



**HAL**  
open science

# Rôle du système générateur d'espèces réactives de l'oxygène NOX4-p22phox dans la thyroïde humaine : implication dans la prolifération et la différenciation thyroïdienne

Jérémy Cailloux

## ► To cite this version:

Jérémy Cailloux. Rôle du système générateur d'espèces réactives de l'oxygène NOX4-p22phox dans la thyroïde humaine : implication dans la prolifération et la différenciation thyroïdienne. Cancer. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT : 2014PA11T064 . tel-01451346

**HAL Id: tel-01451346**

**<https://theses.hal.science/tel-01451346>**

Submitted on 1 Feb 2017

**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.

UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 419 :  
BIOSIGNE

Laboratoire : *Stabilité génétique et oncogénèse (CNRS, UMR 8200)*

## THÈSE DE DOCTORAT

ASPECTS MOLÉCULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

par

**Jérémy CAILLOUX**

Rôle du système générateur d'espèces réactives de l'oxygène  
NOX4-p22<sup>phox</sup> dans la thyroïde humaine : implication dans la  
prolifération et la différenciation thyroïdienne.

Date de soutenance : 17/11/2014

Composition du jury :

Dr. Schumacher Michael	Président
Dr. Miot Françoise	Rapporteur
Dr. Lardy Bernard	Rapporteur
Pr. Benihoud Karim	Examineur
Dr. Dang My-Chan	Examineur
Dr. Dupuy Corinne	Directrice de thèse

## 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 Lardy, d'avoir accepté le rôle de rapporteur de ce manuscrit.

Je remercie le Docteur My Chan Dang et le Professeur Karim Benihoud en qualité d'examineurs.

Je remercie le Docteur Corinne Dupuy, ma directrice de thèse, qui m'a permis de me présenter au concours doctoral, et qui en m'accueillant au sein du groupe thyroïde m'a permis de réaliser ce travail. Je souhaite lui exprimer toute ma reconnaissance.

Je remercie chaleureusement le Docteur Jean-Claude Ehrhart pour son aide et son soutien lors de la rédaction de ce manuscrit.

Ce travail a été réalisé au sein de l'unité UMR 8200 dirigée par le Docteur Patricia Kanouche, que je tiens à remercier pour son soutien. Je remercie également tous les membres de l'unité pour leur aide durant mes trois années de thèse, et tout particulièrement Myriem, Urbain, Noémie, Sanah, Camille, Xavier, Jacques, José, Dorine, Morwena, Imène, Ibtissam, Naïma, Rabii et Amélie.

Je remercie Monique Talbot pour sa contribution quant aux travaux d'immunohistochimie exposés dans ce manuscrit. Je remercie également le Docteur Bernard Caillou pour sa sympathie et pour qui je garderais toujours une pensée affective.

Je remercie le Docteur Christian Bressy pour m'avoir initié à l'expérimentation animale, ainsi qu'en qualité d'ami. Je remercie au même titre le Docteur Najat Raddi. Je remercie également les membres de l'UMR 8203 pour leurs conseils et leur aide pendant mon master et par la suite. Karim, tu as su repousser mes limites et m'a permis d'obtenir brillamment mon master, sans quoi je ne serais arrivé jusqu'ici. Je te remercie sincèrement.

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

Enfin, je remercie mes parents et tous mes proches pour leur soutien au quotidien, leurs conseils et leurs encouragements.

## Abréviations

<b>7TMR :</b>	Récepteurs à 7 domaines trans membranaires
<b>AC :</b>	Adénylate cyclase
<b>ADN :</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ADNc :</b>	ADN complémentaire
<b>AIT :</b>	Apical Iodide Transporter
<b>AMPc :</b>	AMP cyclique
<b>Ang-1:</b>	Angiotensine 1
<b>ARN:</b>	Acide ribonucléique
<b>ARNm:</b>	ARN messenger
<b>ASK1:</b>	Apoptosis Signal-regulated Kinase 1
<b>Asp :</b>	Acide aspartique
<b>ATC :</b>	Cancer anaplasique de la thyroïde
<b>ATP:</b>	Adénosine Tri-Phosphate
<b>BMPs:</b>	Bone Morphogenic Proteins
<b>BRAF:</b>	Murine sarcoma viral oncogene homolog B
<b>Ca<sup>2+</sup>:</b>	Calcium
<b>CAT :</b>	Catalase
<b>CGD :</b>	Chronic Granulomatosis Disease
<b>CHO :</b>	Chinese Hamster Ovary
<b>CLC5 :</b>	Chloride channel-5
<b>ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> :</b>	Perchlorate
<b>CMT :</b>	Carcinome médullaire de la thyroïde
<b>CRE :</b>	Inducible cAMP early repressor ou ICER
<b>D1 :</b>	5'désiodase de type I ou iodothyronine désiodase 1
<b>D2 :</b>	5'désiodase de type II ou iodothyronine désiodase 2
<b>D3 :</b>	5'désiodase de type III ou iodothyronine désiodase 3
<b>DAG :</b>	Diacylglycérol
<b>DIT :</b>	Diodotyrosine
<b>DNA :</b>	Desoxyribonucleic Acid
<b>DSB :</b>	Double strand break ou cassures double brin
<b>DUOX :</b>	Dual Oxydase
<b>DUOX2 :</b>	Dual Oxydase 2
<b>EGF :</b>	Epidermal Growth Factor
<b>EMT :</b>	Epithelial to Mesenchymal Transition
<b>ERK :</b>	Extracellular-signal-regulated kinase
<b>FGF :</b>	Fibroblast Growth Factor
<b>Fk :</b>	Forskoline
<b>FTC :</b>	Cancer folliculaire de la thyroïde
<b>GCL :</b>	Gamma-glutamylcystéine synthétase ou glutamate cysteine ligase
<b>GDP :</b>	Guanosine diphosphate
<b>GPCRs :</b>	G Protein Coupled Receptors
<b>Gpx:</b>	Glutathion peroxydase
<b>GRK:</b>	G Protein Coupled Receptor Kinase
<b>GSH:</b>	Gluthation sulfhydryle

**GSR / GR:** Glutathion reductase  
**GSSG:** Glutathion disulfide  
**GTP :** Guanosine triphosphate  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peroxyde d'hydrogène  
**HGF:** Hepatocyte Growth Factor  
**HIF-1:** Hypoxia Inducible Factor-1  
**HOCl:** Acide hypochlorique  
**HSA:** Sérumalbumine  
**HT:** Hormones thyroïdiennes  
**I<sup>-</sup> :** Iodure/Iodine  
**IGF-1:** Insulin Like Growth Factor 1  
**IGF1-R** IGF-1 Receptor  
**IP3 :** Inositol 1,4,5-trisphosphate  
**I-Samds :** Inhibitory Smads  
**JNK :** Junk  
**kDa :** kilo Dalton  
**Leu :** Leucine  
**LT4 :** L-Thyroxine ou lévothyroxine  
**MAPK:** Mitogen Activated Protein Kinase  
**MAPKKK :** Mitogen Activated Kinase Kinase Kinase  
**MIT :** Monoiodotyrosine  
**MPO :** Myeloperoxidase  
**mRNA:** Messenger RNA  
**MT1 :** Métallothionein 1  
**mTOR :** Mammalian target of rapamycin  
**NAC :** N-acetyl cysteine  
**NADPH:** Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate  
**NIS :** Sodium (Na<sup>+</sup>)/Iodide (I<sup>-</sup>) Symporter  
**NOX :** NADPH oxydase  
**·OH :** Radicaux hydroxyles  
**·O<sub>2</sub><sup>-</sup> :** Anion superoxyde  
**Pax8:** Paired box gene 8  
**PDGF :** Platelet-Derived Growth Factor  
**PDTC :** Cancer thyroïdien pauvrement différencié  
**PEDF :** Pigment Epithelium Derived Factor  
**ONOO<sup>-</sup> :** Peroxynitrite  
**PI :** Phospho-inositides  
**PIP2 :** Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate  
**PKA:** Protein Kinase A  
**PLC :** Phospholipase C  
**PLC-β :** Phospholipase C-β  
**PPARγ :** Peroxisome proliferator-activated receptor gamma  
**PTC :** Cancer papillaire de la thyroïde  
**PTPs :** Protéines Tyrosine Phosphatases  
**RE :** Réticulum Endoplasmique  
**RI :** Rayonnements ionisants  
**RNA :** Ribonucleic Acid

**rNIS** : Rat NIS  
**SCN<sup>-</sup>** : Thiocyanate  
**siRNA** : Small-inhibitory RNA  
**SOD** : Superoxyde dismutase  
**SPECT** : Single-photon Emission Computed Tomography  
**T3** : Triiodothyronine  
**T4** : Thyroxine  
**TBG** : Thyroxin Binding Globulin  
**TBPA** : Thyroxin Binding Prealbumin  
**TBRI** : TGF- $\beta$  Receptor I  
**TBRII** : TGF- $\beta$  Receptor II  
**TETRAC** : Tetraiodothyroacetic Acid  
**Tg** : Thyroglobuline  
**TGF- $\beta$**  : Transforming Growth Factor  $\beta$   
**Thr** : Threonine  
**TPO** : Thyroperoxydase  
**TRH** : Thyroid Releasing Hormone  
**TRIAC** : 3,3',5-triiodothyroacetic acid  
**Trx1** : Thiorédoxine  
**TR $\alpha$ 1** : Thyronine Receptor  $\alpha$ -1  
**TR $\alpha$ 3** : Thyronine Receptor  $\alpha$ -3  
**TR $\beta$ 1** : Thyronine Receptor  $\beta$ -1  
**TR $\beta$ 2** : Thyronine Receptor  $\beta$ -2  
**TSH** : Thyroid Stimulating Hormone ou thyrotropine  
**TSHR** : TSH-Receptor  
**TTF-1** : Thyroid Transcription Factor 1  
**TTF-2** : Thyroid Transcription Factor 2  
**Tyr** : Tyrosine  
**VEGF** : Vascular Endothelial Growth Factor  
**VEGF** : Vascular Endothelial Growth Factor  
**VEGFR** : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

# Sommaire

Introduction.....	5
I. La Physiologie de la thyroïde .....	6
A. Aspects morphologiques et histologiques de la thyroïde .....	6
B. Rôles physiologiques de la thyroïde .....	7
C. Métabolisme de l'iode dans la thyroïde : synthèse, catabolisme et modes d'action des hormones thyroïdiennes .....	7
1. Le symporteur Na <sup>+</sup> /I <sup>-</sup> (NIS) et le transport basolatéral de l'iode .....	9
2. L'organification de l'iode et la biosynthèse des hormones T3 et T4.....	10
3.....	11
4. Sécrétion et transport des HT.....	12
5. La désiodation de la pro-hormone T4 en T3 .....	12
6. La reconnaissance du signal de la T3 au niveau des tissus cibles .....	14
7. Autorégulation du transport de l'iode .....	14
D. Aspects moléculaires de la physiologie thyroïdienne.....	15
1. La transduction du signal TSH/TSH-R.....	16
a. Le TSH-R: un récepteur couplé aux protéines G .....	16
b. La voie de l'AMPC.....	19
c. La voie des phospho-inositides.....	21
d. Mécanismes d'autorégulation et de désensibilisation du TSH-R.....	22
e. Régulation transcriptionnelle de la fonction thyroïdienne .....	22
f. Interactions avec la voie MAPK.....	24
g. Interactions entre la signalisation TSH/TSH-R et les facteurs de croissance .....	25
2. Rôle de la voie du TGF-beta dans la régulation de l'homéostasie thyroïdienne .....	27
a. La signalisation TGF-β/Smad .....	27
b. Régulation de la prolifération et de la différenciation thyroïdiennes par le TGF-β.....	29
c. Utilisation des propriétés de captation d'iode du NIS en médecine .....	30
II. Les carcinomes thyroïdiens de souche folliculaire .....	32

A.	Anatomo-pathologie.....	32
B.	Aspects cliniques .....	34
1.	Epidémiologie et facteurs de risque .....	34
2.	Manifestation clinique et diagnostique .....	35
3.	Traitement du carcinome de la thyroïde .....	36
4.	Intérêt thérapeutique de l'identification de nouvelles cibles moléculaires pour traiter les formes incurables .....	38
C.	Les anomalies génétiques de la carcinogenèse thyroïdienne .....	39
1.	Les réarrangements chromosomiques affectant un oncogène .....	39
a.	Les réarrangements <i>PPARγ-PAX8</i> .....	39
b.	Les réarrangements <i>RET/PTC</i> .....	40
2.	Les mutations ponctuelles de la voie MAPK.....	41
a.	Les mutations du gène <i>ras</i> .....	41
b.	Les mutations du gène <i>braf</i> .....	41
c.	La mutation de p53 .....	42
D.	Mécanismes moléculaires de la carcinogenèse thyroïdienne et de la progression tumorale	43
1.	La dédifférenciation cellulaire et la perte de l'expression des protéines impliquées dans le métabolisme de l'iode .....	43
2.	La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT).....	45
3.	Rôle de l'oncogène <i>BRAF<sup>V600E</sup></i> dans ces mécanismes.....	46
i.	Implication dans le processus de dédifférenciation.....	47
ii.	Implication dans la progression vers l'EMT .....	48
4.	Implication du TGF-β dans la progression tumorale.....	48
a.	Les altérations moléculaires à l'origine du détournement de la voie TGF-β/Smad dans le contexte tumoral .....	49
b.	Rôle de la coopération avec des voies MAPK et TGF-β/Smad dans le développement de l'EMT et de la dédifférenciation .....	50
i.	Mécanismes d'interaction entre la voie MAPK et la voie TGF-β/Smad.....	50
ii.	Implication dans la dédifférenciation et l'EMT .....	50



5.	Thérapies moléculaires ciblant BRAF et la voie MAPK.....	52
a.	Les inhibiteurs non sélectifs de BRAF et de la voie MAPK.....	52
b.	Les inhibiteurs spécifiques de BRAF <sup>V600E</sup> .....	53
c.	Mécanismes de résistance aux inhibiteurs de BRAF .....	53
III.	Rôle des espèces réactives de l’oxygène (ROS) et du stress oxydatif dans le développement et la progression des cancers .....	56
A.	Les espèces réactives de l’oxygène (ROS).....	56
B.	Les systèmes antioxydants .....	57
C.	La famille des NADPH oxydases: des enzymes dédiées à la production de ROS .....	59
D.	La signalisation cellulaire sensible à l’environnement redox .....	63
1.	Le rôle des résidus cystéine dans la signalisation redox .....	63
2.	Exemples de signaux cellulaires sensibles à l’environnement redox .....	64
3.	Effets des ROS et du stress oxydant sur la fonction thyroïdienne.....	65
4.	Importance du maintien de l'homéostasie redox de la cellule .....	65
E.	Rôle de la NADPH oxydase NOX4 dans le développement du cancer .....	67
1.	La NADPH oxydase NOX4 et son partenaire fonctionnel la p22 <sup>phox</sup> .....	67
a.	La NOX4 .....	67
b.	La p22 <sup>phox</sup> .....	68
2.	Implications de la NOX4 dans le développement tumoral.....	69
a.	Implication des ROS et de la NOX4 dans la réponse aux dommages à l'ADN.....	71
b.	Rôle des ROS et de la NOX4 dans le développement de l'angiogenèse .....	72
c.	Implication des ROS et de la NOX4 dans le développement de la transition épithélio-mésenchymateuse.....	73
IV.	Objectifs.....	77
	Résultats .....	79
	Abstract. ....	80
	Introduction .....	81
	Results .....	83

Material & Methods.....	95
Discussion & Perspectives .....	100
Conclusion .....	110
Références .....	113
Résumé.....	140

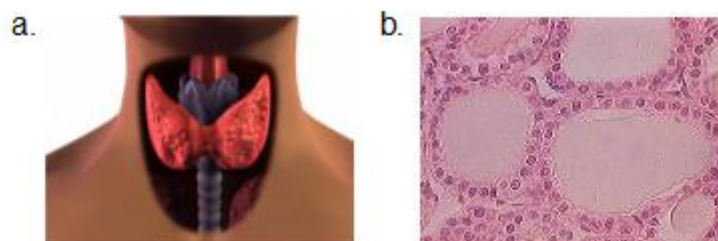
# Introduction

## I. La Physiologie de la thyroïde

### A. Aspects morphologiques et histologiques de la thyroïde

La thyroïde, ou glande thyroïdienne, est une glande endocrine moulée dans une capsule avasculaire, qui siège au niveau cervical (Figure 1a). Elle est composée de deux lobes, droit et gauche, situés de part et d'autre du larynx. La partie intermédiaire horizontale, appelée l'isthme thyroïdien, forme un pont entre les deux lobes. L'unité fonctionnelle de la thyroïde est le follicule thyroïdien (Figure 1b), constitué d'un épithélium unistratifié de cellules folliculaires ou thyrocytes, formant une cavité contenant une substance appelée colloïde, lieu d'accumulation des hormones thyroïdiennes, les iodothyronines T3 et T4, et de leur précurseur protéique, la thyroglobuline (Tg), synthétisée dans le Réticulum Endoplasmique (RE). La colloïde est aussi le lieu de concentration de l'iode nécessaire à la synthèse des hormones thyroïdiennes. Celui-ci est concentré par les follicules thyroïdiens, à un taux environ trente fois supérieur à sa concentration dans le sang. La thyroïde comprend aussi une minorité de cellules parafolliculaires ou cellules C (pour cellules claires). Elles participent au métabolisme du calcium par la sécrétion de calcitonine. Le rôle de la calcitonine est d'abaisser le taux sanguin du calcium et du phosphore en empêchant la destruction osseuse. La calcitonine est utilisée dans le traitement des décalcifications osseuses (ostéoporose, maladie de Paget).

Figure 1 : a. Représentation schématique de la thyroïde chez l'homme ; b. Coupe histologique de la thyroïde illustrant les follicules thyroïdiens.



## **B. Rôles physiologiques de la thyroïde**

Les hormones thyroïdiennes participent à la régulation de nombreuses fonctions physiologiques. Ces hormones agissent au niveau des cellules cibles, leur rôle majeur étant la régulation du métabolisme cellulaire de différents tissus cibles, en augmentant notamment l'activité métabolique de base. Elles sont essentielles au développement et à la différenciation de certaines cellules. Par exemple, elles participent à la maturation neuronale, elles agissent sur la synthèse protéique, lipidique et le métabolisme des glucides et augmentent la sensibilité aux catécholamines comme l'adrénaline. Chez l'homme, les hormones thyroïdiennes engendrent une dépense d'énergie et une production de chaleur. Chez certains mammifères, elles ont un rôle important dans la régulation des cycles d'hibernation.

Les effets physiologiques de la T3 concernent le développement chez les Ectothermes et chez les Endothermes, la croissance staturale et le développement de plusieurs organes, ainsi que la thermogénèse sans frisson obligatoire et facultative.

## **C. Métabolisme de l'iode dans la thyroïde : synthèse, catabolisme et modes d'action des hormones thyroïdiennes**

Les hormones thyroïdiennes, produits du métabolisme de l'iode dans la thyroïde, sont appelées iodothyronines: triiodothyronine (T3) et thyroxine (T4) (Figure 2a). De nombreux stimuli physiologiques et pathologiques influencent la synthèse des hormones thyroïdiennes. L'hormone thyroïdienne ou TSH (Thyroid Stimulating Hormone) est le principal régulateur de l'activité thyroïdienne. Sécrétée par l'hypophyse antérieure, elle-même stimulée par l'hormone hypothalamique TRH (Thyrotropin Releasing Hormone), la neurohormone TSH stimule la production des hormones thyroïdiennes T3 et T4. La sécrétion de TRH est ensuite freinée par la T3 et la T4 qui exercent un rétrocontrôle inhibiteur sur l'hypothalamus (Figure 2b).

Figure 2 : a. Les hormones thyroïdiennes T3 et T4 ; b. Représentation schématique du réseau endocrinien reliant l'hypothalamus, l'hypophyse antérieure et la thyroïde.

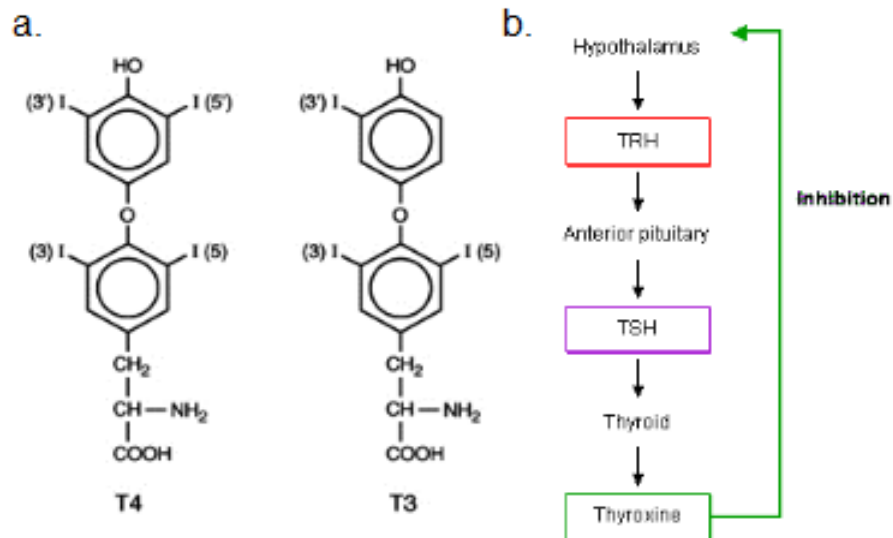
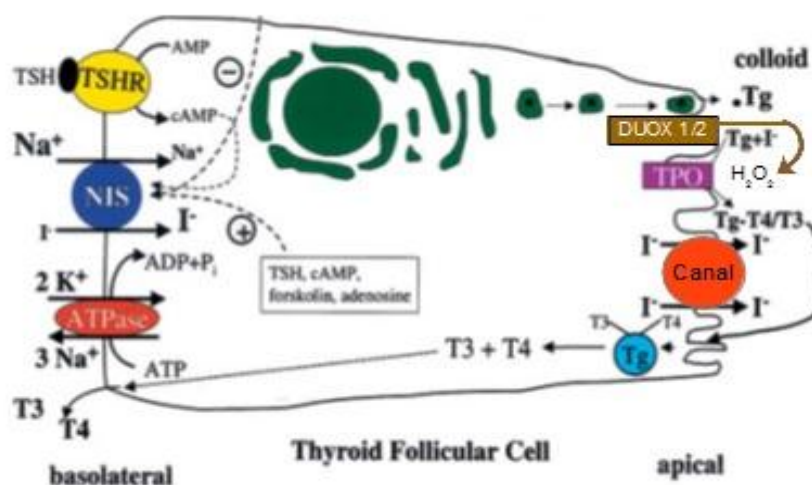


Figure 3 : Représentation schématique d'un thyrocyte et des protéines clés du métabolisme de l'iode et de la synthèse des hormones thyroïdiennes (TSHR= TSH-receptor ; TPO= Thyroid peroxydase ; DUOX2= Dual Oxydase 2 ; NIS= sodium iodide symporter ; Tg= thyroglobuline ; T3= triiodothyronine ; T4= thyroxine (Spitzweg & Morris, 2002).



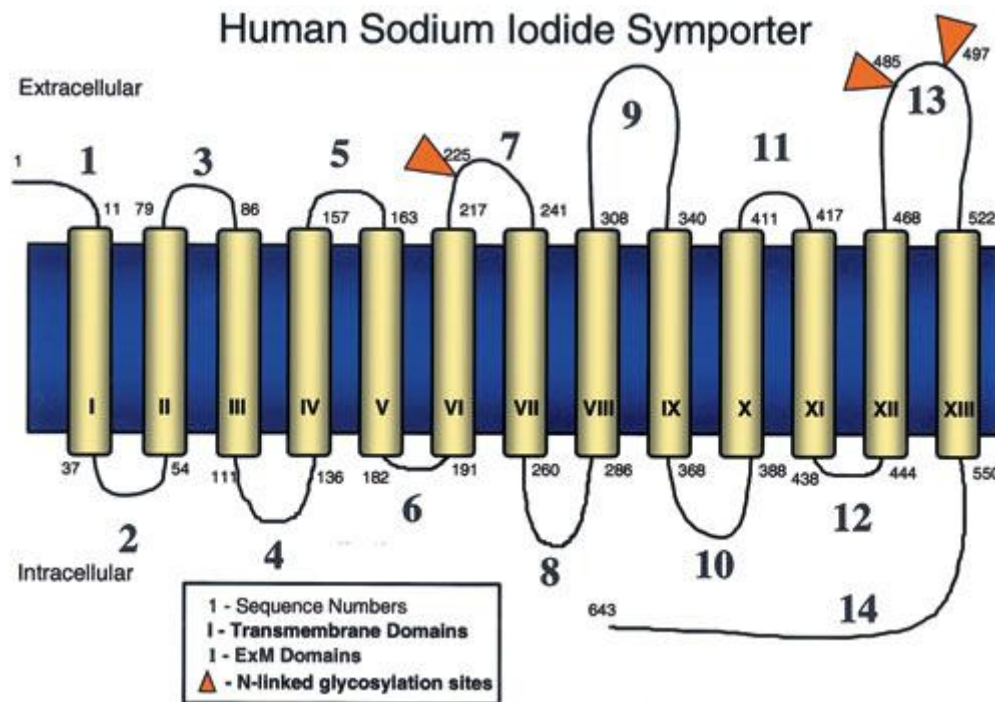
## 1. Le symporteur Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> (NIS) et le transport basolatéral de l'iode

La première étape de la production des hormones iodées T<sub>3</sub> et T<sub>4</sub> dans le thyrocyte est le transport actif secondaire basolatéral de l'iode de l'interstitium vers le cytoplasme contre un gradient électrochimique. Cette étape est réalisée grâce au symporteur sodium/iodure (NIS pour sodium (Na<sup>+</sup>)/iodide (I<sup>-</sup>) symporter). Le NIS utilise la translocation des ions sodium (Na<sup>+</sup>), *via* le gradient électrochimique généré par la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase, (transport actif primaire) pour effectuer le co-transport de l'iode (I<sup>-</sup>) (Carrasco N. *et al.*, 1993) (Figure 3). Ce transport est inhibé de manière compétitive par les anions thiocyanate (SCN<sup>-</sup>) et perchlorate (ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>) (Yoshida *et al.*, 1997).

Le clonage du gène *NIS* en 1996 (Dai *et al.*, 1996), ainsi que la production d'anticorps spécifiques dirigés contre la protéine NIS (Castro *et al.*, 1999 ; Paire *et al.*, 1997 ; Levy *et al.*, 1997), ont permis la caractérisation moléculaire du NIS (De La Vieja *et al.*, 2000 ; Dohàn *et al.*, 2003 ; Eskandari *et al.*, 1997 ; Levy *et al.*, 1998 ; Ohno *et al.*, 1999). Le NIS de rat est une protéine de 618 acides aminés. Les NIS humain et porcin possèdent, quant à eux, 648 acides aminés et présentent respectivement 75,9% et 74,2% d'homologie avec celui de rat. Le modèle proposé actuellement est une structure secondaire qui possède 13 domaines transmembranaires (I à XIII), avec une extrémité N-terminale extracellulaire et une extrémité C-terminale intracellulaire (Levy *et al.*, 1997) (Figure 4). Le transporteur de l'iodure (I<sup>-</sup>) est une glycoprotéine possédant trois sites de glycosylation sur les résidus Asp 225, 485 et 497. Ces glycosylations ont lieu essentiellement dans le réticulum endoplasmique (RE), ce qui confère à la protéine une masse moléculaire variant de 65 à 196 kDa. Des études de microscopie électronique ont montré que le NIS fonctionnerait sous forme de protéine multimérique, *via* des sites d'interaction situés au niveau des Leucines 199, 206, 213 et 220, qui sont considérées comme essentielles pour l'oligomérisation (Dohàn *et al.*, 2003). Les mécanismes de régulation de l'expression du NIS au niveau transcriptionnel et traductionnel dans la thyroïde et dans les autres tissus qui l'expriment, comme les glandes salivaires, l'estomac et les glandes mammaires ont également été caractérisés (Vayre *et al.*, 1999). Les propriétés de captation d'iode des cellules thyroïdiennes sont utilisées depuis plus de 60 ans en médecine nucléaire pour le diagnostic et le traitement des cancers thyroïdiens. En effet, cette propriété est exploitée pour la détection et la localisation des sites métastatiques par imagerie SPECT après l'administration de doses traceuses de <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> aux patients ainsi que

pour leur traitement par l'administration de doses thérapeutiques de  $^{131}\text{I}$  qui seront accumulées dans la tumeur et irradieront les cellules cancéreuses. Cette approche thérapeutique est dénommée «radiothérapie métabolique». L'expression du NIS dans d'autres tissus a permis d'envisager d'utiliser cette propriété de captation de l'iode pour le traitement de pathologies extra-thyroïdiennes (*De la Vieja et al.*, 2000), telles que les cancers du sein (*Upadhyay et al.*, 2003).

Figure 4 : Modèle du transporteur sodium/iodure NIS humain représentant la protéine et ses 13 segments transmembranaires (*Spitzweg et al.*, 2002)



## 2. L'organisation de l'iode et la biosynthèse des hormones T3 et T4

A la membrane apicale, des canaux permettent le transport passif de l'iode ( $\text{I}^-$ ) vers la lumière folliculaire (efflux d'iode). Deux canaux potentiels ont, dans un premiers temps, été identifiés : l'AIT (Apical Iodide Transporter) et la Pendrine (Figure 3). Cependant, leur mécanisme de transport n'est pas caractérisé et est sujet à de multiples controverses. Plus

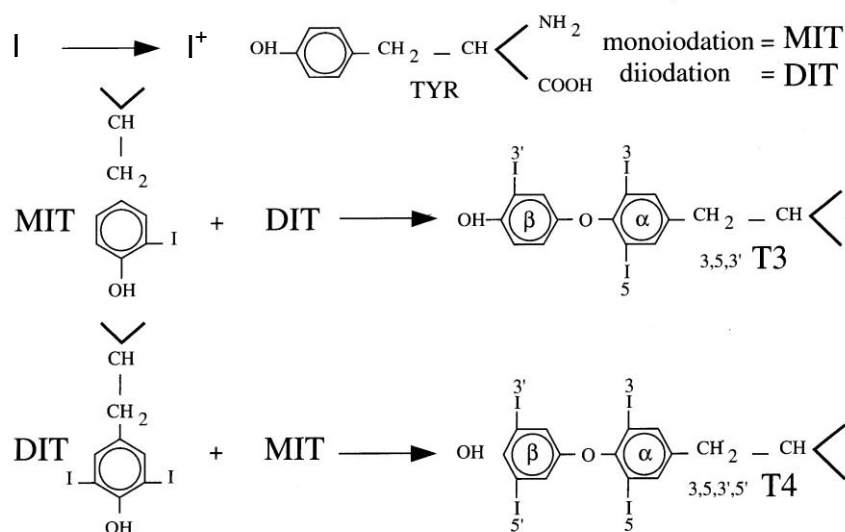


récemment, l'existence d'un autre canal appelé CLC5 (Chloride channel-5), fortement exprimé dans les thyrocytes de souris et impliqué dans la modulation de l'efflux d'iode, a été identifié (*Van Den Hove et al., 2006*). De manière importante, une délétion au niveau du gène codant pour CLC5 entraîne la formation de goître, ce qui suggère un rôle essentiel de ce canal dans la physiologie thyroïdienne.

Une fois dans la colloïde, l'iode est oxydé en  $I^+$  par la thyroperoxydase (TPO) pour son organification au niveau de la matrice de l'hormonogénèse, la thyroglobuline (Tg) (Figure 3). Cette étape requiert l'oxydation de la TPO par le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), une espèce réactive de l'oxygène produite localement à la membrane basale des thyrocytes par une NADPH oxydase dorénavant appelée DUOX2 (*De Deken et al., 2000 ; Dupuy et al., 1991, 1999*).

L'iodation de certains résidus Tyrosine de la Tg par la TPO aboutit à la formation de monoiodotyrosine (MIT) et de diiodotyrosine (DIT). Le couplage de certains de ces résidus iodés conduit à la formation des hormones thyroïdiennes (HT). Ainsi, le couplage de deux DIT permet d'obtenir la thyroxine (T4) avec quatre atomes d'iode, et la liaison d'une DIT avec une MIT donne la triiodothyroxine (T3) qui en porte trois (Figure 5).

Figure 5: Représentation des étapes d'organification de l'iode sur des résidus de la thyroglobuline aboutissant à la formation des hormones thyroïdiennes T3 et T4.



#### 4. Sécrétion et transport des HT

En phase sécrétoire, la membrane apicale des thyrocytes émet des pseudopodes qui captent la Tg iodée par micropinocytose (*McCluskey et al., 2000*). La TSH stimule l'endocytose des hormones thyroïdiennes de la colloïde vers le cytosol. Les vésicules d'endocytose fusionnent avec les lysosomes où des enzymes, en clivant la Tg, libèrent les hormones T4 et T3, qui sont ensuite sécrétées dans la circulation sanguine. Le passage à travers la membrane plasmique basolatérale ne se fait pas de manière passive. Au moins dix transporteurs actifs dépendant de l'énergie ont été identifiés chez l'homme (*Dietrich, J. W. et al., 2008 ; K. Brisseau and B. O. Boehm et al., 2008*). Le transport plasmatique se fait sous forme libre ou liée, à la TBG (Thyroxin Binding Globulin), à la transthyrétine ou TBPA (Thyroxin Binding Prealbumin) et à la sérumalbumine (HSA). Au niveau des tissus cibles, les HT sont prises en charge par des transporteurs spécifiques des hormones thyroïdiennes, comme le transporteur MCT8 (monocarboxylate transporter 8), qui permettent leur captation (*van der Deure et al., 2010*). Elles y sont ensuite désiodées en fonction des besoins physiologiques.

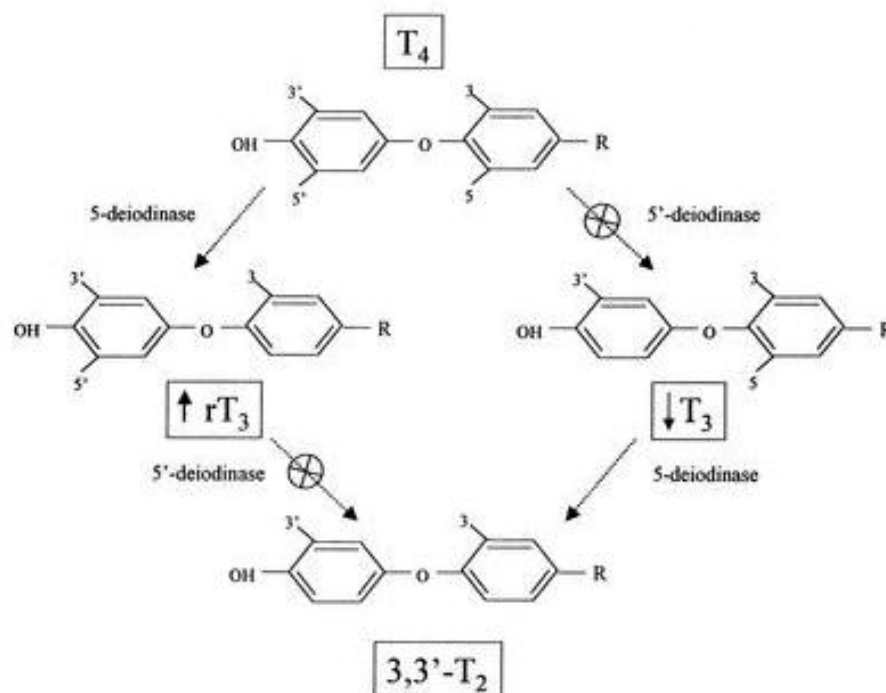
#### 5. La désiodation de la pro-hormone T4 en T3

La thyroïde sécrète environ 13 fois plus de T4 que de T3, la T3 étant environ 5 fois plus active que la T4. La T4 est donc considérée comme une pro-hormone, la T3 étant obtenue par la désiodation de la T4. La désiodation est la principale voie de catabolisme des HT puisqu'elle permet de réguler la concentration de leur formes actives et inactives. Elle est le fait de trois sélénodésiodases ou iodothyronine désiodases: la 5' désiodase de type I (iodothyronine désiodase I ou D1), la 5'désiodase de type II (iodothyronine désiodase 2 ou D2) et la 5'désiodase de type III (iodothyronine désiodase 3 ou D3). Ce sont des sélénoprotéines, c'est pourquoi l'apport diététique de sélénium est essentiel dans le métabolisme de l'iode et des HT (*Arthur et al., 1991, 1992, 1993*). Leur expression est différente en fonction des tissus qui régulent l'activité des HT en modulant l'expression et l'activité de ces désiodases (*Bidey SP et al., 1976; Boye N et al., 1984*). Il existe une production systémique de T3, assurée par la désiodation hépatique, rénale et thyroïdienne de T4. Elle est catalysée par la D1, et permet d'augmenter la concentration plasmatique de T3. La T3 plasmatique provient donc pour 20% de la thyroïde et pour 80% de la transformation

périphérique de T4 en T3 (Visser *et al.*, 1999). La T3 est également produite au niveau local, la D2 catalyse la désiodation de la T4 en T3 dans le cytoplasme des cellules des tissus cibles tels que le cerveau (astrocytes, tanocytes), l'antéhypophyse, le muscle squelettique et le tissu adipeux brun (Oppenheimer *et al.*, 1995 ; Visser *et al.*, 1999).

Afin de protéger l'organisme d'un excès d'HT actives, la désiodase D3 catalyse l'inactivation de T4 en rT3 et de la T3 en 3,3'-T2 (Figure 6). Ainsi la désamination oxydative de T4 et de T3 transforme ces iodothyronines en TETRAC (Tetraiodothyroacetic Acid) et en TRIAC (3,3',5-triiodothyroacetic acid) (Idelman & Verdetti, Endocrinologie et Communications cellulaires, EDP Sciences Ed., 2000). Ces produits du métabolisme périphérique des HT étaient jusqu'ici considérés comme inactifs destinés à être ensuite désiodés en acides pyruvique et acétique, cependant des études récentes ont montré que ces molécules ont sont à l'origine de nombreux effets biologiques (Senese *et al.*, 2014).

Figure 6 : Représentation schématique des étapes de désiodation par les 5'-désiodases de la T4 en T3 et rT3, et de la T3 en 3,3'-T2.



## 6. La reconnaissance du signal de la T3 au niveau des tissus cibles

Deux gènes, NR1A (TR $\alpha$ ) et NR1A2 (TR $\beta$ ), codent les récepteurs de T3, TR $\alpha$ 1 et TR $\alpha$ 3 d'une part, TR $\beta$ 1 et TR $\beta$ 2 d'autre part (*Dauncey et al.*, 2001). L'affinité de T3 pour ces récepteurs est 30 fois plus élevée que celle de T4 (Kd= 0,06 mM versus Kd= 2 mM).

Le récepteur TR $\alpha$ 1 est exprimé en particulier dans les myocytes striés (*Dauncey et al.*, 2001), les ostéoblastes (*Abu et al.*, 1997) et les kératinocytes de l'épiderme. Chez les petits mammifères, il est aussi exprimé dans les adipocytes du tissu adipeux brun. Le récepteur TR $\beta$ 1 est quant à lui exprimé dans de nombreux types cellulaires : hépatocytes, chondrocytes du cartilage de croissance de os longs, ostéoblastes, kératinocytes de l'épiderme (*Abu et al.*, 1997 ; *Yen et al.*, 2001). Le TR $\beta$ 1 est exprimé dans les cellules thyroïdiques de l'antéhypophyse, l'hypothalamus, la rétine et l'oreille interne.

## 7. Autorégulation du transport de l'iode

L'iode thyroïdien exerce une action autorégulatrice en contrôlant négativement toutes les étapes du métabolisme de l'iode telles que le transport de l'iode, son organification, la synthèse et la sécrétion des HT. Il existe en effet une autorégulation du transport de l'iode, spécifique de la thyroïde, qui a pour rôle de protéger des excès soudains d'iode en bloquant l'hormonogénèse à plusieurs niveaux (*Ingbar et al.*, 1972 ; *Wolff et al.*, 1969 ; *Yen-Chow et al.*, 1984). Ce mécanisme d'inhibition complexe qui implique de multiples processus (*Wolff et al.* 1989) a été observé chez l'animal, où l'administration aiguë d'une forte dose d'iode provoque l'inhibition de son organification. Cet effet a été appelé effet « Wolff-Chaikoff », du nom de ceux qui l'ont découvert (*Wolff & Chaikoff*, 1948). C'est un effet transitoire, qui diminue après 48h. Cette adaptation résulte de l'inhibition de la synthèse du NIS, afin de limiter l'entrée d'iode et donc son accumulation intracellulaire excessive dans les thyrocytes (*Uyttersprot et al.*, 1997). Cet effet inhibiteur de l'iode requiert son oxydation par la thyroperoxydase (TPO) (*Wollman et al.*, 1958). Des composés inhibiteurs iodés (composés X-I), formés notamment par l'addition d'iodure sur les doubles liaisons d'acides gras insaturés, ont été identifiés, ces acides gras étant souvent l'acide arachidonique et l'acide gras 22:6 (w3) et les additions aboutissent à la formation de d'iodolactones. Le mode d'action des composés X-I est encore mal défini. Cependant, il a été

démontré que l'iode oxydé inhibe la NADPH oxydase DUOX2 qui génère le peroxyde d'hydrogène nécessaire à la thyroperoxydase pour l'organification de l'iode (*Corvilain et al.*, 1988 et *Morand S et al.*, 2003). L'effet « Wolff-Chaikoff » est levé par l'ajout d' $H_2O_2$  (*Chiraseveenuprapund P et al.*, 1981).

#### **D. Aspects moléculaires de la physiologie thyroïdienne**

La fonction, la prolifération et la croissance des cellules thyroïdiennes sont essentiellement contrôlées par la TSH (Thyroid Stimulating Hormone) (*Dumont et al.*, 1992), par l'intermédiaire de son récepteur membranaire le TSH-R (Thyrotropin-stimulating hormone receptor) qui contrôle la synthèse et la sécrétion des hormones thyroïdiennes. Le TSH-R (Thyrotropin-stimulating hormone receptor) appartient à la sous-famille des récepteurs à 7 domaines trans membranaires (7TMR) couplé aux protéines G (GPCR) qui activent la voie de l'adénylate cyclase (AC) et de l'AMP cyclique (AMPC). Cette voie qui active à la fois la différenciation et la prolifération thyroïdienne est connue pour réguler la captation de l'iode et l'expression de la thyroglobuline (Tg) (*Bell et al.*, 2002 ; *Wilson et al.*, 1968). La liaison de la TSH au TSH-R active également les voies des phospho-inositides (IP3 et DAG) et de la phospholipase C (PLC) qui régule l'efflux d'iode, la production d' $H_2O_2$  et l'iodation de la Tg (*Field et al.*, 1987; *Riedel et al.*, 2001). Cependant on ne peut pas restreindre les effets de la TSH aux deux seules voies de l'AMPC et de la PLC- $\beta$ . En effet, bien que ce soit encore controversé, la voie MAPK a été montrée être aussi activée par la TSH. Par ailleurs, des différences dans la transduction du signal du TSH-R ont été observées entre les espèces étudiées, telles que le chien, le porc, le rat et la souris. Bien que de manière générale l'activation du signal TSH/TSH-R conduit à l'activation de la voie de l'AMPC, l'activité des isoformes de la PKA peut être modulée de manières différentes. De plus on observe des divergences concernant le niveau d'activation la voie des phosphoinositides, et une grande confusion persiste quant à son indépendance vis-à-vis de la voie de l'AMPC. D'une manière générale, la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales thyroïdiennes sont sous le contrôle du signal positif de la TSH, et du signal négatif du TGF- $\beta$ . Ces signaux modulent l'activité thyroïdienne au niveau transcriptionnel via les facteurs de transcription TTF-1

(Thyroid Transcription Factor 1), TTF-2 (Thyroid Transcription Factor 2) et Pax8 (*Plachov et al.*, 1990).

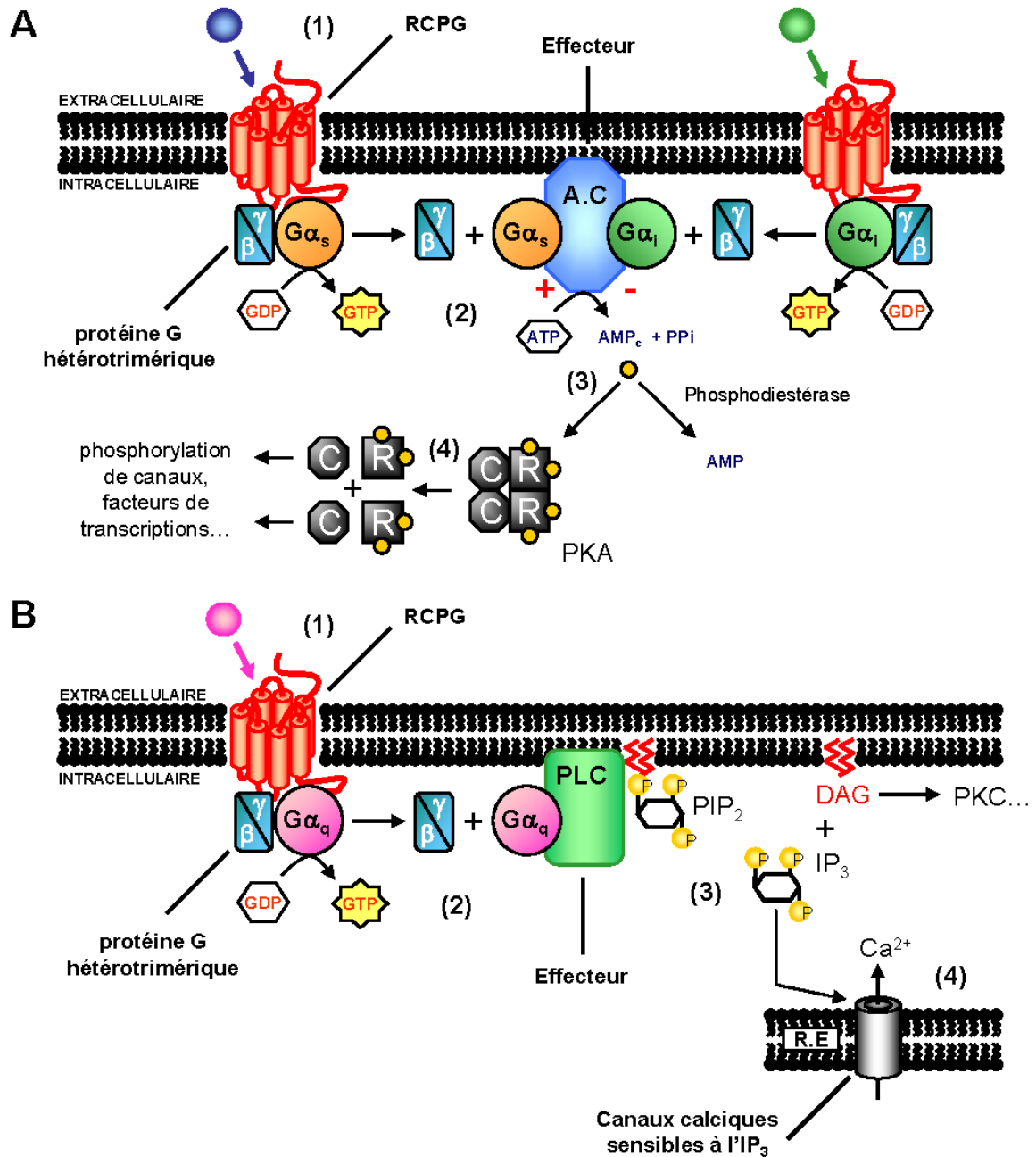
## 1. La transduction du signal TSH/TSH-R

### a. Le TSH-R: un récepteur couplé aux protéines G

Les récepteurs couplés aux protéines G, ou GPCRs, interagissent et activent les protéines G (guanine nucleotide binding-protein) qui exercent un rôle crucial dans la transduction du signal vers les seconds messagers des différentes cascades de signalisation (*Oldham et al.*, 2006). L'activation des protéines G médiée par les GPCRs est caractérisée par de multiples changements de conformation des sous-unités des protéines G, permettant l'échange du GDP de la sous-unité  $\alpha$  pour un GTP, et la séparation de  $G\alpha$  des sous-unités  $G\beta\gamma$  qui jouent un rôle central dans la signalisation des GPCRs (*Smrcka et al.*, 2008). Les études de mutagenèse sur les domaines intracellulaires du TSH-R effectuées dans les années 1990 ont permis de démontrer que la sensibilité mais aussi la sélectivité du récepteur vis-à-vis des différentes protéines G sont déterminées par les boucles intracellulaires et le domaine C-terminal (*Chazenbalk et al.*, 1990; *Kosugi & Mori.*, 1994). Les acides aminés responsables de ces couplages spécifiques ont également été identifiés (*Grüters et al.*, 1998; *Camilot et al.*, 2005; *Klainau et al.*, 2010; *Neumann et al.*, 2005; *Cangul et al.*, 2010).

Dans les thyrocytes humains, bien que l'activation de la voie de l'adénylate cyclase *via*  $G_s$  soit très importante pour la signalisation du TSH-R (*Vassart & Dumont*, 1992), de nombreuses protéines G hétérotrimériques activées par le TSH-R ont été identifiées :  $G_s$ ,  $G_i$ ,  $G_o$ ,  $G_q$ ,  $G_{11}$ ,  $G_{12}$  et  $G_{13}$  (*Laugwitz et al.*, 1996). L'activation simultanée de  $G_s$  et  $G_q/11$  dans le thyrocyte humain peut être corrélée respectivement à la stimulation de l'AC (Figure 7a) et de la voie de la phospholipase C- $\beta$  (PLC-  $\beta$ ) et des phosphoinositides (Figure 7b) (*Laurent et al.*, 1987).  $G_i$  participe au contrôle négatif activé par la TSH sur l'AC; l'inactivation de  $G_i$  par la toxine *Bordetella pertussis* augmente l'effet positif de la TSH sur l'AC.

Figure 7 : La signalisation des récepteurs couplés aux protéines G. a. Représentation de la voie AMPc-dépendante ; b. Représentation de la voie phosphoinositide-dépendante.



Une étude sur l'effet d'anticorps dirigés contre différents épitopes du TSH-R a permis de mettre en évidence qu'un anticorps n'inhibant pas la liaison de la TSH peut inhiber la stimulation de l'AC, même si celle-ci est stimulée par la Forskoline (Fk), suggérant ainsi la présence d'un mécanisme complexe de régulation entre le TSH-R et l'AC (Dallas JS et al., 1996). Par ailleurs, dans les thyrocytes canins, la TSH ne stimule pas la voie des phosphoinositides alors que Gq/11 est bien activée (Allgeier et al., 1997), tandis que dans les cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) la transfection du TSH-R humain (JP09) ou du TSH-R canin (GC29) peut entraîner la transduction du signal vers l'AC et la PLC- $\beta$  (Van Sande et al., 1995). Des études de mutagenèse dirigée contre des acides aminés susceptibles d'interagir avec les protéines G ont permis de mieux caractériser les mécanismes de spécificité du couplage. Ainsi, la substitution de certains acides aminés dans le domaine C-terminal entraîne la perte du couplage avec Gq/11 sans pour autant affecter la liaison de la TSH à son récepteur ni la stimulation maximale de l'AC (Biebermann et al., 1998). Ces résultats suggèrent l'existence de différentes conformations du TSH-R qui peuvent être stabilisées sous l'effet de différentes concentrations agonistes, qui elles-mêmes favorisent un couplage préférentiel pour une protéine G. Des différences d'efficacité sur l'une ou l'autre des voies ont été démontrées pour les différentes isoformes ou certaines mutations de la TSH (Szkudlinski MW et al., 1996; Medri G et al., 1994). Dans les thyrocytes porcins par exemple, un traitement par la TSH ou la Fk augmente l'expression des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de Gs, qui se traduit par une régulation positive de l'activité de l'AC. La régulation négative de la voie de l'AMPc observée lors d'un traitement chronique ou l'utilisation de concentrations élevées de TSH ou de Fk, ou encore de 8 bromo-AMPc, se traduit par une diminution de la capacité de dissociation des sous-unités G $\alpha$  et G $\beta\gamma$  (Saunier et al., 1990).

Le TSH-R, comme la plupart des 7TMRs, est sujet à plusieurs modifications post-traductionnelles telles que la glycosylation ou la phosphorylation, qui participent et modulent aussi bien sa capacité à lier la TSH que son adressage à la membrane et la transduction de son signal via les protéines G. Aussi, la formation d'homo ou hétéro-oligomères, observée pour une grande variété de 7TMRs (Rios et al., 2001; Javitch et al., 2004), est-elle un mécanisme qui influence la pharmacologie et la fonction du récepteur (Milligan et al., 2006). Le couplage avec les protéines G et les éléments de la signalisation en aval, mais aussi leur processus de régulation et d'internalisation, se voient modulés par la



dimérisation des récepteurs membranaires (*Breit et al., 2004*). En effet, la dimérisation du TSH-R est une étape importante de sa maturation post-traductionnelle. C'est un mécanisme qui a un impact sur plusieurs propriétés fonctionnelles du TSH-R. Des études assez récentes ont démontré un lien entre la dimérisation et la coopérativité négative (*Urizar et al., 2005*). Des dimères de TSH-R ont été trouvés dans les préparations de tissus thyroïdiens et les cellules transfectées, et les différentes approches utilisées pour étudier cet aspect ont conduit à l'observation de dimères en plus des monomères dans la membrane plasmique (*Latif et al., 2001; Latif et al., 2002; Urizar et al., 2005*). Une étude plus récente montre la liaison de la TSH aux dimères de TSH-R (*Allen et al., 2011*). Cependant, on ne sait pas si la formation des dimères de TSH-R se fait de manière constitutive ou bien si elle est sujette à une régulation *via* la liaison du ligand ou l'activation du récepteur et de la transduction des signaux qu'il initie (*Persani et al., 2007*).

Le TSH-R ne transmet pas seulement les signaux *via* les protéines G, il existe en effet d'autres protéines qui font l'objet d'un couplage avec le TSH-R et les GPCRs en général. Il s'agit des GRKs (G-protein coupled receptor Kinases) et des  $\beta$ -arrestines qui participent au processus de désensibilisation et d'internalisation du récepteur (Figure 7a). Le processus de désensibilisation des GPCRs, qui peut être défini par le découplage des protéines G vis-à-vis du récepteur actif, est initié par les GRKs. Ces protéines phosphorylent le domaine intracellulaire du récepteur actif, permettant alors le recrutement d'adaptateurs protéiques multifonctionnels: les arrestines. Cela conduit à l'atténuation du signal intracellulaire dépendant des protéines G et initié par le récepteur (*R.J. Lefkowitz & S.K. Shenoy, 2005*). Le recrutement des  $\beta$ -arrestines permet également l'adressage des GPCRs à la machinerie d'endocytose médiée par la clathrine (*Zhang et al., 1996; Goodman O.B. Jr. et al, 1996*). Ce mécanisme de rétrocontrôle a été décrit pour le TSH-R (*Iacovelli et al., 1996; Nagayama et al., 1996*).

#### **b. La voie de l'AMPC**

Chacun des acteurs de la voie de l'AMPC peut être régulé au niveau de son expression ou de son activité, avec un effet sur la production d'AMPC. La cible reconnue du nucléotide cyclique est la protéine kinase A (PKA) de type R2C2. La liaison de l'AMPC aux sous-unités régulatrices R permet la libération des sous-unités catalytiques C ainsi activées. Parmi leurs

nombreux substrats, ces sous-unités phosphorylent les protéines CREB (*CRE binding protein*)/CREM (*CRE modulator*), respectivement activateur et répresseur des séquences CRE (cAMP response element) des promoteurs (Figure 7a).

Dans les cultures primaires de thyrocytes porcins, la TSH contrôle l'activité des isoformes PKA I et PKA II de la PKA via l'AMPc, en modulant leur expression (*Ben Abdelkhalek et al., 1999; Roger et al., 1991; Rohlf et al., 1993*) et leur localisation sub-cellulaire (*Feliciello et al., 1998*). Dans la lignée de thyrocytes de rat FRTL-5, ces effets sont plus modérés (*Tortora et al., 1993*). L'activité de la PKA I est corrélée avec la prolifération et la transformation néoplasique alors que celle de la PKA II l'est avec la différenciation cellulaire. Dans les thyrocytes porcins, le traitement par la TSH induit la différenciation *via* la PKA II. Enfin, la stimulation chronique par la TSH diminue l'activité des PKA en inhibant l'expression protéique des sous-unités catalytiques C (*Ben Abdelkhalek et al., 1999*).

Dans la thyroïde, la TSH active également la voie Epac/Rap1 et Ras *via* l'AMPc. Cependant, la contribution de Rap1 dans l'activation de la voie ERK par la TSH est mal définie. Dans les lignées thyroïdiennes de rat WRT, PCCL3 et FRTL-5, la TSH stimule l'activation de la voie ERK *via* la PKA et non *via* Rap1. Cette activation est dépendante de B-Raf et de Ras (*Vuchak et al., 2009*). Ces résultats positionnent la PKA, Ras et B-Raf en amont dans la régulation de ERK impliquée dans la croissance cellulaire et permettent de mettre en évidence le rôle fonctionnel de B-Raf dans la signalisation de la TSH. Une autre étude, cette fois dans les thyrocytes primaires humains, montre que la TSH module l'expression des gènes de différenciation thyroïdiens *via* l'AMPc et la PKA et non *via* les Epac (Exchange proteins directly activated by cAMP) (*van Staveren et al., 2012*). Dans les thyrocytes de chien, la TSH induit une forte activation de Rap1 indépendante de la PKA (Dremier et al., 2000). L'expression d'Epac1, qui est à l'origine de l'activation de Rap1, est également fortement induite par la TSH. Cependant, la prolifération et la fonction thyroïdienne, toutes deux stimulées par la TSH de manière dépendante de l'AMPc, sont induites par la PKA et non par Epac1 (*Dremier et al., 2007*). Il faut noter que l'activation de Rap1 n'est donc pas spécifique de la TSH ou de l'AMPc puisqu'elle est une étape commune à de nombreuses cascades de signalisation impliquées dans la prolifération, la différenciation et la fonction thyroïdienne, telles que la signalisation de l'EGF et de l'insuline. Dans la lignée PCCL3, l'action synergique de la voie Epac/Rap1 et de la PKA est nécessaire pour induire la prolifération (*Hochbaum et*

*al.*, 2008). On sait aussi que Rap1 joue un rôle important dans l'activation de B-Raf dans les tumeurs (*Xing M, 2005; Kondo et al., 2006*).

La phosphorylation des protéines cibles de la PKA représente une étape essentielle de la signalisation de l'AMPC, cependant il semble que des voies alternatives existent et qu'elles pourraient rendre compte des effets de l'AMPC indépendants de la PKA. Il existe par exemple des protéines qui possèdent à la fois un site de liaison de l'AMPC et un domaine de facteur d'échange nucléotidique (guanine exchange factor ou GEF). Ces protéines ont été identifiées dans plusieurs tissus humains et notamment dans la thyroïde. Elles transmettent également l'information de l'AMPC à la protéine Rap1 de la famille Ras (*Kawasaki et al., 1998*).

### c. La voie des phospho-inositides

L'activation de la voie des phospho-inositides par la transduction du signal TSH/TSH-R est effectuée *via* la sous-unité  $\alpha$  de la protéine Gq/11 qui va à son tour activer la PLC- $\beta$ . Celle-ci hydrolyse le précurseur des phospho-inositides, le PIP2 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate), conduisant à la formation de seconds messagers: le DAG (diacylglycérol) (*Chazenbalk et al., 1990*) et l'IP3 (inositol 1,4,5-trisphosphate) (*Raspé et al., 1991; Van Sande et al., 1995*), ce qui entraîne la libération de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) du réticulum endoplasmique (RE) (Figure 7b). De tels effets ont été démontrés dans les thyrocytes humains et les cellules CHO transfectés respectivement par le TSH-R (*Rani et al., 1989; Raspé et al., 1991; Van Sande et al., 1995*). Dans la lignée FRTL-5 de rat, la mobilisation du  $\text{Ca}^{2+}$  sous l'action de la TSH *via* la stimulation de la PLC- $\beta$  s'accompagne d'une augmentation de la teneur en intermédiaires du cycle des phospho-inositides (*Brenner-Gati et al., 1990*). Des résultats similaires ont été obtenus dans les thyroïdes canines et humaines (*Lejeune et al., 1996*).

Une grande confusion existe quant au rôle propre de la PKC dans la signalisation de la TSH. En effet, lors d'un traitement aigu par la TSH, qui active le système cyclasique et les PKA de manière prévisible et reproductible, l'activation de la PLC- $\beta$  n'est pas systématique dans les différents modèles. Il semble exister selon les études une indépendance de la PKC vis-à-vis de l'AMPC. Des études ont montré que l'augmentation de l'activité de la PKC observée lors du développement d'un goitre *in vivo* chez le rat est dépendante de la TSH et résulte dans ce cas de la production de DAG par la PLC- $\beta$  (*Omri et al., 1985*). Néanmoins, d'autres études ont montré que cet effet n'est pas totalement indépendant de l'AMPC (*Fujimoto et al., 1992*).

Ainsi, dans le thyrocyte porcin, une activité des différentes isoformes de la PKC est observée en présence de TSH et également de Fk (*Matowe et al., 1996*). Plus récemment, des études ont montré que dans les thyrocytes primaires humains et des cellules de carcinome folliculaire l'induction de la métallothionéine 1 (MT1) par la TSH se fait *via* les protéines Gq/11 et la PKC, alors que la signalisation de l'AMPc et de la PKA n'est que très peu impliquée. Bien qu'à ce jour très peu de résultats aient été publiés à propos de la signalisation TSH/TSH-R indépendante de l'AMPc, certains résultats mettent néanmoins en évidence l'implication de la PKC dans la signalisation du TSH-R (*Bäck CM et al., 2013*).

#### **d. Mécanismes d'autorégulation et de désensibilisation du TSH-R**

Lors de l'exposition à la TSH, il existe un phénomène d'autorégulation du TSH-R qui se traduit par une désensibilisation du récepteur. Dans les thyrocytes humains et canins, ainsi que dans la lignée de rat FRTL-5, lors d'une exposition chronique à la TSH l'induction de l'expression de l'ARNm du TSH-R est suivie d'une régulation négative de sa synthèse (*Huber et al., 1991; Maenhaut et al., 1992; Shimura et al., 1994*). Des études dans les thyrocytes canins suggèrent que cet effet pourrait résulter de la synthèse d'une isoforme du répresseur de la séquence CRE (*inducible cAMP early repressor* ou ICER) localisée au niveau du promoteur du gène du TSH-R (*Uyttersprot et al., 1999*). De même la désensibilisation du TSH-R par la TSH est corrélée avec une diminution de l'activité adénylate cyclase (*Deery et al., 1991*). Enfin, des concentrations élevées en TSH induisent une régulation négative de la voie de l'AMPc via une inhibition de la dissociation des sous-unités alpha et bêta de Gs (*Saunier et al., 1990*). En revanche, aucune désensibilisation par la TSH n'a été observée lors de l'expression du TSH-R recombinant dans la lignée non thyroïdienne CHO, ce qui suggère que ce phénomène nécessite la présence de facteurs spécifiques des cellules thyroïdiennes (*Chazenbalk et al., 1990*).

#### **e. Régulation transcriptionnelle de la fonction thyroïdienne**

Afin de comprendre les mécanismes responsables de la différenciation des cellules folliculaires, les promoteurs des marqueurs de différenciation de la thyroïde (Tg, TPO, NIS, TSH-R) ont été étudiés. L'expression de la Tg et de la TPO est spécifique de la thyroïde alors que le NIS et le TSH-R sont exprimés dans d'autres tissus, comme les intestins. Ces études ont permis d'identifier et de cloner les trois facteurs de transcription qui contribuent à

l'expression spécifique dans la thyroïde (*Damante et al., 1994*). Il s'agit de TTF-1 (ou Nkx2.1), TTF-2 (ou FOXE1) et Pax8. TTF-1 est une protéine à homéodomaine qui est exprimée dans le diencephale embryonnaire, les poumons et la thyroïde (*Lazzaro et al., 1991*). TTF-2 est une protéine à domaine «forkhead» qui est exprimée dans l'hypophyse et la thyroïde (*Zannini et al., 1997*). Pax8 appartient à la famille des gènes contenant un domaine pair. Il est exprimé lors du développement du rein et du tube neural, dans la thyroïde adulte et en développement (*Plachov et al., 1990*). Aucun de ces trois facteurs de transcription n'est exprimé exclusivement dans la thyroïde, mais c'est la combinaison de leur expression au sein de cet organe qui est unique et semble être responsable du développement et de la différenciation des thyrocytes (*Damante et al., 2001*).

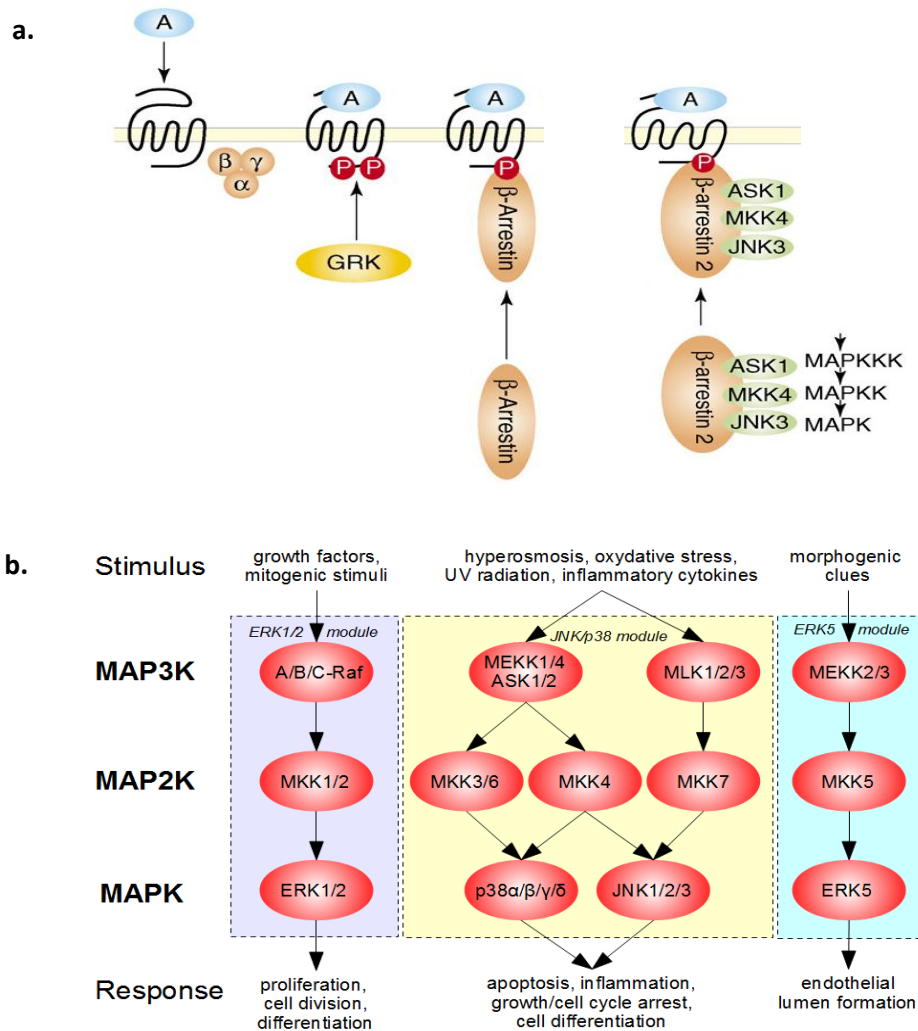
Le gène *Pax8* a été identifié comme un important régulateur de l'expression du NIS de rat (*Ohno et al., 1999*) et de la Tg (*Fabbro et al., 1998*). Les souris Knock-Out (KO) pour *Pax8* montrent une absence totale de cellules folliculaires (*Mansouri et al., 1998*). La transformation de la lignée PCCL3 par différents oncogènes aboutit dans la plupart des cas à la diminution de l'expression des marqueurs de différenciation thyroïdiens, qui est corrélée à une diminution de l'expression des facteurs de transcription spécifiques de la thyroïde (*Fusco et al., 1987; Berlingieri et al., 1988*). Il a été montré que TTF-1 régule l'activité du promoteur du gène codant pour le TSH-R (*Cicitareale et al., 1993*). Cette régulation se fait grâce à la présence d'éléments de réponse TRE (pour TSH Responsive Element) dans le promoteur du NIS. Une mutation de l'élément TRE entraîne une diminution de l'activité du promoteur et cause une perte de la réponse à la TSH. Il a été mis en évidence qu'il existe une coopération entre Pax8 et TTF-1. Le site de fixation de Pax8 aux promoteurs de la Tg et de la TPO se superpose à celui de TTF-1. Ainsi toutes les mutations qui abolissent la liaison de Pax8 au promoteur de la Tg inhibent également la liaison de TTF-1 (*Zannini et al., 1992; Pasca di Magliano et al., 2000*). L'activité synergique de Pax8 et TTF-1 contrôle l'expression de la TPO (*Miccadei et al., 2002*). Une autre étude a montré que les domaines pairs et homéo des protéines Pax8 et TTF-1 sont impliqués dans le contrôle de la prolifération des cellules thyroïdiennes médié par la TSH via l'AMPc (*Rossi et al., 1995*).

## f. Interactions avec la voie MAPK

La liaison de la  $\beta$ -arrestine aux récepteurs aux GPCRs met fin au couplage entre le récepteurs et les protéines G, et stimule également la transduction d'une nouvelle vague de signaux initiée par le récepteur désensibilisé (Figure 8a) et qui joue un rôle crucial dans la signalisation mitogène. La  $\beta$ -arrestine interagit aussi avec les composants de la voie des MAPKs (mitogen activated protein kinases) de manière indépendante des protéines G (*R.J. Lefkowitz, S.K. Shenoy et al., 2005; S.K. Shenoy, R.J. Lefkowitz, 2011*). Des études ont montré l'implication des GRKs et de la  $\beta$ -arrestine dans la transmission du signal du TSH-R à la voie des MAPKs (*Eszlinger et al., 2004; Voigt et al., 2004*). La  $\beta$ -arrestine est un adaptateur protéique qui lie à la fois le récepteur lié à son ligand et les domaines c-Src des kinases (*Luttrell et al., 1999*) (Figure 8). Dans les follicules thyroïdiens humains, il a été montré que la TSH stimule la phosphorylation et l'activation de l'isoforme p42 de ERK (Figure 8b) dans un processus indépendant de l'AMPc (*Saunier et al., 1995*). Cet effet n'est pas observé dans les thyrocytes canins, où la phosphorylation de p42-p44 n'est observée qu'en présence d'EGF (*Lamy et al., 1993*).

L'implication de la voie MAPK/ERK dans l'effet mitogène de la TSH reste à être confirmé et les résultats obtenus sont souvent opposés selon l'origine des thyrocytes. En revanche, de nombreuses études ont mis à jour le rôle de la voie MAPK/ERK et de ses mutations oncogéniques dans le contexte physiopathologique de la carcinogénèse.

Figure 8 : a. Représentation de l'interaction entre la signalisation du TSH-R et la voie des MAPKs *via* les GRKs et la  $\beta$ -arrestine b. Représentation schématique des voies MAPK chez les mammifères, organisées en trois modules différents (ERK1/2, JNK/p38 et ERK5).



### g. Interactions entre la signalisation TSH/TSH-R et les facteurs de croissance

Les études sur l'effet de la TSH et des différents facteurs de croissance (EGF, IGF-1, Insuline) sur la croissance et la fonction thyroïdienne ont permis de conclure que les hormones et les facteurs de croissance agissent de manière synergique sur la croissance et la fonction des cellules thyroïdiennes (Eggo *et al.*, 1984; Roger *et al.*, 1987).

Bien qu'il ait été montré que l'EGF (Epidermal Growth Factor) diminue de manière modérée la production d'AMPc engendrée par l'activation du TSH-R (*Greil et al., 1987*), d'autres études ont indiqué que la TSH exerce toujours ses effets dépendants de l'AMPc en présence d'EGF. L'inhibition de la fonction thyroïdienne par l'EGF semble être indépendante de l'activité de l'AC et de la voie de l'AMPc. Dans les thyrocytes porcins, l'EGF stimule la croissance et inhibe le métabolisme de l'iode (*Westermark et al., 1983*). Des effets similaires ont été observés dans les thyrocytes canins, où l'EGF et la TSH possèdent des effets antagonistes sur la différenciation des thyrocytes. L'EGF inhibe la captation de l'iode et l'expression de la Tg, toutes deux induites par la TSH *via* la signalisation de l'AMPc (*Roger et al., 1985*). L'expression du TSH-R est également régulée négativement par l'EGF (*Pohl et al., 1992*), et il a également été montré que la TSH régule positivement l'expression de l'EGF-R (EGF Receptor) (*Westermark et al., 1985*). Aussi, l'EGF et la TSH ont des effets opposés sur l'expression de l'IGF1-R (IGF-1 Receptor) (*Eggo et al., 1991*). Dans les thyrocytes canins, l'insuline, qui semble agir par l'intermédiaire de l'IGF1-R, potentialise l'effet de l'EGF sur la synthèse d'ADN (*Roger et al., 1987*). L'IGF-1 et l'insuline contrôlent de manière indépendante la croissance et la synthèse d'ADN, et se complètent pour induire la mitose (*Deleu et al., 1999*).

Dans les thyrocytes de rat, l'insuline et l'IGF-1 (Insulin Like Growth Factor 1) stimulent seuls l'expression de la Tg et potentialisent l'effet de la TSH (*Santisteban et al., 1987*), en modulant l'expression du facteur de transcription thyroïdien TTF-2 (*Santisteban et al., 1992*). Cette modulation intervient au niveau transcriptionnel (*Ortiz et al., 1997*), et positionne TTF-2 comme un médiateur important de l'expression des gènes de la Tg et de la TPO, par la TSH *via* l'AMPc, par l'insuline et l'IGF-1 (*via* le récepteur à l'IGF-1) (*Ortiz et al., 1997*). De manière intéressante, on sait que la TSH inhibe l'expression du TSH-R alors qu'elle stimule l'expression de la Tg, cependant leur expression est régulée de manière commune au niveau transcriptionnel par le facteur de transcription TTF-1. Le rétrocontrôle inhibiteur de la TSH sur l'expression du TSH-R se traduit par une diminution de l'expression de TTF-1 et nécessite la présence d'insuline. Le facteur de transcription Pax8, également impliqué dans la régulation de l'expression de la Tg, est quant à lui régulé positivement par la TSH, de manière indépendante de l'insuline. En effet, l'expression des facteurs de transcription TTF-1 et Pax8 est régulée de manière indépendante par la TSH et les facteurs de croissance du sérum tels



que l'insuline, qui n'affectent pas l'expression de Pax8. C'est pourquoi la présence d'insuline n'est pas requise pour induire l'expression de la Tg. La régulation indépendante de TTF-1 et Pax8 permet à la TSH réguler de manière opposée l'expression du TSH-R et de la Tg (*Medina et al.*, 2000).

## **2. Rôle de la voie du TGF-beta dans la régulation de l'homéostasie thyroïdienne**

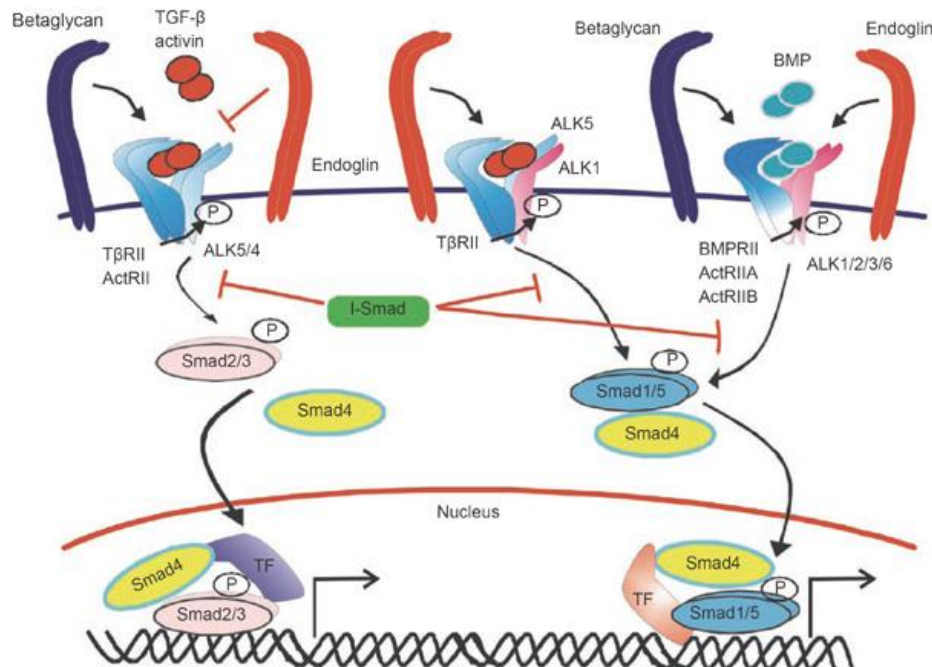
La régulation de l'homéostasie thyroïdienne fait également l'objet d'interactions complexes entre le TSH-R et d'autres facteurs et cytokines. De nombreuses évidences montrent l'implication de la voie TGF- $\beta$  dans la régulation de la prolifération et la différenciation des cellules thyroïdiennes. Le TGF- $\beta$  appartient à la famille des protéines dimériques multifonctionnelles, incluant les activines et les BMPs (Bone Morphogenic Proteins), qui régulent la croissance, la différenciation et la production de la matrice extracellulaire dans de nombreux types cellulaires. Dans les cellules épithéliales, le TGF- $\beta$  agit comme un suppresseur de tumeur en inhibant la croissance cellulaire ou en agissant sur la différenciation et l'apoptose.

### **a. La signalisation TGF- $\beta$ /Smad**

Le TGF- $\beta$  est synthétisé sous forme de précurseur inactif qui doit être activé par différentes protéases produites dans la thyroïde. L'activation de la signalisation TGF- $\beta$  débute par la phosphorylation des récepteurs kinases de la famille des récepteurs TGF- $\beta$  lors de la liaison de leurs ligands. Ces récepteurs sont des complexes hétéromériques composés de sérine/thréonine kinases membranaires de type I et II. Le modèle établi est constitué de deux récepteurs de type I et deux récepteurs de type II. Au sein du complexe, les récepteurs de type II sont constitutivement actifs et phosphorylent les récepteurs de type I sur leur résidu sérine/thréonine, en réponse à la liaison des ligands de la famille TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ s, activines. Il existe cinq récepteurs de type I et sept récepteurs de type II. Les caractéristiques structurales des différents complexes de récepteurs modulent leur spécificité vis-à-vis des différents Smads. Ces petites protéines intracellulaires, qui sont des facteurs de transcription, une fois phosphorylés, assurent la transduction du signal initié par la liaison du ligand TGF- $\beta$ . Les

récepteurs de type I actifs phosphorylent les R-Smads (receptor activated Smads 1/2/3/5/8) sur le motif SXS de leur domaine C-terminal. C'est leur état de phosphorylation qui détermine l'assemblage et le désassemblage des complexes Smads, et régule leur trafic dans le noyau cellulaire et leur activité transcriptionnelle. Le récepteur ALK5 de type I est spécifique des ligands TGF- $\beta$ s. Il phosphoryle Smad2 et Smad3, qui vont alors s'associer indépendamment à leur partenaire commun: Smad4 (Co-Smad). Ces complexes vont alors migrer dans le noyau cellulaire afin de réguler la transcription des gènes cibles de la voie TGF- $\beta$ , en interagissant avec d'autres facteurs de transcription, co-activateurs ou co-répresseurs, ou directement en se fixant à la séquence d'un promoteur. Les I-Smads (Smad6 et Smad7), inhibent par compétition l'activation des R-Smads par le TBRI (TGF- $\beta$  Receptor I). La protéine Smurf1 (Smad ubiquitin regulatory factor 1), une ubiquitine ligase est connue pour interagir avec Smad7 et s'associe avec le TBRI afin d'induire son renouvellement (*Suzuki et al., 2002*).

Figure 9 : Représentation schématique de la transduction du signal spécifique des membres de la famille TGF- $\beta$  médiée par les récepteurs sérine/thréonine kinase hétéromériques de type I et II (*Goumans et al., 2009*).



### b. Régulation de la prolifération et de la différenciation thyroïdiennes par le TGF- $\beta$

Dans de nombreux systèmes cellulaires épithéliaux, le TGF- $\beta$  est un inhibiteur de la croissance cellulaire et de la synthèse d'ADN, où il bloque le cycle cellulaire en supprimant les mécanismes d'action des cyclines et de leur kinases (*Ewen et al., 1993; Geng et al., 1993; Koff et al., 1993*). Il ralentit la progression du cycle cellulaire au milieu de la phase G1 en contrôlant directement le niveau des cyclines D1-3 et en prévenant la relocalisation de l'inhibiteur p27/kip1 de la cycline E/cdk2 au complexe D3/cdk4 (*Depoortere et al., 2000*). Le TGF- $\beta$  inhibe la croissance des thyrocytes chez le porc, le rat et l'homme (*Tsushima et al., 1988; Morris et al., 1988; Cirafici et al., 1992; Taton et al., 1993*). Dans les thyrocytes de rat, le TGF- $\beta$  antagonise les effets mitogènes de la TSH et des facteurs de croissance tel que l'IGF-1 (*Logan et al., 1994; Colletta et al., 1989; Carneiro et al., 1998; Mincione et al., 2003*).

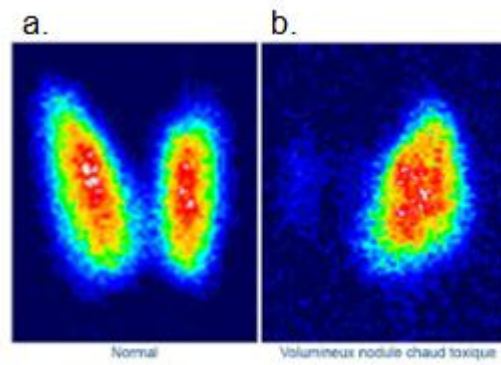
Il a également été démontré que le TGF- $\beta$  inhibe l'expression des gènes spécifiques de la fonction thyroïdienne comme le NIS, la Tg, la TPO et le TSH-R (*Colletta et al.*, 1989; *Taton et al.*, 1993; *Kawagushi et al.*, 1997; *Franzén et al.*, 1999) dans la majeure partie des espèces étudiées. Dans la lignée thyroïdienne de rat FRTL-5, le TGF- $\beta$  inhibe l'expression du NIS au niveau transcriptionnel et traductionnel, mais également l'expression et l'activité de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase impliquée dans le métabolisme de l'iode (*Pekary et al.*, 1997). Le contrôle transcriptionnel de l'expression des gènes de différenciation thyroïdiens par le TGF- $\beta$  se fait *via* le complexe Smad2/Smad4. Le blocage de la translocation du complexe Smad2/Smad4 dans le noyau inhibe l'expression du facteur de transcription Pax8 au niveau transcriptionnel, ce qui inhibe la formation des complexes Pax8/ADN, provoquant ainsi une diminution de l'expression des marqueurs contrôlés par Pax8 (*Nicolussi et al.*, 2003). Smad3 jouerait également un rôle clé dans l'inhibition de l'expression du NIS en interagissant avec Pax8, ce qui empêcherait sa liaison aux éléments de réponse localisés dans le gène *NIS* (*Delorme et al.*, 2002). Enfin, le TGF- $\beta$  joue un rôle important dans la modulation du cytosquelette et de la matrice extra-cellulaire (*Garbi et al.*, 1990). En effet, le TGF- $\beta$  est notamment impliqué dans l'incorporation de la fibronectine et du collagène dans la matrice (*Ignatz et al.*, 1986), et module également l'expression des protéines de l'adhésion cellulaire (*Ignatz et al.*, 1987).

### c. Utilisation des propriétés de captation d'iode du NIS en médecine

Les principaux isotopes radioactifs de l'iode sont l'iode 132 et 133, qui ont une demi-vie de quelques heures, et l'iode 131 qui a une demi-vie de 8 jours. L'iode 131 émet des rayonnements  $\beta$  et  $\delta$ . L'utilisation de l'iode 131 en médecine repose sur les propriétés de fixation de l'iode par la thyroïde, *via* le symporteur de l'iode : NIS. Le NIS étant exprimé majoritairement dans la thyroïde, et faiblement dans les intestins, cela permet une spécificité de l'examen ou du traitement pratiqué. Ainsi, l'iode va être concentré principalement par la thyroïde. Cette propriété de fixation de l'iode des cellules thyroïdiennes permet l'utilisation de l'iode 131 pour des examens diagnostiques tels que la scintigraphie de la thyroïde. Celle-ci permet l'exploration des nodules de la thyroïde, afin de discerner les nodules dits chauds qui fixent l'iode, des nodules froids qui ne fixent pas l'iode (Figure 10). Dans le cas du traitement d'un cancer de la thyroïde, la scintigraphie du corps entier est pratiquée en post-opératoire afin de vérifier le caractère complet de l'exérèse

chirurgicale ou de visualiser la persistance de la maladie et la présence d'éventuelles lésions métastatiques fixantes.

Figure 10: Scintigraphie de la thyroïde a. Thyroïde normale : nodules froids b. Nodule chaud.



## II. Les carcinomes thyroïdiens de souche folliculaire

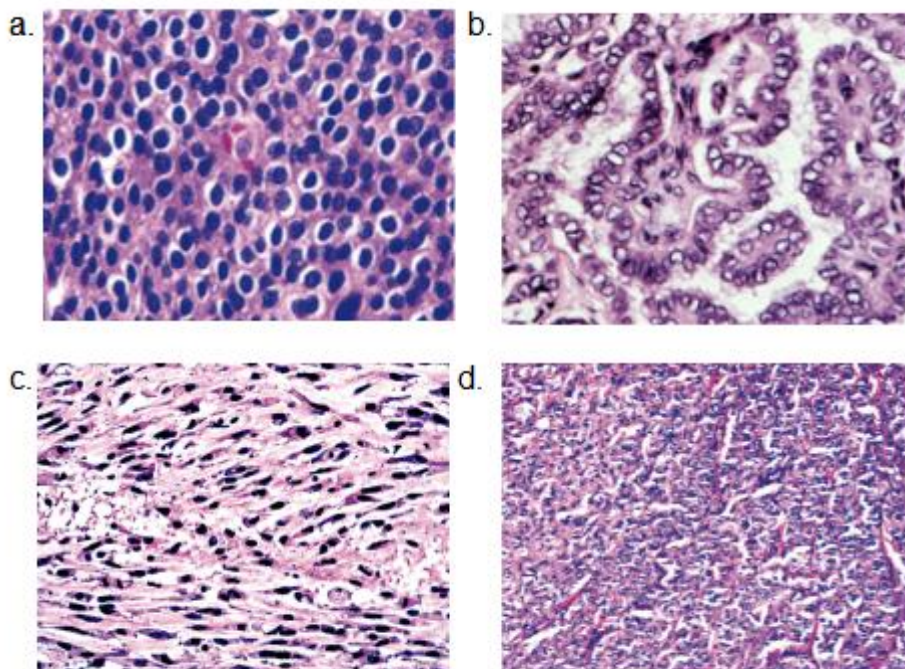
Le cancer de la thyroïde est l'affection endocrine la plus répandue : il a souvent pour origine les cellules folliculaires de la thyroïde, à l'exception du cancer médullaire (CMT) qui représente 5 à 8% des cas de cancers de la thyroïde et qui est issu des cellules parafolliculaires ou cellules C (Figure 1b). Nous nous intéresserons ici aux cancers thyroïdiens de souche folliculaire et principalement au cancer papillaire de la thyroïde. Les cancers papillaires et folliculaires de la thyroïde sont des tumeurs malignes épithéliales de souche folliculaire. Les cancers papillaires représentent 80% des cancers de la thyroïde et les cancers folliculaires environ 15%. Ils sont appelés cancers différenciés car ils conservent certaines caractéristiques morphologiques et fonctionnelles de ces cellules, comme la sensibilité à la TSH, la capacité de capter l'iode et la sécrétion de thyroglobuline, avec cependant une très faible production d'hormones thyroïdiennes T3 et T4. Les cancers dits anaplasiques sont également développés à partir des thyrocytes et sont caractérisés par leur dédifférenciation et leur agressivité. Ils représentent 5% des cancers thyroïdiens. L'examen histologique permet la classification des cancers issus de cellules folliculaires en cancers folliculaires, papillaires ou anaplasiques (Figure 11).

### A. Anatomico-pathologie

Les cancers folliculaires peuvent ressembler à la thyroïde normale, et le diagnostic de malignité repose sur l'existence d'une invasion vasculaire ou capsulaire (Figure 11a). C'est un cancer souvent unifocal, avec des métastases ganglionnaires peu fréquentes et des métastases à distance qui siègent au niveau des poumons et des os. Les cancers papillaires sont comme leur nom l'indique constitués de papilles (Figure 11b), qui sont des structures composées d'un axe conjonctivo-vasculaire et bordées de cellules épithéliales et de cellules folliculaires. Dans la majorité des cas, il s'agit d'une tumeur encapsulée, souvent multifocale. L'effraction de la capsule thyroïdienne est notée dans 8 à 32% des cas (Hedinger, International histological Classification Of tumors, 1988; Schlumberger, William's Textbook of Endocrinology, 2003) alors que dans 50% des cas, on retrouve des métastases ganglionnaires cervicales. Les métastases à distance sont peu fréquentes et siègent principalement au niveau des poumons. Cependant, les métastases peuvent être à l'origine du diagnostic alors

tardif. Leur fréquence augmente avec la taille de la tumeur thyroïdienne. Dans ce cas, le diagnostic peut être confirmé par la mise en évidence de la thyroglobuline par immunohistochimie sur biopsie d'une métastase. L'histologie des cancers anaplasiques est faite de cellules géantes envahissant et détruisant les structures thyroïdiennes normales (Figure 11c). Elles ne produisent pas de Tg et n'expriment pas de récepteurs à la TSH. La masse tumorale augmente rapidement et envahit généralement les structures locales telles que la trachée, l'œsophage et les vaisseaux du cou. L'invasion des ganglions lymphatiques est également courante.

Figure 11 : Coupes histologiques des différents cancers de la thyroïde a. Cancer folliculaire de la thyroïde (FTC) b. Cancer papillaire de la thyroïde (PTC) (GNU Free Documentation License) c. Cancer anaplasique de la thyroïde (ATC) d. Carcinome médullaire de la thyroïde (CMT). (Copyright: (c) 2003-2013, PathologyOutlines.com, Inc. , Contributed by Dr. Mark R. Wick).



## B. Aspects cliniques

### 1. Epidémiologie et facteurs de risque

L'incidence apparente des cancers papillaires et folliculaires augmente régulièrement depuis plusieurs décennies en raison d'une meilleure détection. En effet, de nombreux progrès permettant l'amélioration des techniques de détection ont été effectués et la majorité des nodules thyroïdiens sont mis en évidence par examen morphologique pratiqué pour d'autres raisons. Cela permet la détection précoce de petits cancers papillaires qui ont un très bon pronostic. Les cancers de 1 cm ou moins représentent 49% de l'augmentation de l'incidence. Cependant, les bénéfices de cette détection précoce n'ont pas été démontrés. En effet, on distingue les carcinomes (>10mm) des micro-carcinomes (<10mm) qui sont beaucoup plus fréquents mais ont un potentiel évolutif très faible. Les nodules thyroïdiens sont fréquents, mais les cancers différenciés de la thyroïde restent rares. Seulement 5% des nodules thyroïdiens s'avèrent être des cancers après ponction à l'aiguille fine. La prévalence actuelle des cancers papillaires et folliculaires en France est de 8/6 000. Ils représentent 3 500 nouveaux cas par an et causent environ 300 décès. Environ 80 000 personnes sont surveillées pour un cancer de la thyroïde. Ils se manifestent le plus souvent chez l'adulte jeune (environ 45 ans), avec une prédominance féminine (2/1). Ils sont rares chez l'enfant et l'adolescent.

Cinq pour cent des sujets atteints de cancers papillaires ont un parent atteint du même cancer, ce qui suggère l'existence d'une prédisposition familiale. L'anomalie génétique à l'origine de cette prédisposition n'est à ce jour pas connue. Les facteurs de prédisposition du développement d'une forme sporadique du cancer papillaire de la thyroïde sont l'irradiation de la tête et du cou, l'hypothyroïdie d'Hashimoto, la polypose adénomateuse familiale et le syndrome de Cowden. Les cancers folliculaires (FTC) sont plus fréquents chez les femmes. L'irradiation pendant l'enfance est un facteur de risque important et elle est aujourd'hui la seule cause connue. L'incidence augmente une dizaine d'années après l'exposition avec un maximum après 20 ans. Deux tiers des tumeurs apparues chez les sujets irradiés sont des adénomes (tumeur bénigne) et 1/3 sont des cancers, majoritairement papillaires. L'augmentation des cancers papillaires chez les enfants ayant été soumis aux radiations de l'accident de Tchernobyl en 1986 en est une bonne illustration.



Les cancers anaplasiques se voient généralement après 50 ans et représentent peut être l'évolution d'un cancer différencié (papillaire) non traité. Le cancer émerge probablement d'un goitre à évolution lente ou chez les patients porteurs d'un carcinome thyroïdien différencié, le plus souvent de type papillaire.

## 2. Manifestation clinique et diagnostique

La majorité des cancers de la thyroïde constituent un nodule thyroïdien asymptomatique. Ces nodules sont souvent cancéreux lorsque le patient a subi une irradiation pendant l'enfance. Il s'agit le plus souvent d'un nodule thyroïdien palpable, généralement ferme, indolore et peu évolutif. Parfois le nodule n'est pas palpable et est découvert de manière fortuite lors d'une échographie. Le premier examen pratiqué après la détection d'un nodule solide est le dosage de la TSH. Quasiment tous les patients atteints d'un cancer de la thyroïde ont un taux de TSH normal. Les carcinomes thyroïdiens ne sécrètent pas plus de thyroglobuline que les thyrocytes normaux, le dosage de la Tg n'a aucun intérêt pour le diagnostic de malignité d'un nodule, par manque de spécificité. Les caractéristiques du nodule sont précisées par échographie (localisation, volume). Elle permet de déterminer les caractéristiques échogènes d'un nodule; cependant la plupart des nodules (bénins ou malins) sont hypoéchogènes. Ce caractère a une bonne sensibilité mais une très faible spécificité pour le diagnostic d'un cancer thyroïdien. De même, 80% des nodules (bénins ou malins) sont hypofixants, c'est-à-dire qu'ils captent l'iode de manière moins efficace que le tissu thyroïdien avoisinant, ils sont appelés nodules froids. Le caractère froid d'un nodule à la scintigraphie à l'iode 123 a également une bonne sensibilité, mais une très faible spécificité pour le diagnostic des cancers thyroïdiens. A ce jour, la cytoponction à l'aiguille fine est l'examen le plus performant permettant de distinguer les nodules bénins des nodules malins. Alors que les nodules de moins de 1cm sont surveillés avec une évaluation tous les 6 à 12 mois, la cytoponction à l'aiguille fine, guidée par échographie, est pratiquée sur les nodules de 1 à 1,5 cm (*Cooper et al., 2009 ; Pacini et al., 2008*). Dans 75% des cas il s'agit d'un nodule bénin, dans 5% des cas d'un nodule malin; 20% des cas sont indéterminés et correspondent à des proliférations de cellules folliculaires, dont environ 20%

sont des cancers. Seul l'examen histologique permet un diagnostic fiable, validé par la présence d'un envahissement vasculaire ou capsulaire.

Dans le cas des cancers anaplasiques, la TSH est souvent normale ou parfois élevée, une hypothyroïdie pouvant être causée par destruction du tissu thyroïdien normal. Elles ne fixent pas l'iode. Les signes généraux sont l'asthénie, l'amaigrissement, l'anorexie et la fébricule. La cytologie signe le diagnostic et permet le diagnostic différentiel avec les lymphomes et autres cancers secondaires.

### **3. Traitement du carcinome de la thyroïde**

Le traitement est d'abord chirurgical, avec une thyroïdectomie totale ou strumectomie, même pour les cancers papillaires de bon pronostic. Dans le cas du cancer papillaire, ce geste est complété d'un curage ganglionnaire cervical et des ganglions lymphatiques du compartiment central. Deux à cinq jours après l'ablation, une scintigraphie du corps entier à l'iode 123 est effectuée dans le but de dépister d'éventuelles métastases encore inconnues.

La thyroïdectomie totale est complétée par une radiothérapie postopératoire dans le but d'une destruction isotopique à l'iode 131 du tissu thyroïdien normal résiduel et d'éventuels résidus tumoraux microscopiques. L'irradiation est effectuée environ un mois après l'ablation de la thyroïde et sans avoir administré de traitement substitutif (prise d'hormones thyroïdiennes). Le patient est alors en hypothyroïdie avec un taux de TSH élevé, pour stimuler la captation de l'iode 131 par les résidus cervicaux et éventuelles métastases lors de son administration (les cellules carcinomateuses étant généralement sensibles à la TSH). Afin d'éviter les symptômes invalidants d'une hypothyroïdie après l'interruption des hormones thyroïdiennes, il est possible d'effectuer une injection de TSH recombinante humaine ou rhTSH. L'alimentation du patient est également déprivée en iode. L'administration d'iode 131, qui se fait en isolement total du patient, permet aussi de mettre en évidence par scintigraphie d'éventuelles métastases non identifiées avant l'acte chirurgical. L'irradiation par l'iode 131 permet de traiter ces métastases lorsqu'elles sont de petite taille. Sinon, une nouvelle intervention chirurgicale doit être envisagée. Le traitement

chirurgical et isotopique est suivi d'un traitement par la L-Thyroxine ou lévothyroxine (LT4). On administre au patient une dose de LT4 supérieure à la dose nécessaire pour substituer la sécrétion thyroïdienne après thyroïdectomie, dans le but de freiner la sécrétion de TSH. De ce fait, on inhibe la prolifération d'éventuelles cellules tumorales résiduelles dépendantes de la TSH.

L'incidence des cancers papillaires de la thyroïde augmente beaucoup plus vite que celle des autres pathologies, cependant la plupart des PTCs diagnostiqués sont de petites tailles et présentent généralement un faible risque. Bien qu'il permette d'éliminer les risques de rechute chez les patients présentant un phénotype plus agressif, les bénéfices du traitement précoce de ce type de cancer chez une majorité de patients reste controversés (*McLeod et al., 2013*). Le traitement par radiothérapie métabolique à l'iode 131, bien que très efficace pour l'élimination des tumeurs thyroïdiennes différenciées, a des effets qui ne se limitent pas aux cellules tumorales, c'est pourquoi il peut engendrer des effets secondaires aigus et des séquelles à long terme, parfois psychologiques, mais également des effets génétiques et cancérogènes. Parmi ces effets à long terme, on observe une baisse de la fertilité chez les femmes et les hommes, par contre aucun effet n'a aujourd'hui été constaté sur le devenir des grossesses et la santé des enfants des patients traités à l'iode 131. Ces derniers sont cependant une source potentielle d'irradiation pour leur entourage.

Le phénomène de second cancer est connu depuis le début du XXe siècle, mais c'est une préoccupation récente en raison de l'augmentation de l'incidence des cancers. Les seconds cancers après rémission d'un premier cancer peuvent être spontanés, favorisés par des facteurs communs au premier cancer, génétiques ou environnementaux, ou bien favorisés par le traitement du premier cancer (Chimiothérapie, Hormonothérapie ou Radiothérapie). Des études comparatives prennent en compte les facteurs qui modifient le risque, mais celui-ci est cependant difficile à quantifier (*H Suit et al., 2007*). Les cancers radio-induits sont engendrés par le pouvoir cancérogène des radiations ionisantes (RI) qui participent au processus multi-étapes de la transformation cellulaire. Les RI induisent des lésions à l'ADN, en général des cassures double brin (DSB). Une réparation imparfaite, induit une accumulation de mutations oncogéniques ou non, pouvant seules ou en coopération entraîner le développement d'un cancer. L'âge auquel a eu lieu l'irradiation est un facteur important, mais aussi la dose. Le fractionnement et la technique utilisée sont cependant des

paramètres maîtrisés et contrôlés aujourd'hui. A ce jour, les données médicales excluent un effet cancérigène de l'iode 131 sur la thyroïde à l'âge adulte. Ces études ne permettent pas d'exclure un effet cancérigène chez l'enfant. En effet, après irradiation pendant l'enfance le risque de nodules thyroïdiens, dont 1/3 sont des cancers papillaires, est augmenté. Ainsi le risque de second cancer après administration d'iode 131 est 25% supérieur à la population générale.

#### **4. Intérêt thérapeutique de l'identification de nouvelles cibles moléculaires pour traiter les formes incurables**

Peu de thérapies efficaces existent pour le traitement des cancers ayant évolué vers une forme indifférenciée, mise à part le protocole de traitement par chirurgie et radiothérapie métabolique. Les formes incurables sont les tumeurs réfractaires à la radiothérapie métabolique à l'iode 131 et inopérables. Dans ce cas, les autres formes de traitement n'ayant pas leur place dans le traitement du carcinome thyroïdien différencié peuvent être envisagées mais elles sont très limitées. Il s'agit de la radiothérapie externe visant à freiner la progression de la tumeur afin d'augmenter l'espérance de vie du patient mais qui s'avère souvent non curative et utilisée en dernier recours. Des traitements chimiothérapiques peuvent également être envisagés, cependant les molécules actuellement disponibles sont peu efficaces chez les patients multirécidivistes. Les formes évolutives et réfractaires aux traitements conventionnels doivent bénéficier des progrès thérapeutiques récents que représentent les thérapies moléculaires ciblées actuellement en cours d'évaluation. De nombreuses études sont effectuées et tentent d'identifier les mécanismes moléculaires et génétiques impliqués dans la carcinogénèse thyroïdienne et son évolution vers des formes aggravées s'avérant incurables par les moyens thérapeutiques disponibles à ce jour. Ces études ont donc pour objectif d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pouvant être ciblées pharmacologiquement avec une recherche de spécificité.

### C. Les anomalies génétiques de la carcinogenèse thyroïdienne

Nous nous intéresserons à la théorie de la carcinogenèse séquentielle et évolutive, qui considère que la plupart des cancers ont une origine clonale, émergeant d'une cellule anormale unique. Ce modèle est supporté par de nombreuses évidences fondées sur l'étude de modèles clinique et expérimentaux. C'est aujourd'hui le modèle qui est accepté pour de nombreux cancers. Selon ce modèle, les cancers folliculaires sont issus d'adénomes folliculaires, les cancers papillaires de cellules précurseurs générées à partir de thyrocytes, et les cancers anaplasiques se développeraient à partir de carcinomes folliculaires ou papillaires par dédifférenciation.

Les anomalies génétiques mises en évidence dans les cancers folliculaires et papillaires sont les réarrangements chromosomiques *PPAR $\gamma$ -PAX8* et *RET/PTC*, et des mutations ponctuelles des gènes *RAS* et *BRAF*, qui provoquent une activation permanente de la voie MAPK. Ces mutations représentent 70 à 80% des mutations oncogénique des cas de cancers, ce qui met en évidence l'importance de la voie MAPK dans le développement de ces tumeurs.

#### 1. Les réarrangements chromosomiques affectant un oncogène

##### a. Les réarrangements *PPAR $\gamma$ -PAX8*

Tout d'abord une translocation spécifique fréquente (t(2;3)(q13;3p25)) a été décrite dans des cas de cancers folliculaires (FTC) agressifs (*Sozzi et al.*, 1992) mais c'est seulement en 2000 que le réarrangement *PAX8-PPAR $\gamma$*  a été caractérisé (*Kroll et al.*, 2000) dans les cancers folliculaires de la thyroïde. Il s'agit d'une translocation interchromosomique impliquant les chromosomes 2 et 3 : la fusion du fragment 2q19, contenant la majeure partie du gène codant pour Pax8, avec le fragment 3p25 contenant la séquence complète du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor gamma), forme un néo-gène, qui résulte en l'expression d'une protéine de fusion appelée PFFP, impliquée dans la pathogenèse du FTC. Cette protéine chimère conserve certaines propriétés de liaison à l'ADN de Pax8 et de liaison à certains ligands du récepteur PPAR $\gamma$ , lui conférant un potentiel significatif pour interférer avec les voies de signalisation faisant intervenir Pax8 et PPAR $\gamma$ . Elle

influence la tumorigenèse en exerçant un effet dominant négatif sur la protéine PPAR $\gamma$  et en stimulant la transcription des promoteurs comportant des éléments de réponse à Pax8 (Placzkowski *et al.*, 2008; Eberhardt *et al.*, 2010). Le récepteur PPAR $\gamma$  est connu pour participer à la régulation de l'adipogenèse et jouer un rôle majeur dans la sensibilité à l'insuline, mais il a plus récemment été étudié pour son rôle dans la tumorigenèse, qui semble être médié par son influence sur l'expression de gènes impliqués dans de nombreuses voies de signalisation (Fajas *et al.*, 2001; Michalik *et al.*, 2006; Rieusset *et al.*, 1999; Schoonjans *et al.*, 1997). Les ligands de PPAR $\gamma$  sont également étudiés en tant qu'agents thérapeutiques dans de nombreux cancers et notamment dans les cancers de la thyroïde (Shen & Chung, 2005). Aucune mutation ponctuelle du gène *PPAR $\gamma$*  n'a été identifiée à ce jour.

#### **b. Les réarrangements *RET/PTC***

Ces réarrangements sont trouvés dans 15% des cas de cancers papillaires. C'est l'altération génétique la plus fréquente retrouvée dans les cas de cancers papillaires de la thyroïde, malgré l'absence de l'expression de la protéine RET dans les cellules folliculaires. Le proto-oncogène RET est localisé sur le chromosome 10q11.2 et code pour un récepteur tyrosine kinase qui active Ras. Le réarrangement conduit à la fusion du domaine tyrosine kinase de RET avec la région 5'-terminale de gènes exprimés constitutivement dans la thyroïde, générant ainsi des oncogènes chimères appelés *RET/PTC*. Les protéines chimériques générées forment des dimères de manière indépendante de la liaison de leur ligand, constituant ainsi une tyrosine kinase cytoplasmique constitutivement active, engendrant l'activation de Ras.

La forte proportion de cancers papillaires porteurs de la mutation *RET/PTC* chez les populations exposées aux radiations lors de l'accident de Tchernobyl supporte l'hypothèse que les radiations induisent les réarrangements chromosomiques et que ceux-ci représentent probablement des évènements précoces de la pathogenèse thyroïdienne, considérant le fait qu'ils évoluent très souvent vers un micro-carcinome papillaire. Une étude a montré la présence de *RET/PTC* dans 21% des adénomes folliculaires bénins (Ishizaka *et al.*, 1991), qu'ils soient d'origine sporadique ou induits par irradiation, ce qui suggère que *RET/PTC* seul n'est pas capable d'initier la carcinogenèse thyroïdienne. De plus, ces réarrangements ne

sont présents que dans une partie de la population cellulaire tumorale, ce qui est favorable à l'hypothèse d'un événement secondaire de la carcinogenèse thyroïdienne.

## 2. Les mutations ponctuelles de la voie MAPK

### a. Les mutations du gène *ras*

L'oncogène *ras* exerce un rôle important dans la régulation de la croissance cellulaire et la différenciation. Les mutations ponctuelles activatrices du gène *ras* se situent respectivement dans les codons 12, 13 et 61 des gènes *H-ras*, *K-ras* et *N-ras*. Elles sont retrouvées dans 40% des cas de cancers de la thyroïde, avec une prédominance de la mutation de *N-ras* sur les mutations de *H-ras* et *K-ras*. Celle-ci représente 45% des cas de cancers folliculaires. Cependant, il existe une forte prédominance de *K-ras* dans les cas de cancers folliculaires radio-induits par rapport aux formes spontanées. La présence des mutations du gène *ras* aussi bien dans les adénomes que dans les carcinomes suggère leur implication dans les étapes précoces de la carcinogenèse thyroïdienne. Ces mutations sont souvent associées à des caractéristiques histologiques de mauvais pronostic et à une faible espérance de survie. Les mutations du gène *ras* sont également retrouvées dans 15% des cas de cancers papillaires de la thyroïde, particulièrement dans les variants folliculaires (FVPTC). Elles sont très peu associées aux métastases des ganglions lymphatiques. Cependant, les cancers papillaires et folliculaires porteurs des mutations *ras* sont susceptibles d'évoluer en cancers anaplasiques par dédifférenciation.

### b. Les mutations du gène *braf*

Le gène *braf* code pour la protéine BRAF, une sérine/thréonine kinase qui est le principal activateur de la voie MAPK (Figure 6b). La première mutation du gène *braf* qui est aussi la plus commune, a été identifiée en 2002. Il s'agit de la transversion T1799A, qui se traduit au niveau protéique par un acide glutamique à la place d'une valine (V600E). Cette valine est adjacente à la sérine 599 (Ser599), qui est un site de phosphorylation activateur. Dans la conformation normale inactive de la kinase, les résidus G597 à V601 forment des interactions hydrophobes avec les résidus G465 à V472 dans le site fixateur de l'ATP ou P-loop. La mutation BRAF<sup>V600E</sup> rompt ces interactions hydrophobes, laissant la kinase dans une

conformation catalytique active, ce qui entraîne une activité kinase très fortement augmentée. Il s'en suit une augmentation directe de la phosphorylation de MEK.  $BRAF^{V600E}$  est retrouvée dans 80% des cas de mutation du gène *braf* et a été identifiée dans de nombreux cas de cancers chez l'homme tels que le mélanome. Il existe plus de 40 mutations de l'oncogène *Braf*, dont la majorité est localisée dans le domaine kinase et la P-loop. Cependant, certaines mutations entraînent une diminution de l'activité kinase de la protéine sur la phosphorylation de MEK. De manière intéressante, ces mutations confèrent une activité de transphosphorylation qui active CRAF en formant des hétérodimères. Par exemple, la mutation  $BRAF^{D594V}$ , inactive du point de vue catalytique, est connue pour activer CRAF et potentialiser les mutations de RAS, ce qui mime l'activation de la cascade de signalisation MAPK et entraîne une augmentation de la croissance tumorale. Ce phénomène met en évidence les risques de cibler l'activité de BRAF.

Bien que les mutations ponctuelles du gène *Braf* soient les plus fréquentes, une étude a mis en évidence l'existence d'un autre mécanisme d'activation du gène par réarrangement chromosomique aboutissant à la formation d'une protéine de fusion appelée ASKAP9/BRAF. Celle-ci comprend le domaine kinase mais est dépourvue du domaine autorégulateur de la protéine BRAF, ce qui résulte en l'activation constitutive de la kinase. Ce réarrangement chromosomique est majoritairement retrouvé dans les tumeurs radio-induites et très rarement dans les formes sporadiques (*Fusco et al., 2005; Ciampi et al., 2005*).

### c. La mutation de p53

Le gène *p53* code pour une phosphoprotéine nucléaire qui est le médiateur de l'arrêt du cycle cellulaire en phases G1 et G2 et joue un rôle important dans le développement des cancers. La mutation de *p53* est un événement tardif dans la progression des cancers thyroïdiens. Elle est retrouvée dans 40 à 60% des cas de cancers anaplasiques indifférenciés et dans seulement 5 à 10% des autres formes de cancers. Elle est associée à la progression d'un cancer différencié en cancer dédifférencié, et est considérée comme un événement secondaire dans l'évolution de la carcinogenèse : *p53* muté n'a donc pas un rôle initiateur comme  $BRAF^{V600E}$ . En plus de participer à la progression du cancer, l'inactivation de *p53* est connue pour être impliquée dans les phénomènes de chimiorésistance.



## **D. Mécanismes moléculaires de la carcinogenèse thyroïdienne et de la progression tumorale**

### **1. La dédifférenciation cellulaire et la perte de l'expression des protéines impliquées dans le métabolisme de l'iode**

L'activation de proto-oncogène, leur surexpression ou bien les deux, jouent un rôle important dans la tumorigenèse thyroïdienne et déterminent la perte de différenciation et de la fonction thyroïdienne (*Winford Thomas et al., 1993; Farid NR et al., 1996*). Au cours de la tumorigenèse thyroïdienne étudiée sur des tissus tumoraux, on observe un pattern d'altération caractéristique des gènes spécifiques de la thyroïde impliqués dans le métabolisme de l'iode (NIS>TPO>Tg>TSH-R) (*Caillou B et al., 1998*). Il est similaire à celui observé *in vitro* dans les lignées thyroïdiennes de rat, PCCL3 et FRTL-5, transformées par l'expression d'un oncogène, où l'altération des facteurs de transcription Pax8 et TTF-1 a également été constatée dans les cellules transformées par K-Ras et RET/PTC1 (*Francis Lang et al., 1992; De Vita et al., 1998*). Différents degrés de malignité et de différenciation ont été observés dans les différentes lignées obtenues, qui cependant montrent toutes une altération de la fonction de captation d'iode (*Trapasso et al., 1999*). De manière intéressante, dans les lignées de rat transformées possédant un degré de malignité élevé, on observe la perte de l'expression de tous les marqueurs de la fonction thyroïdienne, alors que dans les lignées possédant un faible degré de malignité le processus de dédifférenciation semble limité à la perte de la fonction de captation de l'iode. Ces résultats suggèrent que la perte de la capacité de captation d'iode est un événement précoce du processus de transformation oncogénique des cellules thyroïdiennes. De plus, l'analyse de l'expression des gènes spécifiques de la fonction thyroïdienne dans les banques de données de tissus thyroïdiens a permis de mettre en évidence que l'absence de l'ARNm NIS n'est pas restreinte aux phénotypes malins. Elle est également observée dans les adénomes folliculaires bénins, alors que l'expression des ARNm de la Tg, du TSH-R et de la TPO est similaire à celle observée dans les tissus normaux. En revanche, dans les tissus néoplasiques l'expression des ARNm de la Tg et de la TPO est également altérée tandis que celle du TSH-R ne l'est généralement pas. Dans les tumeurs de stades tardifs, on observe souvent une diminution de l'expression du NIS et de la TPO, qui n'est pas accompagnée d'une altération de l'expression de la Tg ou du TSH-R (*Arturi et al., 1998*). Ces résultats concordent avec l'hypothèse considérant que l'altération de

l'expression du NIS est un événement précoce dans la transformation des cellules thyroïdiennes et la carcinogenèse, et non la conséquence de la progression du cancer.

A ce jour différentes hypothèses tentent d'expliquer les cibles potentielles des altérations impliquées dans le processus de tumorigenèse qui sont responsables de la perte de la capacité de captation et de la concentration de l'iode dans les thyrocytes. On considère tout d'abord l'aspect génétique, avec l'altération de la transcription et de la structure du gène *NIS*, éventuellement liées. Puis on considère ensuite l'aspect protéique avec les altérations de la synthèse de la protéine NIS et de son transport à la membrane plasmique depuis le réticulum endoplasmique (RE). Une étude récente montre que la présence du NIS à la membrane plasmique est altérée dans les adénomes bénins et dans les tumeurs thyroïdiennes malignes de manière dépendante de leur état de différenciation (*Kollecker et al., 2012*). Une autre étude a montré que le défaut de marquage du NIS était bien la conséquence d'un défaut d'adressage de la protéine à la membrane plasmique (*Sodré et al., 2008*). Cependant, certains patients ne présentant pas de marquage du NIS à la membrane mais captent l'iode radioactif, ce qui met en évidence une différence de sensibilité entre les deux méthodes pour la détection de l'expression du NIS, l'expression même très faible du NIS dans les carcinomes thyroïdiens pouvant ne pas être détectée par immuno-histochimie alors qu'elle permet de détecter la présence d'iode radioactif capté par les cellules (*Kollecker et al., 2012*). De plus l'hétérogénéité de l'expression du NIS dans les tumeurs influence la sensibilité de la détection, c'est pourquoi à ce jour l'analyse du marquage immunohistochimique du NIS dans les carcinomes thyroïdiens ne peut pas être utilisée pour prédire les capacités de captation d'iode radioactif des tumeurs. On doit également considérer l'altération de l'organification de l'iode, conséquence de l'altération de l'expression des autres gènes spécifiques de la thyroïde impliqués dans le métabolisme de l'iode tels que la TPO, la NADPH oxydase DUOX2 et la Tg.

La possibilité de rétablir l'expression et la fonctionnalité du NIS dans les cellules tumorales thyroïdiennes est depuis longtemps exploitée *via* l'utilisation de différents agents pharmacologiques. Ces études suggèrent que le processus responsable du processus de transformation à l'origine de la perte de la capacité de captation de l'iode par les thyrocytes est initié au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel, mais n'interviendrait pas au niveau de la structure du gène *NIS*. Cependant, l'augmentation de l'expression de l'ARNm du

gène *NIS* ne s'accompagne pas forcément d'une augmentation de l'expression de la protéine ou de la réactivation de la capacité de captation de l'iode. Il est nécessaire d'identifier les multiples acteurs de la dédifférenciation des cellules thyroïdiennes afin de pouvoir traiter de manière efficace et ciblée les tissus thyroïdiens tumoraux par radiothérapie métabolique à l'iode 131.

## **2. La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT)**

En plus de la dédifférenciation des thyrocytes au cours du développement de la carcinogenèse, un autre processus se met en place et évolue en parallèle, la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT pour Epithelial to Mesenchymal Transition), qui est un modèle cohérent du concept de plasticité cellulaire. C'est le processus par lequel les cellules épithéliales, telles que les cellules folliculaires, perdent leur polarisation (orientation basale et apicale) et leurs jonctions intercellulaires, permettant ainsi une réorganisation du cytosquelette afin d'acquérir les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles des cellules du mésenchyme. L'EMT a tout d'abord été décrite dans le développement embryonnaire où la migration cellulaire et le remodelage tissulaire jouent un rôle primaire dans la régulation de la morphogenèse des organismes multicellulaires. Des études récentes ont montré son implication dans le développement de nombreuses conditions physiopathologiques comme le cancer et la fibrose. Les signaux susceptibles d'induire l'EMT sont tout d'abord les composants de la matrice extracellulaire (collagène et acide hyaluronique), plusieurs facteurs de croissance solubles comme l'HGF (Hepatocyte Growth Factor), le PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), le FGF (Fibroblast Growth Factor) et le TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ). Ces signaux initiés depuis l'environnement extracellulaire et intégrés au niveau de la membrane par leurs récepteurs spécifiques, impliquent ensuite plusieurs voies de signalisation, facteurs de transcription et gènes cibles, qui montrent souvent de nombreuses interactions. La spécificité et le degré d'implication d'un signal seul sur l'EMT dépendent du contexte cellulaire. La plupart de ces signaux convergent vers la régulation négative de l'expression de la E-cadhérine, qui est une étape cruciale de la perte de l'adhérence cellulaire pouvant mener à la déstabilisation de l'architecture épithéliale. La réactivation du gène de la E-cadhérine permet de contrer le

processus de l'EMT (*Alcloque et al., 2009; Guarino et al., 2007*). On constate également l'activation de la transcription de nombreux gènes « mésoenchymateux » comme la vimentine, la N-cadhérine ou PAI-1.

### 3. Rôle de l'oncogène $BRAF^{V600E}$ dans ces mécanismes

La détection de la mutation  $BRAF^{V600E}$  s'avère être d'une grande sensibilité et spécificité pour le diagnostic du cancer et participe également à l'évaluation du pronostic. La mutation  $BRAF^{V600E}$  est souvent associée aux formes invasives et peu différenciées, souvent diagnostiquées à un stade avancé. Ces formes agressives présentent un risque de récurrence élevé et sont difficilement curables car elles sont réfractaires à l'iode (*Riesco-Eizaguirre et al., 2006*). Les tumeurs précoces observées en post-opératoire, métastatiques ou non, sont négatives lors de la scintigraphie du corps entier. Le traitement à l'iode 131 s'avère donc inefficace. Elles sont en majorité porteuses de la mutation  $BRAF^{V600E}$ . L'expression conditionnelle de cette mutation dans la lignée PCCL3 induit une augmentation de la synthèse d'ADN en raison d'une augmentation de l'apoptose, mais n'induit pas la croissance cellulaire en absence de stimulation des récepteurs à la TSH. La mutation  $BRAF^{V600E}$  n'interfère pas avec la signalisation classique du TSH-R (induction de l'activité AC par la Forskoline) mais la croissance cellulaire et la synthèse d'ADN dépendante de la TSH sont inhibées par  $BRAF^{V600E}$ . L'expression conditionnelle de  $BRAF^{V600E}$  dans la lignée PCCL3 induit également de l'instabilité génétique, augmentant la fréquence des micronucléi. Ces données indiquent que l'expression de  $BRAF^{V600E}$  facilite l'acquisition d'anomalies génétiques secondaires qui pourraient participer à ces propriétés agressives, en induisant l'instabilité génétique et la dédifférenciation cellulaire (*Mitsutake et al., 2005*). En effet, la mutation  $BRAF^{V600E}$  semble participer à l'évolution des cancers papillaires différenciés ou peu différenciés en cancers indifférenciés (*Nikiforova et al., 2003*). Elle est également trouvée dans 25% des cas de cancers anaplasiques de la thyroïde (ATC). C'est pourquoi de nombreuses études tentent de définir le modèle de la carcinogenèse thyroïdienne dans le cas du cancer papillaire porteur de la mutation  $BRAF^{V600E}$ , avec pour objectif d'identifier de nouvelles cibles moléculaires permettant un traitement par chimiothérapie.

### i. Implication dans le processus de dédifférenciation

De nombreuses études ont montré l'implication de la mutation  $BRAF^{V600E}$  dans l'inhibition de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme de l'iode dans les cas de cancers papillaires de la thyroïde (PTCs) (*Durante et al., 2007*). *In vitro*, dans les cultures de thyrocytes primaires humains ou dans les lignées thyroïdiennes de rat PCCL3 et FRTL-5 (*Kogai et al., 1997; Trapasso et al., 1999*), mais aussi *in vivo* (*Levy et al., 1997*), la TSH stimule l'expression du gène *NIS*, l'abondance de la protéine et la captation d'iode. Cet effet peut être mimé par la Forskoline ou le dibutyryl-cAMP. L'arrêt de la TSH affecte immédiatement l'adressage du NIS à la membrane. Les mécanismes de maturation post-traductionnelle qui en sont responsables sont dépendants de la TSH (*Dohan et al., 2003*). Dans la lignée thyroïdienne de rat PCCL3, l'expression transitoire de  $BRAF^{V600E}$  réduit de manière importante l'activité transcriptionnelle du promoteur du gène *NIS* mais aussi l'adressage du symporteur à la membrane. L'activité transcriptionnelle des autres promoteurs spécifiques de la thyroïde sont affectés de manière moins importante (TPO>TSH-R>Tg).  $BRAF^{V600E}$  interfère avec le signal médié par la TSH. L'altération de l'expression et de la fonctionnalité du NIS est due à l'interférence de  $BRAF^{V600E}$  avec la signalisation du TSH-R. L'activation pharmacologique de la voie de l'AMPc (Forskoline) permet d'induire de nouveau l'expression de la protéine mais pas son adressage à la membrane.  $BRAF^{V600E}$  interfère donc en aval de la signalisation TSH-R/AMPc (*Riesco-Eizaguirre et al., 2006*). La transduction du signal médié par BRAF se fait de manière conventionnelle par la voie MAPK impliquant les kinases MEK/ERK, cependant l'utilisation d'un inhibiteur de MEK (U0126) ne réduit que partiellement l'effet inhibiteur de  $BRAF^{V600E}$  sur l'activité transcriptionnelle du promoteur du NIS et sur l'expression de la protéine qui n'est pas localisée à la membrane. Ces résultats permettent d'envisager une contribution partielle de la voie MEK/ERK dans l'effet inhibiteur de  $BRAF^{V600E}$  sur l'expression du NIS au niveau transcriptionnel et traductionnel, ainsi que sur son adressage à la membrane (*Riesco-Eizaguirre et al., 2006*). Une autre étude a montré que les inhibiteurs spécifiques de  $BRAF^{V600E}$  permettent également d'induire de nouveau, partiellement, l'activité de captation d'iode de la thyroïde chez les souris transgéniques exprimant de manière conditionnelle la protéine  $BRAF^{V600E}$  (*Chakravarty et al., 2011*).

## ii. Implication dans la progression vers l'EMT

Une étude sur des souris transgéniques a montré que l'expression thyroïde-spécifique de  $BRAF^{V600E}$  sous le contrôle du promoteur de la Tg permet d'induire un PTC invasif qui évolue vers les formes peu différenciées de carcinomes thyroïdiens (*Knauf et al., 2005*). Ces résultats concordent avec les phénotypes observés chez l'homme, dans les cas de PTC porteurs de la mutation  $BRAF^{V600E}$  et supporte l'hypothèse considérant cet oncogène comme un acteur clé de la carcinogenèse thyroïdienne. Plus récemment, les même auteurs ont montré que la progression vers la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) des PTC induits par  $BRAF^{V600E}$  chez des souris transgéniques nécessite l'action coordonnée de la voie MAPK et de la voie de signalisation du TGF- $\beta$  (*Knauf et al., 2011*).

## 4. Implication du TGF- $\beta$ dans la progression tumorale

Le TGF-  $\beta$  ayant un rôle multifonctionnel (*Truty et al., 2007*), il est logique qu'une altération dans la cascade de signalisation du TGF-  $\beta$  puisse avoir des conséquences pathologiques importantes. Les cellules cancéreuses exploitent à leur avantage les capacités du TGF- $\beta$  à moduler les processus d'invasion cellulaire et leur micro-environnement. La réponse au TGF-  $\beta$  est donc conditionnée par le contexte cellulaire et le tissu (*Massagué et al., 2008*). La sensibilité des cellules au TGF-  $\beta$  dans les tumeurs thyroïdiennes est altérée et ce phénomène semble être fortement sélectionné lors du développement des tumeurs. Dans le contexte tumoral, le TGF-  $\beta$  est impliqué dans des activités opposées : en tant qu'inhibiteur de croissance dans les phases précoces du développement des tumeurs, d'une part, et en tant que promoteur de la carcinogenèse et de la progression tumorale dans les stades tardifs de la néoplasie lorsque les tumeurs ont développé la capacité de détourner sa fonction inhibitrice, d'autre part. Ce double rôle du TGF-  $\beta$  résulte certainement d'interactions avec des voies de signalisation ayant un effet direct sur la cellule ou un effet paracrine sur les cellules voisines (*Torre-Amione et al., 1990*).

### a. Les altérations moléculaires à l'origine du détournement de la voie TGF- $\beta$ /Smad dans le contexte tumoral

Bien qu'il ait été observé que le TGF- $\beta$  est produit par les cellules de la thyroïde, l'expression du récepteur TBRII est diminuée (*Lazzereschi et al.*, 1997), aussi bien dans les lésions bénines (adénomes) que dans les lésions d'agressivité progressive (PTC et FTC), la diminution la plus importante étant constatée dans les cas de cancer anaplasiques indifférenciés. L'altération de l'expression du TBRII est la plus communément trouvée dans les carcinomes de la thyroïde. Il existe cependant d'autres altérations de la cascade de signalisation du TGF- $\beta$ , comme les mutations inactivatrices de Smad2 et Smad4 qui sont moins fréquentes (*Seoane et al.*, 2006). Ce mécanisme pourrait participer au détournement de la voie TGF- $\beta$ /Smad de son rôle primaire, à savoir l'inhibition de croissance des cellules thyroïdiennes dans les carcinomes thyroïdiens (*West et al.*, 2000). D'autres auteurs ont montré que, dans la lignée TPC-1 issue d'un carcinome papillaire, les effets du TGF- $\beta$  sont probablement dus à une diminution de l'expression de Smad2 et Smad4, et à une augmentation de l'expression de Smad7 (*Matsuo et al.*, 2006). Il existe de nombreuses altérations de Smad4 dans les tumeurs thyroïdiennes (*Lazzereschi et al.*, 2005), ce qui permet de penser qu'elles constituent un évènement fréquent impliqué dans le développement des tumeurs thyroïdiennes. Dans les lignées issues de carcinomes papillaires telles que TPC-1 (issue d'un clone de PTC porteur de la translocation RET/PTC1) et BCPAP (issue d'un PTC porteur de la mutation *BRAF*<sup>V600E</sup>), la forte diminution de l'expression de Smad4 est responsable de l'altération de la signalisation du TGF- $\beta$  et de ses effets biologiques (*D'Inzeo et al.*, 2010). La surexpression de Smad4 dans ces lignées permet de restaurer une réponse anti-proliférative au TGF- $\beta$ . Le niveau d'expression de Smad4 est donc un élément critique de la régulation du signal médié par le TGF- $\beta$ . La stabilité du TBRI est également un élément important de la régulation de la signalisation du TGF- $\beta$ . Ces récepteurs sont ubiquitinylés et dégradés par des complexes protéiques incluant l'E3 ligase. Les I-Samds, et notamment Smad7, régulent l'activité de ces complexes, modulant ainsi l'ubiquitylation et la désubiquitylation (*Moustakas et al.*, 2009). Smad7 est surexprimé dans les PTC, FTC et ATC (*Matsuo et al.*, 2010). En bref les altérations des Smads, que ceux-ci soient R-Smads ou I-Smads, sont toutes impliquées dans le développement de la carcinogenèse thyroïdienne.

## **b. Rôle de la coopération avec des voies MAPK et TGF- $\beta$ /Smad dans le développement de l'EMT et de la dédifférenciation**

### **i. Mécanismes d'interaction entre la voie MAPK et la voie TGF- $\beta$ /Smad**

Le TGF- $\beta$  active la voie MAPK par l'intermédiaire des Smads (*Derynck et al., 2003*) mais il a été montré que la voie MAPK peut à son tour moduler la voie TGF- $\beta$ /Smad. Mis à part le site SXS du domaine C-terminal qui est phosphorylé par les récepteurs de type I, les R-Smads possèdent deux segments polypeptidiques appelés domaines MH1 et MH2 qui sont séparés par une région « linker » riche en résidus sérine/thréonine qui constituent de multiples sites de phosphorylation. Certains de ces sites sont phosphorylés par les MAP kinases (*Derynck et al., 2003; Feng et al., 2005; Moustakas et al., 2005; Wrighton et al., 2009*). La phosphorylation de la région « linker » régule de manière allostérique les interactions intramoléculaires entre les domaines MH1 et MH2. La variété des kinases qui phosphorylent cette région, parfois elles-mêmes régulées par la signalisation TGF- $\beta$ , contribue à la complexité du pattern de phosphorylation. Les multiples combinaisons potentielles peuvent avoir des effets différents, voire opposés, ce qui explique que la phosphorylation des Smads par une même kinase, par exemple ERK, puisse conduire à des effets différents sur la signalisation du TGF- $\beta$  (*Kretzschmar et al., 1999; Funaba et al., 2002; Kamaraju et al., 2005*). De manière intéressante, une forte augmentation de la phosphorylation des résidus Ser208/Ser213 est associée aux stades tardifs de cancers colorectaux (*Yamagata et al., 2005*).

### **ii. Implication dans la dédifférenciation et l'EMT**

L'activité TGF- $\beta$  Smad-dépendante qui active la transcription de nombreux gènes « mésenchymateux » comme la vimentine, la N-cadhérin ou PAI-1 (*Zavadil et al., 2005; Nawshad et al., 2005*) est associée à l'EMT, aux tumeurs invasives et à leur progression vers un état métastatique et peu différencié (*Padua et al., 2009; Jian Xu et al., 2009*), ainsi qu'à la mutation *BRAF*<sup>V600E</sup> dans les cas de PTCs. Il a été montré que les Smads peuvent induire les voies mitogènes par interaction avec les protéines tyrosine kinases activées par les RTKs («cross-talk») (*De Caestecker et al., 1998*) ou encore avec les oncogènes tels que BRAF muté. La voie MEK-ERK coopère avec la voie TGF- $\beta$ /Smad dans le développement de l'EMT et la



dédifférenciation cellulaire. En effet, l'induction par le TGF- $\beta$  de la phosphorylation de Smad2 et de son activité transcriptionnelle dépend de l'activité de MEK. L'activation constitutive de la voie MAPK est nécessaire pour obtenir une activité optimale de la voie TGF- $\beta$ /Smad. Ces interactions entre BRAF<sup>V600E</sup> et la voie TGF- $\beta$ /Smad mettent en évidence que l'initiation tumorale par l'oncogène BRAF<sup>V600E</sup> est à l'origine du détournement de la voie du TGF- $\beta$  qui permet alors le développement de l'EMT.

L'expression conditionnelle de BRAF<sup>V600E</sup> dans la thyroïde de souris induit une dérégulation des gènes impliqués dans l'adhérence cellulaire et les jonctions intercellulaires qui se traduisent par une diminution de l'expression de la E-Cadhérine et une augmentation de l'expression de la Vimentine, corrélées à une forte phosphorylation de Smad2. Dans les cultures primaires de thyrocytes de souris transgéniques (*Tg-Braf*), le TGF- $\beta$  induit l'EMT, alors que les thyrocytes normaux préservent leurs caractéristiques épithéliales. L'activation de la voie MAPK dans les thyrocytes *Tg-Braf* est nécessaire pour que le TGF- $\beta$  active la phosphorylation de Smad2 et son activité transcriptionnelle. La progression du cancer papillaire différencié (PTC) vers le cancer thyroïdien pauvrement différencié (PDTC) est associée au développement de l'EMT qui requiert l'action combinée des voies MAPK et TGF- $\beta$ /Smad (*Knauf et al., 2011*).

Dans la lignée de thyrocytes normaux de rat PCCL3, l'expression de l'oncogène BRAF<sup>V600E</sup> induit une diminution de l'expression du NIS et de la captation d'iode, ainsi qu'une progression de l'EMT (*Riesco-Ezaguirre et al, 2009*), *via* une activité autocrine par la sécrétion de TGF- $\beta$  fonctionnel, l'expression du TBRII à la membrane plasmique et l'activation des Smads illustrée par la translocation du complexe Smad2/Smad4 au noyau cellulaire. L'inhibition de MEK (U0126) permet de réinduire l'expression du messager et de la protéine NIS mais le symporteur n'est pas correctement adressé à la membrane, ce qui ne permet pas de rétablir la captation de l'iode (*Riesco-Ezaguirre et al., 2006*), alors que le blocage à différents niveaux du signal activé par le TGF- $\beta$  et les Smads (TGF- $\beta$ /Smad) (transfection transitoire de Smad7, inhibition du TBRI *via* le SB-431542, ou utilisation d'un anticorps monoclonal anti-TGF- $\beta$ ) permet de contrer la répression du NIS initiée par BRAF<sup>V600E</sup> et de rétablir la captation d'iode dans les cellules de la lignée PCCL3. En effet, l'inhibition de MEK (U0126) n'a pas d'effet sur la localisation nucléaire de Smad2. La voie MEK-ERK n'est pas ou peu impliquée dans l'activation de la voie TGF- $\beta$ /Smad par BRAF<sup>V600E</sup>, mais il faut rappeler

que les inhibiteurs de la voie MEK/ERK permettent de partiellement restaurer la captation d'iode radioactif dans les thyroïdes des souris transgénique exprimant BRAF<sup>V600E</sup> de manière conditionnelle (*Chakravarty et al., 2011*).

Une étude récente a montré que l'augmentation de l'expression cytoplasmique du TGF- $\beta$  en périphérie des tumeurs peu différenciées est associée aux phénotypes localement invasifs présentant les caractéristiques de l'EMT, et à la présence de nodules métastatiques. L'expression nucléaire de Smad7 est plus importante dans les tumeurs différenciées qui ne présentent pas de phénotype à caractère invasif et métastatique que dans les tumeurs peu différenciées. Les nodules métastatiques présentent un faible niveau de Smad7 nucléaire et une surexpression de TGF- $\beta$  en périphérie de la tumeur. La forte activité de la voie TGF- $\beta$ /Smad au niveau nucléaire est corrélée au développement de l'EMT dans les cas de cancers papillaires invasifs porteurs de la mutation BRAF<sup>V600E</sup> (*Eloy et al., 2012*).

## 5. Thérapies moléculaires ciblant BRAF et la voie MAPK

La découverte des mutations de BRAF dans les cancers papillaires (PTC), anaplasiques (ATC), le mélanome et d'autres tumeurs, a mis en évidence des phénotypes généralement plus agressifs associés à la mutation, et le développement d'une résistance aux traitements conventionnels. C'est pourquoi le développement d'agents thérapeutiques ciblant spécifiquement l'oncogène *BRAF* muté représente un fort potentiel thérapeutique pour le traitement de ces tumeurs (*Dienstmann et al., 2011*)

### a. Les inhibiteurs non sélectifs de BRAF et de la voie MAPK

Il existe des inhibiteurs multikinases comme le Sorafenib (BAY 43-9006), qui cible RAF1, BRAF sauvage, BRAF<sup>V600E</sup>, mais aussi les récepteurs à activité tyrosine kinase tels que le récepteur du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) de type 1/2, le récepteur du PDGF (Platelet-derived Growth Factor) de type bêta pouvant inhiber la croissance tumorale et l'angiogenèse. De nombreux essais cliniques avec la première génération d'inhibiteurs de BRAF (Sorafenib), chez des patients porteurs d'un PTC réfractaire et métastatique ou d'un ATC, ont montré des résultats encourageants, mais les mécanismes des effets du Sorafenib restent à préciser en raison des nombreuses kinases ciblées (*McFarland et al., 2014 ; Abdel-*

*Rahman et al., 2014 ; Takami et al., 2014 ; Huillard et al., 2014 ; Fallahi et al., 2014 ; Hasskarl et al., 2014 ; Pitoia et al., 2014*). D'autres inhibiteurs ont été développés afin de cibler de manière plus spécifique la protéine BRAF<sup>V600E</sup>.

### **b. Les inhibiteurs spécifiques de BRAF<sup>V600E</sup>**

Le PLX4032 (ou vemurafenib) (*Garbe et al., 2014*) cible spécifiquement la protéine BRAF<sup>V600E</sup>, en interagissant avec le domaine kinase dans sa conformation active, par compétition avec l'ATP, empêchant ainsi sa fixation. Cet inhibiteur possède une spécificité environ trois fois supérieure pour le mutant V600E de BRAF par rapport à BRAF sauvage. Cependant, le PLX4032 qui inhibe cette voie en présence de la mutation BRAF<sup>V600E</sup> peut conduire à l'activation de la voie MAPK *via* RAS. Dans les tumeurs BRAF sauvage, BRAF est inactivé par autophosphorylation. Cette auto-inhibition est interrompue par les inhibiteurs spécifiques de BRAF. Le recrutement de BRAF à la membrane plasmique induit alors la trans-activation de RAF1 qui serait l'isoforme de RAF majoritairement impliquée dans ce processus. Il en résulte l'activation de MEK et ERK. Cette activation paradoxale de ERK n'est pas observée dans les cellules porteuses du mutant BRAF<sup>V600E</sup>. Ces études mettent en avant la nécessité d'utiliser les inhibiteurs spécifiques de BRAF uniquement chez les patients porteurs d'une mutation de BRAF. Des essais cliniques sur les patients atteints de cancers de la thyroïde ou de mélanomes porteurs de la mutation BRAF<sup>V600E</sup> montrent des résultats encourageants (*Sala et al., 2008 ; Xing et al., 2011 ; Chakravarty et al., 2011 ; Pratilas et al., 2012 ; Sharma et al., 2012 ; Rosove et al., 2013 ; Kim et al., 2014 ;*

### **c. Mécanismes de résistance aux inhibiteurs de BRAF**

D'autres voies de transduction des signaux cellulaires peuvent être activées ou réprimées en concomitance avec la mutation de BRAF et peuvent être les médiateurs de la résistance aux traitements ciblant BRAF. Cette résistance aux inhibiteurs de BRAF est attribuable à des mutations secondaires, non initiatrices de la carcinogenèse mais participant à son évolution et sa persistance. Il peut s'agir de mutations d'autres acteurs de la voie MAPK, d'altérations d'autres mécanismes interférant avec la voie MAPK, ou de l'activation de voies alternatives de survie cellulaire. On parle de « Signaling pathway Switching ». L'interconnexion complexe entre la voie MAPK (Figure 12) et la voie PI3K/Akt/mTOR (Figure 13) en fait un candidat pertinent dans le développement de la résistance. mTOR (mammalian

target of rapamycin) est une sérine/thréonine kinase qui joue un rôle important dans le métabolisme, la croissance et la prolifération cellulaire. L'activation de mTOR est impliquée dans la régulation de la fonction des cellules thyroïdiennes par la TSH, notamment la captation de l'iode (*Lima de Souza et al., 2010*). Il existe plusieurs évidences génétiques et moléculaires suggérant une dérégulation de la voie mTOR dans les néoplasies thyroïdiennes. L'activation de la voie PI3K/Akt dans les cas de translocation RET/PTC et des mutations de RAS a notamment déjà été démontrée (*Rodriguez-Viciano P et al., 1994; Miyagi E et al., 2004 ; Jung HS et al., 2005 ; Kim DW et al., 2003*). Des analyses immunohistochimiques montrent une hyperactivation de la voie mTOR dans les cancers de la thyroïde et particulièrement dans les cas de PTC conventionnels et agressifs (*Maria A. Kouvaraki et al., 2011*). De plus, l'expression de BRAF<sup>V600E</sup> et son inhibition spécifique montrent une association positive entre l'expression de BRAF<sup>V600E</sup> et l'activation de mTOR (*Faustino et al., 2012*). Les lignées cellulaires thyroïdiennes porteuses d'une mutation dans la voie MAPK montrent une plus grande sensibilité au traitement par la rapamycine. La voie de signalisation de mTOR pourrait constituer une cible thérapeutique intéressante pour potentialiser le traitement des carcinomes de la thyroïde et plus particulièrement ceux qui portent la mutation BRAF<sup>V600E</sup>. De nombreuses études ont montré l'implication de la signalisation de la signalisation PI3K/Akt/mTOR dans le développement de nombreux cancers, ainsi que l'intérêt de l'utilisation des inhibiteurs de mTOR et de la voie PI3K/Akt pour le traitement pharmacologique de ces cancers (*Fasolo et al., 2008*) (Figure 13).

Figure 12 : Représentation schématique de la voie MAPK (a) Structure générale des voies MAPK ; (b) La cascade de transduction RAS/MEK/ERK en particulier (Lee JT Jr et al., 2002).

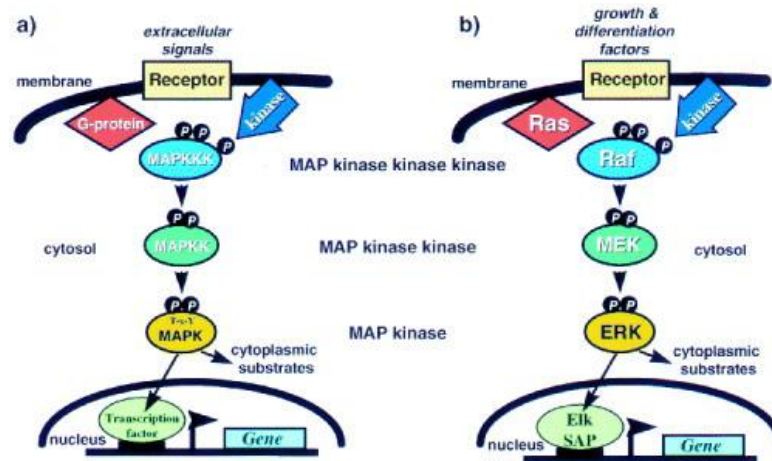
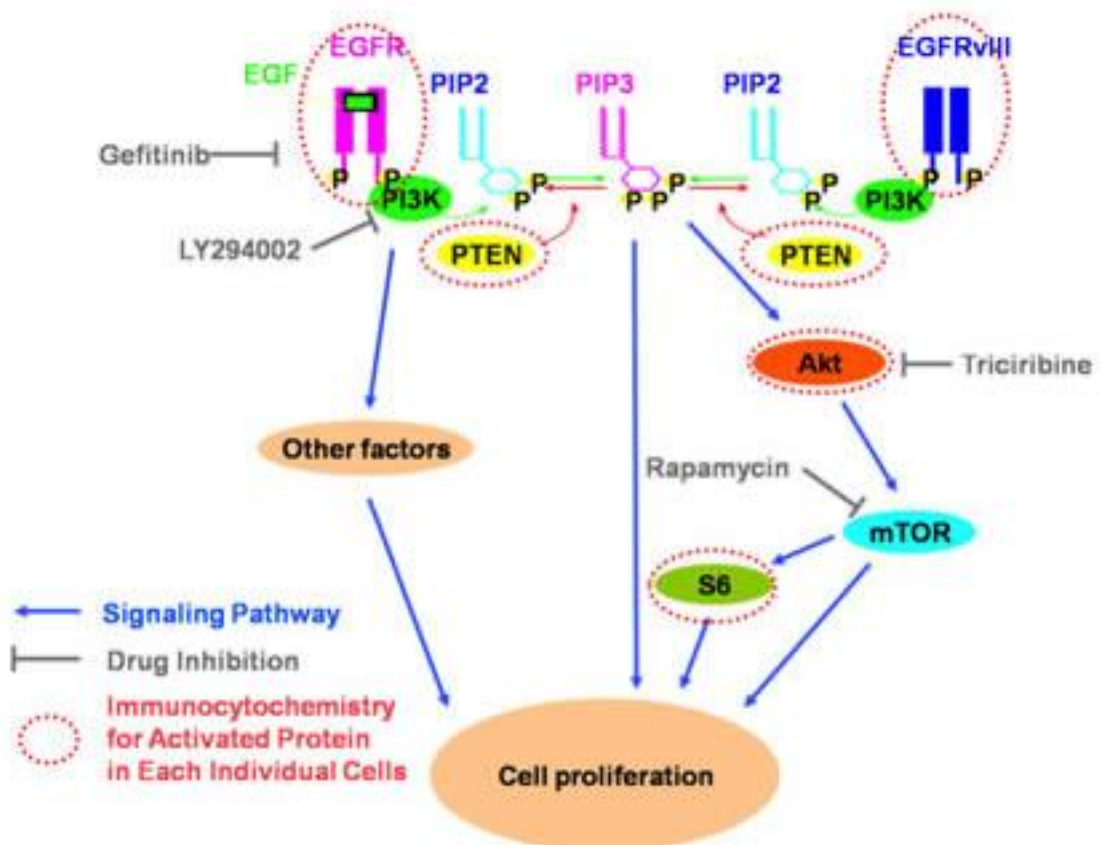


Figure 13 : Représentation schématique de la voie PI3K/Akt/mTOR et des cibles des différents inhibiteurs spécifiques utilisés pour le traitement pharmacologique des cancers (Mellinghoff et al., 2005).



### III. Rôle des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et du stress oxydatif dans le développement et la progression des cancers

#### A. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS pour Reactive Oxygen Species) sont de petites molécules hautement réactives dérivées de l'oxygène. Elles incluent les radicaux libres possédant un électron célibataire sur la couche périphérique de l'atome d'oxygène, comme l'anion superoxyde ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) et l'anion hydroxyle ( $\cdot\text{OH}$ ), mais aussi certains agents non radicaux libres possédant un potentiel oxydant ou pouvant être convertis en radicaux libres comme le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) et l'acide hypochloreux ( $\text{HOCl}$ ). Les ROS sont produites de manière physiologique lors des réactions biologiques, dans les peroxysomes par le cytochrome P-450 et la mitochondrie où l'oxygène (ou dioxygène,  $\text{O}_2$ ) est indispensable à la production d'énergie dans les formes de vie aérobies (animaux, bactéries, plantes). La réduction de l'oxygène en eau dans la chaîne de transport d'électron localisée dans la membrane interne des mitochondries nécessite plusieurs étapes qui donnent naissance à des intermédiaires plus ou moins réduits qui sont des ROS (*Mazat et al.*, 2010).

De par leur instabilité, les ROS interagissent de manière aléatoire avec de très nombreuses molécules, comme les autres molécules inorganiques mais aussi les protéines, les lipides, les glucides et les acides nucléiques. Ces interactions peuvent altérer voire détruire les molécules cibles, c'est pourquoi les ROS ont tout d'abord et pendant longtemps été considérées comme de simples déchets nuisibles, produits par le métabolisme cellulaire et contribuant aux dommages et au vieillissement des organismes biologiques (*Harman et al.*, 1956; *Beckman et al.*, 1998). L'anion superoxyde ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) possède la plus faible réactivité vis-à-vis des substrats organiques, cependant il est capable de produire d'autres radicaux beaucoup plus réactifs, il a donc une toxicité indirecte. La production des ROS s'apparente à une cascade de réactions initiée par la production de  $\cdot\text{O}_2^-$ . Ce dernier est rapidement dismuté en peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), de manière spontanée ou *via* une réaction catalysée par les superoxyde dismutases (SOD). Dans les conditions physiologiques, la vitesse de la réaction de dismutation de  $\cdot\text{O}_2^-$  est faible et le temps de vie du superoxyde est suffisamment long pour qu'il puisse soit oxyder des composants des macromolécules biologiques (acides nucléiques, protéines...), soit générer d'autres ROS bien plus toxiques que

l'anion superoxyde lui-même. Bien que  $H_2O_2$  ne soit pas un radical mais une molécule, il possède une toxicité puisqu'il peut être réduit *via* la réaction de Fenton. Cette réaction est catalysée par les métaux de transition tels que l'ion  $Fe^{++}$  et aboutit à la formation de radicaux hydroxyles ( $\cdot OH$ ). Le radical hydroxyle est l'oxydant le plus puissant, mais possédant une faible durée de vie et une diffusion limitée, il réagit avec des substrats sur son lieu de production. Cette cascade inclut également la réaction du  $\cdot O^{2-}$  avec l'oxyde nitrique ( $NO\cdot$ ) qui forme le peroxyde nitrite ( $ONOO\cdot$ ), la production d'acide hypochlorique ( $HOCl$ ) à partir de  $H_2O_2$ , réaction catalysée par les peroxydases, ou encore la réaction de Fenton. De toute évidence, la production de l'anion superoxyde peut engendrer d'autres formes radicalaires hautement réactives, participe à l'équilibre redox des cellules et peut influencer de nombreux systèmes cellulaires sensibles au potentiel redox de leur environnement.

Alors que les mitochondries sont la source majeure de ROS, il existe aussi une nouvelle famille d'enzymes appelée NOX/DUOX dont la fonction physiologique est de produire des ROS. Ces enzymes sont appelées NADPH oxydases.

## **B. Les systèmes antioxydants**

La dégradation des ROS est contrôlée par des systèmes de défense appelés antioxydants. La production de  $\cdot O^{2-}$  est contrôlée par les superoxyde dismutases (SOD), des métalloprotéines caractérisées par le métal (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni) contenu dans leur site actif. Elles sont présentes chez presque tous les organismes aérobies. Les SOD à Cu-Zn ou à Ni constituent des classes distinctes des superoxydes dismutases à Fe ou à Mn. Ces dernières possèdent des séquences protéiques et des structures tridimensionnelles très proches. La SOD à Cu-Zn a la plus grande constante de vitesse catalytique connue pour sa réaction avec  $\cdot O^{2-}$  n'est limitée que par la diffusion du superoxyde vers le site actif. Les autres SOD sont légèrement moins efficaces. Dans les conditions normales, la SOD à Cu-Zn réduit efficacement la concentration de l'anion superoxyde dans les tissus vivants, empêchant sa toxicité de se manifester.

La concentration de  $H_2O_2$  est, quant à elle, contrôlée par la catalase (CAT), une oxydoréductase héminique qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène en eau et

dioxygène. CAT est formée de quatre chaînes polypeptidiques d'environ 500 acides aminés, comportant chacune un groupement hème. Ces hèmes et leur environnement protéique sont les sites actifs de l'enzyme. Pour catalyser la réaction, l'atome de  $\text{Fe}^{2+}$  d'un hème de la catalase réalise une coupure hétérolytique de la liaison O-O du peroxyde d'hydrogène, créant de ce fait une molécule d'eau et un groupement  $\text{Fe}^{2+}$  hautement oxydant qui peut ensuite oxyder une autre molécule de peroxyde d'hydrogène pour donner du dioxygène. CAT est une des enzymes les plus efficaces connues. Sa vitesse de réaction ne semble limitée que par la diffusion du substrat au site actif de l'enzyme. Chez les eucaryotes, on la trouve dans les peroxysomes des cellules pour la catalase A et dans le cytosol pour la catalase T. On trouve la catalase chez tous les organismes aérobies et plus particulièrement dans les navets, la plupart des racines des plantes, chez la levure et dans le foie des animaux.

Le peroxyde d'hydrogène est également dégradé par la glutathion peroxydase (Gpx), qui appartient à la famille des sélénoprotéines, dans lesquelles le soufre du groupement thiol (-SH) de la cystéine est remplacé par le sélénium. La glutathion peroxydase est essentielle à la détoxification des oxydants de type peroxydes (eau oxygénée, peroxy-nitrite), qu'ils soient d'origine exogène ou endogène (respiration cellulaire, peroxyde d'hydrogène formé par d'autres processus antioxydants complémentaires, peroxy-nitrite impliqué dans l'apoptose cellulaire ou le système immunitaire). Gpx catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau par oxydation du glutathion. Le glutathion est un tripeptide (acide glutamique-cystéine-glycine), présent sous forme réduite (GSH) ou oxydée (GSSG), constituant un couple redox qui participe aux échanges d'électrons donc d'énergie à l'intérieur de la cellule. GSH peut aussi chélater les ions  $\text{Cu}^{2+}$  et ainsi limiter leur participation à la réaction de Fenton. La Glutathion reductase (GSR ou GR), est une enzyme à NADPH qui réduit le glutathion oxydé (GSSG) en GSH. Le ratio entre la forme oxydée et réduite du glutathion dans les cellules est utilisé comme mesure de la toxicité cellulaire. Le glutathion n'est pas un nutriment essentiel ; il peut être synthétisé à partir d'acides aminés: L-cystéine, acide L-glutamique et glycine. Le groupement thiol (-SH) de la cystéine joue le rôle de donneur de proton et est responsable de l'activité biologique du glutathion. La cystéine est en effet le facteur limitant de la synthèse du glutathion au niveau cellulaire. Cette synthèse comprend deux étapes dépendantes de l'ATP. Tout d'abord, le dipeptide gamma-glutamylcystéine est synthétisé à partir du L-glutamate et la cystéine *via* la gamma-glutamylcystéine synthétase (ou glutamate



cysteine ligase, GCL). Cette réaction est l'étape limitante de la synthèse du glutathion. Ensuite, la glycine  $\gamma$  est ajoutée en C-terminal du dipeptide par la glutathion synthétase.

La Myeloperoxidase (MPO) est exprimée de manière abondante dans les granulocytes neutrophiles. C'est une protéine lysosomale stockée dans les granules azurophiliques des neutrophiles. La MPO produit de l'acide hypochloreux (HOCl) à partir de  $H_2O_2$  et de l'anion chlorure ( $Cl^-$ ) pendant le "Burst" oxydatif des neutrophiles. La MPO oxyde aussi les résidus tyrosine en radicaux tyrosyl en utilisant le  $H_2O_2$  comme agent oxydant. L'acide hypochloreux et les radicaux tyrosyl sont cytotoxiques mais sont utilisés par les neutrophiles pour tuer les bactéries et autres pathogènes.

### C. La famille des NADPH oxydases: des enzymes dédiées à la production de ROS

Avant la découverte des NADPH oxydases (Figure 14), les biologistes ont tout d'abord observé et décrit le phénomène de "Burst" respiratoire dans différents types cellulaires, ensuite identifié comme un "Burst" oxydatif dans les phagocytes, correspondant à une production soudaine d'anion superoxyde. Ce phénomène a clairement été identifié comme principale activité anti-microbienne dans les phagocytes. Les observations cliniques, notamment l'absence de "Burst" oxydatif chez les patients atteints de granulomatose chronique (CGD pour Chronic Granulomatous Disease) (*Quie et al.*, 1967; *Holmes et al.*, 1967; *Baehner et al.*, 1967), ont également contribué à la compréhension de l'activité bactéricide des phagocytes. De nombreuses études ont ensuite permis de mieux caractériser ce phénomène d'un point de vue biochimique, jusqu'à la découverte et le clonage du gène codant pour la sous-unité catalytique de la NADPH oxydase de phagocytes, la gp91<sup>phox</sup> (*Royer-Pokora et al.*, 1986; *Teahan et al.*, 1987), aujourd'hui appelée NOX2. Puis vint la découverte de la sous-unité membranaire associée à la gp91<sup>phox</sup>, la p22<sup>phox</sup> (*Dinauer et al.*, 1987; *Segal et al.*, 1987; *Parkos et al.*, 1988). Le développement d'un système acellulaire permettant l'activation de la NADPH oxydase membranaire par la fraction cytosolique a permis d'identifier les sous-unités cytosoliques, notamment la p47<sup>phox</sup> et la p67<sup>phox</sup> (*Nunoi et al.*, 1988; *Volpp et al.*, 1988), puis la p40<sup>phox</sup> (*Wientjes et al.*, 1993), ainsi que de définir le rôle des petites protéines G Rac1 et Rac2, activées par le GTP (*Abo et al.*, 1991; *Knaus et al.*, 1991). De nombreuses évidences et observations ont ensuite suggéré la présence dans de

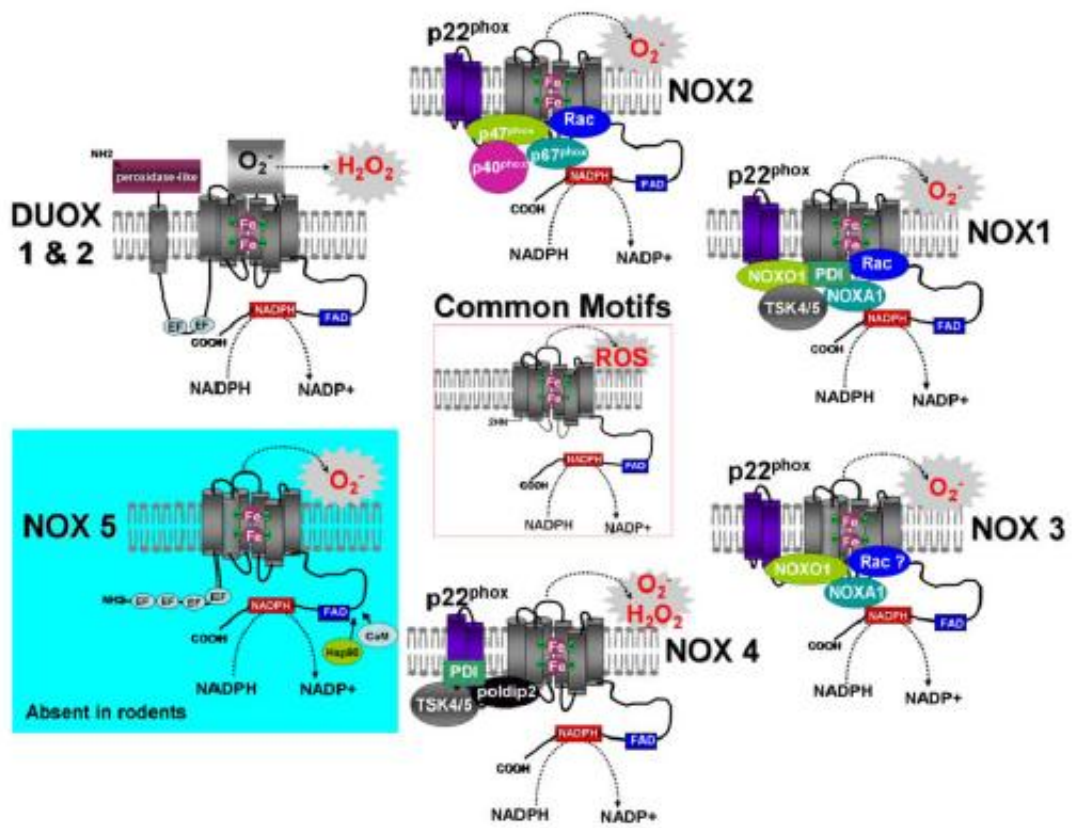
nombreux autres types cellulaires de systèmes enzymatiques similaires à la NADPH oxydase de phagocytes. Cependant, leur identité moléculaire est restée hypothétique jusqu'à la découverte et le clonage des homologues de la NOX2 (*Cheng G et al., 2001*): NOX1 (*Banfi et al., 2000; Suh YA et al., 1999*), NOX3 (*Kikuchi et al., 2000*), NOX4 (*Geiszt et al., 2000; Shiose A et al., 2001*) et NOX5 (*Banfi B et al., 2001*). Les homologues des sous-unités cytosoliques p47<sup>phox</sup> et p67<sup>phox</sup> de la NADPH oxydase de phagocytes, appelés respectivement NOXO1 et NOXA1, ont également été identifiés par homologie de séquence (*Banfi B et al., 2003; Takeya R et al., 2003*). Depuis la mise en évidence d'une production de peroxyde d'hydrogène dépendante du calcium par les cellules épithéliales de la thyroïde (*Bjorkman et al., 1984*), de longues années de recherche ont été nécessaires pour identifier la source de cette production, jusqu'à la découverte des DUOX1 et DUOX2. Celles-ci ont été identifiées respectivement par purification de la protéine et par hybridation d'une sonde NOX2 sur une banque d'ADNc ADN complémentaire) de phage (ADN complémentaire) (*Dupuy C et al., 1999; De Deken X et al., 2000*). Les DUOXs présentent 50% d'identité avec la NOX2 (*De Deken et al., 2000*). Deux états de N-glycosylation ont été observés : on trouve une forme glycosylée dans le RE avec un poids moléculaire de 180 kDa et une autre forme hautement glycosylée de 190 kDa localisée à la membrane plasmique (*De Deken et al., 2002*). Lorsqu'elles sont exprimées de manière hétérologue, les DUOXs sont retenues dans le RE. Cette observation a conduit à la découverte des deux facteurs de maturation appelés DUOXA1 et DUOXA2 (*Grasberger H et al., 2006*), essentiels à l'étape d'adressage des deux DUOXs à la membrane plasmique. Les DUOXs co-immunoprécipitent avec la p22<sup>phox</sup>, cependant, dans le contexte d'une co-expression hétérologue, la p22<sup>phox</sup> ne semble pas augmenter la fonctionnalité des DUOXs (*Dupuy C et al., 1999; Ameziane El Hassani et al., 2005; Wang D et al., 2005*).

En résumé, il existe donc sept isoformes de NOX/DUOX (NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 et DUOX2) (Figure 14), deux sous-unités servant de plate-forme pour le recrutement d'autres facteurs (p47<sup>phox</sup> et NOXO1), deux sous-unités activatrices (p67<sup>phox</sup> et NOXA1) et deux facteurs de maturation spécifique des DUOX (DUOXA1 et DUOXA2). Les membres de la famille des NOX NADPH oxydases, conservent des propriétés structurales, en accord avec la conservation de leur fonction. Ce sont toutes des protéines transmembranaires qui transportent des électrons à travers les membranes biologiques pour réduire l'oxygène en  $\cdot\text{O}^2$  ou en  $\text{H}_2\text{O}_2$ . En partant de l'extrémité C-terminale, on trouve le site

de fixation du FAD puis six domaines transmembranaires avec quatre résidus histidine hautement conservés impliqués dans la liaison des hèmes. La NOX5 et les deux DUOXs possèdent respectivement quatre et deux sites de fixation du calcium, ce qui leur confère une dépendance vis-à-vis de ce cation pour leur activité. Par ailleurs, les DUOXs ont un ectodomaine présentant une homologie avec les peroxydases. Cependant, l'absence des acides aminés essentiels à l'activité peroxydasique corroborent les résultats montrant que les DUOXs ne présentent aucune activité peroxydasique. De nombreuses données suggèrent également que les NOX sont sélectives pour le NADPH par rapport au NADH.

Les différentes localisations subcellulaires des NADPH oxydases et leur adressage aux membranes des différents compartiments cellulaires permettent d'engendrer des productions localisées de ROS. Cette localisation est modulée par leur interaction avec des plates-formes de signalisation telles que les radeaux lipidiques ou les endosomes. La découverte des NOX/DUOX a conduit à reconsidérer la régulation redox car une production localisée et finement régulée fait apparaître les ROS comme de véritables messagers secondaires de la signalisation cellulaire.

Figure 14 : Représentation de la structure des NOXs et DUOXs (Weyemi *et al.*, 2013)



## D. La signalisation cellulaire sensible à l'environnement redox

Dans la dernière décennie, de nombreux travaux ont tenté de démontrer l'implication directe ou indirecte des ROS dans de nombreux processus physiologiques, au sein de différents systèmes et organes, *via* leur interaction avec des molécules clés de la transduction et la régulation des signaux cellulaires impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire (MAPK, PI3K, PTEN, PTPs...), la régulation de l'expression de gènes par l'intermédiaire des mécanismes antioxydants (thioredoxine...), l'apoptose ou encore la réponse aux dommages de l'ADN régulée par ATM et ATR. Les ROS diffusent librement dans les compartiments intracellulaires afin d'activer de manière spécifique les voies de signalisation sensibles à l'environnement redox, aussi appelés signaux redox.

### 1. Le rôle des résidus cystéine dans la signalisation redox

Les résidus cystéine sont sensibles à leur environnement redox. Les ROS exercent en effet un rôle important dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires *via* l'oxydation réversible des résidus cystéine en acide sulfénique (-SOH) ; parfois peut avoir lieu l'oxydation irréversible en acide sulfinique (-SO<sub>2</sub>H) ou en acide sulfonique (-SO<sub>3</sub>H). Le mécanisme moléculaire a été très bien décrit pour les protéines tyrosine phosphatases (PTPs) qui contrôlent l'état de phosphorylation de nombreuses protéines impliquées dans la transduction des signaux cellulaires (*Hunter T et al., 2000*) (Figure 15). Le domaine catalytique des PTPs contient des résidus cystéines et l'oxydation de ceux-ci conduit à leur inactivation (*Salmeen A et al., 2005; Denu JM et al., 1998; Barford D et al., 2004*). La thioredoxine (Trx1) et le glutathion semblent impliqués dans la réduction de l'acide sulfénique et peuvent ainsi réverser l'inactivation oxydative des PTPs (*S.R. Lee et al., 1998*). L'inhibition de l'activité phosphatase par les ROS potentialise immédiatement l'activité de la voie MAPK et des signaux de croissance cellulaires initiés par les RTKs et les cytokines (*T.C. Meng et al., 2002; J.M Denu et al., 1998; K. Lee et al., 2002*).

## 2. Exemples de signaux cellulaires sensibles à l'environnement redox

Les ROS participent aux signaux apoptotiques intrinsèques et extrinsèques *via* l'activation de la voie JNK (*Dhanasekaran et al.*, 2008). Dans la cascade de signalisation des MAPK, la MAPKKK ASK1 (Apoptosis Signal-regulated Kinase 1) régule l'activité des voies JNK et p38 MAPK qui conduisent toutes deux à l'apoptose cellulaire (*H. Ichijo et al.*, 1997). L'effet pro ou anti-apoptotique du TNF $\alpha$  est dépendant de l'intensité et de la durée d'activation de JNK par les ROS (*H. Kamata et al.*, 2005). La forme réduite de la thioredoxine (Trx1) interagit constitutivement avec ASK1 et inhibe son activité kinase (*M. Saitoh et al.*, 1998). ASK1 est activée lorsque les molécules oxydantes, majoritairement les ROS, oxydent deux résidus cystéine dans un pont disulfure, ce qui résulte en la dissociation de la thioredoxine (Trx1) et ASK1 (*M. Saitoh et al.*, 1998). Les ROS inhibent également les phosphatases inactivatrices de JNK et de la p38 MAPK *via* l'oxydation réversible d'un résidu cystéine localisé dans le site catalytique des phosphatases en acide sulfénique (*H. Kamata et al.*, 2005; *K.A Robinson et al.*, 1999; *R.M. Liu et al.*, 2010).

Plusieurs études montrent que les ROS régulent l'activité transcriptionnelle de certains gènes, et de nombreuses données ont démontré l'induction par les ROS de l'expression du TNF- $\alpha$  (*Qin L et al.*, 2005), du TGF- $\beta$ 1, de l'angiotensine-II et d'AP-1 (Plasminogen Activator-1) (*Ha H et al.*, 2005). Cette régulation peut se faire *via* des messagers secondaires sensibles à l'environnement redox (*Go YM et al.*, 2004), ou encore *via* des facteurs de transcription comme le NF- $\kappa$ B, AP-1 ou encore p53, qui contiennent des résidus cystéine redox-sensibles (*Sun Y et al.*, 1996). Dans certaines situations physiologiques ou physiopathologiques, les cytokines et facteurs de croissance sont à l'origine de la production de ROS mais régulent aussi leur propre activité *via* une boucle auto-régulatrice impliquant aussi les ROS. Ces mécanismes dépendent de l'état redox de la cellule et du potentiel redox de l'environnement proche des différents acteurs de la transcription. L'altération de l'équilibre redox de la cellule, localement ou globalement, dans des contextes physiopathologiques peut induire des modifications de l'activité transcriptionnelle des gènes concernés comme une inhibition de la transcription des ARNm.

### 3. Effets des ROS et du stress oxydant sur la fonction thyroïdienne

Des études récentes ont montré l'implication du stress oxydant et des mécanismes antioxydants dans le rétrocontrôle sur la fonction thyroïdienne lors d'un excès d'iode. Chez le rat, le thiocyanate permet d'induire une hypothyroïdie, qui se traduit par une diminution de la concentration sérique en T3 et T4, une augmentation de l'expression du NIS, de la D1 désiodase, et de la TPO, ainsi qu'un stress oxydant. L'exposition chronique à l'iode augmente la concentration en T3 et T4 dans le sérum et l'expression des antioxydants (catalase, SOD), et diminue l'expression du NIS et de la désiodase D1 (Hussein *et al.*, 2012). Dans les thyrocytes de rat (PCCI3), l'iodure ( $I^-$ ) augmente la phosphorylation d'Akt. Cet effet est inhibé par les inhibiteurs de la PI3K (wortmannine ou 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one), ce qui suggère qu'il est dépendant de la PI3K. L'effet inhibiteur de  $I^-$  sur l'expression du NIS et sa fonctionnalité (effet Wolff-Chaikoff) est aboli par les inhibiteurs spécifiques de la PI3K ou d'Akt (Akt1/2 kinase inhibitor). De manière corrélée, l'excès de  $I^-$  dans les thyrocytes augmente la production de ROS, et plus particulièrement d'anion superoxyde. Les mitochondries seraient la source de cette production impliquée dans la réponse à l'exposition chronique à l'iode. Les scavengers de ROS tels que la N-acétyl cystéine (NAC) et le 2-phenyl-1,2-benzisoselenazol-3-(2H)-one bloquent l'effet de l'iode sur la phosphorylation d'Akt. Ces résultats montrent l'implication de la signalisation PI3K/Akt comme nouveau médiateur de l'autorégulation de la fonction thyroïdienne induite par l'iode, et font le lien entre le rôle de l'état oxydatif de la thyroïde et l'effet Wolff-Chaikoff (Serrano-Nascimento *C et al.*, 2014). Toujours dans les thyrocytes de rat (FRTL-5), le resveratrol augmente l'influx d'iode et l'expression du rNIS, même en absence de TSH qui a un effet additif. Le resveratrol et les traitements contre le stress oxydant en général peuvent être, en association avec la rhTSH (TSH recombinante humaine), des molécules intéressantes pour favoriser la radiothérapie à l'iode 131 dans les cas de carcinomes différenciés de la thyroïde (Sebai *et al.*, 2013).

### 4. Importance du maintien de l'homéostasie redox de la cellule

La découverte des NADPH oxydases a permis de reconsidérer les ROS comme éléments essentiels de la signalisation cellulaire, participant au maintien de l'homéostasie

redox de la cellule. Les dérèglements de cette homéostasie radicalaire de la cellule sont à l'origine du développement de nombreuses pathologies. Néanmoins, les sources de ces ROS et leurs mécanismes d'action sont souvent mal définis; la compréhension de ces mécanismes d'action est aujourd'hui un enjeu clinique. Les ROS sont présentes dans la cellule en concentration limitée, celle-ci étant régulée *via* un équilibre entre leur production et leur dégradation par les systèmes antioxydants. Il existe donc une homéostasie redox qui peut cependant être altérée, soit par une production excessive de ROS, soit par une diminution des capacités antioxydantes. La rupture de l'homéostasie redox est définie comme stress oxydant. Dans certaines situations pathologiques comme le cancer, la production de ROS est souvent plus importante, de manière stable et prolongée, et la réponse antioxydante est alors inefficace, le déséquilibre durable.

Un tel déséquilibre de l'homéostasie redox de la cellule peut être provoqué par l'altération des systèmes producteurs de ROS. Le stress oxydant et la transformation cellulaire sont aujourd'hui associés, et de nombreuses évidences montrent que les NADPH oxydases, souvent surexprimées dans des contextes physiopathologiques comme le cancer, sont impliquées dans leur développement et leur maintien dans le temps (*Ushio Fukui et al., 2008*). L'inhibition de certains membres de la famille NOX/DUOX induit la mort des cellules tumorales et un retard de la croissance tumorale (*Yamaura et al., 2009 ; Bhandarkar et al., 2009*). Les traitements antioxydants, seuls ou combinés avec d'autres traitements, sont utilisés en oncologie pour la prévention des rechutes et l'atténuation des effets secondaires (*Mazdak et al., 2012*).

De nombreuses études ont montré l'existence d'interactions ou « Cross-Talk » entre les différentes sources de ROS comme la mitochondrie et les NADPH oxydases. En effet, les ROS produits par les NADPH oxydases peuvent induire une augmentation de la production de ROS par les mitochondries et *vice versa* (*Kimura et al., 2005 ; Doughan et al., 2008 ; Dikalova et al., 2010 ; Dikalov et al., 2011*). Les mitochondries et les NADPH oxydases sont physiquement associées dans le RE, ce qui permet d'obtenir des signaux redox localisés n'exposant pas le reste de la cellule à de fortes concentrations en ROS. Leur interaction peut être médiée par un stress oxydant localisé dans le RE. Le potentiel redox au sein du RE influence la maturation et le repliement des protéines en cours de synthèse (*Santos et al., 2009*). Ce « Cross-Talk » entre les mitochondries et les NADPH oxydases a probablement un



rôle important dans la signalisation redox en conditions physiologiques normales. Une production excessive de ROS peut perturber l'équilibre redox de la cellule et les interactions entre mitochondries et NADPH oxydases, entrant ainsi dans un cercle vicieux qui contribue au développement de nombreuses pathologies (*Dikalov et al.*, 2011). Pour toutes ces raisons, les NADPH oxydases constituent des cibles thérapeutiques potentielles pour le traitement du cancer.

## **E. Rôle de la NADPH oxydase NOX4 dans le développement du cancer**

### **1. La NADPH oxydase NOX4 et son partenaire fonctionnel la p22<sup>phox</sup>**

#### **a. La NOX4**

Le gène codant pour la NOX4 humaine est localisé sur le chromosome 11. L'expression de la NOX4 a tout d'abord été observée dans le rein (*Geiszt M et al.*, 2000; *Shiose A et al.*, 2001). Depuis, son expression de l'ARN messager (ARNm) de la NOX4 a été observée dans de nombreux types cellulaires : cellules endothéliales (*Ago et al.*, 2004), cellules musculaires lisses vasculaires (*Wingler et al.*, 2001), ostéoclastes, cellules souches hématopoïétiques, fibroblastes, kératinocytes, neurones (*Vallet P et al.*, 2005) et thyrocytes (*Weyemi et al.*, 2010). La NOX4 ne présente que 39% d'homologie avec la NOX2. Elle se distingue des NOX1 et NOX3, lesquelles présentent plus d'homologies avec la NOX2 et constituent un sous-groupe. Il existe plusieurs variants d'épissage pour la NOX4 (*Goyal P et al.*, 2005). Les anticorps anti-NOX4 reconnaissent généralement deux formes de tailles distinctes (65 kDa et 75-80 kDa) ayant des localisations subcellulaires différentes selon le type cellulaire étudié (*Hilenski LL et al.*, 2004). La NOX4 possède quatre sites de glycosylation potentiels mais les traitements à la N-glycosylase F n'ont pas apporté d'information sur les deux formes de NOX4 observées (*Shiose A et al.*, 2001).

La NOX4 exprimée de manière endogène se localise préférentiellement dans le noyau des cellules endothéliales humaines (*Kuroda J et al.*, 2005; *Hilenski LL et al.*, 2004). Cette localisation pourrait, dans certains contextes physiopathologiques, participer au stress oxydant qui module l'expression de gènes, en régulant l'activité de facteurs de transcription dépendant du potentiel redox de l'environnement nucléaire. De récentes données ont

rapporté l'existence d'un variant d'épissage actif de la NOX4, privé de certains domaines transmembranaires putatifs, de poids moléculaire de 28 kDa, présentant une localisation nucléaire, et impliqué dans la signalisation redox des cellules vasculaires (Anilkumar N *et al.*, 2012). Surexprimé, ce variant est capable d'induire des dommages de l'ADN, ce qui suggère qu'il pourrait avoir un rôle physiopathologique important *via* la modulation de la signalisation redox nucléaire. La NOX4 est aussi très active dans le RE de nombreux tissus et lignées cellulaires humains où elle participe à la régulation de l'activité de certaines PTPs, également localisées dans le RE (Chen K *et al.*, 2008). Dans les cellules transfectées, la NOX4 est le plus souvent localisée dans le RE (Martyn KD *et al.*, 2006). Cependant, la localisation de la NOX4 varie dans les contextes physiopathologiques tels que le diabète (Block K *et al.*, 2009) ou le cancer du sein (Graham *et al.*, 2010), où une localisation mitochondriale de la NOX4 a été observée.

Bien que le plus souvent, et ce malgré l'expression hétérogène de la NOX4, on observe une production de peroxyde d'hydrogène et non d'anion superoxyde (Martyn KD *et al.*, 2006), on ne peut pas conclure à une production directe de peroxyde d'hydrogène par la NOX4. L'anion superoxyde produit au sein d'un compartiment subcellulaire, peut rapidement être dismuté en peroxyde d'hydrogène dans la lumière du compartiment où est localisée la NOX4. Le peroxyde d'hydrogène produit peut alors diffuser à travers les membranes dans le cytosol et vers l'extérieur de la cellule. L'activité enzymatique de la NOX4 est dépendante de la p22<sup>phox</sup> avec laquelle elle est localisée et co-immunoprécipite (Kawahara T *et al.*, 2005 ; Martyn KD *et al.*, 2006).

### **b. La p22<sup>phox</sup>**

Le gène humain codant pour la p22<sup>phox</sup> est localisé sur le chromosome 16. C'est une protéine membranaire possédant une masse moléculaire de 22 kDa. A ce jour, les données convergent vers un à deux domaines transmembranaires (Burritt JB *et al.*, 1998; Imajoh-Ohmi S *et al.*, 1992; Taylor RM *et al.*, 2004). L'ARNm de la p22<sup>phox</sup> est exprimé de manière quasi-ubiquitaire dans les tissus humains et les lignées cellulaires. Sa localisation subcellulaire dépend de l'isoforme NOX avec laquelle elle est co-exprimée dans un contexte physiologique et un type cellulaire donné. A l'exception des DUOXs et de NOX5, la p22<sup>phox</sup> est co-localisée avec tous les membres de la famille des protéines NOXs (Jesaitis AJ *et al.*, 1990;

*Bayraktutan U et al*, 2000; *Ambasta RK et al.*, 2004; *Hanna IR et al.*, 2004; *Martyn KD et al.*, 2006), avec lesquels elle forme un hétérodimère stable (*Deleo FR et al.*, 2000; *Ambasta RK et al.*, 2004; *Kawahara T et al.*, 2005; *Laude K et al.*, 2005; *Martyn KD et al.*, 2006; *Takeya R et al.*, 2003; *Ueno N et al.*, 2005). Les NOXs et la p22<sup>phox</sup> sont considérées comme des protéines instables sous forme de monomères, majoritairement dégradées par le protéasome (*Deleo FR et al.*, 2000). La diminution de l'expression de la p22<sup>phox</sup> par siRNA (Small Inhibitory RNA), entraîne une diminution de l'activité des NOX1, NOX2, NOX3 et NOX4 (*Kawahara T et al.*, 2005; *Martyn KD et al.*, 2006). La p22<sup>phox</sup> est une protéine transmembranaire qui joue un rôle de plate-forme pour le recrutement et la fixation des sous-unités cytosoliques nécessaires à l'activation et la régulation de l'activité NADPH oxydase. Cette interaction se fait *via* les domaines SH3 des sous-unités cytosoliques et un domaine riche en résidus proline de la p22<sup>phox</sup> (*Deleo FR et al.*, 1995; *Leto TL et al.*, 1994) situé dans le domaine C-terminal. Lorsque celui-ci est tronqué ou muté, on observe une diminution de l'activité enzymatique des NOX1, NOX2 et NOX3 (*Leusen JH et al.*, 1994 ; *Kawahara T et al.*, 2005). Dans le cas de la NOX4, aucune sous-unité cytosolique n'est requise pour son activation, c'est pourquoi le domaine COOH-terminal n'influence pas l'activité de la NOX4. Cependant, le recrutement de Rac a été observé dans certains cas d'expression endogène dans les cellules mésangiales sous contrôle de l'angiotensine-II (*Gorin Y et al.*, 2003; *Inogushi T et al.*, 2003). Deux nouveaux partenaires ont été identifiés, poldip2 (*Lyle AN et al.*, 2012; *Manickam et al.*, 2014) et NOXR1, dans les cellules musculaires lisses vasculaires (*Sedeek M et al.*, 2009). L'importance de la sous-unité membranaire p22<sup>phox</sup> a été mise en évidence chez les patients atteints de granulomatose chronique ou CGD (Chronic Granulomatosis Disease), qui sont porteurs d'une mutation du gène codant pour la p22<sup>phox</sup> ou n'ont pas d'expression détectable de la p22<sup>phox</sup> (*Roos et al.*, 199 ; *Roos et al.*, 1994). Cependant, le rôle de la p22<sup>phox</sup> vis-à-vis des autres NOX n'a pas encore été correctement décrit, d'autant que celui-ci est très certainement dépendant du contexte physiologique ou physiopathologique, ainsi que du type cellulaire.

## 2. Implications de la NOX4 dans le développement tumoral

On sait que la NADPH oxydase NOX4 est impliquée dans le développement de l'angiogenèse et des maladies cardiovasculaires (*Alison C. Cave et al.*, 2006; *Lassègue B et al.*,

2010), qu'elle participe à l'instabilité génétique (*Weyemi et al., 2012*), et qu'elle est impliquée dans le développement des maladies inflammatoires et de certains cancers. Alors qu'elle est exprimée dans un contexte physiologique normal dans les cellules épithéliales mammaires humaines, sa surexpression est capable d'induire aussi bien la sénescence que la résistance apoptotique et la transformation tumorale (*Graham et al., 2010*). Dans les cancers du sein, la NOX4 est surexprimée et est localisée dans la mitochondrie. La NOX4 induit une augmentation de la production mitochondriale de ROS, et est fortement impliquée dans le maintien du phénotype tumorigène des cellules épithéliales mammaires. Ces résultats mettent en évidence la fonction oncogénique de la NOX4 en tant que nouvelle source de ROS dans la mitochondrie (*Graham et al., 2010*). La NOX4 est l'isoforme des NOXs la plus souvent retrouvée dans les lignées cellulaires tumorales (*Cheng et al., 2001*). Elle est également fortement exprimée dans les tumeurs neuroépithéliales (*Shono et al., 2008*), dans 31% des biopsies et plus de 60% des lignées cellulaires issues de mélanomes (*Yamaura et al., 2009*). La surexpression de la NOX4 est aussi observée dans les cancers colorectaux (*Wang et al., 2011*) et les cancers ovariens (*Graham et al., 2010*). D'autres évidences montrent l'implication de la NOX4 dans la résistance à l'apoptose et la croissance tumorale, dans les gliomes ou encore les adénocarcinomes (*Shono et al., 2008; Vaquero et al., 2004*). L'activation des voies de survie cellulaire a également été observée dans les cancers pancréatiques (*Lee JK et al., 2007*). L'expression de la NOX4 et de son partenaire fonctionnel p22<sup>phox</sup> est significativement augmentée dans les cancers papillaires (PTC) et folliculaires pauvrement différenciés (ATC) de la thyroïde. Son expression est homogène et diffuse dans le cytoplasme des cellules tumorales, contrairement à ce qui est observé dans les tissus thyroïdiens normaux où son expression apparaît hétérogène, avec un aspect granulaire (*Weyemi et al., 2010*). Au-delà de sa surexpression dans de nombreuses tumeurs, la NOX4 apparaît comme un médiateur critique de la transformation et la croissance tumorale. Chez la souris nude, l'inhibition de la NOX4 engendre une diminution de la production de ROS et l'inhibition du développement du mélanome (*Yamaura et al., 2009*). Le rôle de la NOX4/p22<sup>phox</sup> dans le développement tumoral doit être investi afin de mieux caractériser les mécanismes moléculaires de la carcinogenèse, et d'identifier un nouvel acteur pouvant constituer une cible thérapeutique.

### **a. Implication des ROS et de la NOX4 dans la réponse aux dommages à l'ADN**

La sénescence a initialement été identifiée dans les cultures cellulaires comme une réponse à l'activation d'un oncogène (OIS pour oncogene-induced senescence). Depuis, plusieurs études ont montré qu'il ne s'agit pas d'un événement observé uniquement *in vitro* mais que la sénescence intervient aussi *in vivo* (souris, homme). La sénescence est observée dans les cancers humains en phase pré-néoplasique. Elle est considérée dorénavant comme une barrière à l'oncogénèse. Les voies de signalisation activées par certains oncogènes tels que Ras ou c-Myc et impliquées dans la réponse aux dommages de l'ADN contribuent à l'induction de la sénescence (*Mallette et al., 2007*). Les foyers formés aux sites des dommages de l'ADN font partie des lésions observées dans les stades précoces du développement tumoral, et ont été identifiés comme une conséquence de l'activation oncogénique (*Bartkova et al., 2005*). Deux hypothèses tentent d'expliquer comment l'expression oncogénique induit des dommages de l'ADN. Une possibilité est que cette réponse soit la conséquence d'une réplication excessive causée par le signal oncogénique (*Bartkova et al., 2006; Di Mico et al., 2006*). Une autre hypothèse suggère qu'une augmentation de la concentration intracellulaire de ROS est à l'origine des dommages de l'ADN observés, notamment par l'oxydation des guanines et les cassures simple et double brin. Il a été suggéré que les ROS peuvent induire et participer au maintien de la sénescence lors du développement tumoral (*Suzuki EM et al., 2006*). L'oncogène H-Ras, retrouvé dans les tumeurs bénignes et malignes de la thyroïde (*Suarez et al., 1990; Tallini et al., 2002*) est capable d'induire la sénescence lors de son expression dans des cellules saines (*Serrano et al., 1997; Lin AW et al., 1998; Lin AW, 2001*). L'oncogène H-Ras peut induire une augmentation de la production cellulaire de ROS (*Leikam et al., 2008*). Il a été observé que les cellules exprimant Ras muté, cultivées dans un environnement pauvre en oxygène ou traitées avec un anti-oxydant tel que le NAC (*N-Acetyl-cystéine*), n'entrent pas en sénescence (*Lee et al., 1999; Vafa et al., 2002*). Ces résultats ont suggéré un rôle des ROS et plus particulièrement des NADPH oxydases dans la sénescence (*Schilder et al., 2009; Lener et al., 2009*). Une étude récente a montré que la NOX4, en produisant des ROS, induit des dommages de l'ADN et favorise l'entrée en sénescence des cellules thyroïdiennes exprimant l'oncogène H-RasV12 (*Weyemi et al., 2012*).

## **b. Rôle des ROS et de la NOX4 dans le développement de l'angiogenèse**

Les ROS produites par les NADPH oxydases sont impliquées dans la signalisation de différents facteurs de croissance tels que le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), l'EGF (Epithelial Growth Factor) et le PEDF (Pigment Epithelium Derived Factor), tous impliqués dans la prolifération cellulaire et l'angiogenèse. *In vitro*, dans les cellules endothéliales, de nombreuses réponses cellulaires relatives à l'angiogenèse sont médiées par les ROS. Il a été montré que la stimulation des cellules endothéliales par le VEGF ou l'Ang-1 (Angiotensine 1) induisent une augmentation de la production de ROS dépendante de NADPH oxydases (Ushio-Fukai *et al.*, 2002 ; Ushio-Fukai *et al.*, 2006). Les ROS sont impliquées dans l'autophosphorylation du récepteur VEGFR2 stimulée par le VEGF (M.T Lin *et al.*, 2003). *In vivo*, les ROS jouent un rôle important dans l'angiogenèse au cours de la croissance tumorale (Monte *et al.*, 1997) car la néovascularisation est inhibée par le NAC (Cai *et al.*, 1999). Les phases d'hypoxie/réoxydation augmentent la production de ROS, entraînent la formation de tubes capillaires, stimulent l'angiogenèse des cardiomyocytes et le développement des cancers colorectaux (Lakshminatrayanan *et al.*, 2001; Maulik *et al.*, 2006 ; Penumathsa *et al.*, 2007). Les antioxydants inhibent la néovascularisation dans les modèles murins de l'angiogenèse (Yoshida *et al.*, 1999).

Les facteurs de transcription et les gènes impliqués dans l'angiogenèse sont régulés par les ROS. Parmi les facteurs de transcription et les gènes sensibles à l'environnement redox nucléaire, il y a HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1). C'est un facteur de transcription hétérodimérique composé des sous-unités HIF-1 $\alpha$  et HIF-1 $\beta$ . En condition d'hypoxie, plusieurs gènes impliqués dans l'angiogenèse, comme le VEGF et l'érythropoïétine, sont régulés positivement par HIF-1, ainsi que de nombreux autres gènes impliqués dans différents aspects de la croissance tumorale, incluant la survie et l'invasion cellulaires. Une forte expression de HIF-1 $\alpha$  a été observée dans de nombreux cancers, de manière corrélée avec la tumorigenèse (BelAiba *et al.* 2004). Dans les cellules vasculaires, les ROS produites par les NADPH oxydases sont également impliquées dans l'induction de HIF-1 $\alpha$  en conditions de normoxie ou d'hypoxie (Gorlatch *et al.*, 2001; Bonello *et al.*, 2007). Des études ont montré l'implication de Rac1 et l'importance de la voie Rac1/Nox/ROS dans la régulation positive de HIF-1 et du VEGF en conditions d'hypoxie (Gorlatch *et al.*, 2003). Dans la lignée OVCAR-3

issue d'un clone de cancer ovarien, la NOX4 est surexprimée, et contribue au maintien d'une concentration élevée de ROS dans ces cellules. Les ROS produits par la NOX4 régulent positivement l'expression de HIF-1 $\alpha$  qui, à son tour, régule l'expression du VEGF au niveau transcriptionnel. L'inhibition spécifique ou non de l'expression de la NOX4 inhibe l'expression de HIF-1 $\alpha$  et l'activité du promoteur du VEGF. On observe alors une inhibition de l'angiogenèse et de la croissance tumorale. Ces résultats mettent en évidence le rôle de la NADPH oxydase NOX4 dans la régulation de l'expression de HIF-1 $\alpha$  et du VEGF, et son implication dans l'induction de l'angiogenèse et de la croissance tumorale dans les cancers ovariens. De manière intéressante, dans la lignée OVCAR-3, le TGF- $\beta$  et le NF- $\kappa$ B sont impliqués dans la régulation de l'expression de la NOX4 (*Xia et al.*, 2007).

Dans la thyroïde, la déficience pour la captation de l'iode induit l'angiogenèse *via* la signalisation ROS/HIF-1/VEGF. Cependant, des études récentes ont montré que dans certains cas de cancers de la thyroïde, notamment dans des modèles murins *RET/PTC3* et plusieurs lignées cellulaires (lignée TPC-1 issue d'un clone de carcinome papillaire porteur de la translocation *RET/PTC1*, lignée 8305C issue d'un carcinome thyroïdien indifférencié et lignée R082-w-1 issue d'un carcinome folliculaire de la thyroïde porteur d'une mutation de l'oncogène *BRAF*), cette déficience pour la captation de l'iode, qui induit l'angiogenèse *via* le VEGF, n'est médiée que partiellement par HIF-1 et ne dépend pas des ROS (*Gérard A. C. et al.*, 2012).

### **c. Implication des ROS et de la NOX4 dans le développement de la transition épithélio-mésenchymateuse**

La migration, l'adhérence et la motilité cellulaires sont des processus importants qui contribuent à l'angiogenèse des cellules endothéliales, à la formation d'une neointima dans les cellules musculaires lisses, ou encore à la réponse inflammatoire dans les macrophages ou des cellules du système immunitaire adaptatif (*Chaubey et al.*, 2013; *Schroder K et al.*, 2007; *Schroder K et al.*, 2011). Les cellules cancéreuses acquièrent une capacité migratoire au cours du développement tumoral qui participe à l'invasion tissulaire et au développement de l'état métastatique (*Peplow et al.*, 2013; *Wells A et al.*, 2013). La migration et l'adhérence cellulaires sont stimulées par les cytokines, les chimiokines et les facteurs de croissance. Dans la plupart des cas, ces agents conduisent à la formation de ROS. Les traitements

antioxydants, les inhibiteurs de NOXs et les enzymes antioxydantes permettent d'inhiber la migration cellulaire de nombreuses cellules (*Lin C.C. et al., 2012; Sadok A et al., 2009; Schroder et al., 2007*).

La modulation de la signalisation de la migration cellulaire par les ROS a été démontrée dans plusieurs types cellulaires. La polarisation des cellules endothéliales par rapport à la direction de l'extension/migration implique la réorganisation du cytosquelette et est régulée en partie par les ROS (*Wojciak-Stothard B. et al., 2003*). Le complexe Rho/Rac est largement impliqué dans la signalisation de la polarisation cellulaire. L'accumulation de Rac, souvent impliquée dans la régulation de l'activité des NOXs, favorise la production localisée de ROS, qui contribue à la polarisation de l'actine et à la migration (*Moldovan et al., 2000*). L'une des conséquences les plus importantes de la migration et de l'adhérence cellulaires est la formation de nouveaux vaisseaux sanguins ou le remodelage des vaisseaux existants. Ce processus est initié et dirigé par le VEGF qui est une cytokine pro-migratoire et angiogénique (*Shweiki D et al., 1992*). La NOX4 contribue à l'expression des stimuli pro-migratoires comme le VEGF (*Schroder et al., 2012; Zhuang et al., 2010*). Cependant de manière intéressante, l'extinction de l'expression de la NOX4 ou sa surexpression peuvent toutes deux inhiber la migration cellulaire. Récemment, une étude a démontré que la NOX4 est liée à la régulation de l'influx de calcium qui bloque la migration cellulaire induite par le VEGF (*Goettsch et al., 2013*). De plus, la NOX4 participe à la régulation de la structure du cytosquelette. Dans les muscles lisses, le complexe NOX4/Poldip2 active RhoA, entraînant l'initiation de la migration cellulaire en réponse au PDGF (*Lyle A.N. et al., 2009*). Il a aussi été suggéré que la NOX4 peut s'associer aux structures du cytosquelette impliquées dans la migration cellulaire, comme la vinculine (*Hilenski et al., 2004*). La formation de la neointima est dépendante de l'activité de la NOX4 et son inhibition est associée à la dédifférenciation cellulaire et à une augmentation de la prolifération des cellules musculaires vasculaires lisses et des fibroblastes (*Clempus et al., 2007; Schroder et al., 2009*).

L'adhérence cellulaire est le processus d'attachement d'une cellule à une autre ou à une matrice extracellulaire. Ce processus est très important pour le maintien de l'intégrité des tissus mais aussi l'angiogenèse et l'inflammation. Dans les cas de cancers, l'adhérence cellulaire est diminuée par divers signaux. On sait que la formation de ROS est une des conséquences de l'attachement cellulaire. Les ROS participent aux signaux initiés par les



adaptateurs de surface tels que les intégrines, qui vont renforcer l'adhérence cellulaire. Plusieurs études ont montré la contribution des NADPH oxydases à la signalisation des forces physiques agissant sur les cellules attachées (*Browning et al., 2014*). Un autre aspect de l'implication des ROS dans la signalisation de l'adhérence cellulaire est leur rôle dans l'expression des molécules d'adhésion participant aux réponses inflammatoires (*Cook-Mills et al., 2011; Elmarakby et al., 2012*). Le contrôle redox de l'adhérence cellulaire participe à la signalisation de l'expression des molécules de la matrice sur laquelle sont réparties les cellules et des molécules d'adhésion. Dans les cellules épithéliales de côlon, un processus impliquant l'activation de Rac1 et du métabolisme de l'acide arachidonique entraîne une production d'anion superoxyde pendant la propagation des cellules après adhérence sur le collagène IV (*de Carvalho DD et al., 2008*). La NOX4 est très exprimée dans les cellules endothéliales où elle participe à l'homéostasie et à la quiescence cellulaires. L'adhérence des macrophages est augmentée sur les cellules déficientes pour la NOX4, ce qui peut expliquer le phénotype hyper-inflammatoire observé chez les souris knock-out (K.O.) pour la NOX4 (*Schroder et al., 2012*). Ces données suggèrent que la NOX4 a un rôle protecteur qui favorise l'intégrité vasculaire mais d'autres données sont contradictoires, les stimuli pro-inflammatoires tels que le LPS ou une forte concentration en glucose augmentant l'expression de la NOX4 dans les cellules endothéliales (*Park HS et al., 2006*).

Plusieurs évidences montrent que la NOX4 est une cible potentielle pour inhiber les métastases dans les cas de cancers. La NOX4 a un rôle important dans la signalisation du TGF- $\beta$ , qui est lui-même un acteur important de l'EMT et de la progression vers l'état métastatique des tumeurs. Une étude récente a montré que le TGF- $\beta$  qui augmente la migration cellulaire, induit une production de ROS dépendante de la NOX4 dans une lignée cellulaire issue d'un cancer du sein (4T1). L'effet du TGF- $\beta$  est dépendant de l'expression de la NOX4. L'extinction de l'expression de la NOX4 par siRNA inhibe la capacité de migration des cellules 4T1 en présence ou en absence de TGF- $\beta$  et atténue significativement les métastases à distance dans les poumons et les os. De manière intéressante, des résultats similaires ont été obtenus avec la Schisandrine B (Sch B), un nouvel inhibiteur de NOXs possédant une très faible toxicité cellulaire (*Zhang B et al., 2013*). Une autre étude montre que les ROS produites par la NOX4 affectent la migration cellulaire et participent à la régulation de l'expression de l'ARNm de la fibronectine qui est un marqueur de l'EMT dans les cellules épithéliales

mammaires. Son expression est induite par le TGF- $\beta$  *via* SMAD3 dans des lignées issues de cancers du sein (MCF10A et MDA-MB-231) (Boudreau *et al.*, 2012). Ces résultats permettent d'attirer l'attention sur l'intérêt de cibler la NOX4 dans un contexte pharmacologique, dans le but d'inhiber la progression tumorale et la progression de l'EMT vers un état métastatique des tumeurs et, plus de limiter les métastases à distance.

#### IV. Objectifs

La perte d'expression du transporteur de l'iode (NIS) est un événement précoce de la carcinogenèse thyroïdienne. Les mécanismes moléculaires assurant le contrôle de son expression sont encore mal connus. Sur un plan clinique, certains cancers de la thyroïde porteurs de la mutation  $BRAF^{V600E}$  concentrent l'iode 131 de manière insuffisante pour pouvoir bénéficier de la radiothérapie métabolique. La compréhension des mécanismes qui sous-tendent cette perte d'expression est importante pour élaborer une stratégie thérapeutique capable de corriger cette anomalie. Les études effectuées à ce jour ont démontré l'implication et la nécessité de l'activation de la voie TGF- $\beta$ /Smads en parallèle de l'activation constitutive de la voie MAPK, dans la carcinogenèse et la dédifférenciation des cancers papillaires de la thyroïde porteurs de l'oncogène  $BRAF^{V600E}$ . En effet la voie TGF- $\beta$ /Smads semble être activée de manière indépendante de la voie MAPK par cet oncogène. Des observations récentes ont montré que les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont d'importants médiateurs des effets du TGF- $\beta$  dans le développement des cancers. Les NADPH oxydases qui constituent une source intracellulaire de ROS, sont souvent surexprimées dans des contextes physiopathologiques, notamment certains cancers. La dérégulation de l'expression des NADPH oxydases aboutit à une production de ROS anormalement élevée (stress oxydatif), qui perturbe l'équilibre redox de la cellule. Les ROS vont alors avoir une influence sur les signaux cellulaires sensibles à l'état redox et ainsi participer au développement oncogénique de la carcinogenèse. La NADPH oxydase NOX4 est régulée positivement par le TGF- $\beta$  dans de nombreux contextes physiopathologiques tels que le diabète et le cancer du sein. La thyroïde exprime la NADPH oxydase NOX4 de manière dépendante de la TSH dans un contexte physiologique normal. Cependant la NOX4 est surexprimée dans les cancers papillaires porteurs de la mutation  $BRAF^{V600E}$ . Le rôle de la NADPH oxydase NOX4 en tant que système générateur de ROS dans la tumorigenèse thyroïdienne reste à déterminer. Puisque l'expression du NIS semble être dépendante de l'état redox de la cellule et que la NOX4 est sur-exprimée dans les cancers papillaires, j'ai entrepris de caractériser le rôle de cette NADPH oxydase dans les mécanismes redox responsables de l'altération de l'expression du transporteur de l'iode dans les cellules thyroïdiennes tumorales.

Dans le but de démontrer une corrélation entre l'oncogène  $BRAF^{V600E}$ , la surexpression de la NOX4 et la régulation négative de l'expression du NIS, nous souhaitons tout d'abord effectuer une analyse transcriptionnelle par RT-qPCR sur une banque de tissus tumoraux issus de cancers de la thyroïde. Notre étude sera ensuite effectuée dans la lignée cellulaire BCPAP porteuse de la mutation  $BRAF^{V600E}$  et issue d'un clone de cancer papillaire humain peu différencié. Cette lignée constitue un bon modèle *in vitro* pour cette étude. Tout d'abord nous établirons des xénogreffes de BCPAP chez la souris nude, afin de confirmer le caractère tumorigène des cellules. Cette étape nous permettra également d'effectuer une analyse immuno-histochimique des xénogreffes afin d'observer le pattern d'expression des différents éléments faisant l'objet de notre étude. Nous pourrons ensuite caractériser *in vitro* l'expression de la NOX4 dans la lignée BCPAP. Nous étudierons également l'expression du partenaire fonctionnel de la NOX4, la  $p22^{phox}$ . L'expression des ARN messagers sera quantifiée par PCR quantitative (RT-qPCR) et l'expression de la protéine sera observée par Western Blot (WB). Nous souhaitons en parallèle mettre en évidence la contribution du système NOX4/ $p22^{phox}$  à la forte production de ROS observée dans la lignée BCPAP. Nous souhaitons également caractériser les signaux cellulaires à l'origine de la surexpression de la NOX4. Nous pourrons ensuite étudier le rôle des ROS et de la NADPH oxydase NOX4 dans la régulation négative de l'expression du NIS, avec pour objectif d'identifier une nouvelle cible thérapeutique dans le cadre du traitement du cancer papillaire de la thyroïde.

# Résultats

***BRAF*<sup>V600E</sup> induced-TGF- $\beta$  secretion down-regulates sodium iodide symporter (NIS) expression *via* NOX4-dependent ROS generation in papillary thyroid carcinoma**

**Abstract.** Papillary thyroid cancer (PTC) is the most common thyroid pathology and *BRAF* point mutations account for 40-60% of tumors. *BRAF*<sup>T1799A</sup> is the most frequent *BRAF* mutation and *BRAF*<sup>V600E</sup> positive tumors are often associated with a significant loss of sodium/iodide symporter (NIS) expression. Clinical results on patients harboring thyroid cancer with *BRAF* mutation have recently shown that MAPK pathway inhibition does not fully revert the *BRAF*-induced NIS repression. *BRAF*<sup>V600E</sup> expression induces secretion of functional TGF- $\beta$  which is a repressor of thyroid specific genes such as *NIS*. Importantly, NOX4 has been shown to be prominently expressed in an increasing number of tumors, in particular in PTCs. In breast cancer cells, a critical mechanism for cancer development involves the transcriptional regulation of NOX4 by TGF- $\beta$ . This result prompted us to test NOX4 as a ROS-producing candidate induced by *BRAF*-induced TGF- $\beta$ . In this report, we first show in PTCs a correlation between *BRAF*<sup>V600E</sup> status, NOX4 overexpression, and low NIS expression level. Then, using BCPAP cells as an *in vitro* PTC model, we demonstrate that *BRAF*<sup>V600E</sup> controls NOX4 and p22<sup>phox</sup> expression *via* TGF- $\beta$  signalling. The TGF- $\beta$  autocrine loop activated by *BRAF*<sup>V600E</sup> induces NOX4 and p22<sup>phox</sup> expression at the transcriptional level *via* phosphorylated SMAD3. Both constitutively expressed proteins form a functional NADPH oxidase which produces high intracellular ROS levels. ROS scavengers increase the NIS expression at both mRNA and protein levels, and rescue a functional NIS, indicating that ROS are involved in the repression of NIS. Knocking down NOX4 with specific siRNAs reinduces NIS expression at both mRNA and protein levels. Altogether, these results show for the first time that NOX4-dependent ROS generation has a critical role in *BRAF*-induced NIS repression *via* the TGF- $\beta$ /SMAD3 oncogenic signalling.

## Introduction

Papillary thyroid cancer (PTC) is the most frequent type of human thyroid carcinoma (Kondo *et al.*, 2006) where the genetic alterations often found are *BRAF* point mutations accounting for 40-60% of the cases. The most frequent *BRAF* mutation is the *BRAF*<sup>T1799A</sup> mutation, which encodes BRAF<sup>V600E</sup> oncogenic constitutively active protein kinase (Xing *et al.*, 2010). This mutation predicts a poor prognosis, with a higher rate of recurrence and a decrease of survival rate (Soares *et al.*, 2003; Elisei *et al.*, 2008). The property of thyroid cells to accumulate iodide is mediated by the sodium/iodide symporter (NIS) (Dai G *et al.*, 1996). This is clinically highly relevant because it makes possible thyroid cancers treatment with ablative doses of radioiodine. But, BRAF<sup>V600E</sup> positive tumors are often associated with a significant loss of NIS expression and therefore to a subsequent radioiodide-refractoriness. BRAF<sup>V600E</sup> promotes dedifferentiation and NIS repression in rat thyroid cells, (Mitsutake *et al.*, 2005; Mesa *et al.*, 2006). In addition, the thyroid-specific overexpression of the mutant BRAF in transgenic mice leads to the development of invasive PTC that closely recapitulates the phenotype of BRAF-positive PTCs in humans (Knauf *et al.*, 2005).

BRAF mediates the signal transduction of the MAP/extracellular signal-regulated kinase (MEK)-ERK pathway. The canonical signaling pathway triggered by BRAF is thought to result in the near exclusive activation of MEK and ERK and therefore, predicts a strong sensitivity to MEK inhibitors in human cancer (Solit *et al.*, 2006; Leboeuf *et al.*, 2008). Thus, BRAF-positive thyroid cancer cell lines are sensitive to the growth suppressive effects of MAPK pathway inhibitors (Ball *et al.*, 2007; Leboeuf *et al.*, 2008; Salerno *et al.*, 2010; Nucera *et al.*, 2010). Recently, small-molecule MAPK inhibitors have shown significant effects in transgenic mice with doxycycline-inducible expression of BRAF<sup>V600E</sup> in thyroid follicular cells. The small selective antagonists of mutant BRAF<sup>V600E</sup> (PLX4720) or MEK inhibitor (PD0325901) restored radioiodine incorporation in thyroid and rendered mice susceptible to therapeutic doses of radioiodine (RAI). However, in other cases, it has been observed that MEK inhibition (U0126) had only partial effect on NIS repression (Riesco-Eizaguirre *et al.*, 2006). In addition, clinical results on patients harboring thyroid cancer with BRAF mutation have recently shown that MAPK pathway inhibition does not fully reverts cancer progression and BRAF-induced NIS repression. This, therefore, indicated that the constitutive activation of the MAP Kinase

pathway cannot explain alone the dedifferentiation mechanisms and the epithelio-mesenchymal transition (EMT) that occur after oncogenic BRAF activation.

Several studies have shown an important role of TGF- $\beta$  in this process. Overexpressed in human tumors (*Pardali et al.*, 2007), including thyroid malignancies (*Matoba et al.*, 1998; *Kimura et al.*, 1999; *Vasko et al.*, 2007), transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) is a potent pro-oncogenic and prometastatic factor. The role of TGF- $\beta$  in cancer biology and cell signaling is complex and it is believed that cellular context is a crucial determinant of the ultimate outcome of the TGF- $\beta$  signaling in normal and tumor cells. TGF- $\beta$ , acting *via* Smads proteins, can be a potent repressor of thyroid specific genes of the iodide metabolism such as the Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter (NIS), thyroglobulin (Tg) and thyroperoxydase (TPO) in normal epithelial thyroid cells (*Kawagushi et al.*, 1997; *Kang et al.*, 2001; *Costamagna et al.*, 2004) and in rat thyroid follicular cells (*Nicollusi et al.*, 2003). BRAF<sup>V600E</sup> expression induces secretion of functional TGF- $\beta$ , which leads to a TGF- $\beta$ -driven autocrine loop that mediates the effects of the BRAF<sup>V600E</sup> oncoprotein in a MEK-independent manner, in particular NIS repression and promotion of cell migration, invasiveness and epithelial to mesenchymal transition (EMT). The blocking of TGF- $\beta$ /Smad signaling at multiple levels rescues BRAF-induced NIS repression (*Riesco-Eizaguirre et al.*, 2009). In human thyroid cells, the development of EMT in response to TGF- $\beta$  following BRAF activation requires concomitant constitutive activation of MAP Kinase pathway (*Knauf et al.*, 2011). However, the molecular basis of such an aggressive behavior induced by BRAF-induced TGF- $\beta$ -loop in the development of thyroid cancers remains unclear.

Recent observations suggest that ROS play an important role in the TGF- $\beta$ -induced EMT and cell mobility of many cell types. The NADPH oxydases (NOXs and DUOXs) generate specifically ROS in a wide variety of tissues. Cancer cells produce high levels of ROS, and in some cases, the source of these ROS has been linked to NOXs/DUOXs deregulation as reported for prostate cancer (NOX1 and NOX5), melanoma, glioblastoma and thyroid cancers (NOX4) among others. NOX4 was shown to be the most frequently expressed NOX isoform in several tumor cell lines (*Cheng et al.*, 2001). A large body of evidence within the last decade shows that NOX4 is prominently expressed in increasing number of tumors (*Shono et al.*, 2008; *Yamaura et al.*, 2009; *Wang et al.*, 2011; *Shimada et al.*, 2011; *Graham et al.*, 2010) in particular in papillary thyroid cancers (*Weyemi et al.*, 2010). In breast cancer cells, the



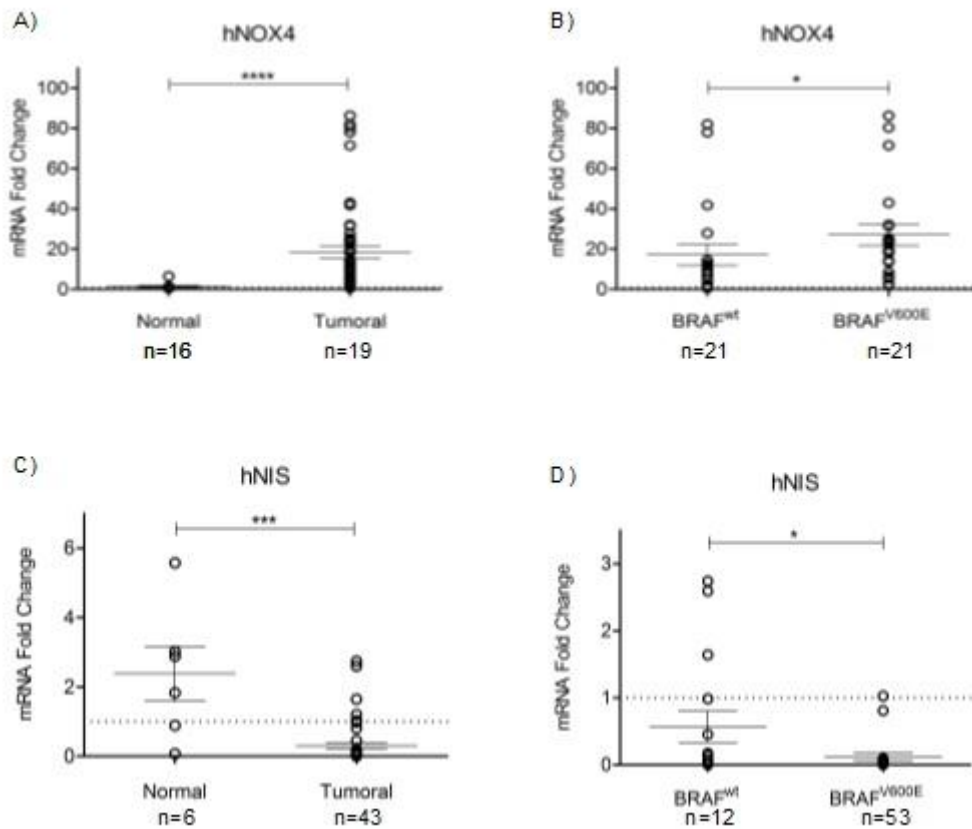
mechanisms critical for cancer development, involves the transcriptional regulation of NOX4 by TGF- $\beta$  through the SMAD3 transcription factor (*Biao Zhang et al.*, 2013 ; *Boudreau et al.*, 2012). This result seriously underscores NOX4 as a new key element of TGF- $\beta$  effects in cancers. These observations lead to consider NOX4 as a serious candidate as a ROS producing system induced by BRAF-induced TGF- $\beta$ -loop.

In this report, we show that NADPH oxidase NOX4 is regulated by mutant BRAF in a TGF $\beta$ -SMAD3-dependent pathway in thyroid cancer cells. We also found that NOX4-dependent ROS generation has a critical role in NIS repression induced by BRAF.

## Results

*NOX4 expression level is significantly increased in BRAF<sup>V600E</sup> mutated tumors*

In a previous study we have shown that, in addition to Dual oxidases 1 and 2 expressed at the apical surface, the thyroid cells express intracellularly the NADPH oxidase NOX4. Since it was suggested that redox potential might also control levels of NIS expression (1), we first compared the expression of NOX4 and NIS mRNA levels in normal and tumor thyroid tissues. Determination of the *NOX4* and *NIS* mRNA levels was done by real-time QPCR. As shown in figure 1, NOX4 expression level, which is globally increased in thyroid tumors ( $p < 0.0001$ ) (Figure 1A), was significantly higher in BRAF mutated tumors (Figure 1B). This was correlated to a significant decrease of NIS gene expression level in tumors in general ( $p < 0.0013$ ) (Figure 1C) and in BRAF-mutated tumors in particular ( $p < 0.0163$ ) (Figure 1D). These findings prompted us to further investigate whether NOX4 as a ROS generating system might be involved in the NIS repression.

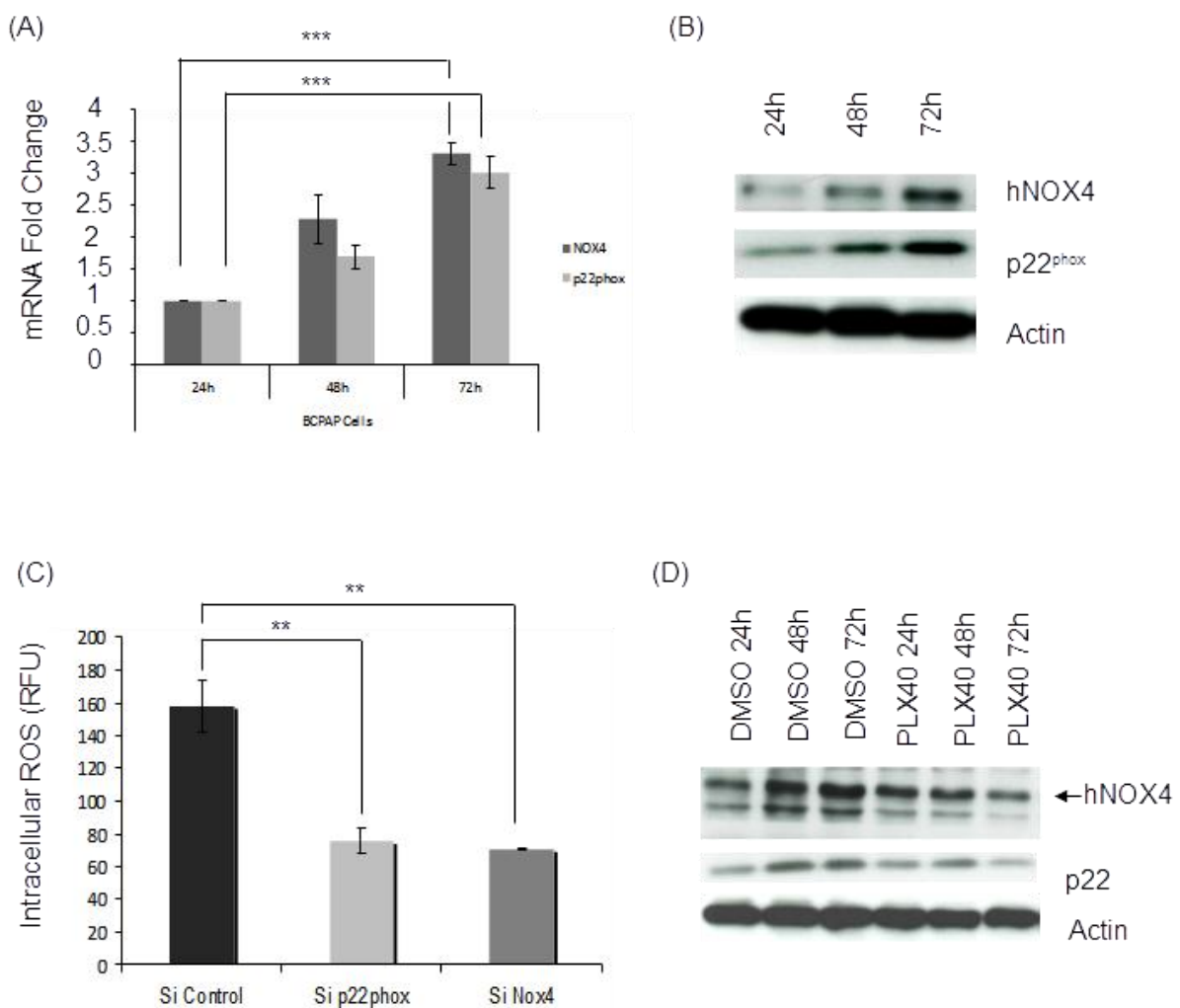


**Figure 1: Relative quantification of hNIS and hNOX4 mRNA by RT-qPCR in normal and tumoral thyroid tissues :** A) NOX4 in normal and tumoral tissues (n=12 and 53 – p<0.0001) ; B) NOX4 (n=21 and 21 – p=0.0241) in BRAF wild-type and mutated tumors; C) hNIS in BRAF wild-type and mutated tumors (n=16 and 19, respectively – p=0.0013); D) hNIS in BRAF wild-type and mutated tumors (n=6 and 43, respectively – p=0.0163). mRNA fold-change expression values (y-axis) are displayed on base 2 logarithmic scale.

*Activated BRAF oncogene promotes ROS generation via NADPH oxidase NOX4*

BCPAP is a papillary thyroid cancer cell lineage harboring the *BRAF*<sup>V600E</sup> mutation (Schweppe et al., 2008; Saiselet et al., 2012). As p22<sup>phox</sup> protein forms with NOX4 a functional heterodimeric complex we evaluated the time course of change in the levels of both mRNAs in these cells by real-time QPCR. Figure 2A shows that the expression of two genes increased with increased time in culture. This was correlated with an increase of expression of both NOX4 and p22<sup>phox</sup> proteins as shown by western-blot analysis (Figure 2B). Knocking down

NOX4 or p22<sup>phox</sup> with specific siRNA reduced the level of ROS in BCPAP cells (Figure 2C). To evaluate the implication of the *BRAF*<sup>V600E</sup> oncogene in the regulation of the NADPH oxidase complexe we used a BRAF<sup>V600E</sup> oncogenic protein specific inhibitor called PLX4032. This small-molecule exerts its effect by specifically blocking the constitutively active phosphorylation site of the oncogenic protein (*Garber et al., 2014*). Treatment of cells for 72 hours with this inhibitor, led to a down-regulation of NOX4 and p22phox protein levels (Figure 2D) indicating that mutated BRAF regulated both NOX4 and p22phox expression in BCPAP cells.



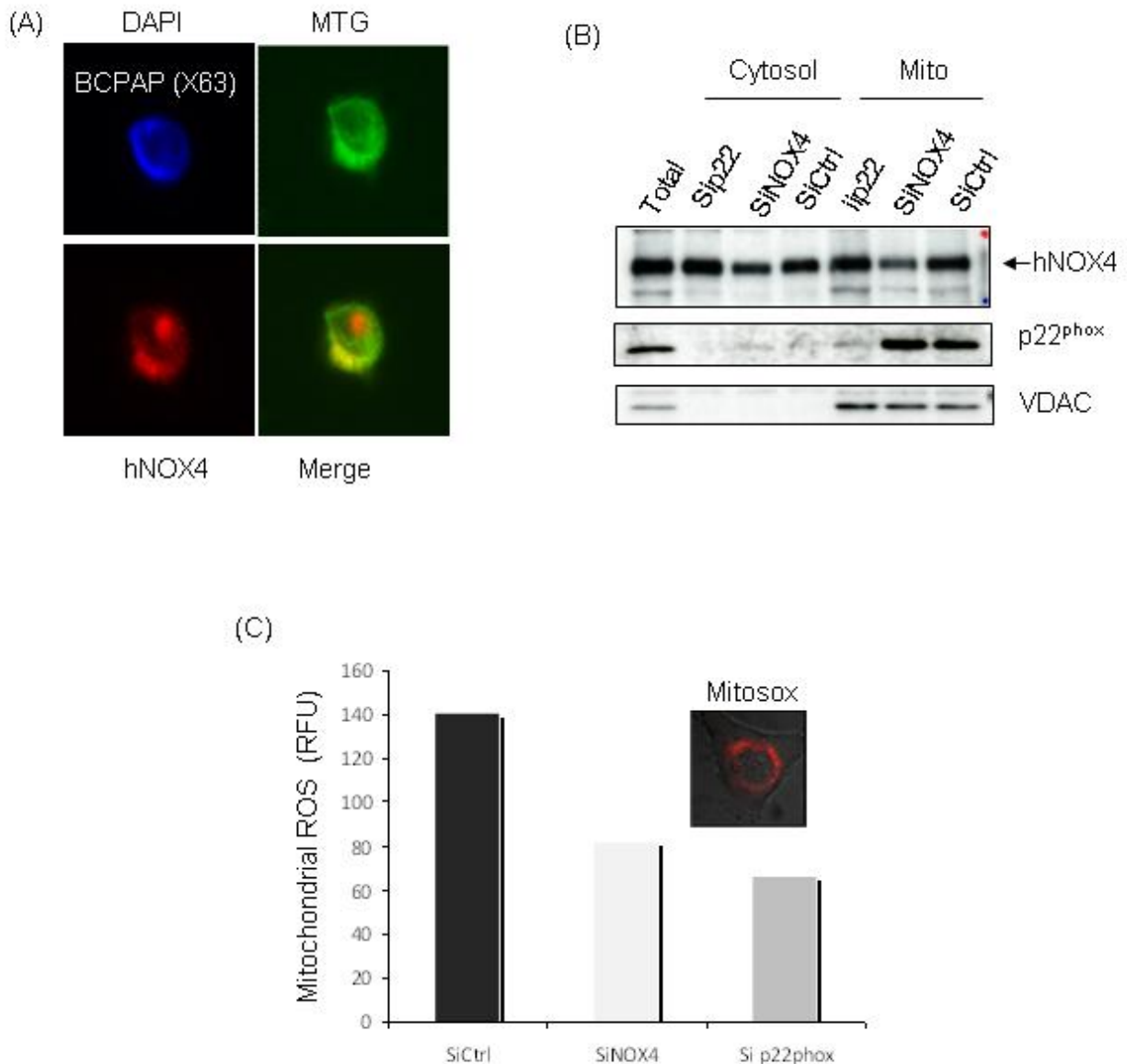
**Figure 2: Time course analysis of hNOX4 and p22phox mRNA and proteins expression, and subsequent ROS production in BCPAP cells under control of activated BRAF oncogene (A)**

Time course relative quantification of hNOX4 and p22phox mRNA expression in BCPAP cells by RT-qPCR on total mRNAs extract after 24h, 48h, and 72h of culture. mRNA fold-change

expression values (y-axis) are displayed on base 2 logarithmic scale. (B) Time course expression of NOX4 and p22phox proteins was analyzed by western blot after 24h, 48h and 72h of culture.  $\beta$ -Actin was used as loading control. Following small-inhibitory RNAs (SiRNAs) transfection, targeting hNOX4 or p22<sup>phox</sup> or Non-Target SiRNA as control (SiCtrl). (C) Intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels were quantified with DCF by flow-cytometry. Values represent mean of fluorescence (RFU). (D) DMSO or PLX4032 (10  $\mu$ M) were added to the medium for 24h, 48h or 72h, and time course expression of NOX4 and p22phox proteins was analyzed by western blot.  $\beta$ -Actin was used as loading control.

#### *NOX4 localizes in part into mitochondria*

Several studies have shown that cancer cells express NOX4 in mitochondria. In line with this we analyse the localization of both NOX4 and p22phox. Using a specific mitochondrial probe we visualized by immunofluorescence a merge between the mitotracker green and NOX4 in thyroid tumoral cells indicating a mitochondrial localization of NOX4 (Figure 3A). Mitochondria isolation experiments provided support for mitochondrial localization for NOX4 (Figure 3B). As expected, p22phox co-localized in mitochondria with NOX4. Both proteins were also found in cytosolic fraction containing the endoplasmic reticulum. Overall, these data indicated that NOX4 and p22<sup>phox</sup> form a functional complex that generates ROS in the mitochondrial environment.



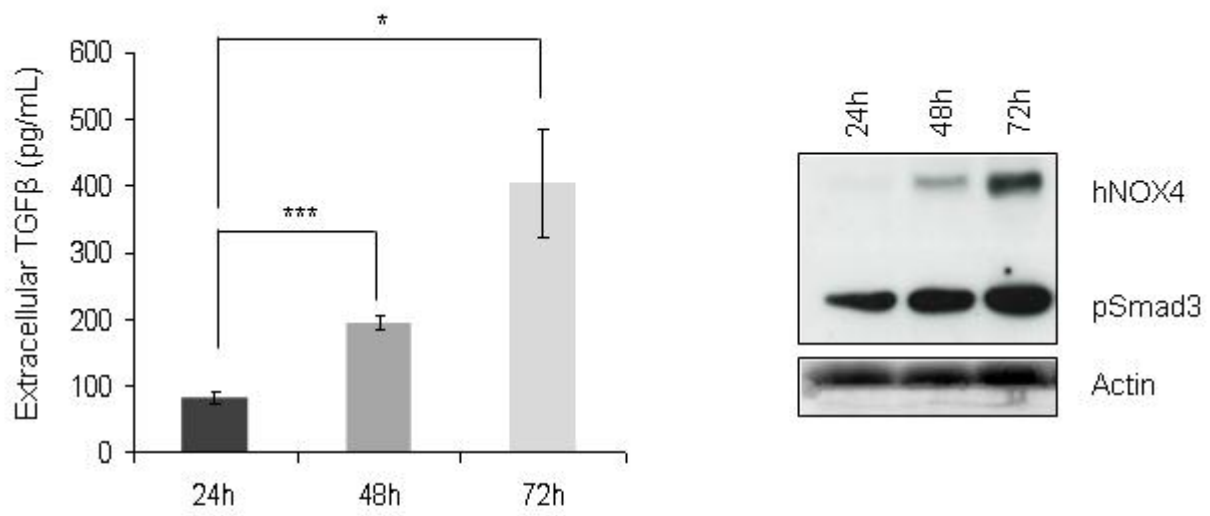
**Figure 3: NOX4 localize to cytosol and mitochondria** (A) Immunofluorescence analysis of NOX4 localization in BCPAP cells: Nucleus were stained with DAPI, NOX4 with FITC, mitochondrias with Mito Green Tracker (MTG), and visualized by microscopy (Magnification x20) (B) Expression of NOX4 and p22<sup>phox</sup> proteins in cytosol and mitochondria. BCPAP cells were transfected with siRNAs targetting hNOX4 or p22<sup>phox</sup> or Non-Target Smart Pool as control (siCtrl). Western Blot analysis was performed after 72h. VDAC was used as loading control for mitochondrias. (C) Effects of NOX4 and p22<sup>phox</sup> siRNAs on mitochondrial ROS levels was quantified with MitoSox by flow-cytometry after 72h.

*BRAF<sup>V600E</sup> induced-TGF- $\beta$  secretion in BCPAP cells*

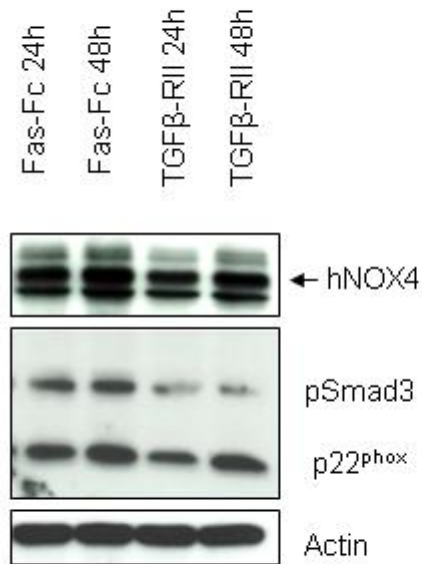
Recently, the *BRAF<sup>V600E</sup>* oncogene was shown to induce TGF- $\beta$  secretion in thyroid cancer. Therefore, we analyzed at different time points the cell culture supernatants for the presence of TGF- $\beta$  by ELISA (Figure 4A). The BCPAP cells produced TGF- $\beta$  and this was associated with an increased of the phosphorylated form of Smad3 indicating an activation of the TGF- $\beta$  /Smad signaling pathway in these cells. Treatment of cells with a TGF- $\beta$  antagonist, such as the soluble recombinant human TGF- $\beta$  soluble receptor RII, affected the phosphorylation of Smad3 and led to a down-regulation of the expression of both NOX4 and p22<sup>phox</sup> protein levels (Figure 4B). These results were confirmed by treating the cells with increasing concentrations of SB431542, a specific TGF- $\beta$  inhibitor (Figure 4C). To investigate the mechanism of this regulation, we analyzed the time course of the effect of 10  $\mu$ M of SB431542 on NOX4 and p22phox mRNA expression by real-time (RT)-qPCR. Figure 4D shows that SB431542 strongly decreased both mRNA expressions indicating that TGF- $\beta$  regulates NOX4 and p22phox at the transcriptional level.

Treatment of BCPAP cells with the selective *BRAF<sup>V600E</sup>* kinase inhibitor (PLX4032) inhibited TGF- $\beta$  secretion (Figure 4E) and phosphorylation of Smad3 (Figure 4F). Therefore, these results showed that mutated BRAF controls the TGF- $\beta$  secretion in these cells.

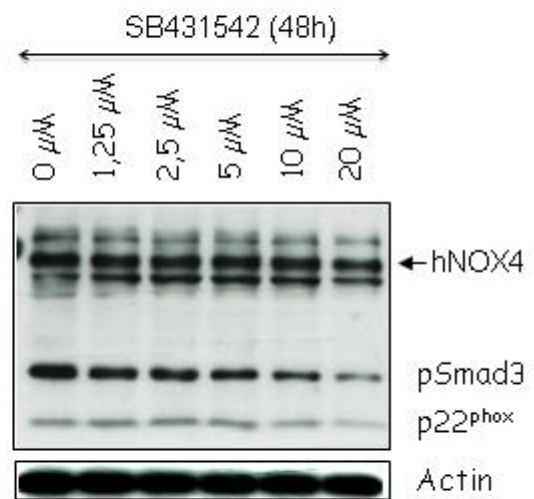
(A)



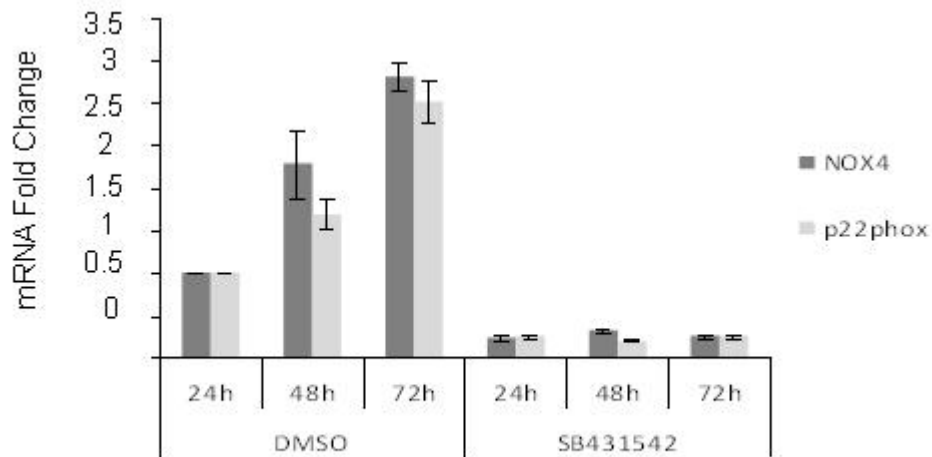
(B)

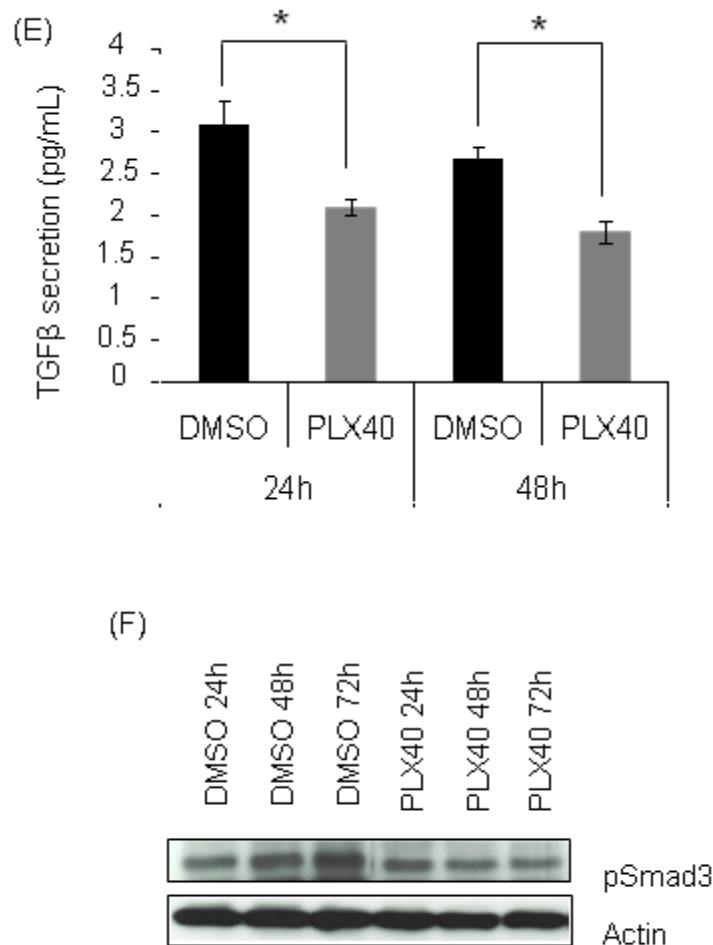


(C)



(D)





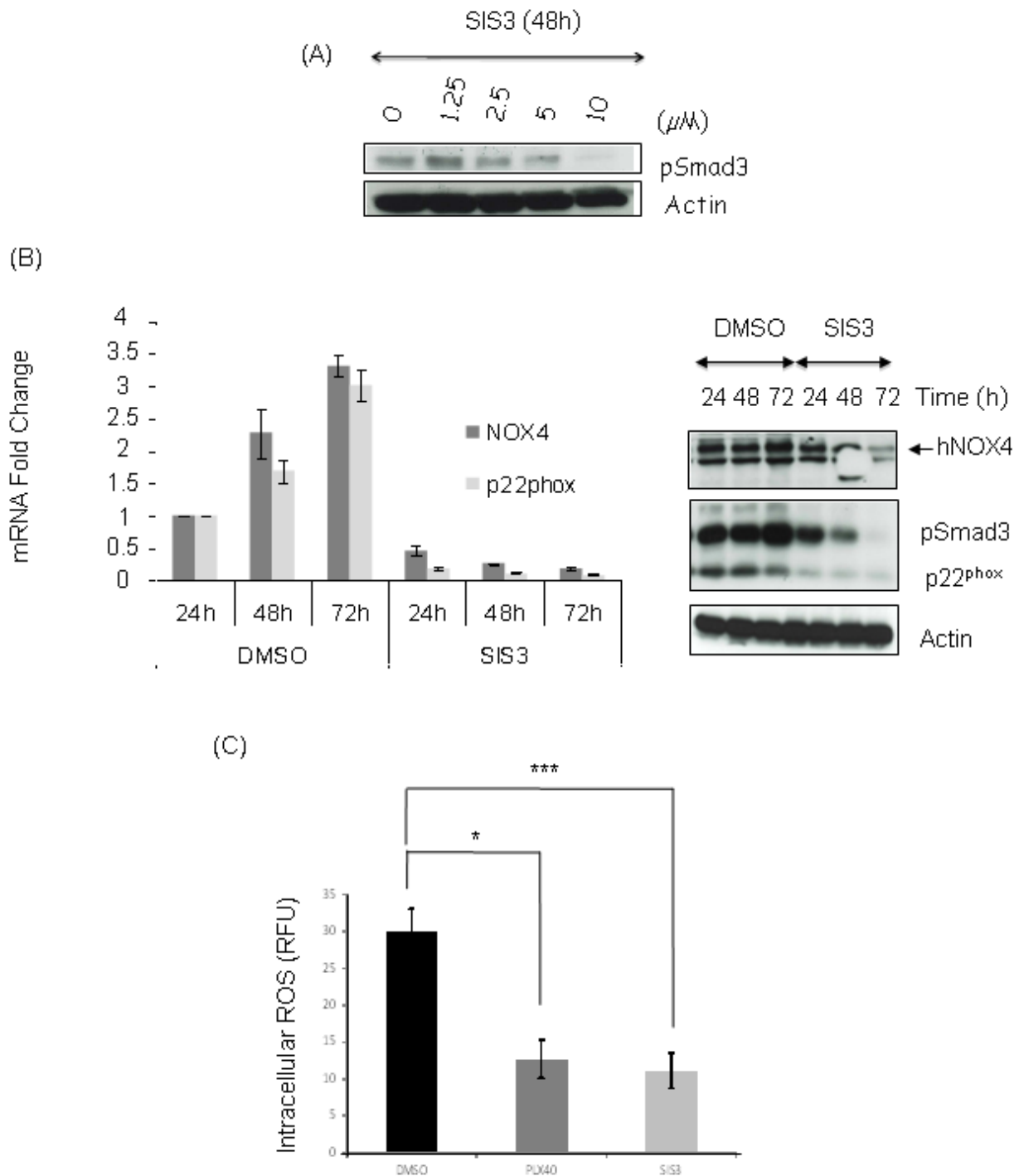
**Figure 4: *BRAF*<sup>V600E</sup> induced-TGF-β secretion in BCPAP Cells** (A) Time course analysis of TGF-β secretion by BCPAP cells in culture medium was quantified by ELISA-test; Smad3 phosphorylation consequent to TGF-β pathway activation was observed by western blot. (B) Soluble TGFβRII was add to medium at 1000 pg/ml versus soluble Fas-Fc as control. Western blot analysis of pSmad3, hNOX4 and p22phox proteins expression was performed at 24h and 48h. (C) BCPAP cells were treated with increasing concentrations of SB431542 (0 – 20 μM). Effect on pSmad3, NOX4 and p22phox proteins expression was assessed by B analysis. β-Actin was used as loading control. (D) Time course relative quantification of hNOX4 and p22phox mRNA expression in BCPAP cells by RT-qPCR on total mRNAs extract after 24h, 48h, and 72h of treatment with 10 μM of SB431542. mRNA fold-change expression values (y-axis) are displayed on base 2 logarithmic scale. (E) Time course analysis of TGF-β secretion by BCPAP cells in culture medium after treatment with 10 μM of PLX4032 inhibitor. TGF-β secretion was quantified by ELISA-test; graph show the quantification inpg/ml. (F) Western blot time



course analysis of Smad3 phosphorylation after treatment with 10  $\mu$ M of PLX4032 (24h, 48h or 72h).

#### *TGF- $\beta$ regulates NOX4 and p22phox via Smad3*

To determine the role of phospho-Smad3 on NOX4 and p22phox expression, we used a specific inhibitor of phospho-Smad3 named SIS3, which blocks the phosphorylation of Smad3, inhibiting consequently its coupling with Smad4, and subsequently their translocation to the nucleus where they bind to their DNA binding sites. The BCPAP cells were treated with increasing concentrations of SIS3. Immunoblot analysis showed that SIS3 at a concentration of 10  $\mu$ M totally abolished the phosphorylation of Smad3 (Figure 5A). The time course analysis of NOX4 and p22<sup>phox</sup> expressions, after treatment of cells with 10  $\mu$ M of SIS3, was accompanied by a down-regulation of both NOX4 and p22<sup>phox</sup> expressions at mRNA and protein levels. As expected, the level of ROS in these cells was reduced under these conditions. Taken together, these results show that the TGF- $\beta$  signaling pathway up-regulates the NADPH oxydase complexe in *BRAF*<sup>V600E</sup> mutation-positive thyroid cells at the transcriptional level in a Smad3-dependent manner. Thus, NOX4 may be considered as a new potential mediator of the TGF $\beta$  signaling pathway involved in thyroid carcinogenesis.

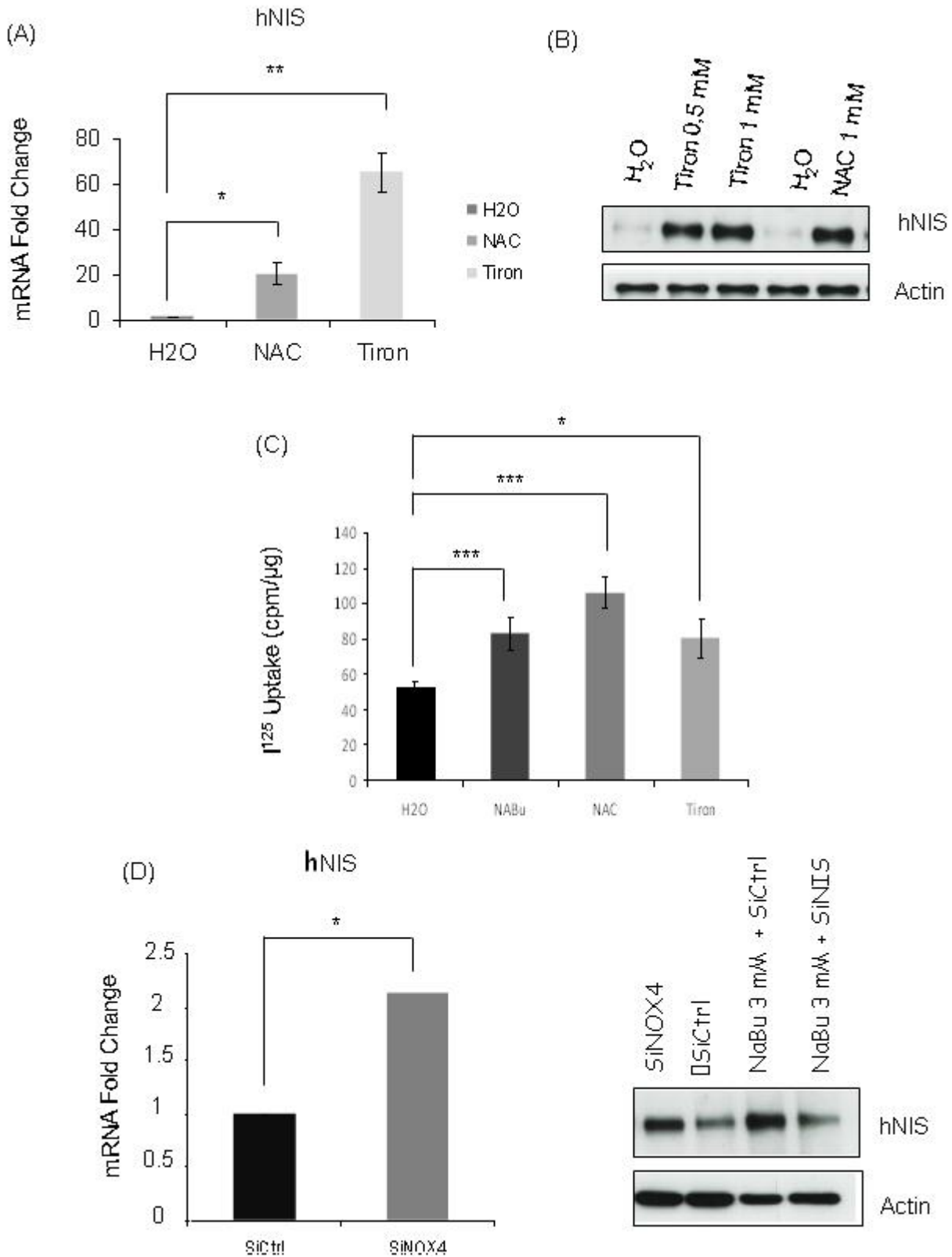


**Figure 5: TGF- $\beta$  regulates NOX4 and p22<sup>phox</sup> expression via phospho-Smad3** (A) BCPAP cells were treated with increasing concentrations of SIS3 for 48h. (B) DMSO or SIS3 (10  $\mu$ M) were add to medium and time course analysis of NOX4 and p22phox mRNAs expression was quantified by RT-qPCR. Graphs show the mRNA fold-change expression values (y-axis) are

displayed on base 2 logarithmic scale. NOX4 and p22phox protein expression was analysed by WB and  $\beta$ -Actin was used as loading control. (C) ROS intracellular levels were quantified with DCF and flow-cytometry after treatment with 10  $\mu$ M of PLX4032 or SIS3. Values are expressed as mean of fluorescence (RFU).

#### *NOX4-dependent ROS generation down-regulates NIS expression*

Since BRAF-induced repression of NIS was shown to be dependent on an autocrine TGF- $\beta$  loop, we wondered whether NOX4-dependent ROS generation might be involved in this repression. We first analyzed the effect of ROS scavengers, such as N-acetyl cysteine (NAC) and Tiron, on NIS expression in BCPAP cells. As shown in figure 6A and 6B, ROS scavengers increased the NIS at both mRNA and protein levels indicating that ROS are involved in the repression of NIS at the transcriptional level. Sodium butyrate, a histone deacetylase inhibitor shown to reinduce NIS in thyroid cancers (*Baldan et al., 2014; Zhang Z et al., 2014*), was taken as control. Because reinduction of NIS does not imply necessarily a correct targeting to the membrane and consequently an iodide transport activity, we assessed NIS activity using a iodide transport assay comparing the effect of the ROS scavengers with butyrate. The figure 6C shows that, in addition to butyrate, ROS scavengers are able to rescue functional NIS repression. As expected, knocking down NOX4 with specific siRNA reinduced NIS expression at both mRNA and protein levels. Taken together these results show for the first time that NOX4-dependent ROS generation is involved in BRAF-induced NIS repression *via* the TGF $\beta$ /Smad3 signaling pathway.



**Figure 6: NOX4-dependant ROS generation down-regulates NIS expression** (A) N-Acetylcysteine (1 mM) or Tiron (0.5 - 1 mM) were add to BCPAP cells medium along 48h. RT-

qPCR analysis of NIS mRNA expression was performed on total RNAs extracts. (B) NIS protein expression was observed by western blot analysis.  $\beta$ -Actin was used as loading control. (C) N-Acetylcysteine (1 mM), Tiron (1 mM) or NaBu (3mM) were added to the medium for 48h and iodide 125 uptake was quantified and normalized to protein concentration. Data are expressed as cpm/ $\mu$ g. (D) BCPAP cells were transfected with small-inhibitory RNAs (siRNAs) targeting hNOX4 for 48h or Non-Target siRNA as control (siCtrl). NIS mRNA expression was quantified by qRT-PCR on total mRNAs, graphs show the mRNA fold-change expression values (y-axis) are displayed on base 2 logarithmic scale. NIS protein expression was analysed by western blot.

## Material & Methods

**Cultured cells and reagents** BCPAP cells lineage arise from a single clone of a human papillary thyroid cancer harboring the *BRAF*<sup>V600E</sup> mutation. Cells were cultured in DMEM (1 g/l glucose) (Gibco) supplemented with 10% of foetal bovine serum (FBS, Gibco) and penicillin/streptomycin (100 mg/ml; Invitrogen). Cells were counted and seeded to a density of  $2,5 \cdot 10^5$  cells per well in six-well plates in a final volume of 2 ml culture medium. The cells were cultured at 37 °C in a humidified air atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Phosphorylated SMAD3 (SIS3) and *BRAF*<sup>V600E</sup> specific inhibitor (PLX4032) are respectively from were add to the medium at the optimal concentration of 10  $\mu$ M. All drugs were solubilized in DMSO.

**Transfection of small interfering RNAs** 24h hours after BCPAP cells were seeded, to obtain a 30-40% confluency, and cells were transfected with small interference RNA (siRNAs) (SiNOX4 SMARTpool and Sip22 or scrambled Non-Target siRNA control, all from Dharmacon) by using the Interferin transfection reagent (Polyplus). A pool of four different siRNAs for NOX4 was used; the target sequences were listed in table 1. Cells were incubated for 8 h with the siRNA-Interferin complexes in SVF free Opti-MEM medium; DMEM with 10% SVF was then added to the medium for 24h, 48h and 72h. The knockdown efficiency was checked by RT-PCR.

**Table 1** Sequences of selected siRNA against NOX4 and p22<sup>phox</sup>

<i>Product (manufacturer)</i>	<i>Name of siRNA</i>	<i>Sequence</i>
siNOX4 SMARTpool (Dharmacon)	NOX4-1	5'-ACUAUGAUUUCUUCUGGUA-3'
	NOX4-2	5'-GAAAUUAUCCCAAGCUGUA-3'
	NOX4-3	5'-GGGCUAGGAUUGUGUCUAA-3'
	NOX4-4	5'-GAUCACAGCCUCUACAUAU-3'
sip22 <sup>phox</sup> pool (Dharmacon)	p22 <sup>phox</sup> -1	5'-CCAUGUGGGCCAACGAACA-3'
	p22 <sup>phox</sup> -2	5'-GAAGAAGGGCUCCACCAUG-3'
	p22 <sup>phox</sup> -3	5'-GUACAUGACCGCCGUGGUG-3'
	p22 <sup>phox</sup> -4	5'-UACCAGGAAUUAUCUAUGUU-3'

**Measurement of intracellular ROS** Intracellular and mitochondrial ROS levels were respectively measured by flow cytometry in cells loaded with the redox-sensitive dye 20,70-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA; Invitrogen) or the mitochondrial superoxide specific probe MitoSox (Invitrogen). The nonfluorescent DCFH-DA readily diffuses into the cells, where it is hydrolyzed to the polar derivative DCFH, which is oxidized in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to the highly fluorescent DCF. Approximately 2,5.10<sup>5</sup> cells were harvested by trypsinization, resuspended in 0.5 ml of HBSS (Gibco) supplemented with 0.2% (v/v) SVF and incubated with 10 mM DCFH-DA or MitoSox for 30 min in the dark at 37 °C. Fluorescence for DCFH-DA and MitoSox was respectively recorded on the FL-1 and the FL-2 channels of FACScan (Becton Dickinson).

**Iodide uptake** BCPAP cells were assayed for iodide-transport. Briefly, cells were incubated for 1 hour at 37 °C in HBSS containing 20 µM/L KI and carrier-free Na<sup>125</sup>I (specific activity, 100 µCi/mmol I-). Radioactivity was quantified in a γ-counter in cpm and normalized to protein concentration (cpm/µg).

**Western blots and ELISA-tests** BCPAP cells were washed twice with PBS and directly solubilized in denaturing RIPA lysis buffer (SIGMA), supplemented with protease inhibitors and phosphatase inhibitors cocktails (Roche). Protein samples (20 mg) were sonicated for 15 s. After a centrifugation step, samples were supplemented with sample reducing agent (SRA, SIGMA) and LDS loading Reagentand (SIGMA), and than denatured at 70 °C during 10 min. They were then subjected to SDS-PAGE with 10% acrylamide gel and electrotransferred to 0.2-mm Protan BA 83 nitrocellulose sheets (Schleicher & Schuell, Mantes La Ville, France) for immunodetection with the following rabbit primary-antibodies: human NOX4 (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology Inc.); phosphorylated SMAD3 (ser ) (1:1000) (Abcam); human p22<sup>phox</sup>

(1:1000) (Santa Cruz Biotechnology Inc.),  $\beta$ -actin (1:1000) (SIGMA). Human NIS was immunodetected with the anti-Na/I symporter (NIS) serum (1:500) as previously described (Caillou *et al.*, 2001). Phosphorylated Immune complexes were detected with HRP-coupled goat anti-rabbit IgG antibody (SouthernBiotech, Birmingham, AL 35260, USA), and immunoreactive proteins were visualized by enhanced chemiluminescence (Amersham). Mitochondria were separated from cytosolic components with a mitochondria purification kit in accordance to the manufacturer's instructions (SIGMA). For TGF- $\beta$  production measurements, serum-free medium were collected from wells and TGF- $\beta$ 1 secreted into cell culture medium was quantified by ELISA according to the manufacturer's instructions (Promega). Serum concentration was decreased to 2% SVF 24 hours before each measurement.

**Immunofluorescence and microscopy** Cells were plated at  $2.5 \cdot 10^5$ /well in 6-well plates in DMEM medium as described in cell cultures for 48h. For MitoGreen Tracker (MTG) and MitoSox labeling, cells were pre-incubated in 0.5 ml of HBSS (Gibco) supplemented with 0.2% (v/v) FBS and 10 mM of MitoSox for 30 min in the dark at 37 °C. Cells were fixed for 30 min with freshly prepared 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS). After washing with PBS, the cells were permeabilized for 10 min in PBS plus sodium dodecyl sulfate 0.1%. The cells were then blocked with 10% fetal calf serum for 30 min and incubated for 1 h at room temperature with primary antibody diluted in PBS plus 0.1% bovine serum albumin: p22phox (Santa Cruz Biotechnology); hNOX4 (Santa Cruz Biotechnology). After washing in PBS plus 0.1% bovine serum albumin, the cells were stained with an Alexa fluor 488 or Alexa fluor 568 antibody (Invitrogen) for 1 h at room temperature. Finally, the cells were washed in PBS and coverslips were mounted for analysis. Fluorescent images were captured using a confocal microscope (Leica DM IRE 2, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA).

**Reverse transcription, PCR and real-time RT-qPCR** Total RNA from cells was extracted with Trizol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Quality of RNA preparation, based on the 28S/18S rRNAs ratio, was assessed with the RNA 6000 Nano Lab-On-chip (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Total RNA (1 mg) was reverse transcribed using 10 U Superscript III transcriptase (Invitrogen) in 20 ml PCR buffer according to the manufacturer's protocol for 60 min at 55 °C. Q-PCRs were performed on the equivalent of 10 ng total RNA per tube in a final volume of 18 ml as previously described (Lacroix *et al.*,

2005). hNOX4, p22phox and hNIS mRNA fold-change expression values (y-axis) are displayed on base 2 logarithmic scale and normalized to TBP gene expression. Oligonucleotide primers and Taqman probes specific for hNOX4, p22phox and hNIS and TBP (used as reference) were designed to be intron spanning by the Primer-Express computer software (Applied Biosystems). Sequences were obtained from the GenBank database, and the oligonucleotides were purchased from MWG Biotech (Courtaboeuf, France); these sequences are listed on table 2. Primers and probes for 18S were obtained from Assays-On-Demand (Applied Biosystems).

**Tissue samples and total RNA extraction** Thyroid tissue samples stored in liquid nitrogen were selected after histological analysis and classification according to World Health Organization recommendations, as previously described (*Lacroix et al., 2005*). Tissues were collected at Institut Gustave Roussy, and informed consent was obtained from all patients. The tissue collection included 15 follicular thyroid adenomas (FTA), 26 follicular thyroid carcinomas (FTC), 19 papillary thyroid carcinomas (PTC), 4 anaplastic thyroid carcinomas (ATC), and 25 nontumoral contralateral thyroid tissues obtained from patients with a unifocal tumor and considered as normal tissues based on histological examination (including 15 paired samples with 2 FTA, 3 FTC, 9 PTC, and 1 ATC). Total RNA was extracted from frozen tissue samples with Tri-reagent (Sigma–Aldrich) and then purified on Rneasy columns (Qiagen) according to the manufacturer's protocols. Reverse Transcription and qPCR were performed as described in the Reverse transcription, PCR and real-time RT-PCR section. For tissue samples analysis, each primers and probes have been controlled not to cross-react, to avoid amplification dimmers, and to provide optimal amplification efficiency tested with standard curves constructed from pool of cDNA from several tissues and cell lines that were serially diluted in nuclease-free H<sub>2</sub>O. The intra-assay coefficient of variation was 1%. Because the conventional use of a single gene for normalization leads to relatively large errors, normalization and relative mRNA expression was assessed by averaging of three internal control genes carefully selected as previously published (*Vandesompele et al., 2002*). Three housekeeping genes, 18S, ribosomal protein large P0 and cyclophilin A (PPIA), have been previously validated as internal control genes in thyroid tissues (*Lacroix et al., 2005*). A calibrator was constituted from pool of several thyroid tissues and cell lines were used as 1 sample, and all other relative levels of expression were expressed as x-fold difference relative



to this calibrator. The expression levels of hNOX4 and p22phox, observed in the various groups of tumor tissues, were compared with those in normal samples by the nonparametric Mann–Whitney test. Differences in gene expression levels in paired tissue samples were analyzed by a nonparametric Wilcoxon matched pairs test. All P values are two sided.

**Experimental animals and xenografts collection** BCPAP cells xenografts were established on 3 weeks nude mice by under-skin injection and grown for 3 weeks before immunohistochemical analysis. Animals were euthanized with CO<sub>2</sub>. Xenografts were collected immediately and conserved in liquid nitrogen.

**Immunohistochemistry** Immunohistochemical studies were performed on liquid nitrogen conserved and formaldehyde-fixed, xenografts tissues, as previously described (*Caillou et al.*, 2001). Briefly, 5-micron sections were deparaffinized. Endogenous peroxidase activity was quenched by incubation in 0.03% hydrogen peroxide, in 0.1 mol/l Tris–HCl buffer 1 (pH 7.6) for 5 min. Microwave/pressure cooker pretreatment was performed in 1 mmol/l EDTA buffer (pH 8). Sections were subsequently incubated for 60 min at room temperature with the rabbit polyclonal anti-NOX4 antiserum (1:100), with the anti-Na/I symporter (NIS) serum (1:500) (*Caillou et al.*, 2001) and with the monoclonal anti-human-p22phox (1:50) (mouse monoclonal antibody 449, *Verhoeven et al.*, 1989). Sections were then washed in Tris–HCl buffer for 5 min and incubated with a peroxidase-conjugated goat anti-rabbit antibody for 30 min (ENVISION; DAKO Corp., Carpinteria, CA, USA). After further washes, peroxidase staining was revealed in diaminobenzidine tetrahydrochloride (Polysciences Inc., Warrington, PA, USA) with 0.1% (w/v) of hydrogen peroxide, in Tris buffer, 0.01 mol/l (pH 7.2). Sections were counterstained and mounted. Negative controls were obtained by replacing the specific primary antibody by an irrelevant antibody. Kidney tissue was used as positive controls for hNOX4 antibody (*Shiose et al.*, 2001). The percentage of positively stained cells was assessed semiquantitatively, being 0–25; 25–50; 50–75; or 75–100%, as well as the intensity of staining in hNOX4-positive cells.

**Statistical analysis** All statistical analyses performed using GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). All datas are presented as the mean +/- SEM of three different experiments performed in triplicate. Statistical significance was determined by Student t-test (\*, p<0,05 ; \*\*, p<0,01 ; \*\*\*, p<0,0001) and ANOVA.

## **Discussion & Perspectives**

The aim of this work was to analyze the role of the ROS-generating system NOX4 in the regulation of the sodium iodide symporter gene expression, which is down regulated in dedifferentiated thyroid tumors. Since more than half of these tumors harbor the *BRAF*<sup>V600E</sup> mutation we have investigated the implication of NOX4 in the *BRAF*<sup>V600E</sup> oncogenic effect on NIS expression and determined which signalling pathway(s) activated by the oncogenic BRAF control(s) NOX4 expression in thyroid cancer cells. Dedifferentiation process is an important step in cancer progression and the lack of NIS expression is one of the first consequences, leading to RAI refractoryness. Thus, the study of NIS gene expression presents a clinical interest. Its expression is suspected to be redox-sensitive and was recently shown to be controlled by TGF- $\beta$  in PTCs. Despite advances in scientific and clinical fronts, advanced thyroid cancers remain incurable. In this context, NOX4 might be a new therapeutic target for NIS re-expression. NOX4 and redox signalling are known to mediate TGF- $\beta$  effects in several diseases. Since in a previous study we observed an overexpression of NOX4 in papillary thyroid cancers, we have investigated the role of NOX4 in the downregulation of NIS gene expression in a *BRAF*<sup>V600E</sup> – mutant thyroid cancer cell line.

#### *Is BCPAP a good in vitro model for papillary thyroid cancer?*

Human thyroid cancer cell lines are the most used models for thyroid cancer studies. They originate from differentiated and dedifferentiated *in vivo* human thyroid tumors. The BCPAP cell line, commonly known as PTC cell line, is derived from a poorly differentiated PTC and harbors the *BRAF*<sup>V600E</sup> mutation (*Fabien et al.*, 1994; *Saiselet & al.*, 2012). DNA profiling did not reveal cross-contaminations and showed BCPAP cell line as unique (*Schweppe & al.*, 2008). The BCPAP cell line does not match any of the cell lines tested or any other cell line listed in the ATCC, DSMZ, or ECACC databases. The BCPAP profile reported in those studies is identical to the one reported by the DSMZ (*van Staveren et al.*, 2007). BCPAP cell line constitutes a pertinent model for the study of molecular mechanisms leading to poorly differentiated thyroid tumors emerging from *BRAF*<sup>V600E</sup> mutated cells. However, it is necessary to confirm our results by using another cell line harboring the *BRAF*<sup>V600E</sup> mutation, such as the 8505C which is derived from a undifferentiated papillary thyroid carcinoma cell

line, and finally by testing the BRAF<sup>V600E</sup> oncogenic protein expression in primary thyrocytes culture.

#### *NOX4 as a new effector of BRAF<sup>V600E</sup> and TGF- $\beta$ oncogenic signalling in PTC*

The BRAF<sup>T1799A</sup> mutation, which encodes BRAF<sup>V600E</sup>, is the most common genetic event in papillary thyroid cancers (Kimura *et al.*, 2003; Soares *et al.*, 2003; Ugolini *et al.*, 2007). BRAF is a potent activator of the MAPK/ERK pathway and, as such, a critical regulator of normal growth, differentiation, and oncogenic transformation (Sebolt-Leopold JS, 2004). However, it has been previously shown that the MAPK pathway alone is not sufficient to control all the thyroid carcinogenesis processes including thyroid specific genes downregulation leading to loss of cell differentiation or to epithelial to mesenchymal transition (EMT), suggesting the involvement of additional signalling pathway(s).

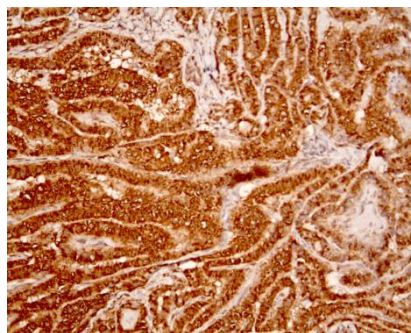
TGF- $\beta$  pathway activation is necessary to undergo thyroid cancer progression in mice (Knauf *et al.*, 2010). Since overexpression of TGF- $\beta$  has been evidenced in human thyroid tumors, its potential role in the thyroid malignancies has been consequently suggested (Matoba H *et al.*, 1998). However, the role of TGF- $\beta$  is complex and is dependent of the cellular context. Overexpression of the BRAF<sup>V600E</sup> oncogene in a rat thyroid cell line (PCCI3) or in mouse thyroid cells (Riesco-Ezaguirre *et al.*, 2009; Knauf *et al.*, 2010) induces TGF- $\beta$  secretion that leads to NIS repression, cell migration and to EMT. These results highlight that TGF- $\beta$  may contribute to the impairment of iodine transport in human BRAF<sup>V600E</sup> mutated thyroid cells.

ROS are known to be an important effector of the TGF- $\beta$  pathway at the molecular level and induce EMT and cell mobility in many cell types (Zavadil *et al.*, 2005; Nawshad *et al.*, 2005). ROS can be produced by the NADPH oxidase NOX4, for which accumulating evidences show that it may be an important downstream effector in mediating TGF- $\beta$ -induced effects such as fibrosis (Gorin Y *et al.*, 2013) and EMT (Hiraga R *et al.*, 2013). NOX4 is over-expressed in thyroid cancers in particular in PTC (Weyemi *et al.*, 2009, Figure 1). Here we present new data showing that NOX4 mRNA expression is significantly higher in papillary thyroid cancers harboring the BRAF<sup>V600E</sup> mutation (Figure 1B). In order to determine which

signalling pathways may control NOX4 expression in BRAF-mutated thyroid cancers, we used the BCPAP cell line as a PTC –derived cell line. We observed that the NOX4 isoform of 65 kDa and the protein p22<sup>phox</sup> (22 kDa) are well expressed and form a functional ROS producing system, making a major contribution to the high intracellular ROS level measured in BCPAP cells (Figure 2C). This is in accordance with the common observation of high levels of ROS in most cancer cells, whose production is often linked to a NOXs/DUOXs deregulation. Evidences to date suggest that NOX4 heterodimerization with p22<sup>phox</sup> is sufficient to enhance the enzymatic activity and does not require cytosolic subunits that are essential for other NOX isoforms (*Bedart K et al., 2007*). NOX4 has been referred to as a “constitutively active” enzyme that is regulated primarily at the level of its expression in response to various stimuli. On the other hand, we also have pertinent preliminary immunohistochemical datas showing that poldip2, recently identified as a new NOX4 cytosolic partner (*Lyle et al., 2009*), is also expressed in papillary thyroid carcinoma tissues (Figure 15). Further studies are necessary to analyse the contribution of poldip2 in the BRAF<sup>V600E</sup> effects.

Figure 15 : Immunohistochemical analysis of polodip2 protein expression in papillary thyroid cancer from the Institut Gustave Roussy tissue bank.

poldip2



Most important, we show that NOX4 and p22<sup>phox</sup> up-regulation at the transcriptional level in BCPAP cells are both controlled by BRAF<sup>V600E</sup> oncogene (Figure 2D) *via* the TGF- $\beta$ /Smad3 signalling pathway (Figure 4A, 4B, 4C). In accordance to the study using a rat thyroid cell line overexpressing mutated BRAF (*Riesco-Ezaguirre et al., 2009*), we show that

BCPAP cells also secrete TGF- $\beta$  under the control of *BRAF*<sup>V600E</sup> oncogene. Here, we quantified more precisely TGF- $\beta$ 1, the most often described isoform to be susceptible to the action of TGF- $\beta$  that induces the activation of the TGF- $\beta$  /Smad signalling pathway. Smad3 is known as the effector of TGF- $\beta$  members of the BMPs family like TGF- $\beta$ 1, rather than Smad2 known to be the transcriptional effector for ALK-5 receptors, and Smad5 for the activin receptors. The specific inhibition of *BRAF*<sup>V600E</sup> oncogenic protein led to the inhibition of TGF- $\beta$  secretion (Figure 4E) and subsequently to the inhibition of Smad3 phosphorylation (Figure 4F). Treatment of cells with inhibitors of the TGF- $\beta$  receptor or with a selective inhibitor of Smad3 function (SIS3) affected, in turn, the expression of both NOX4 and p22<sup>phox</sup> and consequently the intracellular ROS production. To our knowledge, it is the first time that NOX4 and p22<sup>phox</sup> are jointly regulated by the TGF- $\beta$  /Smad3 signalling pathway. In most cases, TGF- $\beta$  is shown to stimulate ROS production mainly through an increase of NOX4 expression. Recent data describe the identification of Smad-binding element involved in TGF- $\beta$  regulation of *NOX4* promoter. Thus, *NOX4* transcriptional regulation by TGF- $\beta$  was Smad3 dependent based on the effect of constitutively active Smad3 increasing *NOX4* promoter activity (*Boudreau HE et al*, 2012). Overall, these results suggest that the NADPH oxidase NOX4 might be a new downstream effector in the *BRAF*<sup>V600E</sup>/TGF- $\beta$ 1/Smad3 oncogenic signalling pathway.

The MAP kinase pathway contributes to the progression of *BRAF* –induced thyroid cancer. Constitutive activation of the MAPK pathway is required for optimal TGF- $\beta$  signalling in mouse thyroid cancer cells induced by *BRAF* (*Knauf et al.*, 2010). Small-molecule MAPK inhibitors have been shown to restore radioiodine incorporation in mouse thyroid cancers with conditional *BRAF* activation (*Chakravarty D et al.*, 2011). Interestingly, short-term pretreatment of PCCL3 cells prior to induction of *BRAF*<sup>V600E</sup> with MEK inhibitors did not restore NIS activity, whereas treatment with a TGF- $\beta$ –R1 inhibitor was more effective (*Riesco-Ezaguirre et al.*, 2009). These results contrast with the data in mice, in which MEK inhibitor treatment for 6 days resulted in a clear reactivation of iodine uptake (*Chakravarty D et al.*, 2011). It is possible that a longer treatment time is required to switch off both the direct and indirect consequences of MEK overactivity on NIS expression. This is all the more surprising because in the same cells TGF- $\beta$ -induced EMT was blocked by MEK inhibition. The effect of MAPK inhibitors was not evaluated in our model. It would be particularly interesting to

analyse in BCPAP cells whether TGF- $\beta$  cooperates with the MEK-ERK pathway in BRAF-induced repression of NIS.

Another interesting point is the possibility of the potentialization of TGF- $\beta$ 1 activation by ROS. Indeed, TGF- $\beta$ s synthesized as precursor proteins (L-TGF- $\beta$ s) have to be intracellularly modified from latent to active form prior to secretion. One of the most relevant intracellular modifications is the cleavage of the C-terminal pro-region, called the latency-associated peptide (LAP), from the N-terminal region of the protein, called the mature or active TGF- $\beta$ . The mature TGF- $\beta$  associated with the LAP cannot interact with its receptors and have no biological effects. The regulation of this conversion is one of the most important steps for controlling the biological effects of TGF- $\beta$ . Since TGF- $\beta$  has been associated with the pathogenesis of numerous diseases, the various mechanisms of activation of L-TGF- $\beta$  offer the possibility of controlling TGF- $\beta$  activity. It has been demonstrated that ROS can potentialize this step (*Barcellos-Hoff et al., 1996*). Indeed, ROS may affect the LAP by oxidation of its cysteine or methionine residues. Oxidation of these residues can result in altering the stability of the LAP, resulting in the loss of non-covalent association with TGF- $\beta$ , or undergoing conformational change resulting to the exposure of the TGF- $\beta$  receptor binding site. Thus, NOX4 might also contribute to the mechanism of TGF- $\beta$ 1 activation in thyroid cancer cells.

#### *Redox regulation of NIS mRNA transcription*

Since BRAF-induced repression of NIS was previously shown to be dependent on an autocrine TGF- $\beta$  loop we wondered whether NOX4-dependent ROS generation, regulated by TGF- $\beta$ , might be involved in this repression *via* a redox mechanism. Using antioxidants (NAC, Tiron) and RNA interference-mediated NOX4 knockdown we showed for the first time that NIS mRNA expression may be controlled at the transcriptional level in a redox-sensitive manner in thyroid cancer cells. Considering that an increase of NIS mRNA expression is not always followed by an increase of a functional protein expression, we also confirmed that inhibition of oxidative stress in BCPAP cells was associated with both an increase of NIS protein expression and iodide uptake (Figure 6C). Taken together these results highlight that TGF- $\beta$  might induce NIS repression through a NOX4-dependent pathway downstream of

Smad3 activated in human *BRAF*<sup>V600E</sup> mutated thyroid cells. In normal rat thyroid epithelial cells (PCCl3 and FRTL-5), TGF- $\beta$  inhibits NIS expression. A mechanism has been proposed involving a functional interaction between the transcription factor PAX8, which is a critical mediator of *NIS* gene transcription, and Smad3, causing an inhibition of the action of PAX8 (Costamagnana *et al.*, 2004). In the light of recent data, Smad3 might also contribute to the inhibition of the action of PAX8 by oxidation through an upregulation of the ROS-generating system NOX4. The molecular mechanisms of this redox-sensitive control of *NIS* gene expression have to be further investigated.

Recent studies focus on the molecular mechanisms of the redox control of NIS down-regulation, and the most promising results are about DNA methylation process. Epigenetic events of DNA hypermethylation are emerging as promising molecular targets for cancer detection. Aberrant promoter methylation is frequent in tumor suppressor genes in many tumor types. Interestingly, hypermethylation of the *NIS* gene is observed in thyroid cancers which regardless of cell type tested, may be an early change in thyroid tumorigenesis (Smith *et al.*, 2007; Stephen JK *et al.*, 2011; Baldan *et al.*, 2014). Indeed, sodium iodide symporter mRNA expression has been shown to be decreased in multiple trials, and this has been proposed to be secondary to methylation of the promoter region (Galrão *et al.*, 2013; Galrão *et al.*, 2014). Within the promoter region for the *NIS* gene, there are two regions of which the methylation status has been studied and reported. These are the NIS-L and NIS-C regions. The use of demethylating agents has been shown to restore decreased iodine uptake by cells with methylated promoter regions (Venkataraman *et al.*, 1999; Li W *et al.*, 2007; Provenzano *et al.*, 2007). ROS and oxidative stress in reticulum endoplasmic or mitochondria have been shown to provide an oxidative stress-mediated epigenetic imbalance which perturbed genomic integrity in numerous oxygen radical-induced injuries, disturbing the DNA demethylation mechanisms mediated by redox-active biomolecules (Mishra PK *et al.*, 2014; Palsamy P *et al.*, 2014; Zhao B *et al.*, 2014).

#### *Mitochondrial localization of NOX4*

TGF- $\beta$  is known to stimulate ROS production from different intracellular sources including mitochondria and endoplasmic reticulum (Albright Craig D *et al.*, 2003).



Interestingly, we observed NOX4 protein expression in both cytosolic fractions containing endoplasmic reticulum in which NOX4 is synthesized and mitochondria (Figure 3A). Various localizations of NOX4 have been observed in numerous diseases. In breast and ovarian cancer, a 73 kDa NOX4 isoform has been identified in mitochondria as an oncogenic protein associated with tumorigenicity (Graham *et al.*, 2010). Here, we detected a 65 kDa NOX4 isoform in both purified mitochondria and cytosolic extracts (Figure 3B). Thus, NOX4 might constitute a novel source of ROS in the mitochondria of papillary thyroid cancer cells (Figure 3C). The cytosolic and mitochondrial isoforms of NOX4 probably do not have the same function, considering that ROS produced in the cytosol or mitochondria do not have the same effects on their local environment. Both functions have to be investigated in BCPAP cells to further characterize the oncogenic roles of NOX4 in PTC development.

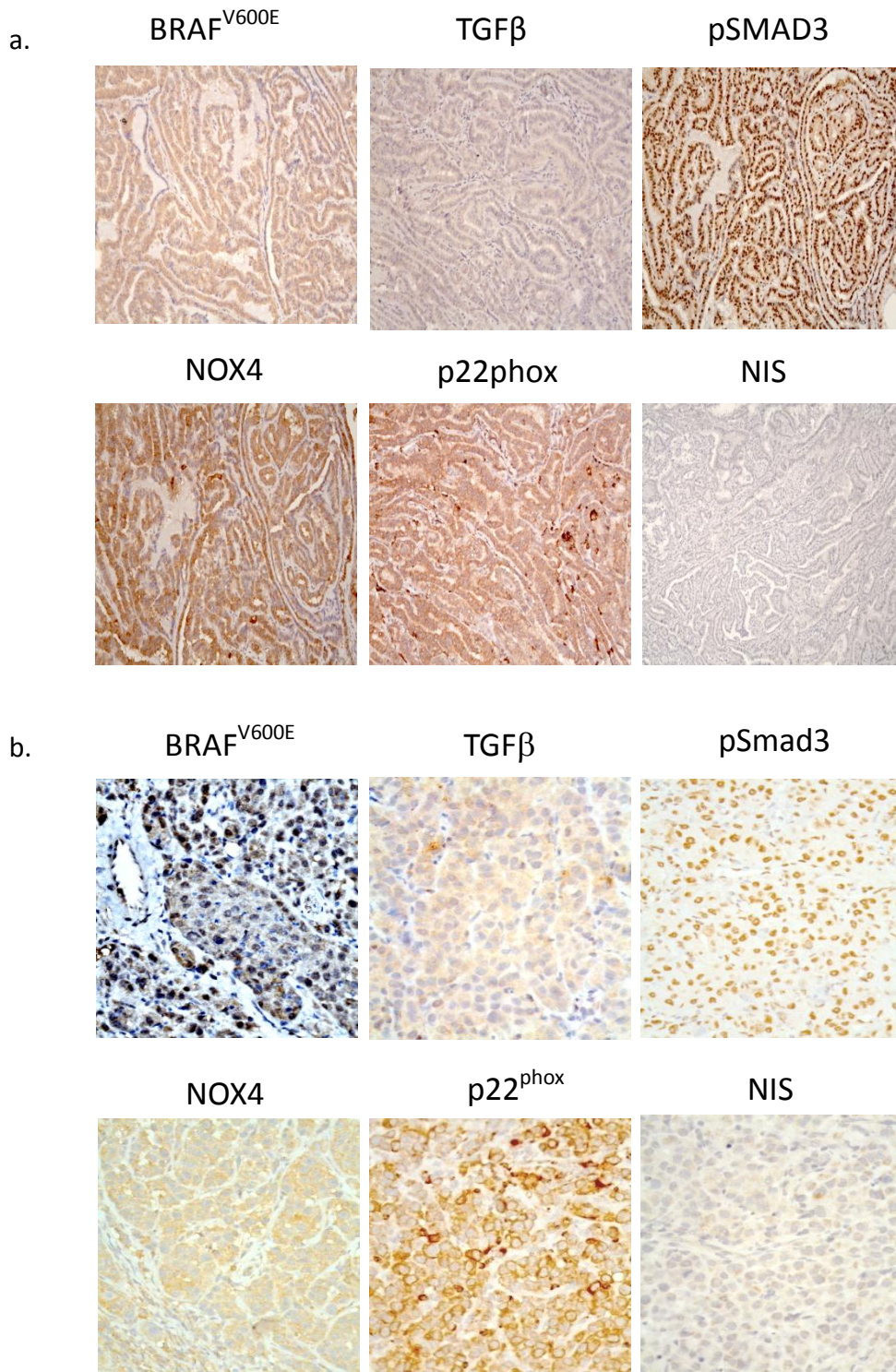
Some previous studies have described the existence of a crosstalk between mitochondria and NADPH oxidases (Dikalova *et al.*, 2012). The interplay between mitochondria and NADPH oxidases-derived superoxide constitutes a feed forward cycle in which the NADPH oxidases increase mitochondrial ROS, which further activate the cytoplasmic NADPH oxidases and increase cellular ROS production. Stimulation of mitochondrial ROS by NADPH oxidases enzymatic activity depends on activation of redox-sensitive mitoK<sub>ATP</sub> channels (Doughan *et al.*, 2008; Kimura *et al.*, 2005). The activation of mitoK<sub>ATP</sub> channels stimulates superoxide production on mitochondrial complex I (Andrukhiv *et al.*, 2006). The opening of mitoK<sub>ATP</sub> channels depolarizes the mitochondrial membrane potential and increases cellular superoxide. It is conceivable that mitoK<sub>ATP</sub> channels are both downstream and upstream of mitochondrial ROS, providing feed forward regulation. The reduction of mitochondrial superoxide measured by treatment with the mitochondria-targeted SOD mimetic mitoTEMPO, can block the increase in NADPH oxidase activities without affecting basal NADPH oxidase activities (Dikalova *et al.*, 2012). The effects of mitochondrial ROS on NADPH oxidase activity would be mediated by c-src (Griendling *et al.*, 2000). The interplay between mitochondrial ROS and NADPH oxidases may be rather specific and does not necessarily represent a general feed-forward mechanism. Both mitochondria and NADPH oxidases are physically associated with the endoplasmic reticulum, and their redox signals can be very site-specific without exposing the whole cell to elevated ROS. This cross talk can be mediated by endoplasmic reticulum stress. In our context, it is possible that

ROS produced by the mitochondrial NADPH oxidase NOX4 can potentially affect the mitochondrial redox homeostasis and influence the mitochondrial superoxide production. We also observed that the mitochondria are located around the nucleus (Figure 3C). As such, they constitute a large source of ROS that can modulate also the nuclear redox homeostasis, which influences the regulation of gene expression.

#### *NOX4 as a potential therapeutic target?*

In mice, data have shown that thyroid tumors carrying *BRAF*<sup>V600E</sup> mutations are exquisitely dependent on the oncoprotein for viability and that genetic or pharmacological inhibition of its expression or activity is associated with tumor regression and restoration of RAI uptake (*Chakravarty D et al., 2011*). MAPK pathway inhibitors have shown to not only have a beneficial effect on iodine transport but also on its organification in thyroid cancer cell lines (*Dingxie Liu et al., 2007*). However, a recent clinical study, using the MAPK kinase inhibitor Selumetinib to reverse refractoriness to radio-iodine in patients with metastatic thyroid cancer, gave mitigate results, in particular in patients having tumors with BRAF mutation. This resistance could occur through activation of an alternative-signalling pathway as that of TGF- $\beta$ , which functions in an autocrine manner. Given the multiple and varied roles of TGF- $\beta$  in human, it would be better to target a downstream effector. NOX4 might be a good candidate. A NOX4 inhibitor, developed by GenKyoTex, is now entering Phase II clinical trials in patients with diabetic nephropathy. We plan to use this new molecule alone or combined with MAPK inhibitors in several human BRAF-mutated cell lines in order to confirm that inhibition of NOX4 promotes NIS re-expression and iodide uptake.

Figure 16: Immunohistochemical analysis of BRAF<sup>V600E</sup>, TGF- $\beta$ , pSmad3, NOX4, p22phox and NIS proteins in : a. BCPAP xenografts from mice, after 3 weeks of tumor growth; b. papillary thyroid cancer tissues from the Institut Gustave Roussy tissue bank.



# Conclusion

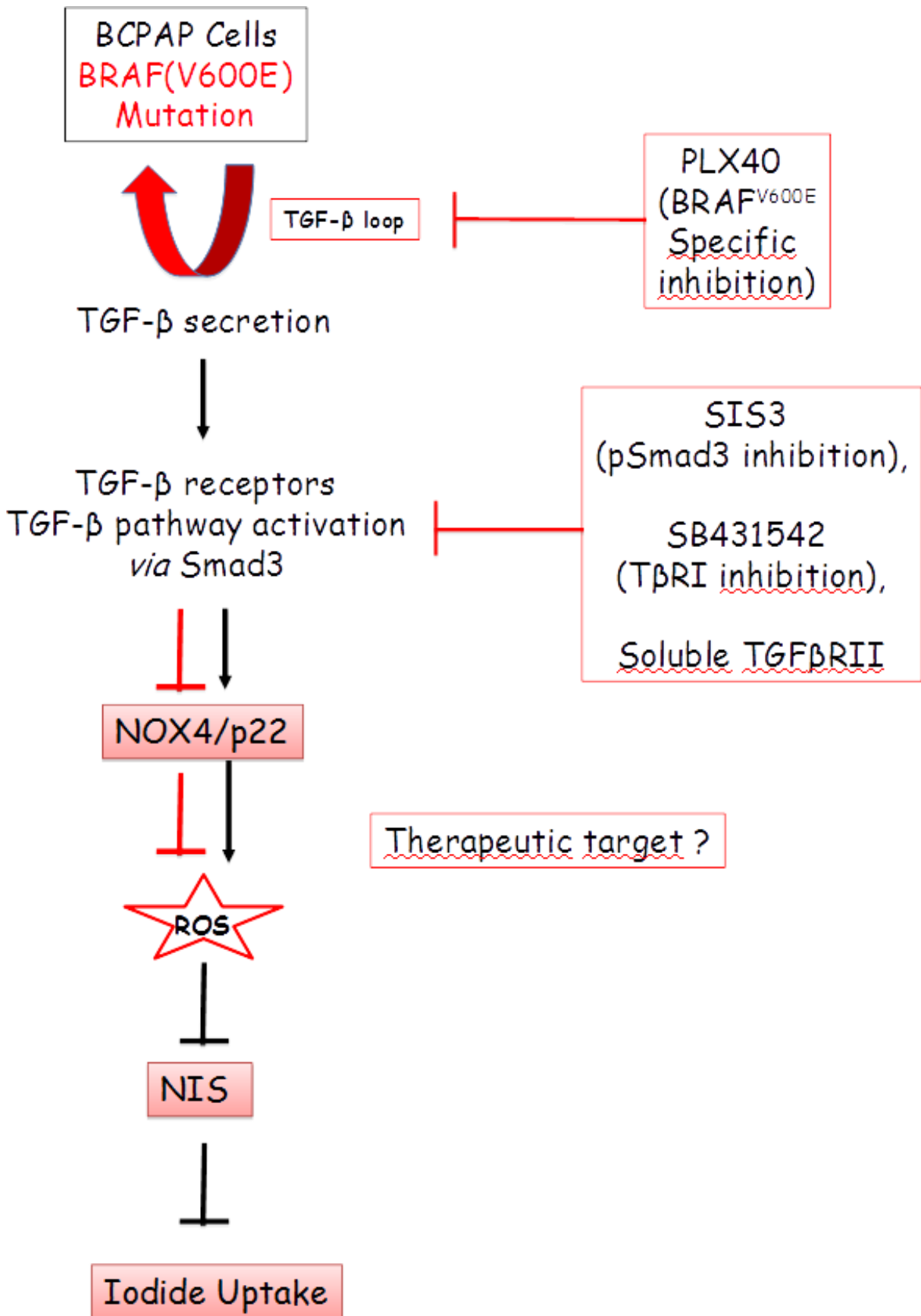
We confirmed *in vitro*, in BCPAP cell line PTC model, the over-expression of NADPH oxidase NOX4 observed in *BRAF*<sup>V600E</sup> thyroid tumors. BCPAP cells also strongly express the p22<sup>phox</sup> subunit in the same pattern of expression as NOX4, leading to a constitutive NADPH oxidase activity, and the subsequent high intracellular ROS levels observed in BCPAP cells.

As observed in PCCl3 cells or mouse PTC model, TGF- $\beta$  secretion is permanently induced by the *BRAF*<sup>V600E</sup> oncogenic protein, leading to a TGF- $\beta$  autocrine loop and the constitutive TGF- $\beta$  signalling pathway activation. Both NOX4 and p22<sup>phox</sup> protein expressions are positively regulated by TGF- $\beta$  *via* Smad3, at the transcriptional level. Inhibition of TGF- $\beta$  pathway leads to inhibition of NOX4 and p22<sup>phox</sup> and significantly decreases ROS intracellular levels. The specific inhibition of *BRAF*<sup>V600E</sup> oncogenic protein lead to the inhibition of TGF- $\beta$  secretion followed by a decrease of Smad3 phosphorylation, and inhibition of NOX4 and p22<sup>phox</sup> protein expressions. These results demonstrate NOX4 as a new ROS producing system controlled by *BRAF*<sup>V600E</sup> oncogene.

In PTC tissues, NOX4 overexpression is correlated with a low NIS protein expression which expression is known to be redox-sensitive. In BCPAP cells, the knock-down of NOX4 by specific small-inhibitory RNA leads to increasing NIS mRNA and protein expression. These effects are directly mediated by intracellular oxydative stress. Indeed, the same effects on NIS mRNA and protein expressions are obtained with antioxydant (NAC) or cytosolic superoxide scavenger (Tiron), and lead to an increase of iodide uptake in BCPAP cells.

We also performed an immunohistochemical analysis of PTC tissues and mice BCPAP xenografts. We observed that the pattern of expression of TGF-B, pSmad3, NOX4, p22phox and NIS proteins in BCPAP cells xenografts (Figure 12b) is reproduced in PTC tissues (Figure 12a). These results confirm the correlation between NOX4 over-expression and NIS low expression observed by RT-qPCR in PTC tissues, and confirms BCPAP cell line as a good model for the study of papillary thyroid cancer.

Finally, this study demonstrates NOX4 as a new key element of the *BRAF*<sup>V600E</sup>/TGF-B/Smads oncogenic signalling in papillary thyroid cancer, and constitutes a new therapeutic target to increase radioiodine-therapy efficacy. It is now necessary to identify the redox-sensitive molecular mechanisms which lead to NIS transcriptional repression of expression.



## Références

- Abdel-Rahman, O. and M. Fouad (2014). "Risk of thyroid dysfunction in patients with solid tumors treated with VEGF receptor tyrosine kinase inhibitors: a critical literature review and meta analysis." Expert Rev Anticancer Ther **14**(9): 1063-1073.
- Abo, A., E. Pick, et al. (1991). "Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1." Nature **353**(6345): 668-670.
- Abu, E. O., S. Bord, et al. (1997). "The expression of thyroid hormone receptors in human bone." Bone **21**(2): 137-142.
- Acloque, H., M. S. Adams, et al. (2009). "Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease." J Clin Invest **119**(6): 1438-1449.
- Ago, T., T. Kitazono, et al. (2004). "Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase." Circulation **109**(2): 227-233.
- Albright, C. D., R. I. Salganik, et al. (2003). "Mitochondrial and microsomal derived reactive oxygen species mediate apoptosis induced by transforming growth factor-beta1 in immortalized rat hepatocytes." J Cell Biochem **89**(2): 254-261.
- Allen, M. D., S. Neumann, et al. (2011). "Occupancy of both sites on the thyrotropin (TSH) receptor dimer is necessary for phosphoinositide signaling." FASEB J **25**(10): 3687-3694.
- Allgeier, A., K. L. Laugwitz, et al. (1997). "Multiple G-protein coupling of the dog thyrotropin receptor." Mol Cell Endocrinol **127**(1): 81-90.
- Ambasta, R. K., P. Kumar, et al. (2004). "Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase." J Biol Chem **279**(44): 45935-45941.
- Ambasta, R. K., P. Kumar, et al. (2004). "Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase." J Biol Chem **279**(44): 45935-45941.
- Ameziane-El-Hassani, R., S. Morand, et al. (2005). "Dual oxidase-2 has an intrinsic Ca<sup>2+</sup>-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating activity." J Biol Chem **280**(34): 30046-30054.
- Andrukhiv, A., A. D. Costa, et al. (2006). "Opening mitoKATP increases superoxide generation from complex I of the electron transport chain." Am J Physiol Heart Circ Physiol **291**(5): H2067-2074.
- Anilkumar, N., G. San Jose, et al. (2013). "A 28-kDa splice variant of NADPH oxidase-4 is nuclear-localized and involved in redox signaling in vascular cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **33**(4): e104-112.
- Arthur, J. R. (1991). "The role of selenium in thyroid hormone metabolism." Can J Physiol Pharmacol **69**(11): 1648-1652.
- Arthur, J. R., F. Nicol, et al. (1992). "The role of selenium in thyroid hormone metabolism and effects of selenium deficiency on thyroid hormone and iodine metabolism." Biol Trace Elem Res **33**: 37-42.
- Arthur, J. R., F. Nicol, et al. (1993). "Selenium deficiency, thyroid hormone metabolism, and thyroid hormone deiodinases." Am J Clin Nutr **57**(2 Suppl): 236S-239S.
- Arturi, F., D. Russo, et al. (1998). "Iodide symporter gene expression in human thyroid tumors." J Clin Endocrinol Metab **83**(7): 2493-2496.



- Back, C. M., S. Stohr, et al. (2013). "TSH induces metallothionein 1 in thyrocytes *via* Gq/11- and PKC-dependent signaling." J Mol Endocrinol **51**(1): 79-90.
- Baehner, R. L. and D. G. Nathan (1967). "Leukocyte oxidase: defective activity in chronic granulomatous disease." Science **155**(3764): 835-836.
- Baldan, F., E. Lavarone, et al. (2014). "Histone post-translational modifications induced by histone deacetylase inhibition in transcriptional control units of NIS gene." Mol Biol Rep **41**(8): 5257-5265.
- Baldan, F., E. Lavarone, et al. (2014). "Histone post-translational modifications induced by histone deacetylase inhibition in transcriptional control units of NIS gene." Mol Biol Rep **41**(8): 5257-5265.
- Banfi, B., A. Maturana, et al. (2000). "A mammalian H<sup>+</sup> channel generated through alternative splicing of the NADPH oxidase homolog NOH-1." Science **287**(5450): 138-142.
- Banfi, B., G. Molnar, et al. (2001). "A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes." J Biol Chem **276**(40): 37594-37601.
- Banfi, B., R. A. Clark, et al. (2003). "Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1." J Biol Chem **278**(6): 3510-3513.
- Barcellos-Hoff, M. H. and T. A. Dix (1996). "Redox-mediated activation of latent transforming growth factor-beta 1." Mol Endocrinol **10**(9): 1077-1083.
- Barford, D. (2004). "The role of cysteine residues as redox-sensitive regulatory switches." Curr Opin Struct Biol **14**(6): 679-686.
- Bartkova, J., N. Rezaei, et al. (2006). "Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints." Nature **444**(7119): 633-637.
- Bartkova, J., Z. Horejsi, et al. (2005). "DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis." Nature **434**(7035): 864-870.
- Bayraktutan, U., L. Blayney, et al. (2000). "Molecular characterization and localization of the NAD(P)H oxidase components gp91-phox and p22-phox in endothelial cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(8): 1903-1911.
- Beckman, K. B. and B. N. Ames (1998). "The free radical theory of aging matures." Physiol Rev **78**(2): 547-581.
- Bedard, K. and K. H. Krause (2007). "The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology." Physiol Rev **87**(1): 245-313.
- BelAiba, R. S., T. Djordjevic, et al. (2004). "Redox-sensitive regulation of the HIF pathway under non-hypoxic conditions in pulmonary artery smooth muscle cells." Biol Chem **385**(3-4): 249-257.
- Bell, A., A. Gagnon, et al. (2002). "TSH signaling and cell survival in 3T3-L1 preadipocytes." Am J Physiol Cell Physiol **283**(4): C1056-1064.
- Ben Abdelkhalek, M., A. Mamoune, et al. (1999). "TSH control of PKA catalytic subunit activity in thyroid cell cultures." Biochem Biophys Res Commun **266**(1): 15-18.

- Berlingieri, M. T., G. Portella, et al. (1988). "Cooperation between the polyomavirus middle-T-antigen gene and the human c-myc oncogene in a rat thyroid epithelial differentiated cell line: model of in vitro progression." Mol Cell Biol **8**(5): 2261-2266.
- Bhandarkar, S. S., M. Jaconi, et al. (2009). "Fulvene-5 potently inhibits NADPH oxidase 4 and blocks the growth of endothelial tumors in mice." J Clin Invest **119**(8): 2359-2365.
- Bidey, S. P., J. Anderson, et al. (1976). "Post-secretory deiodination of iodothyronines released from normal human thyroid cells in vitro." Biochem Biophys Res Commun **72**(1): 67-73.
- Biebermann, H., T. Schoneberg, et al. (1998). "A conserved tyrosine residue (Y601) in transmembrane domain 5 of the human thyrotropin receptor serves as a molecular switch to determine G-protein coupling." FASEB J **12**(14): 1461-1471.
- Bjorkman, U. and R. Ekholm (1984). "Generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in isolated porcine thyroid follicles." Endocrinology **115**(1): 392-398.
- Block, K., Y. Gorin, et al. (2009). "Subcellular localization of Nox4 and regulation in diabetes." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(34): 14385-14390.
- Bonello, S., C. Zahringer, et al. (2007). "Reactive oxygen species activate the HIF-1 $\alpha$  promoter *via* a functional NF $\kappa$ B site." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(4): 755-761.
- Boudreau, H. E., B. W. Casterline, et al. (2012). "Nox4 involvement in TGF- $\beta$  and SMAD3-driven induction of the epithelial-to-mesenchymal transition and migration of breast epithelial cells." Free Radic Biol Med **53**(7): 1489-1499.
- Boye, N. and P. Laurberg (1984). "Deiodination of T<sub>4</sub> to T<sub>3</sub> and rT<sub>3</sub> by microsomes from normal human thyroid tissue." Mol Cell Endocrinol **37**(3): 295-299.
- Breit, A., M. Lagace, et al. (2004). "Hetero-oligomerization between  $\beta$ 2- and  $\beta$ 3-adrenergic receptors generates a  $\beta$ -adrenergic signaling unit with distinct functional properties." J Biol Chem **279**(27): 28756-28765.
- Brenner-Gati, L., J. M. Trowbridge, et al. (1990). "Thyrotropin-induced elevation of 1,2-diacylglycerol and stimulation of growth of FRTL-5 cells are not dependent on inositol lipid hydrolysis." Endocrinology **126**(3): 1623-1629.
- Browning, E., H. Wang, et al. (2014). "Mechanotransduction drives post ischemic revascularization through K(ATP) channel closure and production of reactive oxygen species." Antioxid Redox Signal **20**(6): 872-886.
- Burritt, J. B., S. C. Busse, et al. (1998). "Antibody imprint of a membrane protein surface. Phagocyte flavocytochrome b." J Biol Chem **273**(38): 24847-24852.
- Cai, T., G. Fassina, et al. (1999). "N-acetylcysteine inhibits endothelial cell invasion and angiogenesis." Lab Invest **79**(9): 1151-1159.
- Caillou, B. (1998). "[Follicular carcinoma]." Arch Anat Cytol Pathol **46**(1-2): 39-44.
- Camilot, M., F. Teofoli, et al. (2005). "Thyrotropin receptor gene mutations and TSH resistance: variable expressivity in the heterozygotes." Clin Endocrinol (Oxf) **63**(2): 146-151.
- Cangul, H., N. V. Morgan, et al. (2010). "Novel TSHR mutations in consanguineous families with congenital nongoitrous hypothyroidism." Clin Endocrinol (Oxf) **73**(5): 671-677.

- Carneiro, C., C. V. Alvarez, et al. (1998). "TGF-beta1 actions on FRTL-5 cells provide a model for the physiological regulation of thyroid growth." Oncogene **16**(11): 1455-1465.
- Carrasco, N. (1993). "Iodide transport in the thyroid gland." Biochim Biophys Acta **1154**(1): 65-82.
- Castro, M. R., E. R. Bergert, et al. (1999). "Development of monoclonal antibodies against the human sodium iodide symporter: immunohistochemical characterization of this protein in thyroid cells." J Clin Endocrinol Metab **84**(8): 2957-2962.
- Cave, A. C., A. C. Brewer, et al. (2006). "NADPH oxidases in cardiovascular health and disease." Antioxid Redox Signal **8**(5-6): 691-728.
- Chakravarty, D., E. Santos, et al. (2011). "Small-molecule MAPK inhibitors restore radioiodine incorporation in mouse thyroid cancers with conditional BRAF activation." J Clin Invest **121**(12): 4700-4711.
- Chaubey, S., G. E. Jones, et al. (2013). "Nox2 is required for macrophage chemotaxis towards CSF-1." PLoS One **8**(2): e54869.
- Chazenbalk, G. D., Y. Nagayama, et al. (1990). "Functional analysis of the cytoplasmic domains of the human thyrotropin receptor by site-directed mutagenesis." J Biol Chem **265**(34): 20970-20975.
- Chazenbalk, G. D., Y. Nagayama, et al. (1990). "Functional analysis of the cytoplasmic domains of the human thyrotropin receptor by site-directed mutagenesis." J Biol Chem **265**(34): 20970-20975.
- Chen, K., M. T. Kirber, et al. (2008). "Regulation of ROS signal transduction by NADPH oxidase 4 localization." J Cell Biol **181**(7): 1129-1139.
- 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.
- Chiraseveenuprapund, P. and I. N. Rosenberg (1981). "Effects of hydrogen peroxide-generating systems on the Wolff-Chaikoff effect." Endocrinology **109**(6): 2095-2102.
- Ciampi, R. and Y. E. Nikiforov (2005). "Alterations of the BRAF gene in thyroid tumors." Endocr Pathol **16**(3): 163-172.
- Cirafici, A. M., S. Pepe, et al. (1992). "TGF beta inhibits rat thyroid cell proliferation without alterations in the expression of TSH-induced cell cycle-related genes." Biochem Biophys Res Commun **187**(1): 225-233.
- Civitareale, D., M. P. Castelli, et al. (1993). "Thyroid transcription factor 1 activates the promoter of the thyrotropin receptor gene." Mol Endocrinol **7**(12): 1589-1595.
- Clempus, R. E., D. Sorescu, et al. (2007). "Nox4 is required for maintenance of the differentiated vascular smooth muscle cell phenotype." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(1): 42-48.
- Colletta, G., A. M. Cirafici, et al. (1989). "Dual effect of transforming growth factor beta on rat thyroid cells: inhibition of thyrotropin-induced proliferation and reduction of thyroid-specific differentiation markers." Cancer Res **49**(13): 3457-3462.

- Cook-Mills, J. M., M. E. Marchese, et al. (2011). "Vascular cell adhesion molecule-1 expression and signaling during disease: regulation by reactive oxygen species and antioxidants." Antioxid Redox Signal **15**(6): 1607-1638.
- Cooper, D. S., G. M. Doherty, et al. (2006). "Management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer." Thyroid **16**(2): 109-142.
- Cooper, D. S., G. M. Doherty, et al. (2009). "Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer." Thyroid **19**(11): 1167-1214.
- 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation." Biochem Biophys Res Commun **154**(3): 1287-1292.
- Costamagna, E., B. Garcia, et al. (2004). "The functional interaction between the paired domain transcription factor Pax8 and Smad3 is involved in transforming growth factor-beta repression of the sodium/iodide symporter gene." J Biol Chem **279**(5): 3439-3446.
- Dai, G., O. Levy, et al. (1996). "Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter." Nature **379**(6564): 458-460.
- Dallas, J. S., S. J. Cunningham, et al. (1996). "Thyrotropin (TSH) receptor antibodies (TSHrAb) can inhibit TSH-mediated cyclic adenosine 3',5'- monophosphate production in thyroid cells by either blocking TSH binding or affecting a step subsequent to TSH binding." Endocrinology **137**(8): 3329-3339.
- Damante, G. and R. Di Lauro (1994). "Thyroid-specific gene expression." Biochim Biophys Acta **1218**(3): 255-266.
- Damante, G., G. Tell, et al. (2001). "A unique combination of transcription factors controls differentiation of thyroid cells." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **66**: 307-356.
- de Caestecker, M. P., W. T. Parks, et al. (1998). "Smad2 transduces common signals from receptor serine-threonine and tyrosine kinases." Genes Dev **12**(11): 1587-1592.
- de Carvalho, D. D., A. Sadok, et al. (2008). "Nox1 downstream of 12-lipoxygenase controls cell proliferation but not cell spreading of colon cancer cells." Int J Cancer **122**(8): 1757-1764.
- 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 La Vieja, A., O. Dohan, et al. (2000). "Molecular analysis of the sodium/iodide symporter: impact on thyroid and extrathyroid pathophysiology." Physiol Rev **80**(3): 1083-1105.
- De Vita, G., M. Zannini, et al. (1998). "Expression of the RET/PTC1 oncogene impairs the activity of TTF-1 and Pax-8 thyroid transcription factors." Cell Growth Differ **9**(1): 97-103.
- Deery, W. J. and C. S. Rani (1991). "Protein kinase C activation mimics but does not mediate thyrotropin-induced desensitization of adenylyl cyclase in cultured dog thyroid cells." Endocrinology **128**(6): 2967-2975.
- DeLeo, F. R., J. B. Burritt, et al. (2000). "Processing and maturation of flavocytochrome b558 include incorporation of heme as a prerequisite for heterodimer assembly." J Biol Chem **275**(18): 13986-13993.

- DeLeo, F. R., W. M. Nauseef, et al. (1995). "A domain of p47phox that interacts with human neutrophil flavocytochrome b558." *J Biol Chem* **270**(44): 26246-26251.
- Delorme, N., C. Remond, et al. (2002). "TGFbeta1 effects on functional activity of porcine thyroid cells cultured in suspension." *J Endocrinol* **173**(2): 345-355.
- Denu, J. M. and J. E. Dixon (1998). "Protein tyrosine phosphatases: mechanisms of catalysis and regulation." *Curr Opin Chem Biol* **2**(5): 633-641.
- Derynck, R. and Y. E. Zhang (2003). "Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling." *Nature* **425**(6958): 577-584.
- Dhanasekaran, D. N. and E. P. Reddy (2008). "JNK signaling in apoptosis." *Oncogene* **27**(48): 6245-6251.
- Di Micco, R., M. Fumagalli, et al. (2006). "Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication." *Nature* **444**(7119): 638-642.
- Dienstmann, R. and J. Tabernero (2011). "BRAF as a target for cancer therapy." *Anticancer Agents Med Chem* **11**(3): 285-295.
- Dietrich, J. W., K. Brisseau, et al. (2008). "[Absorption, transport and bio-availability of iodothyronines]." *Dtsch Med Wochenschr* **133**(31-32): 1644-1648.
- Dikalov, S. (2011). "Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases." *Free Radic Biol Med* **51**(7): 1289-1301.
- Dikalova, A. E., A. T. Bikineyeva, et al. (2010). "Therapeutic targeting of mitochondrial superoxide in hypertension." *Circ Res* **107**(1): 106-116.
- Dinauer, M. C., S. H. Orkin, et al. (1987). "The glycoprotein encoded by the X-linked chronic granulomatous disease locus is a component of the neutrophil cytochrome b complex." *Nature* **327**(6124): 717-720.
- D'Inzeo, S., A. Nicolussi, et al. (2010). "Role of reduced expression of SMAD4 in papillary thyroid carcinoma." *J Mol Endocrinol* **45**(4): 229-244.
- Dohan, O., A. De la Vieja, et al. (2003). "The sodium/iodide Symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance." *Endocr Rev* **24**(1): 48-77.
- Doughan, A. K., D. G. Harrison, et al. (2008). "Molecular mechanisms of angiotensin II-mediated mitochondrial dysfunction: linking mitochondrial oxidative damage and vascular endothelial dysfunction." *Circ Res* **102**(4): 488-496.
- Dremier, S., F. Vandeput, et al. (2000). "Activation of the small G protein Rap1 in dog thyroid cells by both cAMP-dependent and -independent pathways." *Biochem Biophys Res Commun* **267**(1): 7-11.
- Dremier, S., M. Milenkovic, et al. (2007). "Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP)-dependent protein kinases, but not exchange proteins directly activated by cAMP (Epac), mediate thyrotropin/cAMP-dependent regulation of thyroid cells." *Endocrinology* **148**(10): 4612-4622.
- Dumont, J. E., F. Lamy, et al. (1992). "Physiological and pathological regulation of thyroid cell proliferation and differentiation by thyrotropin and other factors." *Physiol Rev* **72**(3): 667-697.

- Dupuy, C., A. Virion, et al. (1991). "Mechanism of hydrogen peroxide formation catalyzed by NADPH oxidase in thyroid plasma membrane." *J Biol Chem* **266**(6): 3739-3743.
- 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): 287-292.
- 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.
- Durante, C., E. Puxeddu, et al. (2007). "BRAF mutations in papillary thyroid carcinomas inhibit genes involved in iodine metabolism." *J Clin Endocrinol Metab* **92**(7): 2840-2843.
- Eberhardt, N. L., S. K. Grebe, et al. (2010). "The role of the PAX8/PPARgamma fusion oncogene in the pathogenesis of follicular thyroid cancer." *Mol Cell Endocrinol* **321**(1): 50-56.
- Eggo, M. C., L. K. Bachrach, et al. (1984). "The effects of growth factors and serum on DNA synthesis and differentiation in thyroid cells in culture." *Mol Cell Endocrinol* **38**(2-3): 141-150.
- Eggo, M. C., L. K. Bachrach, et al. (1991). "Thyrotropin inhibits while insulin, epidermal growth factor and tetradecanoyl phorbol acetate stimulate insulin-like growth factor binding protein secretion from sheep thyroid cells." *Growth Factors* **4**(3): 221-230.
- Elmarakby, A. A. and J. C. Sullivan (2012). "Relationship between oxidative stress and inflammatory cytokines in diabetic nephropathy." *Cardiovasc Ther* **30**(1): 49-59.
- Eloy, C., J. Santos, et al. (2012). "TGF-beta/Smad pathway and BRAF mutation play different roles in circumscribed and infiltrative papillary thyroid carcinoma." *Virchows Arch* **460**(6): 587-600.
- Eskandari, S., D. D. Loo, et al. (1997). "Thyroid Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter. Mechanism, stoichiometry, and specificity." *J Biol Chem* **272**(43): 27230-27238.
- Eszlinger, M., K. Krohn, et al. (2005). "Gene expression analysis reveals evidence for increased expression of cell cycle-associated genes and Gq-protein-protein kinase C signaling in cold thyroid nodules." *J Clin Endocrinol Metab* **90**(2): 1163-1170.
- Ewen, M. E., H. K. Sluss, et al. (1993). "TGF beta inhibition of Cdk4 synthesis is linked to cell cycle arrest." *Cell* **74**(6): 1009-1020.
- Fabbro, D., L. Pellizzari, et al. (1998). "Pax-8 protein levels regulate thyroglobulin gene expression." *J Mol Endocrinol* **21**(3): 347-354.
- Fabien, N., A. Fusco, et al. (1994). "Description of a human papillary thyroid carcinoma cell line. Morphologic study and expression of tumoral markers." *Cancer* **73**(8): 2206-2212.
- Fajas, L., M. B. Debril, et al. (2001). "PPAR gamma: an essential role in metabolic control." *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **11**(1): 64-69.
- Fallahi, P., S. M. Ferrari, et al. (2014). "Thyroid dysfunctions induced by tyrosine kinase inhibitors." *Expert Opin Drug Saf* **13**(6): 723-733.
- Farid, N. R. (1996). "Molecular pathogenesis of thyroid cancer: the significance of oncogenes, tumor suppressor genes, and genomic instability." *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **104** Suppl 4: 1-12.

- Feliciello, A., C. S. Rubin, et al. (1998). "Expression of a kinase anchor protein 121 is regulated by hormones in thyroid and testicular germ cells." *J Biol Chem* **273**(36): 23361-23366.
- Feng, X. H. and R. Derynck (2005). "Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads." *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 659-693.
- Field, J. B., P. A. Ealey, et al. (1987). "Thyroid-stimulating hormone stimulates increases in inositol phosphates as well as cyclic AMP in the FRTL-5 rat thyroid cell line." *Biochem J* **247**(3): 519-524.
- Francis-Lang, H., M. Zannini, et al. (1992). "Multiple mechanisms of interference between transformation and differentiation in thyroid cells." *Mol Cell Biol* **12**(12): 5793-5800.
- Franzen, A., E. Piek, et al. (1999). "Expression of transforming growth factor-beta1, activin A, and their receptors in thyroid follicle cells: negative regulation of thyrocyte growth and function." *Endocrinology* **140**(9): 4300-4310.
- Friesema, E. C., R. Docter, et al. (1999). "Identification of thyroid hormone transporters." *Biochem Biophys Res Commun* **254**(2): 497-501.
- Fujimoto, J. and L. Brenner-Gati (1992). "Protein kinase-C activation during thyrotropin-stimulated proliferation of rat FRTL-5 thyroid cells." *Endocrinology* **130**(3): 1587-1592.
- Funaba, M., C. M. Zimmerman, et al. (2002). "Modulation of Smad2-mediated signaling by extracellular signal-regulated kinase." *J Biol Chem* **277**(44): 41361-41368.
- Fusco, A., G. Viglietto, et al. (2005). "A new mechanism of BRAF activation in human thyroid papillary carcinomas." *J Clin Invest* **115**(1): 20-23.
- Fusco, A., M. T. Berlingieri, et al. (1987). "One- and two-step transformations of rat thyroid epithelial cells by retroviral oncogenes." *Mol Cell Biol* **7**(9): 3365-3370.
- Galrao, A. L., A. K. Sodre, et al. (2013). "Methylation levels of sodium-iodide symporter (NIS) promoter in benign and malignant thyroid tumors with reduced NIS expression." *Endocrine* **43**(1): 225-229.
- Galrao, A. L., R. Y. Camargo, et al. (2014). "Hypermethylation of a New Distal Sodium/Iodide Symporter (NIS) enhancer (NDE) is associated with reduced NIS expression in thyroid tumors." *J Clin Endocrinol Metab* **99**(6): E944-952.
- Garbe, C., S. Abusaif, et al. (2014). "Vemurafenib." *Recent Results Cancer Res* **201**: 215-225.
- Garbi, C., G. Colletta, et al. (1990). "Transforming growth factor-beta induces cytoskeleton and extracellular matrix modifications in FRTL-5 thyroid epithelial cells." *Eur J Cell Biol* **53**(2): 281-289.
- 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): 8010-8014.
- 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): 8010-8014.
- Geng, Y. and R. A. Weinberg (1993). "Transforming growth factor beta effects on expression of G1 cyclins and cyclin-dependent protein kinases." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(21): 10315-10319.

- Gerard, A. C., K. Humblet, et al. (2012). "Iodine-deficiency-induced long lasting angiogenic reaction in thyroid cancers occurs *via* a vascular endothelial growth factor-hypoxia inducible factor-1-dependent, but not a reactive oxygen species-dependent, pathway." Thyroid **22**(7): 699-708.
- Goettsch, C., A. Babelova, et al. (2013). "NADPH oxidase 4 limits bone mass by promoting osteoclastogenesis." J Clin Invest **123**(11): 4731-4738.
- Goodman, O. B., Jr., J. G. Krupnick, et al. (1996). "Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor." Nature **383**(6599): 447-450.
- Gorin, Y. and K. Block (2013). "Nox as a target for diabetic complications." Clin Sci (Lond) **125**(8): 361-382.
- Gorin, Y., J. M. Ricono, et al. (2003). "Nox4 mediates angiotensin II-induced activation of Akt/protein kinase B in mesangial cells." Am J Physiol Renal Physiol **285**(2): F219-229.
- Gorlach, A., I. Diebold, et al. (2001). "Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells: Role of the p22(phox)-containing NADPH oxidase." Circ Res **89**(1): 47-54.
- Gorlach, A., U. Berchner-Pfannschmidt, et al. (2003). "Reactive oxygen species modulate HIF-1 mediated PAI-1 expression: involvement of the GTPase Rac1." Thromb Haemost **89**(5): 926-935.
- Goumans, M. J., Z. Liu, et al. (2009). "TGF-beta signaling in vascular biology and dysfunction." Cell Res **19**(1): 116-127.
- Goyal, P., N. Weissmann, et al. (2005). "Identification of novel Nox4 splice variants with impact on ROS levels in A549 cells." Biochem Biophys Res Commun **329**(1): 32-39.
- Graham, K. A., M. Kulawiec, et al. (2010). "NADPH oxidase 4 is an oncoprotein localized to mitochondria." Cancer Biol Ther **10**(3): 223-231.
- 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.
- Greil, W., G. Niedernhuber, et al. (1987). "Inhibition of cAMP formation by EGF in thyroid follicles is mediated by intracellular Ca<sup>++</sup>." Acta Endocrinol Suppl (Copenh) **281**: 267-269.
- Griendling, K. K., D. Sorescu, et al. (2000). "Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(10): 2175-2183.
- Gruters, A., T. Schoneberg, et al. (1998). "Severe congenital hyperthyroidism caused by a germ-line neo mutation in the extracellular portion of the thyrotropin receptor." J Clin Endocrinol Metab **83**(5): 1431-1436.
- Guarino, M. (2007). "Epithelial-mesenchymal transition and tumour invasion." Int J Biochem Cell Biol **39**(12): 2153-2160.
- Hanna, I. R., L. L. Hilenski, et al. (2004). "Functional association of nox1 with p22phox in vascular smooth muscle cells." Free Radic Biol Med **37**(10): 1542-1549.
- Harman, D. (1956). "Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry." J Gerontol **11**(3): 298-300.



- Hasskarl, J. (2014). "Sorafenib: targeting multiple tyrosine kinases in cancer." Recent Results Cancer Res **201**: 145-164.
- Hilenski, L. L., R. E. Clempus, et al. (2004). "Distinct subcellular localizations of Nox1 and Nox4 in vascular smooth muscle cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(4): 677-683.
- Hiraga, R., M. Kato, et al. (2013). "Nox4-derived ROS signaling contributes to TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells." Anticancer Res **33**(10): 4431-4438.
- Hochbaum, D., K. Hong, et al. (2008). "Epac, in synergy with cAMP-dependent protein kinase (PKA), is required for cAMP-mediated mitogenesis." J Biol Chem **283**(8): 4464-4468.
- Holmes, B., A. R. Page, et al. (1967). "Studies of the metabolic activity of leukocytes from patients with a genetic abnormality of phagocytic function." J Clin Invest **46**(9): 1422-1432.
- Huber, G. K., E. S. Concepcion, et al. (1991). "Positive regulation of human thyrotropin receptor mRNA by thyrotropin." J Clin Endocrinol Metab **72**(6): 1394-1396.
- Huillard, O., B. Blanchet, et al. (2014). "Sorafenib in thyroid cancer patients: learning from toxicity." Oncologist **19**(8): e3.
- Hunter, T. (2000). "Signaling--2000 and beyond." Cell **100**(1): 113-127.
- Hussein Ael, A., A. M. Abbas, et al. (2012). "Effect of chronic excess iodine intake on thyroid function and oxidative stress in hypothyroid rats." Can J Physiol Pharmacol **90**(5): 617-625.
- Iacovelli, L., R. Franchetti, et al. (1996). "GRK2 and beta-arrestin 1 as negative regulators of thyrotropin receptor-stimulated response." Mol Endocrinol **10**(9): 1138-1146.
- Ichijo, H., E. Nishida, et al. (1997). "Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways." Science **275**(5296): 90-94.
- Ignatz, R. A. and J. Massague (1986). "Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix." J Biol Chem **261**(9): 4337-4345.
- Ignatz, R. A. and J. Massague (1987). "Cell adhesion protein receptors as targets for transforming growth factor-beta action." Cell **51**(2): 189-197.
- Imajoh-Ohmi, S., K. Tokita, et al. (1992). "Topology of cytochrome b558 in neutrophil membrane analyzed by anti-peptide antibodies and proteolysis." J Biol Chem **267**(1): 180-184.
- Ingbar, S. H. (1972). "Autoregulation of the thyroid. Response to iodide excess and depletion." Mayo Clin Proc **47**(11): 814-823.
- Inoguchi, T., T. Sonta, et al. (2003). "Protein kinase C-dependent increase in reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues of diabetes: role of vascular NAD(P)H oxidase." J Am Soc Nephrol **14**(8 Suppl 3): S227-232.
- Ishizaka, Y., S. Kobayashi, et al. (1991). "Detection of retTPC/PTC transcripts in thyroid adenomas and adenomatous goiter by an RT-PCR method." Oncogene **6**(9): 1667-1672.
- Javitch, J. A. (2004). "The ants go marching two by two: oligomeric structure of G-protein-coupled receptors." Mol Pharmacol **66**(5): 1077-1082.

- Jesaitis, A. J., E. S. Buescher, et al. (1990). "Ultrastructural localization of cytochrome b in the membranes of resting and phagocytosing human granulocytes." *J Clin Invest* **85**(3): 821-835.
- Kamaraju, A. K. and A. B. Roberts (2005). "Role of Rho/ROCK and p38 MAP kinase pathways in transforming growth factor-beta-mediated Smad-dependent growth inhibition of human breast carcinoma cells in vivo." *J Biol Chem* **280**(2): 1024-1036.
- Kamata, H., S. Honda, et al. (2005). "Reactive oxygen species promote TNFalpha-induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases." *Cell* **120**(5): 649-661.
- Kawaguchi, A., M. Ikeda, et al. (1997). "Transforming growth factor-beta1 suppresses thyrotropin-induced Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter messenger RNA and protein levels in FRTL-5 rat thyroid cells." *Thyroid* **7**(5): 789-794.
- Kawahara, T., D. Ritsick, et al. (2005). "Point mutations in the proline-rich region of p22phox are dominant inhibitors of Nox1- and Nox2-dependent reactive oxygen generation." *J Biol Chem* **280**(36): 31859-31869.
- Kawasaki, H., G. M. Springett, et al. (1998). "A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1." *Science* **282**(5397): 2275-2279.
- Kikuchi, H., M. Hikage, et al. (2000). "NADPH oxidase subunit, gp91(phox) homologue, preferentially expressed in human colon epithelial cells." *Gene* **254**(1-2): 237-243.
- Kim, K. B., M. E. Cabanillas, et al. (2013). "Clinical responses to vemurafenib in patients with metastatic papillary thyroid cancer harboring BRAF(V600E) mutation." *Thyroid* **23**(10): 1277-1283.
- Kimura, E. T., M. N. Nikiforova, et al. (2003). "High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma." *Cancer Res* **63**(7): 1454-1457.
- Kimura, S., G. X. Zhang, et al. (2005). "Mitochondria-derived reactive oxygen species and vascular MAP kinases: comparison of angiotensin II and diazoxide." *Hypertension* **45**(3): 438-444.
- Kleinau, G., A. K. Haas, et al. (2010). "Signaling-sensitive amino acids surround the allosteric ligand binding site of the thyrotropin receptor." *FASEB J* **24**(7): 2347-2354.
- Knauf, J. A., M. A. Sartor, et al. (2011). "Progression of BRAF-induced thyroid cancer is associated with epithelial-mesenchymal transition requiring concomitant MAP kinase and TGFbeta signaling." *Oncogene* **30**(28): 3153-3162.
- Knaus, U. G., P. G. Heyworth, et al. (1991). "Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTP-binding protein Rac 2." *Science* **254**(5037): 1512-1515.
- Koff, A., M. Ohtsuki, et al. (1993). "Negative regulation of G1 in mammalian cells: inhibition of cyclin E-dependent kinase by TGF-beta." *Science* **260**(5107): 536-539.
- Kogai, T., T. Endo, et al. (1997). "Regulation by thyroid-stimulating hormone of sodium/iodide symporter gene expression and protein levels in FRTL-5 cells." *Endocrinology* **138**(6): 2227-2232.
- Kollecker, I., R. von Wasielewski, et al. (2012). "Subcellular distribution of the sodium iodide symporter in benign and malignant thyroid tissues." *Thyroid* **22**(5): 529-535.

- Kondo, T., S. Ezzat, et al. (2006). "Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia." Nat Rev Cancer **6**(4): 292-306.
- Kosugi, S. and T. Mori (1994). "[Signal transduction of the thyrotropin receptor]." Nihon Rinsho **52**(4): 984-989.
- Kretzschmar, M., J. Doody, et al. (1999). "A mechanism of repression of TGFbeta/ Smad signaling by oncogenic Ras." Genes Dev **13**(7): 804-816.
- Kroll, T. G., P. Sarraf, et al. (2000). "PAX8-PPARgamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma [corrected]." Science **289**(5483): 1357-1360.
- Kuroda, J., K. Nakagawa, et al. (2005). "The superoxide-producing NAD(P)H oxidase Nox4 in the nucleus of human vascular endothelial cells." Genes Cells **10**(12): 1139-1151.
- Lakshminarayanan, V., M. Lewallen, et al. (2001). "Reactive oxygen intermediates induce monocyte chemotactic protein-1 in vascular endothelium after brief ischemia." Am J Pathol **159**(4): 1301-1311.
- Lamy, F., F. Wilkin, et al. (1993). "Phosphorylation of mitogen-activated protein kinases is involved in the epidermal growth factor and phorbol ester, but not in the thyrotropin/cAMP, thyroid mitogenic pathway." J Biol Chem **268**(12): 8398-8401.
- Lassegue, B. and K. K. Griendling (2010). "NADPH oxidases: functions and pathologies in the vasculature." Arterioscler Thromb Vasc Biol **30**(4): 653-661.
- Latif, R., P. Graves, et al. (2001). "Oligomerization of the human thyrotropin receptor: fluorescent protein-tagged hTSHR reveals post-translational complexes." J Biol Chem **276**(48): 45217-45224.
- Latif, R., P. Graves, et al. (2002). "Ligand-dependent inhibition of oligomerization at the human thyrotropin receptor." J Biol Chem **277**(47): 45059-45067.
- Laude, K., H. Cai, et al. (2005). "Hemodynamic and biochemical adaptations to vascular smooth muscle overexpression of p22phox in mice." Am J Physiol Heart Circ Physiol **288**(1): H7-12.
- Laurent, E., P. Roger, et al. (1987). "New data on thyroid regulation and their implications in thyroid physiopathology and specifically of autoimmune diseases." Horm Metab Res Suppl **17**: 51-56.
- Lazzaro, D., M. Price, et al. (1991). "The transcription factor TTF-1 is expressed at the onset of thyroid and lung morphogenesis and in restricted regions of the foetal brain." Development **113**(4): 1093-1104.
- Lazzereschi, D., A. Ranieri, et al. (1997). "Human malignant thyroid tumors displayed reduced levels of transforming growth factor beta receptor type II messenger RNA and protein." Cancer Res **57**(10): 2071-2076.
- Lazzereschi, D., F. Nardi, et al. (2005). "A complex pattern of mutations and abnormal splicing of Smad4 is present in thyroid tumours." Oncogene **24**(34): 5344-5354.
- Lee, A. C., B. E. Fenster, et al. (1999). "Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species." J Biol Chem **274**(12): 7936-7940.

- Lee, J. K., M. Edderkaoui, et al. (2007). "NADPH oxidase promotes pancreatic cancer cell survival *via* inhibiting JAK2 dephosphorylation by tyrosine phosphatases." Gastroenterology **133**(5): 1637-1648.
- Lee, K. and W. J. Esselman (2002). "Inhibition of PTPs by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> regulates the activation of distinct MAPK pathways." Free Radic Biol Med **33**(8): 1121-1132.
- Lee, S. R., K. S. Kwon, et al. (1998). "Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor." J Biol Chem **273**(25): 15366-15372.
- Leikam, C., A. Hufnagel, et al. (2008). "Oncogene activation in melanocytes links reactive oxygen to multinucleated phenotype and senescence." Oncogene **27**(56): 7070-7082.
- Lejeune, C., M. Taton, et al. (1996). "Regulation and metabolic role of phospholipase D activity in human thyroid and cultured dog thyrocytes." J Clin Endocrinol Metab **81**(10): 3526-3534.
- Lener, B., R. Koziel, et al. (2009). "The NADPH oxidase Nox4 restricts the replicative lifespan of human endothelial cells." Biochem J **423**(3): 363-374.
- Leto, T. L., A. G. Adams, et al. (1994). "Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: binding of Src homology 3 domains to proline-rich targets." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(22): 10650-10654.
- Leusen, J. H., M. de Boer, et al. (1994). "A point mutation in gp91-phox of cytochrome b558 of the human NADPH oxidase leading to defective translocation of the cytosolic proteins p47-phox and p67-phox." J Clin Invest **93**(5): 2120-2126.
- Levy, O., A. De la Vieja, et al. (1998). "N-linked glycosylation of the thyroid Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter (NIS). Implications for its secondary structure model." J Biol Chem **273**(35): 22657-22663.
- Levy, O., G. Dai, et al. (1997). "Characterization of the thyroid Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter with an anti-COOH terminus antibody." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(11): 5568-5573.
- Levy, O., G. Dai, et al. (1997). "Characterization of the thyroid Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter with an anti-COOH terminus antibody." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(11): 5568-5573.
- Li, W., G. M. Venkataraman, et al. (2007). "Protein synthesis inhibitors, in synergy with 5-azacytidine, restore sodium/iodide symporter gene expression in human thyroid adenoma cell line, KAK-1, suggesting trans-active transcriptional repressor." J Clin Endocrinol Metab **92**(3): 1080-1087.
- Lin, A. W. and S. W. Lowe (2001). "Oncogenic ras activates the ARF-p53 pathway to suppress epithelial cell transformation." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(9): 5025-5030.
- Lin, A. W., M. Barradas, et al. (1998). "Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling." Genes Dev **12**(19): 3008-3019.
- Lin, C. C., H. L. Hsieh, et al. (2012). "NADPH oxidase 2-derived reactive oxygen species signal contributes to bradykinin-induced matrix metalloproteinase-9 expression and cell migration in brain astrocytes." Cell Commun Signal **10**(1): 35.

- Lin, M. T., M. L. Yen, et al. (2003). "Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis by resveratrol through interruption of Src-dependent vascular endothelial cadherin tyrosine phosphorylation." Mol Pharmacol **64**(5): 1029-1036.
- Liu, D., Z. Liu, et al. (2007). "Inhibitory effects of the mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor CI-1040 on the proliferation and tumor growth of thyroid cancer cells with BRAF or RAS mutations." J Clin Endocrinol Metab **92**(12): 4686-4695.
- Liu, R. M., J. Choi, et al. (2010). "Oxidative modification of nuclear mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 is involved in transforming growth factor beta1-induced expression of plasminogen activator inhibitor 1 in fibroblasts." J Biol Chem **285**(21): 16239-16247.
- Logan, A., C. Smith, et al. (1994). "Enhanced expression of transforming growth factor-beta 1 during thyroid hyperplasia in rats." J Endocrinol **141**(1): 45-57.
- Luttrell, L. M., S. S. Ferguson, et al. (1999). "Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes." Science **283**(5402): 655-661.
- 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): 249-259.
- 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): 249-259.
- Maenhaut, C., G. Brabant, et al. (1992). "In vitro and in vivo regulation of thyrotropin receptor mRNA levels in dog and human thyroid cells." J Biol Chem **267**(5): 3000-3007.
- Mallette, F. A. and G. Ferbeyre (2007). "The DNA damage signaling pathway connects oncogenic stress to cellular senescence." Cell Cycle **6**(15): 1831-1836.
- Manickam, N., M. Patel, et al. (2014). "RhoA/Rho kinase mediates TGF-beta1-induced kidney myofibroblast activation through Poldip2/Nox4-derived reactive oxygen species." Am J Physiol Renal Physiol **307**(2): F159-171.
- Mansouri, A., K. Chowdhury, et al. (1998). "Follicular cells of the thyroid gland require Pax8 gene function." Nat Genet **19**(1): 87-90.
- Marino, M., L. Chiovato, et al. (2000). "Circulating thyroglobulin transcytosed by thyroid cells in complexed with secretory components of its endocytic receptor megalin." J Clin Endocrinol Metab **85**(9): 3458-3467.
- Martyn, K. D., L. M. Frederick, et al. (2006). "Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases." Cell Signal **18**(1): 69-82.
- Massague, J. (2008). "TGFbeta in Cancer." Cell **134**(2): 215-230.
- Matoba, H., S. Sugano, et al. (1998). "Expression of transforming growth factor-beta1 and transforming growth factor-beta Type-II receptor mRNA in papillary thyroid carcinoma." Horm Metab Res **30**(10): 624-628.
- Matowe, W. C., S. Gupta, et al. (1996). "Regulation of protein kinase C isoforms in FRTL-5 thyroid cells by TSH and phorbol ester." Thyroid **6**(1): 53-58.
- Matsuo, S. E., A. P. Fiore, et al. (2010). "Expression of SMAD proteins, TGF-beta/activin signaling mediators, in human thyroid tissues." Arq Bras Endocrinol Metabol **54**(4): 406-412.

- Matsuo, S. E., S. G. Leoni, et al. (2006). "Transforming growth factor-beta1 and activin A generate antiproliferative signaling in thyroid cancer cells." *J Endocrinol* **190**(1): 141-150.
- Maulik, N. (2006). "Reactive oxygen species drives myocardial angiogenesis?" *Antioxid Redox Signal* **8**(11-12): 2161-2168.
- Mazat, J. P., J. Fromentin, et al. (2010). "Virtual mitochondrion: towards an integrated model of oxidative phosphorylation complexes and beyond." *Biochem Soc Trans* **38**(5): 1215-1219.
- Mazdak, H. and H. Zia (2012). "Vitamin e reduces superficial bladder cancer recurrence: a randomized controlled trial." *Int J Prev Med* **3**(2): 110-115.
- McFarland, D. C. and K. J. Misiukiewicz (2014). "Sorafenib in radioactive iodine-refractory well-differentiated metastatic thyroid cancer." *Onco Targets Ther* **7**: 1291-1299.
- McLeod, D. S., A. M. Sawka, et al. (2013). "Controversies in primary treatment of low-risk papillary thyroid cancer." *Lancet* **381**(9871): 1046-1057.
- Medina, D. L., K. Suzuki, et al. (2000). "Role of insulin and serum on thyrotropin regulation of thyroid transcription factor-1 and pax-8 genes expression in FRTL-5 thyroid cells." *Thyroid* **10**(4): 295-303.
- Medri, G., I. Sergi, et al. (1994). "Dual activity of human pituitary thyrotrophin isoforms on thyroid cell growth." *J Mol Endocrinol* **13**(2): 187-198.
- Meng, T. C., T. Fukada, et al. (2002). "Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo." *Mol Cell* **9**(2): 387-399.
- Miccadei, S., R. De Leo, et al. (2002). "The synergistic activity of thyroid transcription factor 1 and Pax 8 relies on the promoter/enhancer interplay." *Mol Endocrinol* **16**(4): 837-846.
- Michalik, L. and W. Wahli (2006). "Involvement of PPAR nuclear receptors in tissue injury and wound repair." *J Clin Invest* **116**(3): 598-606.
- Milligan, G., M. Canals, et al. (2006). "The role of GPCR dimerisation/oligomerisation in receptor signalling." *Ernst Schering Found Symp Proc*(2): 145-161.
- Mincione, G., D. L. Esposito, et al. (2003). "TGF-beta 1 modulation of IGF-I signaling pathway in rat thyroid epithelial cells." *Exp Cell Res* **287**(2): 411-423.
- Mishra, P. K., G. V. Raghuram, et al. (2014). "Mitochondrial oxidative stress-induced epigenetic modifications in pancreatic epithelial cells." *Int J Toxicol* **33**(2): 116-129.
- Moldovan, L., N. I. Moldovan, et al. (2000). "Redox changes of cultured endothelial cells and actin dynamics." *Circ Res* **86**(5): 549-557.
- Monte, M., L. E. Davel, et al. (1997). "Hydrogen peroxide is involved in lymphocyte activation mechanisms to induce angiogenesis." *Eur J Cancer* **33**(4): 676-682.
- 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.
- Morris, J. C., 3rd, G. Ranganathan, et al. (1988). "The effects of transforming growth factor-beta on growth and differentiation of the continuous rat thyroid follicular cell line, FRTL-5." *Endocrinology* **123**(3): 1385-1394.

- Moustakas, A. and C. H. Heldin (2005). "Non-Smad TGF-beta signals." J Cell Sci **118**(Pt 16): 3573-3584.
- Moustakas, A. and C. H. Heldin (2009). "The regulation of TGFbeta signal transduction." Development **136**(22): 3699-3714.
- Nagayama, Y., K. Tanaka, et al. (1996). "Expression and regulation of G protein-coupled receptor kinase 5 and beta-arrestin-1 in rat thyroid FRTL5 cells." Thyroid **6**(6): 627-631.
- Nawshad, A., D. Lagamba, et al. (2005). "Transforming growth factor-beta signaling during epithelial-mesenchymal transformation: implications for embryogenesis and tumor metastasis." Cells Tissues Organs **179**(1-2): 11-23.
- Neumann, S., G. Krause, et al. (2005). "Structural determinants for g protein activation and selectivity in the second intracellular loop of the thyrotropin receptor." Endocrinology **146**(1): 477-485.
- Nicolussi, A., S. D'Inzeo, et al. (2003). "TGF-beta control of rat thyroid follicular cells differentiation." Mol Cell Endocrinol **207**(1-2): 1-11.
- Nikiforova, M. N., E. T. Kimura, et al. (2003). "BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas." J Clin Endocrinol Metab **88**(11): 5399-5404.
- Nunoi, H., D. Rotrosen, et al. (1988). "Two forms of autosomal chronic granulomatous disease lack distinct neutrophil cytosol factors." Science **242**(4883): 1298-1301.
- Ohno, M., M. Zannini, et al. (1999). "The paired-domain transcription factor Pax8 binds to the upstream enhancer of the rat sodium/iodide symporter gene and participates in both thyroid-specific and cyclic-AMP-dependent transcription." Mol Cell Biol **19**(3): 2051-2060.
- Oldham, W. M., N. Van Eps, et al. (2006). "Mechanism of the receptor-catalyzed activation of heterotrimeric G proteins." Nat Struct Mol Biol **13**(9): 772-777.
- Omri, B. and M. Pavlovic-Hournac (1985). "Protein kinase C activity in experimentally developed and regressed rat thyroid goitres." Mol Cell Endocrinol **40**(2-3): 175-180.
- Oppenheimer, J. H., L. E. Braverman, et al. (1995). "A therapeutic controversy. Thyroid hormone treatment: when and what?" J Clin Endocrinol Metab **80**(10): 2873-2883.
- Ortiz, L., M. Zannini, et al. (1997). "Transcriptional control of the forkhead thyroid transcription factor TTF-2 by thyrotropin, insulin, and insulin-like growth factor I." J Biol Chem **272**(37): 23334-23339.
- Pacini, F., M. Schlumberger, et al. (2008). "[European consensus on the management of patients with differentiated carcinoma of the thyroid from follicular epithelium]." Vestn Khir Im I I Grek **167**(1): 52-56.
- Padua, D. and J. Massague (2009). "Roles of TGFbeta in metastasis." Cell Res **19**(1): 89-102.
- Paire, A., F. Bernier-Valentin, et al. (1997). "Characterization of the rat thyroid iodide transporter using anti-peptide antibodies. Relationship between its expression and activity." J Biol Chem **272**(29): 18245-18249.

- Palsamy, P., K. R. Bidasee, et al. (2014). "Methylglyoxal induces endoplasmic reticulum stress and DNA demethylation in the Keap1 promoter of human lens epithelial cells and age-related cataracts." Free Radic Biol Med **72**: 134-148.
- Park, H. S., J. N. Chun, et al. (2006). "Role of NADPH oxidase 4 in lipopolysaccharide-induced proinflammatory responses by human aortic endothelial cells." Cardiovasc Res **72**(3): 447-455.
- Parkos, C. A., M. C. Dinauer, et al. (1988). "Primary structure and unique expression of the 22-kilodalton light chain of human neutrophil cytochrome b." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(10): 3319-3323.
- Pasca di Magliano, M., R. Di Lauro, et al. (2000). "Pax8 has a key role in thyroid cell differentiation." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(24): 13144-13149.
- Pekary, A. E., S. R. Levin, et al. (1997). "Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) inhibit the expression and activity of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in FRTL-5 rat thyroid cells." J Interferon Cytokine Res **17**(4): 185-195.
- Penumathsa, S. V., M. Thirunavukkarasu, et al. (2007). "Statin and resveratrol in combination induces cardioprotection against myocardial infarction in hypercholesterolemic rat." J Mol Cell Cardiol **42**(3): 508-516.
- Peplow, P. V. and M. P. Chatterjee (2013). "A review of the influence of growth factors and cytokines in in vitro human keratinocyte migration." Cytokine **62**(1): 1-21.
- Persani, L., D. Calebiro, et al. (2007). "Technology Insight: modern methods to monitor protein-protein interactions reveal functional TSH receptor oligomerization." Nat Clin Pract Endocrinol Metab **3**(2): 180-190.
- Pitoin, F. (2014). "Response to sorafenib treatment in advanced metastatic thyroid cancer." Arq Bras Endocrinol Metabol **58**(1): 37-41.
- Plachov, D., K. Chowdhury, et al. (1990). "Pax8, a murine paired box gene expressed in the developing excretory system and thyroid gland." Development **110**(2): 643-651.
- Plachov, D., K. Chowdhury, et al. (1990). "Pax8, a murine paired box gene expressed in the developing excretory system and thyroid gland." Development **110**(2): 643-651.
- Placzkowski, K. A., H. V. Reddi, et al. (2008). "The Role of the PAX8/PPARgamma Fusion Oncogene in Thyroid Cancer." PPAR Res **2008**: 672829.
- Pohl, V., C. Maenhaut, et al. (1992). "Differential regulation of thyrotropin receptor and thyroglobulin mRNA accumulation at the cellular level: an in situ hybridization study." Exp Cell Res **199**(2): 392-397.
- Pratilas, C. A., F. Xing, et al. (2012). "Targeting oncogenic BRAF in human cancer." Curr Top Microbiol Immunol **355**: 83-98.
- Provenzano, M. J., M. P. Fitzgerald, et al. (2007). "Increased iodine uptake in thyroid carcinoma after treatment with sodium butyrate and decitabine (5-Aza-dC)." Otolaryngol Head Neck Surg **137**(5): 722-728.
- Quie, P. G., J. G. White, et al. (1967). "In vitro bactericidal capacity of human polymorphonuclear leukocytes: diminished activity in chronic granulomatous disease of childhood." J Clin Invest **46**(4): 668-679.



- Rani, C. S., W. P. Schilling, et al. (1989). "Intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization by thyrotropin, carbachol, and adenosine triphosphate in dog thyroid cells." Endocrinology **125**(4): 1889-1897.
- Raspe, E., E. Laurent, et al. (1991). "ATP, bradykinin, TRH and TSH activate the Ca(2+)-phosphatidylinositol cascade of human thyrocytes in primary culture." Mol Cell Endocrinol **81**(1-3): 175-183.
- Riedel, C., O. Levy, et al. (2001). "Post-transcriptional regulation of the sodium/iodide symporter by thyrotropin." J Biol Chem **276**(24): 21458-21463.
- Riesco-Eizaguirre, G., I. Rodriguez, et al. (2009). "The BRAFV600E oncogene induces transforming growth factor beta secretion leading to sodium iodide symporter repression and increased malignancy in thyroid cancer." Cancer Res **69**(21): 8317-8325.
- Riesco-Eizaguirre, G., P. Gutierrez-Martinez, et al. (2006). "The oncogene BRAF V600E is associated with a high risk of recurrence and less differentiated papillary thyroid carcinoma due to the impairment of Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> targeting to the membrane." Endocr Relat Cancer **13**(1): 257-269.
- Rieusset, J., F. Andreelli, et al. (1999). "Insulin acutely regulates the expression of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in human adipocytes." Diabetes **48**(4): 699-705.
- Rios, C. D., B. A. Jordan, et al. (2001). "G-protein-coupled receptor dimerization: modulation of receptor function." Pharmacol Ther **92**(2-3): 71-87.
- Robinson, K. A., C. A. Stewart, et al. (1999). "Redox-sensitive protein phosphatase activity regulates the phosphorylation state of p38 protein kinase in primary astrocyte culture." J Neurosci Res **55**(6): 724-732.
- Roger, P. P., B. Van Heuverswyn, et al. (1985). "Antagonistic effects of thyrotropin and epidermal growth factor on thyroglobulin mRNA level in cultured thyroid cells." Eur J Biochem **152**(2): 239-245.
- Roger, P. P., M. F. Breton, et al. (1991). "Epidermal growth factor and phorbol ester actions on the TSH induced down regulation of the isoenzyme I (PKA I) of cyclic AMP-dependent protein kinases in dog thyroid cell primary cultures." Cell Signal **3**(2): 145-151.
- Roger, P. P., P. Servais, et al. (1987). "Induction of DNA synthesis in dog thyrocytes in primary culture: synergistic effects of thyrotropin and cyclic AMP with epidermal growth factor and insulin." J Cell Physiol **130**(1): 58-67.
- Rohlf, C., T. Clair, et al. (1993). "8-Cl-cAMP induces truncation and down-regulation of the RI alpha subunit and up-regulation of the RII beta subunit of cAMP-dependent protein kinase leading to type II holoenzyme-dependent growth inhibition and differentiation of HL-60 leukemia cells." J Biol Chem **268**(8): 5774-5782.
- Roos, D. (1994). "The genetic basis of chronic granulomatous disease." Immunol Rev **138**: 121-157.
- Roos, D., M. de Boer, et al. (1992). "Chronic granulomatous disease with partial deficiency of cytochrome b558 and incomplete respiratory burst: variants of the X-linked, cytochrome b558-negative form of the disease." J Leukoc Biol **51**(2): 164-171.

- Rosove, M. H., P. F. Peddi, et al. (2013). "BRAF V600E inhibition in anaplastic thyroid cancer." N Engl J Med **368**(7): 684-685.
- Rossi, D. L., A. Acebron, et al. (1995). "Function of the homeo and paired domain proteins TTF-1 and Pax-8 in thyroid cell proliferation." J Biol Chem **270**(39): 23139-23142.
- Royer-Pokora, B., L. M. Kunkel, et al. (1986). "Cloning the gene for an inherited human disorder--chronic granulomatous disease--on the basis of its chromosomal location." Nature **322**(6074): 32-38.
- Sadok, A., A. Pierres, et al. (2009). "NADPH oxidase 1 controls the persistence of directed cell migration by a Rho-dependent switch of alpha2/alpha3 integrins." Mol Cell Biol **29**(14): 3915-3928.
- Saiselet, M., S. Floor, et al. (2012). "Thyroid cancer cell lines: an overview." Front Endocrinol (Lausanne) **3**: 133.
- Saitoh, M., H. Nishitoh, et al. (1998). "Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1." EMBO J **17**(9): 2596-2606.
- Sala, E., L. Mologni, et al. (2008). "BRAF silencing by short hairpin RNA or chemical blockade by PLX4032 leads to different responses in melanoma and thyroid carcinoma cells." Mol Cancer Res **6**(5): 751-759.
- Salmeen, A. and D. Barford (2005). "Functions and mechanisms of redox regulation of cysteine-based phosphatases." Antioxid Redox Signal **7**(5-6): 560-577.
- Santisteban, P., A. Acebron, et al. (1992). "Insulin and insulin-like growth factor I regulate a thyroid-specific nuclear protein that binds to the thyroglobulin promoter." Mol Endocrinol **6**(8): 1310-1317.
- Santisteban, P., L. D. Kohn, et al. (1987). "Thyroglobulin gene expression is regulated by insulin and insulin-like growth factor I, as well as thyrotropin, in FRTL-5 thyroid cells." J Biol Chem **262**(9): 4048-4052.
- Santos, C. X., L. Y. Tanaka, et al. (2009). "Mechanisms and implications of reactive oxygen species generation during the unfolded protein response: roles of endoplasmic reticulum oxidoreductases, mitochondrial electron transport, and NADPH oxidase." Antioxid Redox Signal **11**(10): 2409-2427.
- Saunier, B., C. Tournier, et al. (1995). "Stimulation of mitogen-activated protein kinase by thyrotropin in primary cultured human thyroid follicles." J Biol Chem **270**(8): 3693-3697.
- Saunier, B., K. Dib, et al. (1990). "Cyclic AMP regulation of Gs protein. Thyrotropin and forskolin increase the quantity of stimulatory guanine nucleotide-binding proteins in cultured thyroid follicles." J Biol Chem **265**(32): 19942-19946.
- Schoonjans, K., G. Martin, et al. (1997). "Peroxisome proliferator-activated receptors, orphans with ligands and functions." Curr Opin Lipidol **8**(3): 159-166.
- Schroder, K., K. Wandzioch, et al. (2009). "Nox4 acts as a switch between differentiation and proliferation in preadipocytes." Arterioscler Thromb Vasc Biol **29**(2): 239-245.
- Schroder, K., M. Spille, et al. (2007). "Differential effects of CpG DNA on IFN-beta induction and STAT1 activation in murine macrophages versus dendritic cells: alternatively activated STAT1 negatively regulates TLR signaling in macrophages." J Immunol **179**(6): 3495-3503.

- Schroder, K., M. Zhang, et al. (2012). "Nox4 is a protective reactive oxygen species generating vascular NADPH oxidase." *Circ Res* **110**(9): 1217-1225.
- Schweppe, R. E., J. P. Klopper, et al. (2008). "Deoxyribonucleic acid profiling analysis of 40 human thyroid cancer cell lines reveals cross-contamination resulting in cell line redundancy and misidentification." *J Clin Endocrinol Metab* **93**(11): 4331-4341.
- Sebai, H., S. Hovsepian, et al. (2010). "Resveratrol increases iodide trapping in the rat thyroid cell line FRTL-5." *Thyroid* **20**(2): 195-203.
- Sebolt-Leopold, J. S. (2004). "MEK inhibitors: a therapeutic approach to targeting the Ras-MAP kinase pathway in tumors." *Curr Pharm Des* **10**(16): 1907-1914.
- Sedeek, M., R. L. Hebert, et al. (2009). "Molecular mechanisms of hypertension: role of Nox family NADPH oxidases." *Curr Opin Nephrol Hypertens* **18**(2): 122-127.
- Segal, A. W. (1987). "Absence of both cytochrome b-245 subunits from neutrophils in X-linked chronic granulomatous disease." *Nature* **326**(6108): 88-91.
- Seoane, J. (2006). "Escaping from the TGFbeta anti-proliferative control." *Carcinogenesis* **27**(11): 2148-2156.
- Serrano, M., A. W. Lin, et al. (1997). "Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a." *Cell* **88**(5): 593-602.
- Serrano-Nascimento, C., S. da Silva Teixeira, et al. (2014). "The acute inhibitory effect of iodide excess on sodium/iodide symporter expression and activity involves the PI3K/Akt signaling pathway." *Endocrinology* **155**(3): 1145-1156.
- Sharma, A., S. R. Shah, et al. (2012). "Vemurafenib: targeted inhibition of mutated BRAF for treatment of advanced melanoma and its potential in other malignancies." *Drugs* **72**(17): 2207-2222.
- Shen, W. T. and W. Y. Chung (2005). "Treatment of thyroid cancer with histone deacetylase inhibitors and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists." *Thyroid* **15**(6): 594-599.
- Shenoy, S. K. and R. J. Lefkowitz (2005). "Seven-transmembrane receptor signaling through beta-arrestin." *Sci STKE* **2005**(308): cm10.
- Shenoy, S. K. and R. J. Lefkowitz (2005). "Seven-transmembrane receptor signaling through beta-arrestin." *Sci STKE* **2005**(308): cm10.
- Shenoy, S. K. and R. J. Lefkowitz (2011). "beta-Arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction." *Trends Pharmacol Sci* **32**(9): 521-533.
- Shimura, H., F. Okajima, et al. (1994). "Thyroid-specific expression and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate autoregulation of the thyrotropin receptor gene involves thyroid transcription factor-1." *Mol Endocrinol* **8**(8): 1049-1069.
- Shiose, A., J. Kuroda, et al. (2001). "A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney." *J Biol Chem* **276**(2): 1417-1423.
- Shono, T., N. Yokoyama, et al. (2008). "Enhanced expression of NADPH oxidase Nox4 in human gliomas and its roles in cell proliferation and survival." *Int J Cancer* **123**(4): 787-792.

- Shweiki, D., A. Itin, et al. (1992). "Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis." *Nature* **359**(6398): 843-845.
- Smith, J. A., C. Y. Fan, et al. (2007). "Methylation status of genes in papillary thyroid carcinoma." *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **133**(10): 1006-1011.
- Smrcka, A. V. (2008). "G protein betagamma subunits: central mediators of G protein-coupled receptor signaling." *Cell Mol Life Sci* **65**(14): 2191-2214.
- Soares, P., V. Trovisco, et al. (2003). "BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC." *Oncogene* **22**(29): 4578-4580.
- Sodre, A. K., I. G. Rubio, et al. (2008). "Association of low sodium-iodide symporter messenger ribonucleic acid expression in malignant thyroid nodules with increased intracellular protein staining." *J Clin Endocrinol Metab* **93**(10): 4141-4145.
- Sozzi, G., M. Miozzo, et al. (1992). "A t(2;3)(q12-13;p24-25) in follicular thyroid adenomas." *Cancer Genet Cytogenet* **64**(1): 38-41.
- Spitzweg, C. and J. C. Morris (2002). "The sodium iodide symporter: its pathophysiological and therapeutic implications." *Clin Endocrinol (Oxf)* **57**(5): 559-574.
- Stephen, J. K., D. Chitale, et al. (2011). "DNA methylation in thyroid tumorigenesis." *Cancers (Basel)* **3**(2): 1732-1743.
- Suarez, H. G., J. A. du Villard, et al. (1990). "Presence of mutations in all three ras genes in human thyroid tumors." *Oncogene* **5**(4): 565-570.
- Suh, Y. A., R. S. Arnold, et al. (1999). "Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1." *Nature* **401**(6748): 79-82.
- Suit, H., S. Goldberg, et al. (2007). "Secondary carcinogenesis in patients treated with radiation: a review of data on radiation-induced cancers in human, non-human primate, canine and rodent subjects." *Radiat Res* **167**(1): 12-42.
- Suzuki, C., G. Murakami, et al. (2002). "Smurf1 regulates the inhibitory activity of Smad7 by targeting Smad7 to the plasma membrane." *J Biol Chem* **277**(42): 39919-39925.
- Suzuki, E., M. Takahashi, et al. (2013). "Oncogene- and oxidative stress-induced cellular senescence shows distinct expression patterns of proinflammatory cytokines in vascular endothelial cells." *ScientificWorldJournal* **2013**: 754735.
- Szkudlinski, M. W., M. Grossmann, et al. (1996). "Structure-function studies of human TSH: new advances in design of glycoprotein hormone analogs." *Trends Endocrinol Metab* **7**(8): 277-286.
- Takami, H., K. Ito, et al. (2014). "Development of molecular targeted drugs for advanced thyroid cancer in Japan [Review]." *Endocr J*.
- Takeya, R. and H. Sumimoto (2003). "Molecular mechanism for activation of superoxide-producing NADPH oxidases." *Mol Cells* **16**(3): 271-277.
- Takeya, R., N. Ueno, et al. (2003). "Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases." *J Biol Chem* **278**(27): 25234-25246.

- Tallini, G. (2002). "Molecular pathobiology of thyroid neoplasms." Endocr Pathol **13**(4): 271-288.
- Taton, M., F. Lamy, et al. (1993). "General inhibition by transforming growth factor beta 1 of thyrotropin and cAMP responses in human thyroid cells in primary culture." Mol Cell Endocrinol **95**(1-2): 13-21.
- Taylor, R. M., J. B. Burritt, et al. (2004). "Site-specific inhibitors of NADPH oxidase activity and structural probes of flavocytochrome b: characterization of six monoclonal antibodies to the p22phox subunit." J Immunol **173**(12): 7349-7357.
- Teahan, C., P. Rowe, et al. (1987). "The X-linked chronic granulomatous disease gene codes for the beta-chain of cytochrome b-245." Nature **327**(6124): 720-721.
- Torre-Amione, G., R. D. Beauchamp, et al. (1990). "A highly immunogenic tumor transfected with a murine transforming growth factor type beta 1 cDNA escapes immune surveillance." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(4): 1486-1490.
- Tortora, G., S. Pepe, et al. (1993). "Thyroid-stimulating hormone-regulated growth and cell cycle distribution of thyroid cells involve type I isozyme of cyclic AMP-dependent protein kinase." Cell Growth Differ **4**(5): 359-365.
- Trapasso, F., R. Iuliano, et al. (1999). "Iodide symporter gene expression in normal and transformed rat thyroid cells." Eur J Endocrinol **140**(5): 447-451.
- Truty, M. J. and R. Urrutia (2007). "Basics of TGF-beta and pancreatic cancer." Pancreatology **7**(5-6): 423-435.
- Tsushima, T., M. Arai, et al. (1988). "Effects of transforming growth factor-beta on deoxyribonucleic acid synthesis and iodine metabolism in porcine thyroid cells in culture." Endocrinology **123**(2): 1187-1194.
- 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.
- Ugolini, C., R. Giannini, et al. (2007). "Presence of BRAF V600E in very early stages of papillary thyroid carcinoma." Thyroid **17**(5): 381-388.
- Upadhyay, G., R. Singh, et al. (2003). "Functional expression of sodium iodide symporter (NIS) in human breast cancer tissue." Breast Cancer Res Treat **77**(2): 157-165.
- Urizar, E., L. Montanelli, et al. (2005). "Glycoprotein hormone receptors: link between receptor homodimerization and negative cooperativity." EMBO J **24**(11): 1954-1964.
- Ushio-Fukai, M. (2006). "Redox signaling in angiogenesis: role of NADPH oxidase." Cardiovasc Res **71**(2): 226-235.
- Ushio-Fukai, M. and Y. Nakamura (2008). "Reactive oxygen species and angiogenesis: NADPH oxidase as target for cancer therapy." Cancer Lett **266**(1): 37-52.
- Ushio-Fukai, M., Y. Tang, et al. (2002). "Novel role of gp91(phox)-containing NAD(P)H oxidase in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis." Circ Res **91**(12): 1160-1167.

- Uyttensprot, N., N. Pelgrims, et al. (1997). "Moderate doses of iodide in vivo inhibit cell proliferation and the expression of thyroperoxidase and Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter mRNAs in dog thyroid." Mol Cell Endocrinol **131**(2): 195-203.
- Uyttensprot, N., S. Costagliola, et al. (1999). "Requirement for cAMP-response element (CRE) binding protein/CRE modulator transcription factors in thyrotropin-induced proliferation of dog thyroid cells in primary culture." Eur J Biochem **259**(1-2): 370-378.
- Vafa, O., M. Wade, et al. (2002). "c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability." Mol Cell **9**(5): 1031-1044.
- Vallet, P., Y. Charnay, et al. (2005). "Neuronal expression of the NADPH oxidase NOX4, and its regulation in mouse experimental brain ischemia." Neuroscience **132**(2): 233-238.
- 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 Deure, W. M., R. P. Peeters, et al. (2010). "Molecular aspects of thyroid hormone transporters, including MCT8, MCT10, and OATPs, and the effects of genetic variation in these transporters." J Mol Endocrinol **44**(1): 1-11.
- Van Sande, J., S. Swillens, et al. (1995). "In Chinese hamster ovary K1 cells dog and human thyrotropin receptors activate both the cyclic AMP and the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate cascades in the presence of thyrotropin and the cyclic AMP cascade in its absence." Eur J Biochem **229**(2): 338-343.
- van Staveren, W. C., D. W. Solis, et al. (2007). "Human thyroid tumor cell lines derived from different tumor types present a common dedifferentiated phenotype." Cancer Res **67**(17): 8113-8120.
- van Staveren, W. C., S. Beeckman, et al. (2012). "Role of Epac and protein kinase A in thyrotropin-induced gene expression in primary thyrocytes." Exp Cell Res **318**(5): 444-452.
- Vaquero, E. C., M. Edderkaoui, et al. (2004). "Reactive oxygen species produced by NAD(P)H oxidase inhibit apoptosis in pancreatic cancer cells." J Biol Chem **279**(33): 34643-34654.
- Vassart, G. and J. E. Dumont (1992). "The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocyte function and growth." Endocr Rev **13**(3): 596-611.
- Vayre, L., J. C. Sabourin, et al. (1999). "Immunohistochemical analysis of Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter distribution in human extra-thyroidal tissues." Eur J Endocrinol **141**(4): 382-386.
- Venkataraman, G. M., M. Yatin, et al. (1999). "Restoration of iodide uptake in dedifferentiated thyroid carcinoma: relationship to human Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup>symporter gene methylation status." J Clin Endocrinol Metab **84**(7): 2449-2457.
- Voigt, C., H. P. Holzapfel, et al. (2004). "Increased expression of G-protein-coupled receptor kinases 3 and 4 in hyperfunctioning thyroid nodules." J Endocrinol **182**(1): 173-182.
- Volpp, B. D., W. M. Nauseef, et al. (1988). "Two cytosolic neutrophil oxidase components absent in autosomal chronic granulomatous disease." Science **242**(4883): 1295-1297.

- Vuchak, L. A., O. M. Tsygankova, et al. (2009). "Protein kinase A and B-Raf mediate extracellular signal-regulated kinase activation by thyrotropin." Mol Pharmacol **76**(5): 1123-1129.
- 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): 3096-3103.
- Wells, A., J. Grahovac, et al. (2013). "Targeting tumor cell motility as a strategy against invasion and metastasis." Trends Pharmacol Sci **34**(5): 283-289.
- West, J., T. Munoz-Antonia, et al. (2000). "Transforming growth factor-beta type II receptors and smad proteins in follicular thyroid tumors." Laryngoscope **110**(8): 1323-1327.
- Westermarck, K., F. A. Karlsson, et al. (1983). "Epidermal growth factor modulates thyroid growth and function in culture." Endocrinology **112**(5): 1680-1686.
- Westermarck, K., F. A. Karlsson, et al. (1985). "Thyrotropin modulates EGF receptor function in porcine thyroid follicle cells." Mol Cell Endocrinol **40**(1): 17-23.
- Weyemi, U. and C. Dupuy (2012). "The emerging role of ROS-generating NADPH oxidase NOX4 in DNA-damage responses." Mutat Res **751**(2): 77-81.
- 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.
- Weyemi, U., C. E. Redon, et al. (2013). "NADPH Oxidases NOXs and DUOXs as putative targets for cancer therapy." Anticancer Agents Med Chem **13**(3): 502-514.
- Weyemi, U., O. Lagente-Chevallier, et al. (2012). "ROS-generating NADPH oxidase NOX4 is a critical mediator in oncogenic H-Ras-induced DNA damage and subsequent senescence." Oncogene **31**(9): 1117-1129.
- White, P., K. A. Burton, et al. (2001). "Developmental expression analysis of thyroid hormone receptor isoforms reveals new insights into their essential functions in cardiac and skeletal muscles." FASEB J **15**(8): 1367-1376.
- Wientjes, F. B., J. J. Hsuan, et al. (1993). "p40phox, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain src homology 3 domains." Biochem J **296 ( Pt 3)**: 557-561.
- Wilson, B., E. Raghupathy, et al. (1968). "TSH-like actions of dibutyryl-cAMP on isolated bovine thyroid cells." Endocrinology **83**(4): 877-884.
- Wingler, K., S. Wunsch, et al. (2001). "Upregulation of the vascular NAD(P)H-oxidase isoforms Nox1 and Nox4 by the renin-angiotensin system in vitro and in vivo." Free Radic Biol Med **31**(11): 1456-1464.
- Wojciak-Stothard, B. and A. J. Ridley (2003). "Shear stress-induced endothelial cell polarization is mediated by Rho and Rac but not Cdc42 or PI 3-kinases." J Cell Biol **161**(2): 429-439.
- Wolff, J. (1969). "Iodide goiter and the pharmacologic effects of excess iodide." Am J Med **47**(1): 101-124.
- Wolff, J. (1989). "Excess iodide inhibits the thyroid by multiple mechanisms." Adv Exp Med Biol **261**: 211-244.

- Wolff, J. and I. L. Chaikoff (1948). "The inhibitory action of excessive iodide upon the synthesis of diiodotyrosine and of thyroxine in the thyroid gland of the normal rat." Endocrinology **43**(3): 174-179.
- Wollman, S. H. and F. E. Reed (1958). "Acute effect of organic binding of iodine on the iodide concentrating mechanism of the thyroid gland." Am J Physiol **194**(1): 28-32.
- Wrighton, K. H., X. Lin, et al. (2009). "Phospho-control of TGF-beta superfamily signaling." Cell Res **19**(1): 8-20.
- Wynford-Thomas, D. (1993). "Molecular basis of epithelial tumorigenesis: the thyroid model." Crit Rev Oncog **4**(1): 1-23.
- Xia, C., Q. Meng, et al. (2007). "Reactive oxygen species regulate angiogenesis and tumor growth through vascular endothelial growth factor." Cancer Res **67**(22): 10823-10830.
- Xing, J., R. Liu, et al. (2011). "The BRAFT1799A mutation confers sensitivity of thyroid cancer cells to the BRAFV600E inhibitor PLX4032 (RG7204)." Biochem Biophys Res Commun **404**(4): 958-962.
- Xing, M. (2005). "BRAF mutation in thyroid cancer." Endocr Relat Cancer **12**(2): 245-262.
- Xu, J., S. Lamouille, et al. (2009). "TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition." Cell Res **19**(2): 156-172.
- Yamagata, H., K. Matsuzaki, et al. (2005). "Acceleration of Smad2 and Smad3 phosphorylation *via* c-Jun NH(2)-terminal kinase during human colorectal carcinogenesis." Cancer Res **65**(1): 157-165.
- Yamaura, M., J. Mitsushita, et al. (2009). "NADPH oxidase 4 contributes to transformation phenotype of melanoma cells by regulating G2-M cell cycle progression." Cancer Res **69**(6): 2647-2654.
- Yen, P. M. (2001). "Physiological and molecular basis of thyroid hormone action." Physiol Rev **81**(3): 1097-1142.
- Yen-Chow, Y. C., S. Y. Chow, et al. (1984). "Distribution of sodium in cellular and luminal compartments of turtle thyroid glands." Am J Physiol **246**(5 Pt 1): E436-443.
- Yoshida, A., N. Sasaki, et al. (1997). "Different electrophysiological character of I-, ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>, and SCN<sup>-</sup> in the transport by Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter." Biochem Biophys Res Commun **231**(3): 731-734.
- Yoshida, A., S. Yoshida, et al. (1999). "Suppression of retinal neovascularization by the NF-kappaB inhibitor pyrrolidine dithiocarbamate in mice." Invest Ophthalmol Vis Sci **40**(7): 1624-1629.
- Zannini, M., H. Francis-Lang, et al. (1992). "Pax-8, a paired domain-containing protein, binds to a sequence overlapping the recognition site of a homeodomain and activates transcription from two thyroid-specific promoters." Mol Cell Biol **12**(9): 4230-4241.
- Zannini, M., V. Avantiagato, et al. (1997). "TTF-2, a new forkhead protein, shows a temporal expression in the developing thyroid which is consistent with a role in controlling the onset of differentiation." EMBO J **16**(11): 3185-3197.
- Zavadil, J. and E. P. Bottinger (2005). "TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions." Oncogene **24**(37): 5764-5774.



- Zhang, B., Z. Liu, et al. (2013). "Inhibiting cancer metastasis *via* targeting NADPH oxidase 4." Biochem Pharmacol **86**(2): 253-266.
- Zhang, J., S. S. Ferguson, et al. (1996). "Dynamin and beta-arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization." J Biol Chem **271**(31): 18302-18305.
- Zhang, Z., D. Liu, et al. (2014). "Histone deacetylation of NIS promoter underlies BRAF V600E-promoted NIS silencing in thyroid cancer." Endocr Relat Cancer **21**(2): 161-173.
- Zhao, B., Y. Yang, et al. (2014). "Redox-active quinones induces genome-wide DNA methylation changes by an iron-mediated and Tet-dependent mechanism." Nucleic Acids Res **42**(3): 1593-1605.
- Zhuang, J., T. Jiang, et al. (2010). "NADPH oxidase 4 mediates reactive oxygen species induction of CD146 dimerization in VEGF signal transduction." Free Radic Biol Med **49**(2): 227-236.

# Résumé

## ***L'activation autocrine de la voie TGF-β induite par BRAF<sup>V600E</sup> régule négativement l'expression du symporteur sodium/iode (NIS) via une production de ROS dépendante de la NOX4 dans le cancer papillaire de la thyroïde***

Le cancer papillaire de la thyroïde (PTC) est la pathologie thyroïdienne la plus répandue. Les mutations ponctuelles de *BRAF* sont retrouvées dans 40 à 60 % des cas de PTC. La transversion *BRAF*<sup>T1799A</sup> est la mutation de *BRAF* la plus fréquente. Les tumeurs porteuses de la mutation *BRAF*<sup>V600E</sup> sont souvent associées avec une diminution significative de l'expression du transporteur sodium/iode (NIS). Les résultats cliniques sur les patients atteints d'un cancer de la thyroïde porteur de la mutation *BRAF*<sup>V600E</sup> ont montré que l'inhibition de la voie MAPK ne permet pas de rétablir de manière assez importante l'expression du NIS induite par *BRAF*<sup>V600E</sup>. L'expression de *BRAF*<sup>V600E</sup> induit la sécrétion de TGF-β fonctionnel, qui inhibe l'expression des protéines thyroïdiennes impliquées dans le métabolisme de l'iode, et particulièrement le NIS. La NOX4 est surexprimée dans un nombre croissant de tumeurs, et particulièrement dans les cas de PTC. Dans le cas du cancer du sein, les mécanismes critiques pour le développement du cancer impliquent la régulation par le TGF-β de la NOX4 au niveau transcriptionnel *via* le facteur de transcription Smad3. Ces données nous mènent à considérer la NOX4 comme un candidat sérieux pour le rôle de système générateur de ROS contrôlé par la boucle autocrine TGF-β induite par *BRAF*<sup>V600E</sup>. Dans cette étude, nous avons tout d'abord observé une corrélation entre la présence de l'oncogène *BRAF*<sup>V600E</sup>, la surexpression de la NOX4 et l'inhibition de l'expression du NIS dans les cancers papillaires de la thyroïde. Puis, en utilisant la lignée BCPAP comme modèle *in vitro* de PTC, nous avons démontré *BRAF*<sup>V600E</sup> contrôle l'expression de la NOX4 et de la p22phox par l'intermédiaire de la signalisation TGF-β/Smads. La boucle TGF-β induite par *BRAF*<sup>V600E</sup> induit l'expression de la NOX4 et de la p22phox au niveau transcriptionnel *via* phosphorylated SMAD3. L'expression constitutive de la NOX4 et de la p22phox, qui forment ensemble un complexe NADPH oxydase fonctionnel, contribue au stress oxydatif observé dans les cellules BCPAP. Le traitement des cellules BCPAP par des scavengers de ROS comme le N-acetyl cysteine (NAC) et le Tiron permettent d'augmenter l'expression du NIS au niveau transcriptionnel et de rétablir l'expression d'une protéine fonctionnelle permettant la captation d'iode, ce qui indique que les ROS sont impliqués dans l'inhibition de l'expression du NIS. L'inhibition spécifique de la NOX4 par siRNA permet de réinduire l'expression de l'ARN messenger et de la protéine NIS. Ces résultats montrent pour la première fois que les ROS produits par la NOX4 jouent un rôle critique dans l'inhibition de l'expression du NIS induite par *BRAF*<sup>V600E</sup> *via* la signalisation TGF-β/SMAD3.