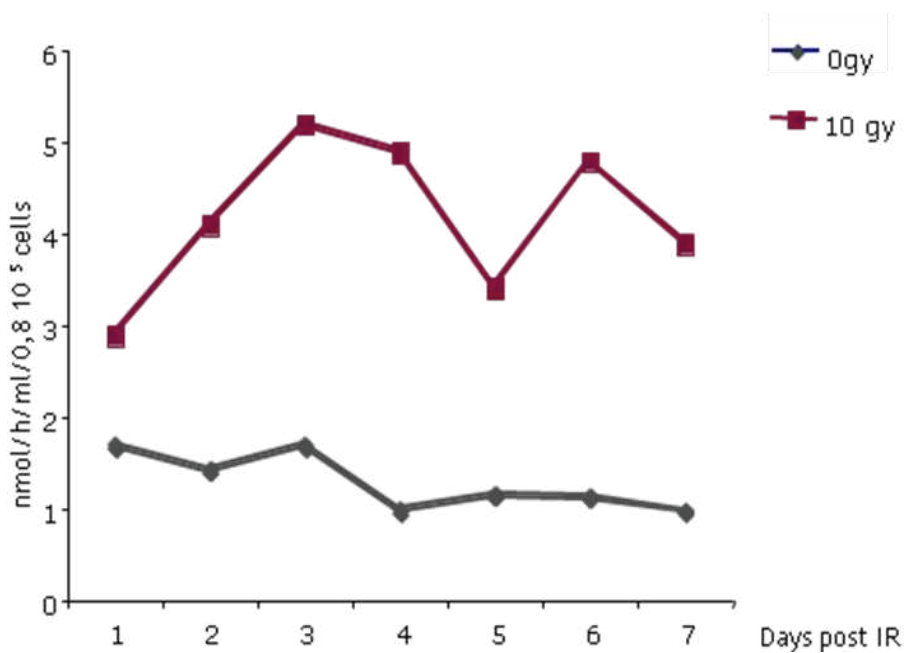
- Effet des *siRNA* DUOX1 sur la production d'IL6 dans la lignée Hthy Ori quatre jours post irradiation

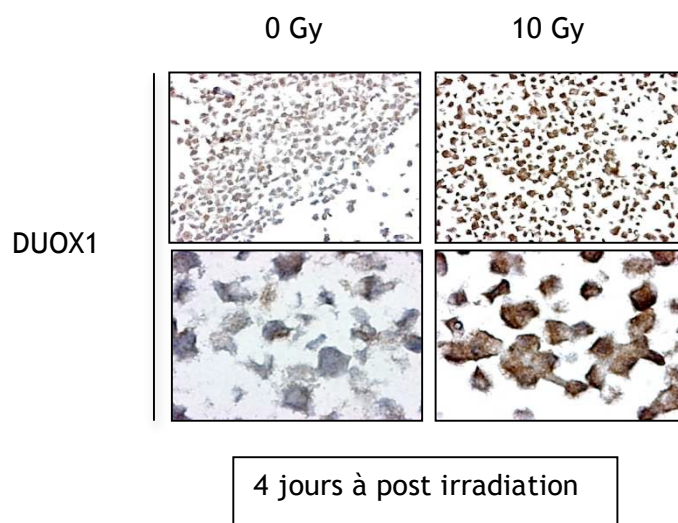
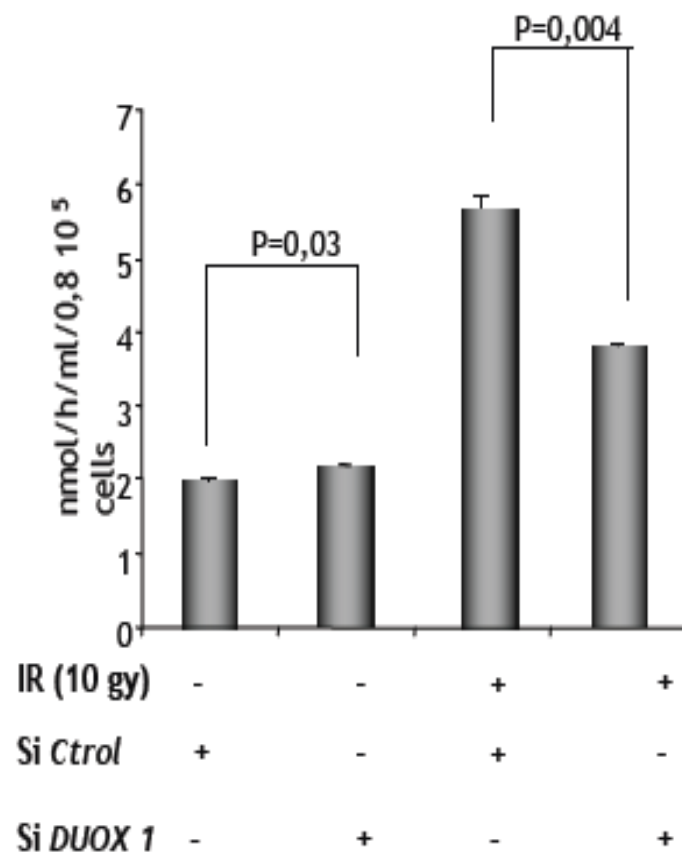


- Implication du facteur de transcription Sp-1 dans l'expression radioinduite de la DUOX1 dans la lignée Hthy Ori:



- L'expression de la DUOX1 en réponse aux radiations ionisantes est également retrouvée dans les fibroblastes humains en culture primaire





C) DISCUSSION GENERALE :

Depuis leur découverte, les radiations ionisantes sont utilisées de façon croissante dans le domaine médical. La radiothérapie est utilisée dans le traitement de la moitié des cancers chez l'Homme. Cette utilisation a permis de nombreux progrès dans le traitement des cancers, mais elle peut également entraîner des effets secondaires principalement dans les tissus sains qui entourent la tumeur et ce en dépit des efforts fournis pour l'amélioration du rapport bénéfice/risque. La thyroïde fait partie des organes les plus sensibles aux rayonnements ionisants, et l'irradiation est actuellement reconnue comme un facteur de risque dans le cancer de la thyroïde chez l'enfant. Une augmentation de l'incidence des cancers papillaires de la thyroïde a été longuement étudiée chez les patients traités par radiothérapie pendant l'enfance (Ron et coll,1995). En effet, des travaux publiés en 1991 ont montré l'augmentation du risque de cancer thyroïdien dans une cohorte de patients ayant été traités pour des lymphomes hodgkiniens pendant l'enfance (Hancock et coll,1991). Les nombreux travaux réalisés sur les groupes de survivants de l'accident de Tchernobyl et de l'explosion de la bombe atomique à Nagasaki ont établi un lien direct entre l'exposition aux radiations ionisantes et la prévalence des cancers thyroïdiens de type papillaire. De plus, la translocation chromosomique RET/PTC est très augmentée chez les individus ayant développé un cancer radioinduit suite à une exposition thérapeutique ou accidentelle (Rabes, 2000 ; Bounacer 1997, Nikiforov, 1997). L'étude des différents mécanismes impliqués dans la radiocarcinogenèse thyroïdienne doit permettre de mieux comprendre les effets secondaires observés après les traitements radiothérapeutiques.

Rôle de l'irradiation dans la formation du gène de fusion RET/PTC

Les radiations ionisantes induisent l'activation du proto-oncogène RET par un réarrangement chromosomique. Bien que RET/PTC3 soit le gène chimère le plus fréquent dans les cancers post Tchernobyl, on retrouve majoritairement la forme RET/PTC1 dans les tumeurs liées à une irradiation thérapeutique, et dans les cellules irradiées *in vitro* (Ito et coll 1993 ; Mizuno et coll 2000 ; Caudill et coll 2005).

L'irradiation génère les espèces réactives de l'oxygène (ROS) par les mécanismes de radiolyse de l'eau. Ainsi l'exposition des fibroblastes humains aux radiations ionisantes induit une production importante de ROS intracellulaire dans les minutes qui suivent l'irradiation (Narayanan et coll, 1997). Il est maintenant admis qu'un déséquilibre dans la balance REDOX est capable de perturber la stabilité génomique de la cellule en générant des dommages oxydatifs (Dayal et coll, 2008). Des travaux réalisés sur des cellules hématopoïétiques ont montré par exemple qu'après irradiation il y a une augmentation de l'oxydation des bases de l'ADN, de la fragmentation des noyaux, ainsi qu'une augmentation de la peroxydation lipidique, suggérant ainsi qu'un stress oxydant radioinduit serait responsable des effets délétères observés (Clutton et coll, 1996). L'ensemble de ces résultats indique que les ROS participent aux dommages à l'ADN radioinduits. Les effets indirects de l'irradiation sont responsables de 70% des dommages observés. Nos travaux montrent que l' H_2O_2 généré par la radiolyse de l'eau contribue à l'apparition des dommages à l'ADN, des cassures double-brin et des translocations RET/PTC1 dans les cellules thyroïdiennes. De manière intéressante nous observons grâce à l'utilisation d'un vecteur capable de détecter de manière spécifique l' H_2O_2 nucléaire (Hyper-Nuc), la présence de cette molécule dans le noyau dans les minutes qui suivent l'irradiation. Le même signal est détecté suite à une application exogène d' H_2O_2 . Dans le cas de l'irradiation la détection de l' H_2O_2 au niveau nucléaire peut s'expliquer par le fait que la radiolyse de l'eau affecte tous les compartiments cellulaires. En revanche, la fluorescence détectée dans le noyau après un traitement exogène d' H_2O_2 ne peut s'expliquer que par deux hypothèses : soit l' H_2O_2 extracellulaire diffuse dans la cellule où il va générer des lésions oxydatives, ce qui est improbable en raison des systèmes antioxydants, ou soit l' H_2O_2 active lui-même un système générateur de ROS qui serait proche du compartiment nucléaire.

Les cassures de l'ADN ne se produisent pas de manière sporadique, mais dans des régions spécifiques du chromosome. La majorité de ces régions correspondent aux sites fragiles. Leur présence a été décrite comme étant corrélée à de nombreux réarrangements chromosomiques présents dans certains cancers. Ces réarrangements seraient impliqués dans les étapes précoces du processus de carcinogenèse. Des travaux récents (Ghandi et coll 2010) ont montré que le réarrangement RET/PTC1 est généré suite à une cassure au niveau de sites fragiles de l'ADN. De nombreux facteurs environnementaux peuvent participer à la

perturbation des sites fragiles comme l'hypoxie (Coquelle et coll 1998), ou la présence de certains agents tel que la caféine (Yunis et coll 1984). Dans l'état actuel de nos connaissances, aucune donnée dans la littérature n'a pu montrer le rôle de l'H₂O₂ dans les cassures qui se produisent de manière spécifique au niveau des sites fragiles. L'étude du rôle de l'H₂O₂ dans la formation des réarrangements tel que BCR/ABL observé dans les leucémies permettrait de classer les espèces réactives de l'oxygène parmi les facteurs susceptibles d'engendrer une rupture des sites fragiles.

L'analyse de l'expression de la translocation RET/PTC1 dans une lignée de fibroblastes humains a montré qu'aucune cellule n'était positive pour la translocation après irradiation confirmant ainsi la spécificité thyroïdienne de la translocation RET/PTC1. D'autres résultats ont démontré le caractère tissu-spécifique de la translocation. Ainsi, des expériences de « comet assay » ont mis en évidence que la radiosensibilité du gène RET est particulièrement augmentée dans les cellules thyroïdiennes (Volpato Beu et coll 2008). L'analyse en 3D de la structure du chromosome 10 lors de l'interphase montre un rapprochement entre RET et son partenaire CCDC6 dans la thyroïde, favorisant ainsi la fusion des deux gènes dans ce tissu (Ghandi et coll 2006). Cette proximité entre le gène RET et son partenaire de fusion est observée aussi bien dans la thyroïde d'enfants que dans celle d'adultes suggérant que d'autres mécanismes sont impliqués dans la susceptibilité des enfants à développer un cancer de la thyroïde après une exposition aux radiations ionisantes.

Une étude menée par le groupe de Fagin a rapporté une fréquence importante de réarrangement RET/PTC1 dans des cancers papillaires sporadiques chez des enfants n'ayant jamais été exposés à des radiations ionisantes thérapeutiques ou accidentelles (Nikiforov et coll, 1997). Nos résultats, en lien avec les données de la littérature suggèrent que l'H₂O₂ par lui-même pourrait être à l'origine du gène chimère RET/PTC1 retrouvé dans 15% des cas.

Les thyrocytes possèdent deux systèmes générateurs d'H₂O₂ localisés au pôle apical qui sont les NADPH oxydases DUOX1 et la DUOX2 (Dupuy et coll, 1999 ; De Deken et coll, 2000). L'expression d'une autre NADPH oxydase (NOX4) a été récemment mise en évidence dans les thyrocytes humains au niveau intracellulaire (Weyemi et coll, 2009). Plusieurs observations suggèrent un rôle physiopathologique de l'H₂O₂ et

des systèmes qui le produisent, tels que les NADPH oxydases, dans la thyroïde. En effet, des données obtenues chez le rat montrent une fréquence élevée de mutations somatiques et de lésions oxydatives puriques et pyrimidiques dans la thyroïde comparativement à d'autres organes tels que le foie, la rate et le poumon (Maier et coll, 2006). Par ailleurs, les thyrocytes présentent également une fréquence relativement élevée de mutations du récepteur de la TSH résultant de lésions oxydatives (Krohn et coll 2007). À la lumière de ces observations et compte tenu du caractère radiosensible de la thyroïde il nous est apparu essentiel d'étudier l'expression et la régulation des NADPH oxydases en réponse à l'irradiation.

Un système générateur de ROS participerait-il aux effets délétères de l'irradiation ?

Les NADPH oxydases dont l'unique fonction est la production de ROS peuvent être activées très rapidement par une stimulation par des facteurs de croissance, ou des cytokines (Tolando et coll, 2000), lesquels sont produits en quantité importante en réponse à l'irradiation. Les effets des radiations ionisantes sur les NADPH oxydases restent encore mal connus. Peu de travaux dans la littérature se sont intéressés à l'activation des NOXs/DUOXs à des temps tardifs c'est à dire plusieurs jours après irradiation. En revanche plusieurs travaux montrent l'implication d'une NADPH oxydase aux temps précoces. Ainsi, une exposition aux rayons X induit l'expression et l'activation d'une NADPH oxydase quelques heures après dans des cellules HeLa et dans des cellules endothéliales (Liu et coll, 2008) (Collins-Underwood et coll 2008). Le diphénylène iodonium (DPI), un inhibiteur des NADPH oxydases, diminue de manière significative l'instabilité génomique détectée dans les cellules hématopoïétiques de souris (Pazhanisamy et coll, 2011). Récemment, le rôle de NOX4 dans les mécanismes moléculaires conduisant aux fibroses radioinduites a été montré : l'augmentation de l'expression de NOX4 est due à une régulation positive par le TGF β produit à l'issue de l'irradiation (Park et coll, 2010).

Bien que l'équipe ait montré une expression de NOX4 dans la thyroïde, nous n'observons pas d'effet de l'irradiation sur l'expression de son ARN messager 24 h après. On ne peut cependant pas exclure une régulation positive de cette NADPH oxydase à des temps précoces. En revanche nos travaux montrent pour la première fois une augmentation de l'expression de DUOX1 dans les jours qui suivent l'exposition aux radiations ionisantes, suggérant l'implication d'une cascade

d'évènements qui va conduire à l'activation de facteurs et de voies de signalisation responsables de l'activation tardive de la DUOX1.

L'augmentation de l'expression DUOX1 après irradiation n'est pas restreinte à la thyroïde. En effet, nous avons également observé une augmentation de son expression corrélée à une augmentation de l'activité génératrice d'H₂O₂ dans les fibroblastes humains plusieurs jours après irradiation (Résultats supplémentaires). Il semble donc que ce soit un mécanisme plus général. La DUOX1 peut-elle alors être considérée comme un marqueur du stress oxydatif associé à des pathologies radio-induites ? L'étude de son profil d'expression en immunohistochimie et en PCR quantitative dans des cancers radio-induits permettra de mieux répondre à cette question.

Comment l'irradiation peut-elle induire l'expression de DUOX1 ?

L'exposition à des radiations ionisantes induit de nombreuses voies de signalisation intracellulaires qui impliquent les voies de survie médiées par les récepteurs tyrosine kinase tel que l'EGFR (comme les voies ERK et PI3K/AKT), les facteurs de transcription comme la p53 ou le NFκB, les récepteurs aux chimiokines comme le CXCR4 (Chang, et coll, 2009) et également la sécrétion de cytokines comme le TGFβ, le TNFα, l'IL6 et l'IL8 (Chendil, et coll 2004 ; Xia et coll , 2009). Tous ces éléments sont essentiels à la réponse inflammatoire induite par l'irradiation (Eichholtz-Wirth et coll, 2002 ; Zhou et coll, 2001).

L'analyse du profil pro-inflammatoire des transcrits des cellules thyroïdiennes après une exposition aux rayonnements ionisants nous a permis de montrer une forte augmentation des cytokines IL1β, TNFα, IL13, IL6 et IL8 dans les jours qui suivent l'irradiation. L'IL1 et le TNFα font partie des cytokines qui ont été décrites comme étant induites par l'irradiation et qui contribuent au développement des pathologies en marge des traitements radiothérapeutiques (Zimmermann et coll, 1998, Johnston et coll 1996, Liu et coll 2006).

De précédentes études ont montré que la production d'IL6 et d'IL8 est modulée par les rayonnements ionisants de manière dépendante de la dose d'irradiation dans différents types cellulaires comme les fibroblastes, les kératinocytes et les cellules épithéliales (Tabata et coll, 2006, Beetz et coll, 1997, Rodier et coll, 2009). Cette

production peut être effective quelques heures ou quelques jours après irradiation selon les types cellulaires.

Le rôle du TGF β a été largement caractérisé dans de nombreuses pathologies y compris dans celles associées aux radiations ionisantes (Branton et coll 1999, Barcellos-Hoff 1994, 1993). L'activation très précoce du TGF β par les rayonnements ionisants a été analysée *in vivo* sur un modèle de peau et de poumon (Martin et coll, 2000). L'augmentation précoce de l'expression de NOX4 dans les fibroblastes irradiés est régulée par le TGF β . Par conséquent, l'absence d'expression de NOX4 et du TGF β à des temps tardifs après irradiation dans les cellules thyroïdiennes est corrélée aux précédentes données de la littérature.

Puisque le profil d'expression des différentes cytokines (IL1, TNF α , IL13) coïncide avec l'augmentation de l'expression de DUOX1 observée plusieurs jours après irradiation, nous avons étudié l'implication d'une de ces cytokines dans la régulation de la NADPH oxydase DUOX1.

L'IL13 est décrite comme étant augmentée dans les fibroblastes irradiés (Lee et coll, 2010 ; Zhao et coll, 2009,). Nos résultats montrent que l'IL13 est un médiateur de l'effet de l'irradiation sur l'expression de DUOX1 dans la thyroïde. La voie classique de transduction du signal de l'IL13 est médiée par le facteur de transcription STAT6. L'IL13 en se fixant sur l'hétérodimère formé par l'IL4R α et l'IL13R α (Hershey et coll, 2003) induit la phosphorylation de ce facteur, lequel une fois transloqué dans le noyau, induit l'expression des gènes cibles (Palmer-Crocker et coll, 1996). L'augmentation de la forme phosphorylée de STAT6 observée dans nos conditions indique une activation de la voie IL13. Il a été rapporté récemment que DUOX1, induite sous l'effet d'un traitement aux cytokines de type Th2 comme IL13 et l'IL4 dans les kératinocytes humains, contribue à l'augmentation de la phosphorylation de STAT6 à travers l'inhibition de la tyrosine phosphatase 1B (Hirakawa et coll, 2011). Par conséquent, DUOX1 est un régulateur des voies de signalisation impliquant STAT6. Aucun effet de l'inhibiteur de STAT6 sur l'expression de l'ARN messager de DUOX1 mesurée après irradiation n'a été observé dans nos conditions indiquant que STAT6 n'est pas impliqué dans la voie de l'IL13 qui régule DUOX1. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que DUOX1 participe à l'activation de STAT6.

De manière intéressante, l'IL13 est trouvé augmenté dans de nombreux cancers et joue un rôle important dans la suppression de la réponse immunitaire anti-tumorale (Terabe et coll, 2004). Un travail récent a montré par CGH array et par immunohistochimie une augmentation de l'IL13 dans les cancers papillaires de la thyroïde comparativement aux nodules bénins (Zhao et coll, 2009), suggérant une implication de cette cytokine dans la tumorigenèse thyroïdienne. Puisque nos résultats montrent que DUOX1 est augmenté après irradiation via l'IL13, il nous faudra maintenant étudier l'expression de l'IL-13 dans les cancers radioinduits, afin de confirmer le lien entre l'expression de l'IL13 et celle de DUOX1.

La DUOX1 est-elle impliquée dans la sénescence radioinduite ?

L'irradiation est à l'origine de dommages à l'ADN lesquels activent « la réponse aux dommages (DDR) » qui se caractérise par une augmentation de l'expression des protéines impliquées dans la mise en place des mécanismes de la réparation de l'ADN. La DDR implique notamment les protéines kinases ATM et ATR, la protéine kinase CHK2 et l'histone H2AX. La voie ATM/CHK2 est impliquée dans la production de cytokines inflammatoires comme l'IL6 et l'IL8 par les cellules devenues sénescents après une forte dose d'irradiation (10 Gy) (Rodier et coll, 2009). Cette sécrétion de cytokine est associée au caractère persistant de la DDR en lien avec l'importance des dommages à l'ADN et n'est effective que plusieurs jours après l'irradiation indiquant que la DDR canonique, par elle-même, qui se met en place immédiatement après les dommages, n'est pas suffisante. Il a été montré que la voie p38MAPK est également impliquée dans la production de cytokines associées à la sénescence. Mais bien qu'étant décrite être activée par la DDR via ATM, il apparaît que dans ce cas l'activation tardive de la p38MAPK soit indépendante d'ATM et que les deux voies coopèrent de manière indépendante dans la régulation de l'expression des cytokines. En accord avec ce qui a été récemment décrit pour les cytokines IL-6 et IL-8 nous observons que la p38MAPK et ATM sont toutes deux impliquées dans l'induction de l'expression de l'IL-13 et donc dans l'expression de DUOX1. D'où vient alors l'activation tardive d'ATM et de P38 ? Plusieurs travaux ont montré le rôle des ROS dans l'activation des protéines kinases ATM et p38MAPK. Ainsi, l'H₂O₂ peut par lui-même activer ATM en absence de dommage à l'ADN. Dans ce cas il induit une dimérisation de la protéine ATM nécessaire à son activation via la formation de ponts dissulfure entre deux résidus cystéines (Guo et coll, 2010). La

phosphorylation de la p38MAPK peut, quand à elle, être augmentée en réponse à un stress oxydant via la libération de la MAPKKK, ASK1 (Saitoh et coll, 1998). Il est donc envisageable que les ROS produites par DUOX1 et régulées en amont par ATM et la p38MAPK participent elles-mêmes à l'activation de ces kinases par un mécanisme redox et, dans le cas d'ATM, concourent au maintien de la DDR. Ce rétro-contrôle des ROS dans le maintien de la DDR nécessaire à l'établissement du processus de sénescence a été décrit récemment par Passos et collaborateurs. Cependant dans ce cas, les ROS contribuent de manière aléatoire aux dommages de l'ADN. La phosphorylation de la serine 19 de CHK2 à des temps tardifs après irradiation, décrite préalablement comme étant observée uniquement après la formation de cassures double-brin à l'ADN, et la diminution de la phosphorylation de l'histone H2AX observée après inactivation de DUOX1, suggèrent que les ROS participent à l'activation de la DDR, non pas par un mécanisme redox, mais en générant des dommages à l'ADN.

Des travaux publiés récemment par l'équipe ont montré dans un modèle de lignée thyroïdienne que H-Ras oncogénique induit la NADPH oxydase NOX4 qui, en produisant des ROS, participe aux dommages à l'ADN, lesquels contribuent à l'établissement du processus de sénescence . Puisque NOX4 peut être induit de manière précoce en réponse à l'irradiation, Il est donc envisageable que NOX4 soit impliquée dans l'activation de la DDR, conduisant à l'expression de DUOX1, laquelle contribuerait à son tour au maintien de la DDR et donc au phénomène de sénescence.

Le rôle de la p38MAPK dans la production des cytokines telles que l'IL-6 et l'IL-8 lors de la sénescence est médié par l'activation du facteur de transcription NF κ B (Freund et coll, 2011). La voie ATM agit en synergie avec celle de p38MAPK dans cette activation. Il a été décrit que l'H₂O₂ augmente la sécrétion d'IL6 via l'activation de NF κ B (Kosmidou et coll, 2002). Par conséquent, l'H₂O₂ produit par DUOX1 peut participer à la régulation de l'expression des cytokines dépendantes de NF κ B. Des résultats préliminaires de l'équipe montrent que l'inactivation de la DUOX1 par des ARNs interférents diminue de manière significative la production d'IL6 mesurée 4 jours après irradiation. DUOX1 pourrait non seulement participer au maintien de la DDR et à l'activation de la p38MAPK mais être également un activateur de NF κ B, et donc de la production de cytokines. Il sera donc particulièrement intéressant

d'analyser et de comparer le profil d'expression des différentes cytokines/chimiokines dans les cellules thyroïdiennes dont l'expression du gène DUOX1 aura été invalidé ou non par ARN interférence. L'analyse du cycle cellulaire dans les cellules invalidées pour DUOX1 permettra de mieux définir le rôle de cette protéine dans le processus de sénescence radio-induite.

Existe-t-il d'autres voies d'activation de la DUOX1 après irradiation ?

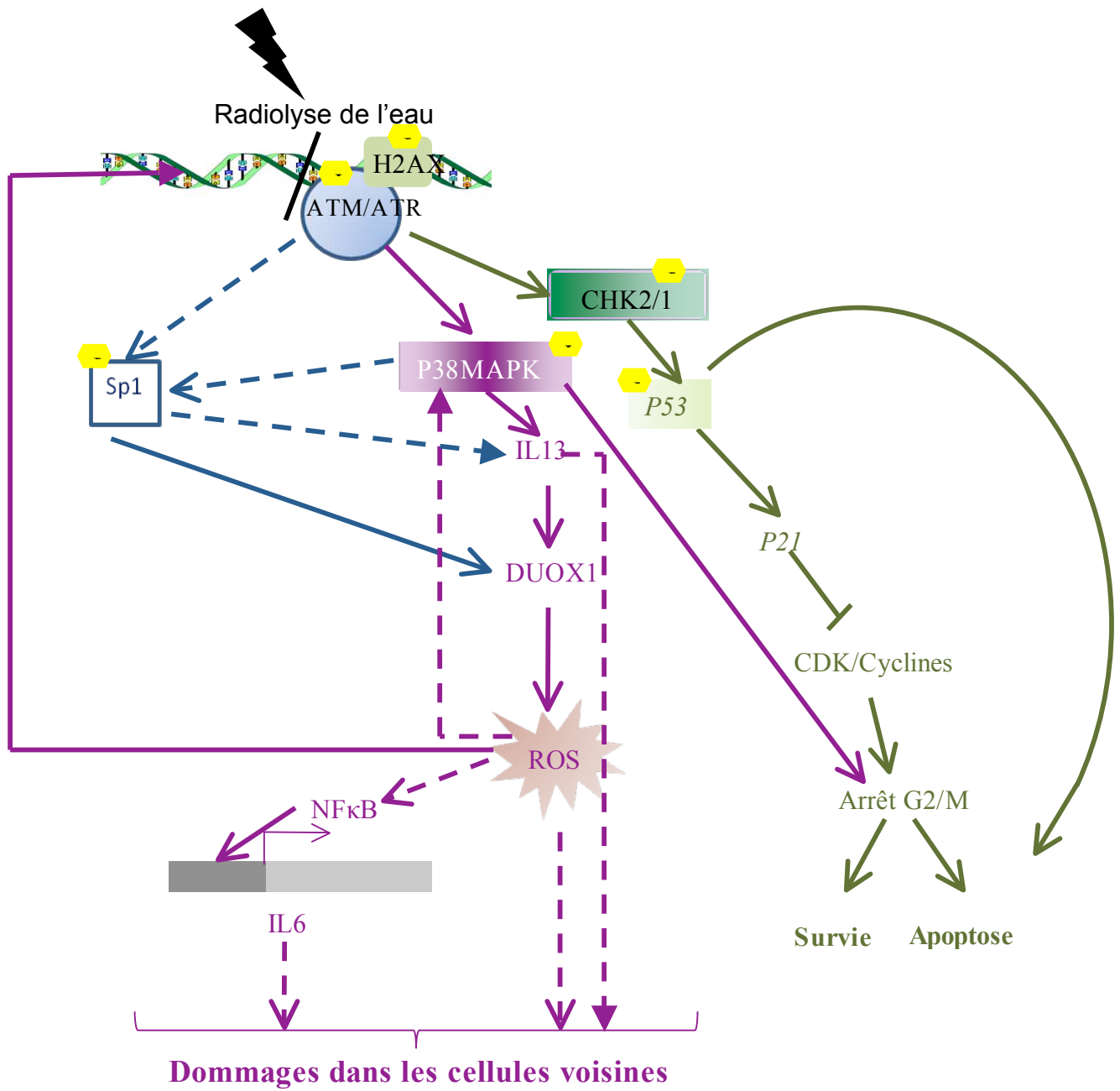
L'activation de nombreux facteurs de transcription tels que NF κ B, p53, AP-1 et Sp-1, a été observée dans différents types cellulaires exposées à des doses d'irradiation allant de 0,2 à 20 Gy (Lu et coll, 1993, Brach et coll, 1993, Yang et coll, 2000). Le promoteur minimal de la DUOX1 comportant plusieurs sites Sp-1, l'étude du rôle de ce facteur de transcription dans l'activation de l'expression de DUOX1 a été entreprise.

Nos résultats préliminaires montrent que l'utilisation d'un inhibiteur de Sp-1 (la mithramycine) engendre une diminution de l'expression du transcrit de DUOX1 après irradiation. De manière intéressante, Sp-1 possède des sites de phosphorylation par la kinase ATM. L'activation de ces sites en réponse aux dommages à l'ADN a été montrée dans les minutes qui suivent l'irradiation (Iwahori et coll, 2008). Cependant, il n'a pas été montré que Sp-1 ainsi phosphorylé soit actif et contrôle la transcription des gènes cibles. De plus, l'augmentation de l'expression de DUOX1 n'est observée que plusieurs jours après irradiation. Il est donc possible que la ou les modification(s) post-traductionnelle(s) de Sp-1 impliquée dans la régulation de l'expression de DUOX1 soit médiée par une autre voie qu'ATM. L'analyse de l'activité transcriptionnelle de Sp-1 dans des cellules où l'expression du gène d'ATM aura été invalidée permettra de mieux définir l'implication de la kinase ATM dans ce mécanisme induit plusieurs jours après irradiation. La p38MAPK peut également activer le facteur de transcription Sp-1 (Lee et coll, 2010). En effet la phosphorylation de Sp-1 par la p38MAPK sur les thréonines 453 et 739 par exemple en réponse au stress augmente son activité transcriptionnelle (D'Addario et coll, 2006). Aucune étude n'a montré jusqu'à présent, une activation de Sp-1 sous l'effet de l'IL-13. L'utilisation d'anticorps neutralisant l'IL-13 permettra de mettre en évidence cette régulation.

Implication de DUOX1 dans les effets *Bystander* observés après irradiation ?

L'exposition aux radiations ionisantes entraîne une production de nombreux facteurs solubles impliqués dans les effets biologiques observés dans les cellules qui n'ont pas été directement exposées. Ce phénomène communément appelé « effet *Bystander* ou effet de voisinage » apparaît sous forme de lésions ou d'induction de réponses aux rayonnements. L'effet *Bystander* est globalement admis comme une conséquence de l'irradiation. En thérapie anticancéreuse, l'effet *Bystander* constitue un élément majeur dans l'établissement des effets secondaires observés suite à des traitements radiothérapeutiques. Ces effets non ciblés comprennent une augmentation de la réponse adaptative, une altération de l'expression génique, une instabilité génomique, des échanges de chromatides sœurs, la mutagenèse, la formation de micronoyaux et l'augmentation de l'apoptose (Asur et coll, 2010 ; Voskanian et coll, 2009). Les cellules irradiées produisent des ROS et des cytokines probablement à l'origine des dommages observés dans le microenvironnement. Les mécanismes de signalisation impliqués dans les effets *Bystander* commencent à être élucidés, et l'implication de nombreuses molécules a été mise en évidence. Ces facteurs de signalisation ne sont pas spécifiques aux radiations ionisantes, mais sont impliqués dans les interactions cellules-cellules. De nombreuses études ont montré le rôle des cytokines comme l'IL6 (Zhou, et coll, 2001, Pasi et coll, 2010), l'IL8 (Narayanan et coll, 1999), le TGF β (Iyer et coll, 2000), le TNF α (Zhou et coll, 2001) et les ROS (Lehnert et coll, 1997) dans les effets non ciblés. Un modèle proposé par Zhou et coll (Zhou et coll, 2005) suggère que les cytokines et les facteurs de croissance produits après irradiation, une fois fixés sur leurs récepteurs spécifiques exprimés dans les cellules voisines, activeraient différentes voies de signalisation comme les voies NF κ B, ERK, JNK et p38MAPK qui seraient responsables de l'inflammation, des mutations et de l'instabilité génomiques observées dans les cellules *Bystander*. Cette hypothèse a été appuyée par des travaux qui ont montré l'implication des voies MAPK dans l'établissement des effets *Bystander* (Asur et coll, 2010). Les voies des MAPK en particulier, sont non seulement activées par différents facteurs génotoxiques comme les UV ou les radiations ionisantes, mais également par le stress oxydant (Torres et coll, 2003). Il est donc envisageable que les ROS produites par DUOX1 participent activement à l'établissement des effets *Bystander*. Nos résultats montrent une phosphorylation de l'histone H2AX dans les cellules *Bystander* 4 jours après irradiation. L'inhibition de DUOX1 par des ARN interférents

ainsi que le traitement des cellules par la catalase, un antioxydant spécifique de l'H₂O₂, diminue les dommages à l'ADN dans les cellules directement irradiées. En revanche, dans les cellules *Bystander*, seule la catalase diminue les dommages à l'ADN, suggérant que les cellules non irradiées produisent elles-mêmes sous l'effet d'un facteur produit par les cellules irradiées, de l'H₂O₂ responsable des dommages observés. Ce facteur pourrait être l'IL-13. La neutralisation de l'IL-13 par des anticorps dans le milieu de co-culture permettra de répondre à la question. De même, l'analyse de l'expression de DUOX1 dans les cellules *Bystander* permettra d'identifier la source de ROS à l'origine des dommages.



e 26: Schéma hypothétique des différentes voies de signalisation activées dans un thyrocyte humain en réponse à l'irradiation

D) CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES :

Ce travail de thèse a permis de montrer d'une part l'implication des espèces réactives de l'oxygène produites par la radiolyse de l'eau dans la formation des translocations RET/PTC1 retrouvées dans de nombreux cas de cancers de la thyroïde radioinduits, et d'autre part l'implication de la NADPH oxydase DUOX1 activée par la voie P38MAPK, dans les effets tardifs de l'irradiation qui se caractérisent par la persistance des radiolésions et par une production accrue d'un large panel de cytokines. Cependant, cette étude devra être approfondie par d'autres investigations:

À court terme :

- l'étude de l'expression de la DUOX1 dans les cellules *Bystander* et du rôle potentiel des cytokines pro-inflammatoires produites par les cellules irradiées dans les dommages à l'ADN observés dans les cellules *Bystander*.
- L'analyse de l'expression de la DUOX1 dans des cellules irradiées et inactivées pour la protéine ATM, permettrait de mieux comprendre le rôle de la réponse aux dommages à l'ADN dans l'activation et l'expression de la NADPH oxydase DUOX1.
- L'analyse du cycle cellulaire des cellules inactivées pour la DUOX1 permettrait d'établir un lien potentiel entre l'expression de la DUOX1 et les mécanismes de sénescence et/ou de radorésistance.
- Etant donné l'activation précoce de la NOX4 en réponse à l'irradiation, il serait intéressant d'étudier l'implication de ce système générateur de ROS dans l'expression tardive de la DUOX1.
- L'étude de l'expression de la DUOX1, de la p38MAPK et de l'IL13 dans les tissus de patients ayant développé un cancer de la thyroïde radioinduit
- Nos résultats montrent que la DUOX1 est également exprimée dans les fibrocytes radioinduits, il serait donc opportun d'étudier l'implication potentielle de cette protéine dans l'activation des fibrocytes irradiés en myofibrocytes.

À moyen et long terme :

- Etant donné l'importance des ROS dans les dommages radioinduits, il serait intéressant d'étudier le rôle de la DUOX1 dans la formation des translocations RET/PTC1.
- La validation du rôle de l'IL13 et de la DUOX1 dans la tumorigenèse thyroïdienne pourrait faire de ces deux protéines de nouvelles cibles thérapeutiques afin de protéger contre les effets secondaires de l'irradiation.

Abulaiti, A., A. J. Fikaris, et al. (2006). "Ras induces chromosome instability and abrogation of the DNA damage response." Cancer Res **66**(21): 10505-12.

Ahn, C. S. and I. N. Rosenberg (1970). "Iodine metabolism in thyroid slices: effects of TSH, dibutyryl cyclic 3',5'-AMP, NaF and prostaglandin E-1." Endocrinology **86**(2): 396-405.

Airaksinen, M. S. and M. Saarma (2002). "The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value." Nat Rev Neurosci **3**(5): 383-94.

Alipov, G., M. Ito, et al. (1999). "Ret proto-oncogene rearrangement in thyroid cancer around Semipalatinsk nuclear testing site." Lancet **354**(9189): 1528-9.

and genomic instability in human precancerous lesions." Nature **434**(7035): 907-13.

Arighi, E., M. G. Borrello, et al. (2005). "RET tyrosine kinase signaling in development and cancer." Cytokine Growth Factor Rev **16**(4-5): 441-67.

Asur, R., M. Balasubramaniam, et al. (2010). "*Bystander* effects induced by chemicals and ionizing radiation: evaluation of changes in gene expression of downstream MAPK targets." Mutagenesis **25**(3): 271-279.

Banfi, B., A. Maturana, et al. (2000). "A mammalian H⁺ channel generated through alternative splicing of the NADPH oxidase homolog NOX-1." Science **287**(5450): 138-142.

Banfi, B., B. Malgrange, et al. (2004). "NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear." J Biol Chem **279**(44): 46065-46072.

Banfi, B., F. Tirone, et al. (2004). "Mechanism of Ca²⁺ activation of the NADPH oxidase 5 (NOX5)." J Biol Chem **279**(18): 18583-91.

Banfi, B., G. Molnar, et al. (2001). "A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes." J Biol Chem **276**(40): 37594-601.

Barcellos-Hoff, M. H. (1993). "Radiation-induced transforming growth factor beta and subsequent extracellular matrix reorganization in murine mammary gland." Cancer Res **53**(17): 3880-6.

Barcellos-Hoff, M. H. (1998). "How do tissues respond to damage at the cellular level? The role of cytokines in irradiated tissues." Radiat Res **150**(5 Suppl): S109-20.

Barcellos-Hoff, M. H., R. Derynck, et al. (1994). "Transforming growth factor-beta activation in irradiated murine mammary gland." J Clin Invest **93**(2): 892-9.

Barker, S., M. Weinfeld, et al. (2005). "DNA-protein crosslinks: their induction, repair, and biological consequences." Mutat Res **589**(2): 111-135.

Basolo, F., F. Pisaturo, et al. (2000). "N-ras mutation in poorly differentiated thyroid carcinomas: correlation with bone metastases and inverse correlation to thyroglobulin expression." Thyroid **10**(1): 19-23.

Basolo, F., R. Giannini, et al. (2002). "Potent mitogenicity of the RET/PTC3 oncogene correlates with its prevalence in tall-cell variant of papillary thyroid carcinoma." Am J Pathol **160**(1): 247-54.

Beckman, K. B. and B. N. Ames (1997). "Oxidative decay of DNA." J Biol Chem **272**(32): 19633-6.

Beetz, A., G. Messer, et al. (1997). "Induction of interleukin 6 by ionizing radiation in a human epithelial cell line: control by corticosteroids." Int J Radiat Biol **72**(1): 33-43.

Berendes, H., R. A. Bridges, et al. (1957). "A fatal granulomatosis of childhood: the clinical study of a new syndrome." Minn Med **40**(5): 309-312.

Bjorkman, U. and R. Ekholm (1984). "Generation of H₂O₂ in isolated porcine thyroid follicles." Endocrinology **115**(1): 392-398.

Bjorkman, U., R. Ekholm, et al. (1981). "Cytochemical localization of hydrogen peroxide in isolated thyroid follicles." J Ultrastruct Res **74**(1): 105-115.

Bohm, M., V. Gamulin, et al. (2002). "Evolution of osmosensing signal transduction in Metazoa: stress-activated protein kinases p38 and JNK." Cell Tissue Res **308**(3): 431-8.

Boiteux, S., E. Gajewski, et al. (1992). "Substrate specificity of the Escherichia coli Fpg protein (formamidopyrimidine-DNA glycosylase): excision of purine lesions in DNA produced by ionizing radiation or photosensitization." Biochemistry **31**(1): 106-10.

Bounacer, A., R. Wicker, et al. (1997). "High prevalence of activating ret proto-oncogene rearrangements, in thyroid tumors from patients who had received external radiation." Oncogene **15**(11): 1263-73.

Bounacer, A., R. Wicker, et al. (1997). "Oncogenic rearrangements of the ret proto-oncogene in thyroid tumors induced after exposure to ionizing radiation." Biochimie **79**(9-10): 619-23.

Bousquet, M., C. Quelen, et al. (2005). "The t(8;9)(p22;p24) translocation in atypical chronic myeloid leukaemia yields a new PCM1-JAK2 fusion gene." Oncogene **24**(48): 7248-52.

Brach, M. A., H. J. Gruss, et al. (1993). "Ionizing radiation induces expression of interleukin 6 by human fibroblasts involving activation of nuclear factor-kappa B." *J Biol Chem* **268**(12): 8466-72.

Brach, M. A., R. Hass, et al. (1991). "Ionizing radiation induces expression and binding activity of the nuclear factor kappa B." *J Clin Invest* **88**(2): 691-5.

Bradley, M. O. and K. W. Kohn (1979). "X-ray induced DNA double strand break production and repair in mammalian cells as measured by neutral filter elution." *Nucleic Acids Res* **7**(3): 793-804.

Branton, M. H. and J. B. Kopp (1999). "TGF-beta and fibrosis." *Microbes Infect* **1**(15): 1349

Bulavin, D. V., S. A. Amundson, et al. (2002). "p38 and Chk1 kinases: different conductors for the G(2)/M checkpoint symphony." *Curr Opin Genet Dev* **12**(1): 92-7.

Cadet, J., M. Berger, et al. (1997). "Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance." *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **131**: 1-87.

Cadet, J., T. Delatour, et al. (1999). "Hydroxyl radicals and DNA base damage." *Mutat Res* **424**(1-2): 9-21.

Cardis, E., M. Vrijheid, et al. (2005). "Risk of cancer after low doses of ionising radiation: retrospective cohort study in 15 countries." *BMJ* **331**(7508): 77.

Carta C, Moretti S, Passeri L, Barbi F, Avenia N, Cavaliere A, Monacelli M, Macchiarulo A, Santeusano F, Tartaglia M, Puxeddu E. cell carcinomas of the thyroid. *Arkh Patol.* **2003** Mar-Apr;65(2):45-7. Review. Genotyping of an Italian papillary thyroid carcinoma cohort revealed high prevalence of BRAF mutations, absence of RAS mutations and allowed the detection of a new mutation of BRAF oncoprotein (BRAF(V599Ins)). *Clin Endocrinol (Oxf).* **2006** Jan;64(1):105-9.

Carter, S., K. L. Auer, et al. (1998). "Inhibition of the mitogen activated protein (MAP) kinase cascade potentiates cell killing by low dose ionizing radiation in A431 human squamous carcinoma cells." *Oncogene* **16**(21): 2787-96.

Castellone, M. D., A. M. Cirafici, et al. (2003). "Ras-mediated apoptosis of PC CL 3 rat thyroid cells induced by RET/PTC oncogenes." *Oncogene* **22**(2): 246-55.

Caudill, C. M., Z. Zhu, et al. (2005). "Dose-dependent generation of RET/PTC in human thyroid cells after *in vitro* exposure to gamma-radiation: a model of carcinogenic chromosomal rearrangement induced by ionizing radiation." *J Clin Endocrinol Metab* **90**(4): 2364-9.

- Ceccherini, I., R. Bocciardi, et al. (1993).** "Exon structure and flanking intronic sequences of the human RET proto-oncogene." *Biochem Biophys Res Commun* **196**(3): 1288-95.
- Ceccherini, I., R. M. Hofstra, et al. (1994).** "DNA polymorphisms and conditions for SSCP analysis of the 20 exons of the ret proto-oncogene." *Oncogene* **9**(10): 3025-9.
- Celetti, A., A. Cerrato, et al. (2004).** "H4(D10S170), a gene frequently rearranged with RET in papillary thyroid carcinomas: functional characterization." *Oncogene* **23**(1): 109-21.
- Chang, C. C., O. Z. Lerman, et al. (2009).** "Dose-dependent effect of radiation on angiogenic and angiostatic CXC chemokine expression in human endothelial cells." *Cytokine* **48**(3): 295-302.
- Chen, H. J. and Chung, F. L. (1996).** Epoxidation of trans-4-hydroxy-2-nonenal by fattyacid hydroperoxides and hydrogen peroxide. *Chem Res Toxicol*, 9(1) :306–312.
- Chendil, D., R. S. Ranga, et al. (2004).** "Curcumin confers radiosensitizing effect in prostate cancer cell line PC-3." *Oncogene* **23**(8): 1599-607.
- Cheng, G., Z. Cao, et al. (2001).** "Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5." *Gene* **269**(1-2): 131-40.
- Cheng, G., Z. Cao, et al. (2001).** "Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5." *Gene* **269**(1-2): 131-140.
- Chi, D. S., S. M. Fitzgerald, et al. (2004).** "MAPK-dependent regulation of IL-1- and beta-adrenoreceptor-induced inflammatory cytokine production from mast cells: implications for the stress response." *BMC Immunol* **5**: 22.
- Chiarugi, P. (2005).** "PTPs versus PTKs: the redox side of the coin." *Free Radic Res* **39**(4): 353-64.
- Chou, C. H., P. J. Chen, et al. (2007).** "Radiation-induced hepatitis B virus reactivation in liver mediated by the *Bystander* effect from irradiated endothelial cells." *Clin Cancer Res* **13**(3): 851-857.
- Ciampi, R. and Y. E. Nikiforov (2005).** "Alterations of the BRAF gene in thyroid tumors." *Endocr Pathol* **16**(3): 163-72.
- Ciampi, R., J. A. Knauf, et al. (2005).** "Oncogenic AKAP9-BRAF fusion is a novel mechanism of MAPK pathway activation in thyroid cancer." *J Clin Invest* **115**(1): 94-101.
- Ciampi, R., Z. Zhu, et al. (2005).** "BRAF copy number gains in thyroid tumors detected by fluorescence in situ hybridization." *Endocr Pathol* **16**(2): 99-105.

Clutton, S. M., K. M. Townsend, et al. (1996). "Radiation-induced genomic instability and persisting oxidative stress in primary bone marrow cultures." *Carcinogenesis* **17**(8): 1633-9.

Collins-Underwood, J. R., W. Zhao, et al. (2008). "NADPH oxidase mediates radiation-induced oxidative stress in rat brain microvascular endothelial cells." *Free Radic Biol Med* **45**(6): 929-38.

Cooke, M. S., M. D. Evans, et al. (2003). "Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease." *FASEB J* **17**(10): 1195-214.

Coquelle, A., F. Toledo, et al. (1998). "A new role for hypoxia in tumor progression: induction of fragile site triggering genomic rearrangements and formation of complex DMS and HSRs." *Mol Cell* **2**(2): 259-65.

Corvilain, B., E. Laurent, et al. (1994). "Role of the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and the phosphatidylinositol-Ca²⁺ cascades in mediating the effects of thyrotropin and iodide on hormone synthesis and secretion in human thyroid slices." *J Clin Endocrinol Metab* **79**(1): 152-9. Salmeen, A., B. O. Park, et al. "The NADPH oxidases NOX4 and DUOX2 regulate cell cycle entry via a p53-dependent pathway." *Oncogene* **29**(31): 4473-84.

Corvilain, B., J. Van Sande, et al. (1988). "Inhibition by iodide of iodide binding to proteins: the "Wolff-Chaikoff" effect is caused by inhibition of H₂O₂ generation." *Biochem Biophys Res Commun* **154**(3): 1287-1292.

Corvilain, B., L. Collyn, et al. (2000). "Stimulation by iodide of H₂O₂ generation in thyroid slices from several species." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **278**(4): E692-9.

D'Addario, M., P. D. Arora, et al. (2006). "Role of p38 in stress activation of Sp1." *Gene* **379**: 51-61.

Damage and Repair : Biochemistry, Genetics, and Cell Biology.

Davies, H., G. R. Bignell, et al. (2002). "Mutations of the BRAF gene in human cancer." *Nature* **417**(6892): 949-54.

Dayal, D., S. M. Martin, et al. (2008). "Hydrogen peroxide mediates the radiation-induced mutator phenotype in mammalian cells." *Biochem J* **413**(1): 185-91.

De Deken X, Wang D, Many MC, Costagliola S, Libert F, Vassart G, Dumont JE, Miot F BERENDES H, BRIDGES RA, GOOD RA. A fatal granulomatosis of childhood: the clinical study of a new syndrome. *Minn Med.* 1957 May;40(5):309-12.

De Deken, X., D. Wang, et al. (2000). "Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family." J Biol Chem **275**(30): 23227-23233.

de Haij, S., A. C. Bakker, et al. (2005). "NF-kappaB mediated IL-6 production by renal epithelial cells is regulated by c-jun NH2-terminal kinase." J Am Soc Nephrol **16**(6): 1603-11.

De Vathaire F, Hardiman C, Shamsaldin A, Campbell S, Grimaud E, Hawkins M, Raquin M, Oberlin O, Diallo I, Zucker JM, Panis X, Lagrange JL, Daly-Schveitzer N, Lemerle J, Chavaudra J, Schlumberger M, Bonaïti C. Thyroid carcinomas after irradiation for a first cancer during childhood. Arch Intern Med. **1999** Dec 13-27;159(22):2713-9.

Deby, C., R. Goutier, et al. (1991). "[Role of free radicals in aging and anti-oxygen treatment]." Ann Cardiol Angeiol (Paris) **40**(6): 341-8.

Demple, B. and L. Harrison (1994). "Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology." Annu Rev Biochem **63**: 915-48.

Denham, J. W. and M. Hauer-Jensen (2002). "The radiotherapeutic injury--a complex 'wound'." Radiother Oncol **63**(2): 129-45.

Dent, P., A. Yacoub, et al. (2003). "MAPK pathways in radiation responses." Oncogene **22**(37): 5885-96.

Dieriks, B., W. H. De Vos, et al. "Medium-mediated DNA repair response after ionizing radiation is correlated with the increase of specific cytokines in human fibroblasts." Mutat Res **687**(1-2): 40-8.

Dolado, I., A. Swat, et al. (2007). "p38alpha MAP kinase as a sensor of reactive oxygen species in tumorigenesis." Cancer Cell **11**(2): 191-205.

Douki, T., R. Martini, et al. (1997). "Measurement of 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine and 8-oxo-7,8-dihydroguanine in isolated DNA exposed to gamma radiation in aqueous solution." Carcinogenesis **18**(12): 2385-91.

Driessens, N., S. Versteyhe, et al. (2009). "Hydrogen peroxide induces DNA single- and double-strand breaks in thyroid cells and is therefore a potential mutagen for this organ." Endocr Relat Cancer **16**(3): 845-56.

Dupuy, C., D. Deme, et al. (1988). "Ca²⁺ regulation of thyroid NADPH-dependent H₂O₂ generation." FEBS Lett **233**(1): 74-78.

Dupuy, C., M. Pomerance, et al. (2000). "Thyroid oxidase (THOX2) gene expression in the rat thyroid cell line FRTL-5." Biochem Biophys Res Commun **277**(2): 287-92.

Dupuy, C., R. Ohayon, et al. (1999). "Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cdnas." *J Biol Chem* **274**(52): 37265-9.

Durbec, P. L., L. B. Larsson-Blomberg, et al. (1996). "Common origin and developmental dependence on c-ret of subsets of enteric and sympathetic neuroblasts." *Development* **122**(1): 349-58.

Eichholtz-Wirth, H. and D. Sagan (2002). "Altered signaling of TNFalpha-TNFR1 and SODD/BAG4 is responsible for radioresistance in human HT-R15 cells." *Anticancer Res* **22**(1A): 235-40.

El Hassani, R. A., N. Benfares, et al. (2005). "Dual oxidase2 is expressed all along the digestive tract." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **288**(5): G933-42.

etained their function after their specification.

Ewan, K. B., R. L. Henshall-Powell, et al. (2002). "Transforming growth factor-beta1 mediates cellular response to DNA damage in situ." *Cancer Res* **62**(20): 5627-31.

Fan, M., K. M. Ahmed, et al. (2007). "Nuclear factor-kappaB and manganese superoxide dismutase mediate adaptive radioresistance in low-dose irradiated mouse skin epithelial cells." *Cancer Res* **67**(7): 3220-8.

Feng, X., Y. Jiang, et al. (2000). "Thyroid hormone regulation of hepatic genes *in vivo* detected by complementary DNA microarray." *Mol Endocrinol* **14**(7): 947-55.

Fischer, A. H., J. A. Bond, et al. (1998). "Papillary thyroid carcinoma oncogene (RET/PTC) alters the nuclear envelope and chromatin structure." *Am J Pathol* **153**(5): 1443-50.

Fortunato, R. S., E. C. Lima de Souza, et al. "Functional consequences of dual oxidase-thyroperoxidase interaction at the plasma membrane." *J Clin Endocrinol Metab* **95**(12): 5403-1

Foster, G. L. & Gutman, A. B. (1930). *J. biol. Chem.* 87, 289

Frankenberg, D., B. D. Michael, et al. (1990). "Fast kinetics of the oxygen effect for DNA double-strand breakage and cell killing in irradiated yeast." *Int J Radiat Biol* **57**(3): 485-501.

Frankenberg-Schwager, M. and D. Frankenberg (1990). "DNA double-strand breaks: their repair and relationship to cell killing in yeast." *Int J Radiat Biol* **58**(4): 569-75.

Frattini M, Ferrario C, Bressan P, Balestra D, De Cecco L, Mondellini P, Bongarzone I, Collini P, Gariboldi M, Pilotti S, Pierotti MA, Greco A. Alternative mutations of BRAF, RET

and NTRK1 are associated with similar but distinct gene expression patterns in papillary thyroid cancer, *Oncogene*. 2004 Sep 23;23(44):7436-40.

Freund, A., C. K. Patil, et al. (2011) "p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype." *EMBO J* **30**(8): 1536-48.

Fugazzola, L., M. A. Pierotti, et al. (1996). "Molecular and biochemical analysis of RET/PTC4, a novel oncogenic rearrangement between RET and ELE1 genes, in a post-Chernobyl papillary thyroid cancer." *Oncogene* **13**(5): 1093-7.

Fujimori, A., R. Okayasu, et al. (2005). "Extremely low dose ionizing radiation up-regulates CXC chemokines in normal human fibroblasts." *Cancer Res* **65**(22): 10159-63.

Furmanchuk, A. V. and N. I. Rusak (1992). "[Latent cancerous pathology of the thyroid]." *Vopr Onkol* **38**(7): 811-817.

Furmanchuk, A. W., J. I. Averkin, et al. (1992). "Pathomorphological findings in thyroid cancers of children from the Republic of Belarus: a study of 86 cases occurring between 1986 ('post-Chernobyl') and 1991." *Histopathology* **21**(5): 401-408.

Fusco, A., G. Viglietto, et al. (2005). "A new mechanism of BRAF activation in human thyroid papillary carcinomas." *J Clin Invest* **115**(1): 20-3.

Fusco, A., M. Grieco, et al. (1987). "A new oncogene in human thyroid papillary carcinomas and their lymph-nodal metastases." *Nature* **328**(6126): 170-2.

Gandhi, M., L. W. Dillon, et al. (2010) "DNA breaks at fragile sites generate oncogenic RET/PTC rearrangements in human thyroid cells." *Oncogene* **29**(15): 2272-80.

Gandhi, M., M. Medvedovic, et al. (2006). "Interphase chromosome folding determines spatial proximity of genes participating in carcinogenic RET/PTC rearrangements." *Oncogene* **25**(16): 2360-6.

Garcia-Rostan G, Zhao H, Camp RL, Pollan M, Herrero A, Pardo J, Wu R, Carcangiu ML, Costa J, Tallini G. ras mutations are associated with aggressive tumor phenotypes and poor prognosis in thyroid cancer *J Clin Oncol*. 2003 Sep 1;21(17):3226-35.

Garcia-Rostan, G., H. Zhao, et al. (2003). "ras mutations are associated with aggressive tumor phenotypes and poor prognosis in thyroid cancer." *J Clin Oncol* **21**(17): 3226-3235.

Geiszt, M., J. B. Kopp, et al. (2000). "Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(14): 8010-4.

Geiszt, M., J. Witta, et al. (2003). "Dual oxidases represent novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defense." FASEB J **17**(11): 1502-4.

Gerard, A. C., M. Boucquey, et al. (2006). "Expression of TPO and ThOXs in human thyrocytes is downregulated by IL-1alpha/IFN-gamma, an effect partially mediated by nitric oxide." Am J Physiol Endocrinol Metab **291**(2): E242-53.

Glover, T. W. and C. K. Stein (1987). "Induction of sister chromatid exchanges at common fragile sites." Am J Hum Genet **41**(5): 882-90.

Glover, T. W. and C. K. Stein (1988). "Chromosome breakage and recombination at fragile sites." Am J Hum Genet **43**(3): 265-73.

Gnidehou, S., L. Lacroix, et al. (2006). "Cloning and characterization of a novel isoform of iodotyrosine dehalogenase 1 (DEHAL1) DEHAL1C from human thyroid: comparisons with DEHAL1 and DEHAL1B." Thyroid **16**(8): 715-24.

Gnidehou, S., B. Caillou, et al. (2004). "Iodotyrosine dehalogenase 1 (DEHAL1) is a transmembrane protein involved in the recycling of iodide close to the thyroglobulin iodination site." FASEB J **18**(13): 1574-6.

Goodhead, D. T. (1994). "Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA." Int J Radiat Biol **65**(1): 7-17.

Goodhead, D. T. and H. Nikjoo (1989). "Track structure analysis of ultrasoft X-rays compared to high- and low-LET radiations." Int J Radiat Biol **55**(4): 513-29.

Gorbunova, V., A. Seluanov, et al. (2002). "Expression of human telomerase (hTERT) does not prevent stress-induced senescence in normal human fibroblasts but protects the cells from stress-induced apoptosis and necrosis." J Biol Chem **277**(41): 38540-9.

Gorgoulis, V. G., L. V. Vassiliou, et al. (2005). "Activation of the DNA damage checkpoint

Grasberger, H. and S. Refetoff (2006). "Identification of the maturation factor for dual oxidase. Evolution of an eukaryotic operon equivalent." J Biol Chem **281**(27): 18269-72.

Grieco, M., A. Cerrato, et al. (1994). "Cloning and characterization of H4 (D10S170), a gene involved in RET rearrangements *in vivo*." Oncogene **9**(9): 2531-5.

Griffin, K. J., L. S. Kirschner, et al. (2004). "Down-regulation of regulatory subunit type 1A of protein kinase A leads to endocrine and other tumors." Cancer Res **64**(24): 8811-5.

Grosovsky, A. J. (1999). "Radiation-induced mutations in unirradiated DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(10): 5346-7.

- Guo, Z., R.** (2010) Deshpande, et al. "ATM activation in the presence of oxidative stress." Cell Cycle **9**(24): 4805-11.
- Gutteridge, J. M.** and B. Halliwell (1990). "The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems." Trends Biochem Sci **15**(4): 129-35.
- Hagan, M., L.** Wang, et al. (2000). "Ionizing radiation-induced mitogen-activated protein (MAP) kinase activation in DU145 prostate carcinoma cells: MAP kinase inhibition enhances radiation-induced cell killing and G2/M-phase arrest." Radiat Res **153**(4): 371-83
- Haij, S., A. C.** Bakker, et al. (2005). "NF-kappaB mediated IL-6 production by renal epithelial cells is regulated by c-jun NH2-terminal kinase." J Am Soc Nephrol **16**(6): 1603-11.
- Hallahan, D. E., D. R.** Spriggs, et al. (1989). "Increased tumor necrosis factor alpha mRNA after cellular exposure to ionizing radiation." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(24): 10104-7.
- Hallahan, D. E., D. R.** Spriggs, et al. (1989). "Increased tumor necrosis factor alpha mRNA after cellular exposure to ionizing radiation." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(24): 10104-7.
- Han, J.** and P. Sun (2007). "The pathways to tumor suppression via route p38." Trends Biochem Sci **32**(8): 364-71.
- Hancock SL,** Cox RS, McDougall IR. (1991). Thyroid diseases after treatment of Hodgkin's disease. N Engl J Med. Aug 29;325(9):599-605.
- Harper, R. W., C.** Xu, et al. (2005). "Differential regulation of dual NADPH oxidases/peroxidases, Duox1 and Duox2, by Th1 and Th2 cytokines in respiratory tract epithelium." FEBS Lett **579**(21): 4911-7.
- HENNEQUIN C.;** Giocanti N.; Averbek. (3) ; Favaudon V. (2) ;La protéine kinase dépendante de l'ADN (DNA-PK), une enzyme clé de la religation desc assures double-brin de l'ADN = Dna-dependent protein kinase (DNA-PK), a key enzyme in the re-ligation of DNA double-strand breaks Cancer radiothérapie, 1999, vol. 3, no4, pp. 289-295
- Hershey, G. K.** (2003). "IL-13 receptors and signaling pathways: an evolving web." J Allergy Clin Immunol **111**(4): 677-90; quiz 691.
- Hill, R. P., A.** Zaidi, et al. "Investigations into the role of inflammation in normal tissue response to irradiation." Radiother Oncol.
- Hirakawa, S., R.** Saito, et al. (2011) "Dual oxidase 1 induced by Th2 cytokines promotes STAT6 phosphorylation via oxidative inactivation of protein tyrosine phosphatase 1B in human epidermal keratinocytes." J Immunol **186**(8): 4762-70.

Hoeijmakers, J. H. (2001). "DNA repair mechanisms." *Maturitas* **38**(1): 17-22; discussion 22-3.

Hui, L., L. Bakiri, et al. (2007). "p38alpha: a suppressor of cell proliferation and tumorigenesis." *Cell Cycle* **6**(20): 2429-33.

Huyen, Y., O. Zgheib, et al. (2004). "Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks." *Nature* **432**(7015): 406-11.

Iervolino, A., R. Iuliano, et al. (2006). "The receptor-type protein tyrosine phosphatase J antagonizes the biochemical and biological effects of RET-derived oncoproteins." *Cancer Res* **66**(12): 6280-7.

Iliakis, G. (1997). "Cell cycle regulation in irradiated and nonirradiated cells." *Semin Oncol* **24**(6): 602-15.

Iliakis, G. E., L. Metzger, et al. (1991). "Detection of DNA double-strand breaks in synchronous cultures of CHO cells by means of asymmetric field inversion gel electrophoresis." *Int J Radiat Biol* **59**(2): 321-41.

Iliakis, G., G. Pantelias, et al. (1991). "Mechanism of radiosensitization by halogenated pyrimidines: effect of BrdU on cell killing and interphase chromosome breakage in radiation-sensitive cells." *Radiat Res* **125**(1): 56-64.

Imaizumi, M., T. Usa, et al. (2006). "Radiation dose-response relationships for thyroid nodules and autoimmune thyroid diseases in Hiroshima and Nagasaki atomic bomb survivors 55-58 years after radiation exposure." *JAMA* **295**(9): 1011-22.

Ito, T., T. Seyama, et al. (1993). "*In vitro* irradiation is able to cause RET oncogene rearrangement." *Cancer Res* **53**(13): 2940-3.

Ito, T., T. Seyama, et al. (1993). "*In vitro* irradiation is able to cause RET oncogene rearrangement." *Cancer Res* **53**(13): 2940-3.

Ito, T., T. Seyama, et al. (1994). "Activated RET oncogene in thyroid cancers of children from areas contaminated by Chernobyl accident." *Lancet* **344**(8917): 259.

Iwahori, S., Y. Yasui, et al. (2008). "Identification of phosphorylation sites on transcription factor Sp1 in response to DNA damage and its accumulation at damaged sites." *Cell Signal* **20**(10): 1795-803.

Iwashita, T., M. Kato, et al. (1999). "Biological and biochemical properties of Ret with kinase domain mutations identified in multiple endocrine neoplasia type 2B and familial medullary

thyroid carcinoma." *Oncogene* **18**(26): 3919-22.

Iyer, R., B. E. Lehnert, et al. (2000). "Factors underlying the cell growth-related *Bystander* responses to alpha particles." *Cancer Res* **60**(5): 1290-1298.

Jeggo, P. A. (1998). "DNA breakage and repair." *Adv Genet* **38**: 185-218.

Jhiang, S. M. (2000). "The RET proto-oncogene in human cancers." *Oncogene* **19**(49): 5590-5597.

Jhiang, S. M., J. Y. Cho, et al. (1998). "Thyroid carcinomas in RET/PTC transgenic mice." *Recent Results Cancer Res* **154**: 265-70.

Jing, S., D. Wen, et al. (1996). "GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF." *Cell* **85**(7): 1113-24.

Johnson, S. M., C. D. Torrice, et al. (2010). "Mitigation of hematologic radiation toxicity in mice through pharmacological quiescence induced by CDK4/6 inhibition." *J Clin Invest* **120**(7): 2528-2536.

Johnston, C. J., B. Piedboeuf, et al. (1996). "Early and persistent alterations in the expression of interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha mRNA levels in fibrosis-resistant and sensitive mice after thoracic irradiation." *Radiat Res* **145**(6): 762-7.

Jones, K. W., M. H. Shaper, et al. (1991). "Subtractive hybridization cloning of a tissue-specific extinguisher: TSE1 encodes a regulatory subunit of protein kinase A." *Cell* **66**(5): 861-72.

Jung, M. and A. Dritschilo (2001). "NF-kappa B signaling pathway as a target for human tumor radiosensitization." *Semin Radiat Oncol* **11**(4): 346-51.

Karin, M. (1999). "How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex." *Oncogene* **18**(49): 6867-74.

Karin, M. (2005). "Inflammation-activated protein kinases as targets for drug development." *Proc Am Thorac Soc* **2**(4): 386-90; discussion 394-5.

Karin, M. (2008). "The IkappaB kinase - a bridge between inflammation and cancer." *Cell Res* **18**(3): 334-42.

Kasai, H., Z. Yamaizumi, et al. (1986). "Detection and identification of mutagens by the adducts formed upon reaction with guanosine derivatives." *IARC Sci Publ*(70): 413-8.

Kawanishi, S., Y. Hiraku, et al. (2001). "Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging." *Mutat Res* **488**(1): 65-76.

Khanna, K. K. and S. P. Jackson (2001). "DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection." *Nat Genet* **27**(3): 247-254.

Kim, J. and P. K. Wong (2009). "Loss of ATM impairs proliferation of neural stem cells through oxidative stress-mediated p38MAPK signaling." *Stem Cells* **27**(8): 1987-98.

Kimura, T., A. Van Keymeulen, et al. (2001). "Regulation of thyroid cell proliferation by TSH and other factors: a critical evaluation of *in vitro* models." *Endocr Rev* **22**(5): 631-56.

Knauf JA, Ma X, Smith EP, Zhang L, Mitsutake N, Liao XH, Refetoff S, Nikiforov YE, Fagin JA. Targeted expression of BRAFV600E in thyroid cells of transgenic mice results in papillary thyroidcancers that undergo dedifferentiation. *Cancer Res.* 2005 May 15;65(10):4238-45.

Kokunai, T., S. Urui, et al. (2001). "Overcoming of radioresistance in human gliomas by p21WAF1/CIP1 antisense oligonucleotide." *J Neurooncol* **51**(2): 111-9.

Kosmidou, I., T. Vassilakopoulos, et al. (2002). "Production of interleukin-6 by skeletal myotubes: role of reactive oxygen species." *Am J Respir Cell Mol Biol* **26**(5): 587-93.

Krause, A., H. Holtmann, et al. (1998). "Stress-activated protein kinase/Jun N-terminal kinase is required for interleukin (IL)-1-induced IL-6 and IL-8 gene expression in the human epidermal carcinoma cell line KB." *J Biol Chem* **273**(37): 23681-9.

Krohn, K. and R. Paschke (2002). "Somatic mutations in thyroid nodular disease." *Mol Genet Metab* **75**(3): 202-8.

Krohn, K., J. Maier, et al. (2007). "Mechanisms of disease: hydrogen peroxide, DNA damage and mutagenesis in the development of thyroid tumors." *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* **3**(10): 713-20.

Kulkarni, S., C. Heath, et al. (2000). "Fusion of H4/D10S170 to the platelet-derived growth factor receptor beta in BCR-ABL-negative myeloproliferative disorders with a t(5;10)(q33;q21)." *Cancer Res* **60**(13): 3592-8.

Kultz, D. and K. Avila (2001). "Mitogen-activated protein kinases are *in vivo* transducers of osmosensory signals in fish gill cells." *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **129**(4): 821-9.

Kumagai, A., H. Namba, et al. (2004). "Low frequency of BRAFT1796A mutations in

childhood thyroid carcinomas." *J Clin Endocrinol Metab* **89**(9): 4280-4.

Kuwabara, M., K. Takahashi, et al. (2003). "Induction of apoptosis through the activation of SAPK/JNK followed by the expression of death receptor Fas in X-irradiated cells." *J Radiat Res (Tokyo)* **44**(3): 203-9.

Kwok, J. B., E. Gardner, et al. (1993). "Structural analysis of the human ret proto-oncogene using exon trapping." *Oncogene* **8**(9): 2575-82.

Lacroix, L., J. C. Soria, et al. (2005). "[Oncogenes and thyroid tumors]." *Bull Cancer* **92**(1): 37-43.

Lacroix, L., M. Nocera, et al. (2001). "Expression of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase flavoprotein DUOX genes and proteins in human papillary and follicular thyroid carcinomas." *Thyroid* **11**(11): 1017-1023.

Langberg, C. W., M. Hauer-Jensen, et al. (1994). "Expression of fibrogenic cytokines in rat small intestine after fractionated irradiation." *Radiother Oncol* **32**(1): 29-36.

Lania, L., B. Majello, et al. (1997). "Transcriptional regulation by the Sp family proteins." *Int J Biochem Cell Biol* **29**(12): 1313-23.

Lanzi, C., M. G. Borrello, et al. (1992). "Identification of the product of two oncogenic rearranged forms of the RET proto-oncogene in papillary thyroid carcinomas." *Oncogene* **7**(11): 2189-94.

Laurent, E., J. Mockel, et al. (1987). "Dual activation by thyrotropin of the phospholipase C and cyclic AMP cascades in human thyroid." *Mol Cell Endocrinol* **52**(3): 273-278.

Leach, J. K., G. Van Tuyle, et al. (2001). "Ionizing radiation-induced, mitochondria-dependent generation of reactive oxygen/nitrogen." *Cancer Res* **61**(10): 3894-901.

Lee, J. W., R. A. Zoumalan, et al. (2010) "Regulators and mediators of radiation-induced fibrosis: Gene expression profiles and a rationale for Smad3 inhibition." *Otolaryngol Head Neck Surg* **143**(4): 525-30.

Lee, S. J., C. E. Kim, et al. "HNE-induced 5-LO expression is regulated by NF- κ B/ERK and Sp1/p38MAPK pathways via EGF receptor in murine macrophages." *Cardiovasc Res* **88**(2): 352-9.

Lehnert, B. E., E. H. Goodwin, et al. (1997). "Extracellular factor(s) following exposure to alpha particles can cause sister chromatid exchanges in normal human cells." *Cancer Res* **57**(11): 2164-2171.

Lemoine NR, Mayall ES, Williams ED, Thurston V, Wynford-Thomas D. Agent-specific ras oncogene activation in rat **thyroid** tumours. *Oncogene*. **1988** Nov;3(5):541-4.

Lemoine NR, Mayall ES, Wyllie FS, Farr CJ, Hughes D, Padua RA, Thurston V, Williams ED, Wynford-Thomas D. Activated ras oncogenes in human thyroid cancers. *Cancer Res*. 1988 Aug 15;48(16):4459-63.

Li, Z., L. Xia, et al. (2001). "Effector genes altered in MCF-7 human breast cancer cells after exposure to fractionated ionizing radiation." *Radiat Res* **155**(4): 543-53.

Lima, J., V. Trovisco, et al. (2004). "BRAF mutations are not a major event in post-Chernobyl childhood thyroid carcinomas." *J Clin Endocrinol Metab* **89**(9): 4267-71.

Little, J. B. (2006). Cellular radiation effects and the *Bystander* response. *Mutat Res*, 597(1-2) :113–118.

Liu, Q., X. He, et al. (2008). "NADPH oxidase-mediated generation of reactive oxygen species: A new mechanism for X-ray-induced HeLa cell death." *Biochem Biophys Res Commun* **377**(3): 775-9.

Liu, W., I. Ding, et al. (2006). "Interleukin 1beta (IL1B) signaling is a critical component of radiation-induced skin fibrosis." *Radiat Res* **165**(2): 181-91.

Loeb, L. A. and B. D. Preston (1986). "Mutagenesis by apurinic/apyrimidinic sites." *Annu Rev Genet* **20**: 201-30.

Lorenzo, M. J., G. D. Gish, et al. (1997). "RET alternate splicing influences the interaction of activated RET with the SH2 and PTB domains of Shc, and the SH2 domain of Grb2." *Oncogene* **14**(7): 763-71.

Lu, X. and D. P. Lane (1993). "Differential induction of transcriptionally active p53 following UV or ionizing radiation: defects in chromosome instability syndromes?" *Cell* **75**(4): 765-78.

Lyle, A. N., N. N. Deshpande, et al. (2009). "Poldip2, a novel regulator of Nox4 and cytoskeletal integrity in vascular smooth muscle cells." *Circ Res* **105**(3): 249-59.

Maier, J., H. van Steeg, et al. (2006). "Deoxyribonucleic acid damage and spontaneous mutagenesis in the thyroid gland of rats and mice." *Endocrinology* **147**(7): 3391-7.

Mallardo, M., V. Giordano, et al. (1994). "DNA damaging agents increase the stability of interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-6 transcripts and the production of the relative proteins." *J Biol Chem* **269**(21): 14899-904

Manna, S. K., H. J. Zhang, et al. (1998). "Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses tumor necrosis factor-induced apoptosis and activation of nuclear transcription factor-kappaB and activated protein-1." *J Biol Chem* **273**(21): 13245-54.

Martin, A. and M. D. Scharff (2002). "AID and mismatch repair in antibody diversification." *Nat Rev Immunol* **2**(8): 605-14.

Martin, A., C. Hedinger, et al. (1988). "Structure and motility of primary cilia in the follicular epithelium of the human thyroid." *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* **55**(3): 159-66.

Martin, M., J. Lefaix, et al. (2000). "TGF-beta1 and radiation fibrosis: a master switch and a specific therapeutic target?" *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **47**(2): 277-90.

Martin, M., M. C. Vozenin, et al. (1997). "Coactivation of AP-1 activity and TGF-beta1 gene expression in the stress response of normal skin cells to ionizing radiation." *Oncogene* **15**(8): 981-9.

Martin-Garrido, A., D. I. Brown, et al. "NADPH oxidase 4 mediates TGF-beta-induced smooth muscle alpha-actin via p38MAPK and serum response factor." *Free Radic Biol Med* **50**(2): 354-62.

Melillo, R. M., M. D. Castellone, et al. (2005). "The RET/PTC-RAS-BRAF linear signaling cascade mediates the motile and mitogenic phenotype of thyroid cancer cells." *J Clin Invest* **115**(4): 1068-81.

Mikhailov, A., M. Shinohara, et al. (2004). "Topoisomerase II and histone deacetylase inhibitors delay the G2/M transition by triggering the p38MAPK checkpoint pathway." *J Cell Biol* **166**(4): 517-26.

Mikkelsen, R. (2004). "Redox signaling mechanisms and radiation-induced *Bystander* effects." *Hum Exp Toxicol* **23**(2): 75-9.

Misteli, T. and E. Soutoglou (2009). "The emerging role of nuclear architecture in DNA repair and genome maintenance." *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(4): 243-54.

Mitsutake N, Knauf JA, Mitsutake S, Mesa C Jr, Zhang L, Fagin JA Conditional BRAFV600E expression induces DNA synthesis, apoptosis, dedifferentiation, and chromosomal instability in thyroid PCCL3 cells. *Cancer Res.* 2005 Mar 15;65(6):2465-73.

Mitsutake, N., J. A. Knauf, et al. (2005). "Conditional BRAFV600E expression induces DNA synthesis, apoptosis, dedifferentiation, and chromosomal instability in thyroid PCCL3 cells." *Cancer Res* **65**(6): 2465-73.

Mizuno T, Iwamoto KS, Kyoizumi S, Nagamura H, Shinohara T, Koyama K, Seyama T, Hamatani K. Preferential induction of RET/PTC1 rearrangement by X-ray irradiation. *Oncogene*. 2000 Jan 20;19(3):438-43.

Mizuno, T., K. S. Iwamoto, et al. (2000). "Preferential induction of RET/PTC1 rearrangement by X-ray irradiation." *Oncogene* **19**(3): 438-43.

Monaco, C., R. Visconti, et al. (2001). "The RFG oligomerization domain mediates kinase activation and re-localization of the RET/PTC3 oncoprotein to the plasma membrane." *Oncogene* **20**(5): 599-608.

Morand, S., M. Chaaoui, et al. (2003). "Effect of iodide on nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activity and Duox2 protein expression in isolated porcine thyroid follicles." *Endocrinology* **144**(4): 1241-1248.

Moreno, J. C., E. Pauws, et al. (2001). "Cloning of tissue-specific genes using serial analysis of gene expression and a novel computational subtraction approach." *Genomics* **75**(1-3): 70-6.

Moreno, J. C. (2003). "Identification of novel genes involved in congenital hypothyroidism using serial analysis of gene expression." *Horm Res* **60 Suppl 3**: 96-10

Moreno, J. C., W. Klootwijk, et al. (2008). "Mutations in the iodotyrosine deiodinase gene and hypothyroidism." *N Engl J Med* **358**(17): 1811-8.

Mothersill, C. and C. Seymour (1997). "Medium from irradiated human epithelial cells but not human fibroblasts reduces the clonogenic survival of unirradiated cells." *Int J Radiat Biol* **71**(4): 421-7.

Mothersill, C. and C. Seymour (2001). "Radiation-induced *Bystander* effects: past history and future directions." *Radiat Res* **155**(6): 759-67.

Mothersill, C. and Seymour, C. B. (2006). Actions of radiation on living cells in the "post-bystander" era.

Mothersill, C. and Seymour, C. B. (2006). Radiation-induced *Bystander* effects and the DNA paradigm : an "out of field" perspective. *Mutat Res*, 597(1-2) :5–10.

Mothersill, C., Seymour, R. J., and Seymour, C. B. (2004). *Bystander* effects in repairdeficient cell lines. *Radiat Res*, 161(3) :256–263.

Muller, I. B., D. Domenicali-Pfister, et al. (2002). "Stage-specific requirement of a mitogen-activated protein kinase by *Trypanosoma brucei*." *Mol Biol Cell* **13**(11): 3787-

Murakumo, Y., M. Jijiwa, et al. (2006). "RET and neuroendocrine tumors." *Pituitary* **9**(3): 179-92.

Murakumo, Y., M. Jijiwa, et al. (2006). "RET and neuroendocrine tumors." *Pituitary* **9**(3): 179-9

Myers, S. M., C. Eng, et al. (1995). "Characterization of RET proto-oncogene 3' splicing variants and polyadenylation sites: a novel C-terminus for RET." *Oncogene* **11**(10): 2039-45.

Narayanan, P. K., E. H. Goodwin, et al. (1997). "Alpha particles initiate biological production of superoxide anions and hydrogen peroxide in human cells." *Cancer Res* **57**(18): 3963-71.

Narayanan, P. K., K. E. LaRue, et al. (1999). "Alpha particles induce the production of interleukin-8 by human cells." *Radiat Res* **152**(1): 57-63.

Nikiforov Y. E., J. M. Rowland, et al. (1997). "Distinct pattern of ret oncogene rearrangements in morphological variants of radiation-induced and sporadic thyroid papillary carcinomas in children." *Cancer Res* **57**(9): 1690-4.

Nikiforov, Y. E. (2011). "Molecular diagnostics of thyroid tumors." *Arch Pathol Lab Med* **135**(5): 569-577.

Nikiforov, Y. E., A. Koshoffer, et al. (1999). "Chromosomal breakpoint positions suggest a direct role for radiation in inducing illegitimate recombination between the ELE1 and RET genes in radiation-induced thyroid carcinomas." *Oncogene* **18**(46): 6330-4.

Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, Biddinger PW, Knauf JA, Basolo F, Zhu Z, Giannini R, Salvatore G, Fusco A, Santoro M, Fagin JA, Nikiforov YE. BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 Nov;88(11):5399-404.

Nikiforova, M. N., J. R. Stringer, et al. (2000). "Proximity of chromosomal loci that participate in radiation-induced rearrangements in human cells." *Science* **290**(5489): 138-41.

Orlowski, R. Z. and A. S. Baldwin, Jr. (2002). "NF-kappaB as a therapeutic target in cancer." *Trends Mol Med* **8**(8): 385-9.

Pachnis, V., B. Mankoo, et al. (1993). "Expression of the c-ret proto-oncogene during mouse embryogenesis." *Development* **119**(4): 1005-1017.

Pachucki, J., D. Wang, et al. (2004). "Structural and functional characterization of the two human ThOX/Duox genes and their 5'-flanking regions." *Mol Cell Endocrinol* **214**(1-2): 53-62.

- Palmer-Crocker, R. L., C. C. Hughes, et al.** (1996). "IL-4 and IL-13 activate the JAK2 tyrosine kinase and Stat6 in cultured human vascular endothelial cells through a common pathway that does not involve the gamma c chain." *J Clin Invest* **98**(3): 604-9.
- Park, S., J. Y. Ahn, et al.** (2010). "Sustained expression of NADPH oxidase 4 by p38MAPK-Akt signaling potentiates radiation-induced differentiation of lung fibroblasts." *J Mol Med (Berl)* **88**(8): 807-16.
- Pasi, F., A. Facoetti, et al.** (2010). "IL-8 and IL-6 *Bystander* signalling in human glioblastoma cells exposed to gamma radiation." *Anticancer Res* **30**(7): 2769-2772.
- Pasini, B., R. M. Hofstra, et al.** (1995). "The physical map of the human RET proto-oncogene." *Oncogene* **11**(9): 1737-43.
- Passos, J. F., G. Nelson, et al.** "Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence." *Mol Syst Biol* **6**: 347.
- Paull, T. T., E. P. Rogakou, et al.** (2000). "A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage." *Curr Biol* **10**(15): 886-895.
- Pazhanisamy, S. K., H. Li, et al** (2011). "NADPH oxidase inhibition attenuates total body irradiation-induced haematopoietic genomic instability." *Mutagenesis* **26**(3): 431-5.
- Pearson, L. L., B. E. Castle, et al.** (2001). "CD40-mediated signaling in monocytic cells: up-regulation of tumor necrosis factor receptor-associated factor mRNAs and activation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways." *Int Immunol* **13**(3): 273-83.
- Peterson, C. L. and J. Cote** (2004). "Cellular machineries for chromosomal DNA repair." *Genes Dev* **18**(6): 602-16.
- Pierotti, M. A. and A. Greco** (2006). "Oncogenic rearrangements of the NTRK1/NGF receptor." *Cancer Lett* **232**(1): 90-8.
- Pierotti, M. A., I. Bongarzone, et al.** (1996). "Cytogenetics and molecular genetics of carcinomas arising from thyroid epithelial follicular cells." *Genes Chromosomes Cancer* **16**(1): 1-14.
- Pierotti, M. A., M. Santoro, et al.** (1992). "Characterization of an inversion on the long arm of chromosome 10 juxtaposing D10S170 and RET and creating the oncogenic sequence RET/PTC." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(5): 1616-20.
- Poncin, S., B. Lengele, et al.** (2008). "Differential interactions between Th1/Th2, Th1/Th3, and Th2/Th3 cytokines in the regulation of thyroperoxidase and dual oxidase expression, and of thyroglobulin secretion in thyrocytes *in vitro*." *Endocrinology* **149**(4): 1534-42.

Powell, N., S. Jeremiah, et al. (2005). "Frequency of BRAF T1796A mutation in papillary thyroid carcinoma relates to age of patient at diagnosis and not to radiation exposure." *J Pathol* **205**(5): 558-64.

Prise, K. M. (1994). "Use of radiation quality as a probe for DNA lesion complexity." *Int J Radiat Biol* **65**(1): 43-8. A number of studies have examined the possible relationships between either initial

Prise, K. M., M. Folkard, et al. (1994). "Effect of radiation quality on lesion complexity in cellular DNA." *Int J Radiat Biol* **66**(5): 537-42.

Rabes, H. M., E. P. Demidchik, et al. (2000). "Pattern of radiation-induced RET and NTRK1 rearrangements in 191 post-chernobyl papillary thyroid carcinomas: biological, phenotypic, and clinical implications." *Clin Cancer Res* **6**(3): 1093-103.

Raman, M., S. Earnest, et al. (2007). "TAO kinases mediate activation of p38 in response to DNA damage." *EMBO J* **26**(8): 2005-14.

Rameh, L. E. and L. C. Cantley (1999). "The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function." *J Biol Chem* **274**(13): 8347-8350.

Reardon, D. B., J. N. Contessa, et al. (1999). "Dominant negative EGFR-CD533 and inhibition of MAPK modify JNK1 activation and enhance radiation toxicity of human mammary carcinoma cells." *Oncogene* **18**(33): 4756-66. Exposure of MDA-MB-231 human mammary carcinoma cells to an ionizing radiation

Reinhardt, H. C., A. S. Aslanian, et al. (2007). "p53-deficient cells rely on ATM- and ATR-mediated checkpoint signaling through the p38MAPK/MK2 pathway for survival after DNA damage." *Cancer Cell* **11**(2): 175-89.

Roberts, C. K., R. J. Barnard, et al. (2006). "Oxidative stress and dysregulation of NAD(P)H oxidase and antioxidant enzymes in diet-induced metabolic syndrome." *Metabolism* **55**(7): 928-34.

Rodier, F., J. P. Coppe, et al. (2009). "Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion." *Nat Cell Biol* **11**(8): 973-9.

Rogakou, E. P., D. R. Pilch, et al. (1998). "DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139." *J Biol Chem* **273**(10): 5858-68.

Roger, P., M. Taton, et al. (1988). "Mitogenic effects of thyrotropin and adenosine 3',5'-monophosphate in differentiated normal human thyroid cells *in vitro*." *J Clin Endocrinol Metab* **66**(6): 1158-1165.

Ron E, Lubin JH, Shore RE, Mabuchi K, Modan B, Pottern LM, Schneider AB, Tucker MA, Boice JD Jr. (1995) Thyroid cancer after exposure to external radiation: a pooled analysis of seven studies. *Radiat Res.* Mar;141(3):259-77.

Rubin, P., C. J. Johnston, et al. (1995). "A perpetual cascade of cytokines postirradiation leads to pulmonary fibrosis." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **33**(1): 99-109.

Safe, S. and K. Kim (2004). "Nuclear receptor-mediated transactivation through interaction with Sp proteins." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **77**: 1-36.

Saitoh, M., H. Nishitoh, et al. (1998). "Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK 1)." *EMBO J* **17**(9): 2596-606.

Saji, M., S. Ikuyama, et al. (1991). "Increases in cytosolic Ca⁺⁺ down regulate thyrotropin receptor gene expression by a mechanism different from the cAMP signal." *Biochem Biophys Res Commun* **176**(1): 94-101.

Saleh-Gohari, N. and T. Helleday (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**(12): 3683-8.

Salvatore G, De Falco V, Salerno P, Nappi TC, Pepe S, Troncone G, Carlomagno F, Melillo RM, Wilhelm SM, Santoro M. BRAF is a therapeutic target in aggressive **thyroid** carcinoma. *Clin Cancer Res.* **2006** Mar 1;12(5):1623-9.

Salvatore, G., V. De Falco, et al. (2006). "BRAF is a therapeutic target in aggressive thyroid carcinoma." *Clin Cancer Res* **12**(5): 1623-1629.

Sancar, A., L. A. Lindsey-Boltz, et al. (2004). "Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints." *Annu Rev Biochem* **73**: 39-85.

Santoro, M., R. M. Melillo, et al. (2006). "RET/PTC activation in papillary thyroid carcinoma: European Journal of Endocrinology Prize Lecture." *Eur J Endocrinol* **155**(5): 645-53.

Schlezing, J. J., B. A. Jensen, et al. (2002). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated NF-kappa B activation and apoptosis in pre-B cells." *J Immunol* **169**(12): 6831-41. Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J Biol Chem.* 2000 Jul 28;275(30):23227-33

Schlumberger M, et Pacini, F Tumeurs de la thyroïde, Editions nucleon (1997)

Schlumberger M, Papillary and follicular thyroid carcinoma. *Ann Endocrinol* 2007 (Paris)

Schlumberger, M., J. P. Travagli, et al. (1987). "Differentiated thyroid carcinoma in childhood. Experience at Institut Gustave-Roussy, Villejuif." *Acta Otorhinolaryngol Belg* **41**(5): 804-808.

Schlumberger, M., S. Chevillard, et al. "[Thyroid cancer following exposure to ionising radiation]." *Cancer Radiother* **15**(5): 394-9.

Schreck, R., P. Rieber, et al. (1991). "Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1." *EMBO J* **10**(8): 2247-58.

Schuchardt, A., V. D'Agati, et al. (1994). "Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret." *Nature* **367**(6461): 380-383.

Schuchardt, A., V. D'Agati, et al. (1994). "Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret." *Nature* **367**(6461): 380-3.

Schwarzer, C., T. E. Machen, et al. (2004). "NADPH oxidase-dependent acid production in airway epithelial cells." *J Biol Chem* **279**(35): 36454-61.

Segal, A. W., O. T. Jones, et al. (1978). "Absence of a newly described cytochrome b from neutrophils of patients with chronic granulomatous disease." *Lancet* **2**(8087): 446-449.

Sen, C. K. and L. Packer (1996). "Antioxidant and redox regulation of gene transcription." *FASEB J* **10**(7): 709-20.

Shiloh, Y. (1997). "Ataxia-telangiectasia and the Nijmegen breakage syndrome: related disorders but genes apart." *Annu Rev Genet* **31**: 635-62.

Shin, M. H., G. E. Rhie, et al. (2005). "H₂O₂ accumulation by catalase reduction changes MAP kinase signaling in aged human skin *in vivo*." *J Invest Dermatol* **125**(2): 221-9.

Shore, R. E. (1992). "Issues and epidemiological evidence regarding radiation-induced thyroid cancer." *Radiat Res* **131**(1): 98-111.

Siddiqi, M. A. and E. Bothe (1987). "Single- and double-strand break formation in DNA irradiated in aqueous solution: dependence on dose and OH radical scavenger concentration." *Radiat Res* **112**(3): 449-63.

Sithanandam, G., T. Druck, et al. (1992). "B-raf and a B-raf pseudogene are located on 7q in man." *Oncogene* **7**(4): 795-9.

Soares P, Máximo V, Sobrinho-Simões M. (2003) Molecular pathology of papillary, follicular and Hürthle.

- Sokolov, M. V.,** L. B. Smilenov, et al. (2005). "Ionizing radiation induces DNA double-strand breaks in *Bystander* primary human fibroblasts." *Oncogene* **24**(49): 7257-65.
- Song, Y.,** J. Ruf, et al. "Association of duoxes with thyroid peroxidase and its regulation in thyrocytes." *J Clin Endocrinol Metab* **95**(1): 375-82.
- Stahlberg N.,** R. Merino, et al. (2005). "Exploring hepatic hormone actions using a compilation of gene expression profiles." *BMC Physiol* **5**(1): 8.
- Storm, S. M.** and U. R. Rapp (1993). "Oncogene activation: c-raf-1 gene mutations in experimental and naturally occurring tumors." *Toxicol Lett* **67**(1-3): 201-210.
- Sturrock, A.,** B. Cahill, et al. (2006). "Transforming growth factor-beta1 induces Nox4 NAD(P)H oxidase and reactive oxygen species-dependent proliferation in human pulmonary artery smooth muscle cells." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **290**(4): L661-L673.
- Sumimoto, H.** (2008). "Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species." *FEBS J* **275**(13): 3249-77.
- Sun, P.,** N. Yoshizuka, et al. (2007). "PRAK is essential for ras-induced senescence and tumor suppression." *Cell* **128**(2): 295-308.
- Sutherland, B. M.,** P. V. Bennett, et al. (2000). "Clustered damages and total lesions induced in DNA by ionizing radiation: oxidized bases and strand breaks." *Biochemistry* **39**(27): 8026-31.
- Tabata, C.,** H. Kubo, et al. (2006). "All-trans retinoic acid modulates radiation-induced proliferation of lung fibroblasts via IL-6/IL-6R system." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **290**(3): L597-606.
- Takahashi, A.** and T. Ohnishi (2005). "Does gammaH2AX foci formation depend on the presence of DNA double strand breaks?" *Cancer Lett* **229**(2): 171-9.
- Takahashi, M.,** J. Ritz, et al. (1985). "Activation of a novel human transforming gene, ret, by DNA rearrangement." *Cell* **42**(2): 581-8.
- Terabe, M.,** J. M. Park, et al. (2004). "Role of IL-13 in regulation of anti-tumor immunity and tumor growth." *Cancer Immunol Immunother* **53**(2): 79-85.
- Thornton, T. M.** and M. Rincon (2009). "Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival." *Int J Biol Sci* **5**(1): 44-51.
- Tolando, R.,** A. Jovanovic, et al. (2000). "Reactive oxygen species and proinflammatory

cytokine signaling in endothelial cells: effect of selenium supplementation." *Free Radic Biol Med* **28**(6): 979-86.

Tong, Q., S. Xing, et al. (1997). "Leucine zipper-mediated dimerization is essential for the PTC1 oncogenic activity." *J Biol Chem* **272**(14): 9043-7.

Torres, M. (2003). "Mitogen-activated protein kinase pathways in redox signaling." *Front Biosci* **8**: d369-91.

Torres, M. and H. J. Forman (2003). "Redox signaling and the MAP kinase pathways." *Biofactors* **17**(1-4): 287-296.

Treanor, J. J., L. Goodman, et al. (1996). "Characterization of a multicomponent receptor for GDNF." *Nature* **382**(6586): 80-3.

Trovisco, V., P. Soares, et al. (2005). "Type and prevalence of BRAF mutations are closely associated with papillary thyroid carcinoma histotype and patients' age but not with tumour aggressiveness." *Virchows Arch* **446**(6): 589-95.

Tubiana, M. (2009). "[Prevention of cancer and the dose-effect relationship: the carcinogenic effects of ionizing radiations]." *Cancer Radiother* **13**(4): 238-58.

Ueno, N., R. Takeya, et al. (2005). "The NADPH oxidase Nox3 constitutively produces superoxide in a p22phox-dependent manner: its regulation by oxidase organizers and activators." *J Biol Chem* **280**(24): 23328-23339.

Valencia, A., A. Rajadurai, et al. (2006). "7-Dehydrocholesterol enhances ultraviolet A-induced oxidative stress in keratinocytes: roles of NADPH oxidase, mitochondria, and lipid rafts." *Free Radic Biol Med* **41**(11): 1704-18.

Valerie, K., A. Yacoub, et al. (2007). "Radiation-induced cell signaling: inside-out and outside-in." *Mol Cancer Ther* **6**(3): 789-801.

van den Hove, M. F., K. Croizet-Berger, et al. (2006). "The loss of the chloride channel, ClC-5, delays apical iodide efflux and induces a euthyroid goiter in the mouse thyroid gland." *Endocrinology* **147**(3): 1287-1296.

Van der Meeren, A., M. Vandamme, et al. (2003). "Inflammatory reaction and changes in expression of coagulation proteins on lung endothelial cells after total-body irradiation in mice." *Radiat Res* **160**(6): 637-46

Verheij, M., G. A. Ruiter, et al. (1998). "The role of the stress-activated protein kinase (SAPK/JNK) signaling pathway in radiation-induced apoptosis." *Radiother Oncol* **47**(3):

22532.

Volpato, C. B., M. Martinez-Alfaro, et al. (2008). "Enhanced sensitivity of the RET proto-oncogene to ionizing radiation *in vitro*." *Cancer Res* **68**(21): 8986-92.

Voskanian, K., G. V. Mitsyn, et al. (2009). "[Manifestation of the adaptive response and *Bystander*-effect of C3H10T1/2 fibroblasts irradiated by protons and gamma-rays]." *Aviakosm Ekolog Med* **43**(6): 23-28. Adaptive response and *Bystander*-effect were studied in mice fibroblasts

Vrana, J. A., S. Grant, et al. (1999). "Inhibition of the MAPK pathway abrogates BCL2-mediated survival of leukemia cells after exposure to low-dose ionizing radiation." *Radiat Res* **151**(5): 559-69.

Wagner, E. F. and A. R. Nebreda (2009). "Signal integration by JNK and p38MAPK pathways in cancer development." *Nat Rev Cancer* **9**(8): 537-49.

Wang, D., X. De Deken, et al. (2005). "Identification of a novel partner of duox: EFP1, a thioredoxin-related protein." *J Biol Chem* **280**(4): 3096-103.

Wang, J., H. Zheng, et al. (1998). "Cellular sources of transforming growth factor-beta isoforms in early and chronic radiation enteropathy." *Am J Pathol* **153**(5): 1531-40.

Wang, J., J. A. Knauf, et al. (2003). "Conditional expression of RET/PTC induces a weak oncogenic drive in thyroid PCCL3 cells and inhibits thyrotropin action at multiple levels." *Mol Endocrinol* **17**(7): 1425-36.

Ward, J. F. (1985). "Biochemistry of DNA lesions." *Radiat Res Suppl* **8**: S103-11.

Ward, J. F. (1997). *Nature of lesions formed by ionizing radiation., volume II. DNA*

Weyemi, U., B. Caillou, et al (2009). "Intracellular expression of reactive oxygen species-generating NADPH oxidase NOX4 in normal and cancer thyroid tissues." *Endocr Relat Cancer* **17**(1): 27-37.

Williams, D. (1996). "Thyroid cancer and the Chernobyl accident." *J Clin Endocrinol Metab* **81**(1): 6-8.

WOLFF J, CHAIKOFF IL. (1948) *J Biol Chem.* 1948 Feb;172(2):855. The inhibitory action of iodide upon organic binding of iodine by the normal thyroid gland.

Wymann, M. P. and L. Pirola (1998). "Structure and function of phosphoinositide 3-kinases." *Biochim Biophys Acta* **1436**(1-2): 127-150.

Wynford-Thomas, D., P. Smith, et al. (1987). "Proliferative response to cyclic AMP elevation of thyroid epithelium in suspension culture." Mol Cell Endocrinol **51**(1-2): 163-166.

Xia, D. H., L. Xi, et al (2009). "The protective effects of ambroxol on radiation lung injury and influence on production of transforming growth factor beta1 and tumor necrosis factor alpha." Med Oncol **27**(3): 697-701.

XIAOXIA LI. (2003) ,NFkB-Dependent Signaling Pathways, mol cell

Xing, M., R. P. Tufano, et al. (2004). "Detection of BRAF mutation on fine needle aspiration biopsy specimens: a new diagnostic tool for papillary thyroid cancer." J Clin Endocrinol Metab **89**(6): 2867-72. Numerous biomolecular markers have been studied to improve the accuracy of fine

Yamashita, M., M. Ukai-Tadenuma, et al. (2002). "Identification of a conserved GATA3 response element upstream proximal from the interleukin-13 gene locus." J Biol Chem **277**(44): 42399-408.

Yang, C. R., C. Wilson-Van Patten, et al. (2000). "Coordinate modulation of Sp1, NF-kappa B, and p53 in confluent human malignant melanoma cells after ionizing radiation." FASEB J **14**(2): 379-90.

Yen, P. M. and S. Y. Cheng (2003). "Germline and somatic thyroid hormone receptor mutations in man." J Endocrinol Invest **26**(8): 780-7.

Yunis, J. J. and A. L. Soreng (1984). "Constitutive fragile sites and cancer." Science **226**(4679): 1199-204.

Zamproni, I., H. Grasberger, et al. (2008). "Biallelic inactivation of the dual oxidase maturation factor 2 (DUOXA2) gene as a novel cause of congenital hypothyroidism." J Clin Endocrinol Metab **93**(2): 605-10.

Zhang, W. and H. T. Liu (2002). "MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells." Cell Res **12**(1): 9-18.

Zhao, H., F. Traganos, et al. (2008). "Oxidative stress induces cell cycle-dependent Mre11 recruitment, ATM and Chk2 activation and histone H2AX phosphorylation." Cell Cycle **7**(10): 1490-5.

Zhao, Z., Q. Wei, et al. (2009). "Genetic copy number alterations and IL-13 expression differences in papillary thyroid cancers and benign nodules." Endocrine **36**(1): 155-160

Zhong, S., L. Delva, et al. (1999). "A RA-dependent, tumour-growth suppressive transcription complex is the target of the PML-RARalpha and T18 oncoproteins." Nat Genet **23**(3): 287-295.

Zhou, D., T. Yu, et al. (2001). "Effects of NF-kappaB1 (p50) targeted gene disruption on ionizing radiation-induced NF-kappaB activation and TNFalpha, IL-1alpha, IL-1beta and IL-6 mRNA expression *in vivo*." *Int J Radiat Biol* **77**(7): 763-72.

Zhou, H., G. Randers-Pehrson, et al. (2000). "Induction of a *Bystander* mutagenic effect of alpha particles in mammalian cells." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(5): 2099-104.

Zhou, H., V. N. Ivanov, et al. (2005). "Mechanism of radiation-induced *Bystander* effect: role of the cyclooxygenase-2 signaling pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(41): 14641-14646.

Zhu, Z., M. Gandhi, et al. (2003). "Molecular profile and clinical-pathologic features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. An unusually high prevalence of ras mutations." *Am J Clin Pathol* **120**(1): 71-7.

Zimmermann, J. S. and B. Kimmig (1998). "Pharmacological management of acute radiation morbidity." *Strahlenther Onkol* **174 Suppl 3**: 62-5.

