



**HAL**  
open science

**Etude de l'implication de la NADPH oxydase NOX4 et  
du stress oxydatif dans la radiorésistance des cancers  
papillaires de la thyroïde exprimant l'oncogène  
BRAFV600E**

Naima Azouzi

► **To cite this version:**

Naima Azouzi. Etude de l'implication de la NADPH oxydase NOX4 et du stress oxydatif dans la radiorésistance des cancers papillaires de la thyroïde exprimant l'oncogène BRAFV600E. Cancer. Université Paris Saclay (COMUE); Université Mohammed V (Rabat), 2016. Français. NNT : 2016SACLS416 . tel-03091991

**HAL Id: tel-03091991**

**<https://theses.hal.science/tel-03091991>**

Submitted on 1 Jan 2021

**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.

**THESE DE DOCTORAT**  
**DE**  
**L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY**  
**PREPAREE A L'UNIVERSITE PARIS-SUD**  
**ET DE**  
**UNIVERSITE MOHAMED V RABAT**

ÉCOLE DOCTORALE n°568

**Signalisations et Réseaux intégratifs en Biologie (Biosigne)**

Spécialité: Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Par

**Mme Naima AZOUZI**

Etude de l'implication de la NADPH Oxydase NOX4 et du Stress  
Oxydatif dans la Radiorésistance des Cancers Papillaires de la  
thyroïde exprimant l'oncogène BRAF<sup>V600E</sup>

Thèse présentée et soutenue à Rabat, le 19 Novembre 2016

**Composition du Jury :**

M. <b>Abdelkarim FILALI-MALTOUF</b> , PES, Université Mohamed 5 Rabat,	<b>Président du Jury</b>
Mme <b>Françoise MIOT</b> , Professeur, Université libre de Bruxelles,	<b>Rapporteur</b>
M. <b>Said AOUFOUCHI</b> , CR1 INSERM, Université Paris Saclay,	<b>Examineur</b>
M. <b>Youssef BAKRI</b> , PES, Université Mohamed V Rabat,	<b>Rapporteur</b>
Mme <b>Nouzha BEN RAIS</b> , PES, Université Mohamed V Rabat,	<b>Examinatrice</b>
M. <b>Rabii AMEZIANE EL-HASSANI</b> , Docteur, CNESTEN - Rabat,	<b>Co-encadrant scientifique</b>
Mme <b>Corinne DUPUY</b> , Directrice de Recherche CNRS, Université Paris Sud,	<b>Directrice de thèse</b>

**Titre :** Etude de l'implication de la NADPH oxydase NOX4 et du stress oxydatif dans la radorésistance des cancers papillaires de la thyroïde exprimant l'oncogène BRAF<sup>V600E</sup>

**Mots clés :** Cancer papillaire de la thyroïde (CPT), radorésistance, Natrium Iodide Symporter (NIS), l'oncogène BRAF<sup>V600E</sup>, NADPH oxydase 4 (NOX4), ROS

**Résumé :** Une des propriétés majeures de la thyroïde est de capter l'iode de la circulation sanguine grâce à la présence d'un transporteur d'iodure (NIS pour Natrium Iodide Symporter). Cette capacité d'accumulation d'iode par les thyrocytes joue un rôle clé dans la synthèse des hormones thyroïdiennes ainsi dans le diagnostic et le traitement des cancers de la thyroïde. Cependant, en raison d'une diminution ou de l'absence de l'expression du NIS dans certaines tumeurs et métastases, des patients deviennent réfractaires à la radiothérapie métabolique et présentent une radorésistance, causant ainsi un problème de santé publique.

L'oncogène BRAF<sup>V600E</sup>, un puissant activateur de la voie MAP kinase, est détecté dans 40 - 60% des cancers thyroïdiens de type papillaires (CPT) qui représentent 80% de la totalité des cancers thyroïdiens. La mutation BRAF<sup>V600E</sup> est associée aux tumeurs thyroïdiennes les plus agressives. Cependant l'inhibition pharmacologique de la voie MAP kinase induite constitutivement par l'oncogène BRAF<sup>V600E</sup> ne permet pas, à elle seule, de rétablir l'expression du NIS chez des patients atteints d'un cancer de la thyroïde muté BRAF<sup>V600E</sup>. Ceci suggère que d'autres mécanismes compensatoires peuvent contribuer à la radorésistance. Une étude récente menée sur un modèle murin a montré que la régulation négative du NIS par l'oncogène BRAF<sup>V600E</sup> est médiée par la voie du TGFβ. Une autre a montré que l'expression du NIS serait dépendante de l'état redox de la cellule, suggérant un rôle des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Dans les cellules les ROS peuvent être produites par les NADPH oxydases (NOX/DUOX). La thyroïde exprime trois : DUOX2 nécessaire à la synthèse des hormones thyroïdiennes ainsi que

DUOX1 et NOX4 dont le rôle physiologique reste inconnu. La NOX4, surexprimé dans les CPTs, a été montré être un nouvel effecteur clé de la voie du TGFβ dans d'autres cancers.

Dans mon projet de thèse, je me suis intéressée à l'étude du rôle de NOX4 dans la régulation négative du NIS dans les CPT mutés BRAF<sup>V600E</sup>. L'étude du mécanisme, réalisée à partir de deux lignées humaines issues de cancers papillaires mutés pour BRAF (BCPAP et 8505C), a permis d'établir que l'oncogène BRAF<sup>V600E</sup> contrôle l'expression de NOX4 au niveau transcriptionnel via la voie TGF-β/Smad3. Ces résultats ont été validés sur une lignée de rat exprimant de manière conditionnelle BRAF<sup>V600E</sup> ainsi que sur des thyrocytes humains en culture primaire. De manière importante, l'utilisation d'antioxydants tels que le N-acetyl cystéine (NAC) ou l'inhibition spécifique de l'expression de NOX4 par ARN interférence permet de réinduire l'expression du NIS. Ces résultats qui montrent que les ROS produites par NOX4 inhibent l'expression du transporteur de l'iode (NIS) établissent un lien entre l'oncogène BRAF<sup>V600E</sup> et NOX4. Une analyse comparative de l'expression de NOX4 effectuée à partir de 500 cancers papillaires de la thyroïdes mutés ou non pour BRAF (données TCGA) confirme que NOX4 est significativement augmenté dans les cancers porteurs de la mutation BRAF et que ceci est corrélé à une diminution de l'ARNm du NIS. Par ailleurs, le niveau de NOX4 est inversement corrélé au score de différenciation thyroïdien, suggérant que NOX4 pourrait être impliqué dans le processus de dédifférenciation. Cette étude ouvre une nouvelle opportunité pour l'optimisation de l'utilisation de la radiothérapie métabolique dans le traitement des cancers thyroïdiens réfractaires à l'iode I<sup>131</sup> et présente

**Title :** The study of the involvement of NADPH oxidase NOX4 and oxidative stress in the radioresistance of papillary thyroid cancers harboring BRAF<sup>V600E</sup> oncogene

**Keywords :** papillary thyroid cancer (PTC), radiation resistance, Natrium Iodide Symporter (NIS), the oncogene BRAF<sup>V600E</sup>, NADPH oxidase 4 (NOX4), ROS

**Abstract:** One of the major properties of the thyroid is iodine uptake from the bloodstream through an iodide transporter (NIS for Natrium Iodide Symporter). This capacity plays a key role in the thyroid hormones synthesis, but also in both diagnosis and treatment of thyroid cancer. However, due to a decrease or absence of the NIS expression in some tumors and metastases, patients become refractory to the metabolic radiotherapy and present a radioresistance, which cause a public health problem.

The BRAF<sup>V600E</sup> oncogene, a potent activator of the MAP kinase pathway, is detected in 40-60% of papillary thyroid cancer (PTC), which represent 80% of total thyroid cancers. The BRAF<sup>V600E</sup> mutation is associated with the more aggressive thyroid tumors. However, the pharmacological inhibition of the MAP kinase pathway, constitutively induced by the BRAF<sup>V600E</sup> oncogene, is not able to restore alone the expression of NIS in patients with BRAF<sup>V600E</sup> mutated thyroid cancer. This suggests that other compensatory mechanisms may contribute to the radioresistance. A recent study in a mouse model demonstrated that downregulation of NIS by BRAF<sup>V600E</sup> oncogene is mediated through the TGFβ activation. An other showed that the expression of NIS is dependent on the redox status of the cell, suggesting a role for the reactive oxygen species (ROS). In cells, ROS can be produced by the NADPH oxidases (NOX/DUOX). The Thyroid gland expresses three of them: DUOX2, which is necessary for the thyroid hormones synthesis, but also DUOX1 and NOX4 whose the physiological role remains unknown.

NOX4, which is overexpressed in the PTCs, has been shown to be a new key effector of the TGF beta pathway.

In my thesis project, I was interested in studying the role of NOX4 in the negative regulation of NIS in BRAF<sup>V600E</sup> mutated CPT. The study of the mechanism, made from two human cell lines derived from BRAF-mutated papillary thyroid cancers (BCPAP and 8505C), has revealed that the oncogene BRAF<sup>V600E</sup> controls the expression of NOX4 at the transcriptional level via the TGF-β/Smad3 pathway. These results were validated on both a rat thyroid cell line conditionnaly expressing BRAF<sup>V600E</sup> and on human thyrocytes in primary culture. Importantly, the use of antioxidants such as N-acetyl cysteine (NAC) or specific inhibition of NOX4 expression by RNA interference allow reinduction of NIS expression. These results, which show that ROS produced by NOX4 inhibit the expression of iodine transporter (NIS), establish a link between the oncogene BRAF<sup>V600E</sup> and NOX4. A comparative analysis of the NOX4 expression, made from 500 papillary thyroid cancers mutated or not for BRAF (TCGA data), confirms that NOX4 is significantly increased in BRAF-mutated cancers and that this is correlated with a decrease of NIS mRNA. Furthermore, the level of NOX4 is inversely related to thyroid differentiation score, suggesting that NOX4 might be involved in the dedifferentiation process. This study opens a new opportunity for optimizing the use of metabolic radiotherapy in the treatment of thyroid cancers refractory to radioiodine I<sup>131</sup> and makes NOX4 as a potential therapeutic target.



Université Mohammed V  
Faculté des Sciences  
Rabat

N° d'ordre :

# THESE DE DOCTORAT

Présentée par

***Naima AZOUZI***

Discipline : Biologie

Spécialité : Aspect Moléculaire et Cellulaire de la Biologie

## **ETUDE DE L'IMPLICATION DE LA NADPH OXYDASE NOX4 ET DU STRESS OXYDATIF DANS LA RADIORESISTANCE DES CANCERS PAPILLAIRES DE LA THYROÏDE EXPRIMANT L'ONCOGENE BRAF<sup>V600E</sup>**

**Soutenu le 19 Novembre 2016**

Devant le jury composé de :

**Président :**

Mr. Abdelkarim FILALI-MALTOUF PES, Faculté des Sciences de Rabat

**Examineurs :**

Mr. Youssef BAKRI PES, Faculté des Sciences de Rabat

Mme Nouzha BEN RAIS PES, Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat

Mme Corinne DUPUY DR, Faculté des Sciences, Université Paris Saclay

Mme Françoise MIOT Professeur, IRIBHM, Université Libre, Bruxelles

Mr. Said AOUFOUCHI CR1, INSERM, Université Paris Saclay

Mr. Rabii AMEZIANE EL-HASSANI Docteur, CNESTEN, Rabat

## **Dédicace**

---

À mes très chers grands-parents, parents et beaux-parents puisse Dieu vous donner santé, prospérité, et longue vie !

À toi **Rachid**, mon Mari chéri, quel bonheur de t'avoir à mes côtés.

À mes cher(e)s frères et sœurs : Fatima, Saloua, Sabah, Mohamed et Abdelkarim, et aussi mes petites nièces Sarah et Lina, mes petits bouts du cœur.

À toi ma chère tante **Fatima**, et ta petite famille.

**« Vous n'avez cessé de me combler par votre amour et votre tendresse. Vous avez su accepter mes choix, m'encourager et me soutenir. Merci pour votre patience, votre amour et pour tous les rires et la joie que vous avez semée dans ma vie. Je vous aime infiniment et je vous souhaite toutes et tous une longue vie pleine de joie et de bonheur. Je suis fière de vous et de vos valeurs. »**

À mes beaux-frères Farid, Youssef et Noureddine.

À toute ma belle-famille : belles-sœurs et beaux-frères.

À tous les membres de ma famille : tantes, oncles, cousins et cousines.

À mes amis tous et toutes. Parce que je ne suis riche que de vous.

**« Vous m'avez soutenu et encouragé durant ma thèse. Je vous souhaite plein de succès et de joie ! »**

À tous ceux, qui m'ont apporté, directement ou indirectement, leur aide ou leurs encouragements lors de la réalisation de cette thèse.

Et à tous ceux que ma réussite leur tient à cœur.

# Préambule

---

## I. **Production Scientifique :**

### 1. Article scientifique international :

AZOUZI N., CAILLOUX J., CAZARIN M.J., KNAUF A.J., CRACCHIOLO J., AL GHUZLAN A., HARTL D., POLAK M., CARRE A., EL MZIBRI M., FILALI-MALTOUF A., AL BOUZIDI A., SCHLUMBERGER M., Fagin A.J., AMEZIANE-EL-HASSANI R. and DUPUY C. ; NADPH oxidase NOX4 is a critical mediator of BRAF<sup>V600E</sup>-induced down regulation of the sodium iodide symporter in papillary thyroid carcinomas. *Antioxidants & Redox Signaling*. August 2016. ahead of print. doi:10.1089/ars.2015.6616.

### 2. Communication orale :

AZOUZI N., CAILLOUX J., AMEZIANE-EL-HASSANI R. and DUPUY C., Role of the NADPH oxidase Nox4 In BRAF<sup>V600E</sup>-dependent downregulation of NIS. European Thyroid Association (ETA) 38<sup>th</sup> Annual Meeting; 6-10 September 2014. Santiago de Compostela, Spain.

### 3. Communications affichées :

AZOUZI N., CAILLOUX J., CAZARIN M.J., KNAUF A.J., CRACCHIOLO J., AL GHUZLAN A., HARTL D., POLAK M., CARRE A., EL MZIBRI M., FILALI-MALTOUF A., AL BOUZIDI A., SCHLUMBERGER M., Fagin A.J., AMEZIANE-EL-HASSANI R. and DUPUY C. NADPH oxidase NOX4 is a critical mediator of BRAF<sup>V600E</sup>-induced down regulation of the sodium iodide symporter in papillary thyroid carcinomas. Gordon Research Conferences, 5-10 June 2016, Waterville Valley, USA.

AZOUZI N., CAILLOUX J., CAZARIN M.J., KNAUF A.J., CRACCHIOLO J., AL GHUZLAN A., HARTL D., POLAK M., CARRE A., EL MZIBRI M., FILALI-MALTOUF A., AL BOUZIDI A., SCHLUMBERGER M., Fagin A.J., AMEZIANE-EL-HASSANI R. and DUPUY C. NADPH oxidase NOX4 is a critical mediator of BRAF<sup>V600E</sup>-induced

down regulation of the sodium iodide symporter in papillary thyroid carcinomas. The 2<sup>nd</sup> International Congress on Cancer in Beni Mellal Morocco (ICCBM 2016) Entitled Cancer diseases: Clinical Studies, Scientific & Therapeutic Advances. May, 19-21, 2016.

AZOUZI N., CAILLOUX J., AMEZIANE-EL-HASSANI R. and DUPUY C., Role of TGF $\beta$  - induced Nox4 in the regulation of Natrium Iodide Symporter (NIS) expression in Thyroid Tumors. Journée de l'école doctorale Biosigne (ED419), 15 Octobre 2015, Faculté de Médecine –Université Paris SUD11, Krémlin Bicêtre.

AZOUZI N., CAILLOUX J., AMEZIANE-EL-HASSANI R. and DUPUY C., Role of TGF $\beta$  -NADPH oxidase NOX4 is a critical mediator in BRAF<sup>V600E</sup>-induced down regulation of sodium iodide symporter in papillary thyroid carcinoma. Journée de l'école doctorale Biosigne (ED419), 5 Janvier 2015, Faculté de Médecine – Université Paris SUD11, Krémlin Bicêtre.

AZOUZI N., CAILLOUX J., AMEZIANE-EL-HASSANI R. and DUPUY C., Role of NADPH Oxidase 4 (NOX4) in Resistance to Metabolic Radiotherapy. Mini-Retrait UMR8200 Stabilité Génétique et Oncogénèse – Institut Gustave Roussy, 2014, Paris.

Naima AZOUZI, Meryem KAABOUCH, Mohammed ATTALEB, Hafsa CHAHDI, Layla BENBACER, Hassan JADDI, Siffedine AL KANDRY, Aissam RHARRASSI, Mohammed OUKABLI, Abdel Karim FILALI-MALTOUF, Corinne DUPUY, Mohammed EL MZIBRI, Abderrahmane AL BOUZIDI & Rabii AMEZIANE EL HASSANI. Methylation status of Sodium Iodide Symporter (NIS) promoter in thyroid cancer. Third annual conference of The Middle-Eastern Association for Cancer Research (MEACR), December 2013. Rabat – Morocco.

Meryem KAABOUCH, Naima AZOUZI, Siffedine AL KANDRY, Mohammed OUKABLI, Aissam RHARRASSI, Adil BOUDEHAS, Hassan JADDI, Mohammed ATTALEB, Layla BENBACER, Mohammed EL MZIBRI, Corinne DUPUY, Rabii AMEZIANE EL HASSANI Et Abderrahmane AL BOUZIDI. Incidence des cancers de la thyroïde et évaluation du statut épigénétique du promoteur du NIS (Natrium Iodide Symporter) dans les cancers de la thyroïde à l'Hôpital Militaire

de Rabat. Les 2<sup>èmes</sup> Journées de la Recherche, 9 et 10 Novembre 2012.  
Rabat, Maroc.

## **II. Bourses, financements et distinctions scientifiques :**

1. Young Investigator award. European Thyroid Association (ETA) 38<sup>th</sup> Annual Meeting; 6-10 September 2014. Santiago de Compostela, Spain.
2. Bourse d'excellence du CRNST, Maroc, édition 2012.
3. Bourse de l'aide à la cotutelle de thèse attribuée par le service international de l'université Paris Sud 11 (2014 -2015).
4. Programme interuniversitaire PHC-Volubilis/Toubkal, Maghreb (France / Maroc) : Mes séjours scientifiques en France (2013 -2015).
5. Programme international de coopération scientifique : CNRST (Maroc) / CNRS (France) : Mes séjours scientifiques en France (2013 -2015).

# Avant-propos

---

Le travail présenté dans cette thèse a été effectué dans le Laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire (LMBM) à la Faculté des Sciences de Rabat dans le cadre d'une collaboration avec l'Unité de Biologie et de la Recherche Médicale (UBRM) au Centre National d'Énergie des Sciences et Techniques Nucléaires (CNESTEN), Rabat et l'UMR8200 CNRS à l'Institut Gustave Roussy, Villejuif, France.

Cette étude rentre dans le cadre d'une convention de cotutelle de thèse entre l'Université Mohamed V de Rabat (Maroc) et l'Université Paris Sud / Paris Saclay (France). La réalisation de ce travail est rendue possible grâce à l'encadrement du Pr. **Abdelkarim FILALI-MALTOUF** (Directeur de thèse), du Docteur **Corinne DUPUY** (Directrice de thèse) et du Docteur **Rabii AMEZIANE-EL-HASSANI** (Co-encadrant).

Je tiens à remercier mon directeur de thèse et président du jury de ma thèse : Mr. **Abdelkarim FILALI-MALTOUF**, directeur du laboratoire de recherche du Laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire et Professeur à la Faculté des Sciences, Université Mohammed V de Rabat, Maroc. Je vous suis très reconnaissante de m'avoir aidée et conseillée et d'avoir été très compréhensif. Je vous remercie également de vous être rendu disponible lorsque j'en avais besoin. J'espère que vous trouverez dans ce travail ma respectueuse gratitude.

Docteur **Corinne DUPUY**, ma directrice de thèse à l'Université Paris Sud / Paris Saclay et directrice de recherche à l'Unité de recherche UMR8200 CNRS à l'Institut Gustave Roussy. Je tiens à vous remercier chaleureusement, même si je ne saurais jamais vous remercier assez. Dans votre équipe je ne me suis jamais sentie étrangère grâce à la bonne ambiance qui y régnait. J'apprécie énormément vos qualités scientifiques et humaines. Je vous remercie de l'aide, de la formation, de votre accompagnement et de vos conseils durant ma thèse, je vous en suis très reconnaissante.

Ce travail n'aurait pas vu le jour sans la confiance et la patience de mon cher co-encadrant scientifique de thèse Mr. **Rabii AMEZIAN EL-HASSANI**, docteur et chercheur à l'Unité de Biologie et de la Recherche Médicale (UBRM) au Centre National d'Énergie des Sciences et Techniques Nucléaires (CNESTEN) à Rabat. Je tiens à vous remercier particulièrement pour votre aide, pour votre encadrement instructif et pour votre suivie tout au long de ma thèse. Je vous remercie sincèrement pour les conseils que vous m'avez promulgués durant mon parcours, depuis mon stage de fin d'études en master M2 jusqu'à la thèse. Quoique je dise, je ne saurais jamais vous remercier assez. J'espère que ce travail sera à la hauteur de vos attentes et de la confiance que vous m'avez accordée.

Je tiens à remercier également les autres membres du jury de ma thèse :

Mr. **Youssef BAKRI**, Professeur à la Faculté des Sciences, Université Mohammed de Rabat, Maroc ; et Mme. **Françoise MIOT**, Docteur chercheur à l'Institut de Recherche Interdisciplinaire en Biologie humaine et moléculaire à la faculté de médecine, Université libre de Bruxelles, Belgique : je vous exprime ma profonde gratitude d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse et je vous remercie pour vos remarques très constructives.

Mme. **Nouzha BEN RAIS**, Professeur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie (FMP), Université Mohamed V de Rabat, et chef de service de médecine nucléaire à l'hôpital Ibn Sina de Rabat, Maroc et Chef du Laboratoire de Médecine Nucléaire et Biophysique à la FMPP; et Mr. **Saïd AOUCHE**, Chargé de recherche CR1 à l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) à l'Unité de recherche UMR8200 CNRS à l'Institut Gustave Roussy : je vous remercie d'avoir accepté d'examiner mon travail de thèse.

J'exprime ma gratitude envers Mr. **Mohamed EL-MZIBRI**, Docteur chercheur et chef de la division sciences du vivant au CNESTEN ; J'ai apprécié vos qualités humaines. Je vous remercie particulièrement pour vos conseils et je vous suis reconnaissante. Mes remerciements sont adressés aussi

au docteur **Mohammed ATTALEB**, directeur de l'Unité de Biologie et de Recherche Médicale (UBRM) au CNESTEN à Rabat.

Aussi, en témoignage de leur sympathie, leurs soutien, des bons moments et souvenirs qu'on a partagé, je ne manquerai pas de remercier le reste des membres de l'équipe de Dr. Corinne DUPUY des anciens aux nouveaux: Monique Talbot, Amélie Boichard, Ruy Louzada, Juliana Cazarin, Fabiot Hecht, et l'adorable Raphaël Corre. Sans oublier mes amies et les membres de l'UBRM : Mouna Fahr, Zineb Qmichou, Ouafae Pakharo, Dr. Imane Chaoui, Mr. Hassan Jeddi, Dr. Leila Benbacer et Dr. Asmae El Hamdouchi .... Merci à vous tous et toutes.

Au terme de ce travail, je tiens à remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse.

# Table des matières

<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>16</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>18</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>20</b>
<b>INTRODUCTION : .....</b>	<b>21</b>
<b>I. La physiologie de la Thyroïde .....</b>	<b>21</b>
1. Morphologie .....	21
2. Hormones thyroïdiennes .....	23
2.1 La Biosynthèse des hormones thyroïdiennes.....	24
2.2 Acteurs de l'hormonosynthèse .....	26
a. L'iode élément majeur de la synthèse des hormones thyroïdiennes.....	26
i. Le transporteur basal de l'iode : NIS (Natrium Iodide Symporter) .....	27
ii. Le transport apical de l'iode .....	30
b. La peroxydase thyroïdienne ou la thyroperoxydase .....	31
c. Le système générateur d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> thyroïdien : DUOX2.....	33
d. La Thyroglobuline (Tg) et ses sites hormonogéniques .....	37
2.3 Régulation de l'hormonosynthèse: .....	37
a. Régulation transcriptionnelle .....	38
i. Régulation transcriptionnelle via le R-TSH .....	38
ii. Régulation transcriptionnelle via des facteurs de transcription.....	40
b. Autorégulation de la captation de l'iode.....	40
2.4 Sécrétion et transport des hormones thyroïdiennes .....	40
2.5 Métabolisme des hormones thyroïdiennes .....	41
3. Rôle des hormones thyroïdiennes.....	42
4. Les pathologies de la thyroïde .....	44
<b>II. Carcinome thyroïdien.....</b>	<b>44</b>

1. Généralités .....	44
1.1 Classification histologique des cancers thyroïdiens .....	45
a. Cancers de la thyroïde d'origine folliculaire .....	46
i. Les cancers papillaires de la thyroïde (PTC) .....	46
ii. Les cancers folliculaires de la thyroïde (FTC) .....	48
iii. Les cancers anaplasiques de la thyroïde (ATC) .....	48
1.2 La Prise en charge clinique des cancers de la thyroïde d'origine folliculaire: Diagnostic et traitement .....	50
a. Diagnostic .....	50
b. Traitement des cancers thyroïdiens d'origine folliculaire .....	50
iv. Chirurgie .....	50
v. Traitement à l'iode radioactif .....	50
vi. Radiothérapie externe .....	50
vii. Chimiothérapie .....	51
viii. Hormonothérapie ou hormonosubstitution .....	51
2. Altérations génétiques et anomalies moléculaires des cancers thyroïdiens .....	51
2.1 Les réarrangements chromosomiques .....	52
a. Les réarrangements <i>RET/PTC</i> .....	52
b. Le réarrangement <i>PAX8/PPAR<math>\gamma</math></i> .....	53
2.2 Autres anomalies moléculaires .....	54
2.3 Les mutations somatiques de la voie de signalisation MAP kinase .....	55
a. Les mutations du gène ras .....	56
b. Les mutations BRAF .....	59
3. L'implication de la voie de signalisation TGF- $\beta$ /Smad dans les PTCs .....	61
3.1 Généralités .....	61
3.2 Description de la signalisation TGF- $\beta$ /Smad : .....	62
3.3 Autres voies de signalisation activées via le TGF- $\beta$ .....	63
3.4 Régulation de la fonction thyroïdienne par le TGF- $\beta$ .....	64
3.5 Rôle du TGF- $\beta$ dans la carcinogenèse thyroïdienne .....	64

4. Meilleure compréhension de la pathogenèse moléculaire des PTCs: Nouvelle classification.....	66
<b>III. Stress Oxydatif et cancer de la thyroïde.....</b>	<b>68</b>
1. Généralités .....	68
1.1. Les espèces réactives de l'oxygène .....	68
1.2. Rôle physiologique des ROS .....	70
1.3. Le stress oxydatif .....	70
1.4. Stress oxydatif et les carcinomes thyroïdiens .....	71
2. La NADPH oxydase 4 et le cancer de la thyroïde.....	73
2.1. Le système générateur de ROS : Nox4/p22 <sup>phox</sup> .....	73
a. NADPH oxydase 4 (NOX4) : expression, activité et régulation .....	73
b. p22 <sup>phox</sup> : partenaire fonctionnel de la NOX4 .....	74
2.2. La NOX4 et le cancer de la thyroïde .....	75
<b>OBJECTIFS DU TRAVAIL.....</b>	<b>76</b>
<b>MATERIEL &amp; METHODES.....</b>	<b>77</b>
<b>I. Matériel Biologique .....</b>	<b>77</b>
1. Lignées cellulaires .....	77
1.1. Lignées cellulaires cancéreuses .....	77
1.2. Lignée cellulaire normale .....	77
2. Thyrocytes en culture primaire .....	78
<b>II. Méthodes .....</b>	<b>78</b>
1. Culture cellulaire et conditions de culture.....	78
1.1. BCPAP et 8505C.....	78
1.2. PCCL3 exprimant conditionnellement l'oncogène BRAF <sup>V600E</sup> (PC-BRAF <sup>V600E</sup> cells .....	78
1.3. Thyrocytes primaires .....	79
1.4. Traitement des cellules en culture .....	80

2. Transfection cellulaire .....	81
3. Dosage des ROS intracellulaires .....	81
3.1. Préparation des cellules .....	81
3.2. Dosage des ROS intracellulaire au FACS C6 .....	82
4. L'analyse par Western-blot .....	82
4.1. Préparation des extraits cellulaires .....	82
4.2. Analyse de l'expression des protéines par Western-blot .....	83
a. Migration et électro-transfert .....	83
b. Hybridation et immuno-détection .....	83
5. Biotinylation des protéines de la surface cellulaire .....	84
6. PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR) .....	85
6.1. Extraction des ARN totaux .....	85
6.2. RT-PCR (Reverse Transcription PCR) .....	86
6.3. Réaction en Chaîne par Polémyrase quantitative en temps réel .....	87
7. Analyse statistique .....	91
<b>PRESENTATION DE L'ARTICLE .....</b>	<b>92</b>
<b>INTRODUCTION DE L'ARTICLE .....</b>	<b>95</b>
<b>DISCUSSION GENERALE .....</b>	<b>122</b>
<b>CONCLUSIONS &amp; PERSPECTIVES .....</b>	<b>127</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>130</b>

# Liste des abréviations

<b>AC :</b>	Adénylate cyclase
<b>ADN :</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ADNc :</b>	ADN complémentaire
<b>AIT :</b>	Apical Iodide Transporter : Transporteur apical de l'iode
<b>AMPc :</b>	AMP cyclique
<b>ANO1 :</b>	Anoctamin -1
<b>ARN:</b>	Acide ribonucléique
<b>ARNm:</b>	ARN messenger
<b>Asp :</b>	Asparagine
<b>ATC :</b>	Anaplastic Thyroid Cancer: Cancer anaplasique de la thyroïde
<b>ATP:</b>	Adénosine Tri-Phosphate
<b>BRAF:</b>	B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase
<b>Ca<sup>2+</sup>:</b>	Calcium
<b>CAT :</b>	Catalase
<b>CGD :</b>	Chronic Granulomatous Disease: maladie granulomateuse chronique
<b>CHO :</b>	Chinese Hamster Ovary
<b>CLC5 :</b>	Chloride channel-5
<b>MTC :</b>	Medullary Thyroid Cancer : Cancer médullaire de la thyroïde
<b>CRE :</b>	Inducible cAMP early repressor ou ICER
<b>D1 :</b>	5'désiodase de type I ou iodothyronine désiodase I
<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>DSB :</b>	Double strand break ou cassures double brin
<b>DUOX :</b>	Dual Oxidase
<b>DUOX1 :</b>	Dual Oxidase 1
<b>DUOX2 :</b>	Dual Oxidase 2
<b>DUOXA1 :</b>	Dual Oxidase Activator 1
<b>DUOXA2:</b>	Dual Oxidase Activator 1
<b>EGF :</b>	Epidermal Growth Factor
<b>EMT :</b>	Epithelial to Mesenchymal Transition
<b>ERK :</b>	Extracellular signal-regulated Kinase
<b>FTC :</b>	Follicular Thyroid Cancer : Cancer folliculaire de la thyroïde
<b>GCL :</b>	Gamma-glutamylcystéine synthétase ou glutamate cystéine ligase
<b>GDP :</b>	Guanosine Diphosphate
<b>GPCRs :</b>	G Protein Coupled Receptors
<b>Gpx:</b>	Glutathion peroxidase
<b>GTP:</b>	Guanosine Triphosphate
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:</b>	Peroxyde d'hydrogène
<b>HIF-1:</b>	Hypoxia Inducible Factor-1
<b>HSA:</b>	Human Serum albumin
<b>I<sup>-</sup> :</b>	Iodide: Iodure
<b>IGF-1:</b>	Insulin Like Growth Factor 1
<b>IGF1-R</b>	IGF-1 Receptor

**IP3** : Inositol 1,4,5-trisphosphate  
**kDa** : kilo Dalton  
**LT4** : L-Thyroxine ou lévothyroxine  
**MAPK**: Mitogen Activated Protein Kinase  
**MAPKKK** : Mitogen Activated protein Kinase Kinase Kinase  
**MIT** : Monoiodotyrosine  
**MPO** : Myeloperoxidase  
**mTOR** : Mammalian target of rapamycin  
**NAC** : N-acetylcysteine  
**NADPH** : Nicotinamide adenine dinucléotide phosphate  
**NIS** : Sodium / Iodide Syporter (Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> Symporter)  
**NOX** : NADPH oxidase : NADPH Oxydase  
**OH<sup>-</sup>** : Hydroxyl anion: Radical hydroxyle  
**O<sub>2</sub><sup>-</sup>** : Syperoxide anion: Anion superoxyde  
**Pax8**: Paired Box 8  
**PDGF** : Platelet-Derived Growth Factor  
**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** : Papillary Thyroid Cancer : Cancer papillaire de la thyroïde  
**PTPs** : Protéines Tyrosine Phosphatases  
**RE** : Réticulum Endoplasmique  
**RET/PTC1**: Rearranged during Transfection/Papillary Thyroid Cancer 1  
**RI** : Rayonnements ionisants  
**rNIS** : le NIS du rat  
**siRNA** : Small Interfering RNA  
**SMAD**: Similar to the 'Mothers Against Decapentaplegic' MAD  
**SOD** : Superoxide dismutase  
**T<sub>3</sub>** : Triiodothyronine  
**T<sub>4</sub>** : Thyroxine  
**TBG** : Thyroxin Binding Globulin  
**Tg** : Thyroglobuline  
**TGF-β** : Transforming Growth Factor β  
**TPO** : Thyroperoxidase: peroxidase thyroïdienne  
**TRH** : Thyroid Releasing Hormone  
**TRα1** : Thyroid hormone receptor α 1  
**TRα3** : Thyroid hormone receptor α 3  
**TRβ1** : Thyroid hormone receptor β 1  
**TRβ2** : Thyroid hormone receptor β 2  
**TSH** : Thyroid Stimulating Hormone ou thyrotropine  
**TSHR** : TSH-receptor  
**TTF-1** : Thyroid Transcription Factor 1  
**TTF-2** : Thyroid Transcription Factor 2  
**VEGF** : Vascular Endothelial Growth Factor  
**VEGFR** : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

# Liste des Figures

<b>Figure 1 :</b> Localisation de la thyroïde chez l'Homme.....	21
<b>Figure 2 :</b> Follicule thyroïdien .....	22
<b>Figure 3 :</b> Histologie d'une glande thyroïde de mammifère. ....	23
<b>Figure 4 :</b> Les principaux acteurs de l'hormonosynthèse et les différentes étapes de synthèse des hormones thyroïdiennes .....	25
<b>Figure 5 :</b> Processus oxydatif de l'iodation de la thyroglobuline .....	25
<b>Figure 6 :</b> Formation et structure des hormones thyroïdiennes T3 et T4 .....	26
<b>Figure 7 :</b> Topologie du transporteur sodium/iodure NIS humain.....	28
<b>Figure 8 :</b> Transport de l'iodure vers l'intérieur du thyrocyte.....	29
<b>Figure 9 :</b> Le cycle peroxydasique et le couplage hormonogène des résidus tyrosyls.....	32
<b>Figure 10 :</b> Le rôle de NOX2 dans la défense phagocytaire de l'immunité innée .....	34
<b>Figure 11 :</b> La famille des NADPH oxydases (NOXs/DUOXs).....	35
<b>Figure 12 :</b> Contrôle hypothalamo-hypophysaire de la fonction thyroïdienne .....	38
<b>Figure 13 :</b> Les réactions de bases des trois désiodinases D1, D2 et D3 .....	42
<b>Figure 14 :</b> Aspect microscopique du cancer thyroïdien papillaire .....	47
<b>Figure 15 :</b> Aspect microscopique du cancer thyroïdien folliculaire.....	48
<b>Figure 16 :</b> Aspect microscopique de deux types de cancer thyroïdien anaplasiques ...	49
<b>Figure 17 :</b> Etapes de progression putatif des tumeurs thyroïdiennes dérivées de cellules folliculaires et des mutations génétiques associées. ....	54
<b>Figure 18 :</b> Schéma simplifié des voies de signalisation RAS/MAPK et PI3K/AKT .....	56
<b>Figure 19 :</b> Forme active et inactive de la protéine RAS.....	57
<b>Figure 20 :</b> les mutations oncogéniques des trois isoformes du gène ras .....	58
<b>Figure 21 :</b> Schéma de l'activation de la voie de signalisation Ras/Ras/MEK/ERK .....	59
<b>Figure 22 :</b> Aspect microscopique du cancer thyroïdien papillaire avec mutation BRAF <sup>V600E</sup> (140).....	60
<b>Figure 23 :</b> Représentation schématique de la structure de BRAF avec les différents domaines. ....	61
<b>Figure 24 :</b> Voie de signalisation du TGF- $\beta$ .....	63
<b>Figure 25 :</b> Le rôle du TGF $\beta$ dans le processus de la carcinogénèse .....	65
<b>Figure 26 :</b> Schéma explicatif de la nouvelle classification des PTCs.....	68
<b>Figure 27 :</b> Origine des espèces réactives de l'oxygène. ....	69

<b>Figure 28</b> : Schéma représentatif de la protéine NOX4 et de son partenaire membranaire fonctionnel p22 <sup>phox</sup> .....	74
<b>Figure 29</b> : Schéma d'une courbe de suivi d'une réaction PCR en temps réel ; représentant les différentes étapes du cycle d'amplification qRT-PCR.....	88
<b>Figure 30</b> : Les mécanismes moléculaires de la régulation négative de l'expression du NIS, d'après Spitzweg, C., et al. ....	99
<b>Figure 31</b> : L'expression du $\gamma$ H2AX dans les deux lignées cellulaires BCPAP et 8505C.....	128
<b>Figure 32</b> : L'expression de la NOX4 dans les différents compartiments cellulaires des deux lignées cellulaires BCPAP et 8505C. ....	129

# Liste des Tableaux

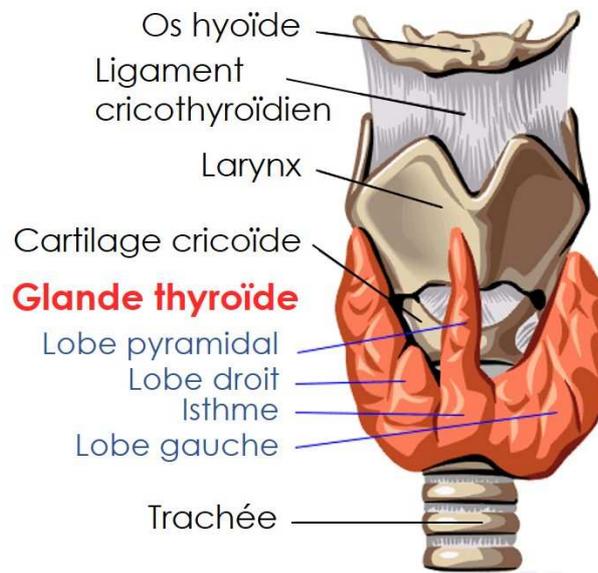
<b>Tableau 1</b> : Les acteurs de l'hormonosynthèse thyroïdienne .....	26
<b>Tableau 2</b> : La distribution tissulaire et les fonctions de la famille de la NADPH oxydase ..	36
<b>Tableau 3</b> : Classification des tumeurs épithéliales de la thyroïde selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS) .....	45
<b>Tableau 4</b> : Les Séquences des différents siRNA .....	81
<b>Tableau 5</b> : Liste et caractéristiques des anticorps primaires et secondaires employés ..	84
<b>Tableau 6</b> : Liste de séquences des amorces et des sondes fluorescentes TaqMan utilisées pour la qRT-PCR afin d'analyser l'expression en ARNm des gènes humains.....	90
<b>Tableau 7</b> : Liste de séquences des amorces utilisées dans la qRT-PCR par le Sybergreen afin d'analyser l'expression en ARNm des gènes.....	90

# Introduction :

## I. La physiologie de la Thyroïde

### 1. Morphologie

La thyroïde est une glande endocrine en forme de papillon qui se situe sur la trachée, dans la région cervical médiane basse, juste en dessous du larynx. Elle est composée de deux lobes latéraux, le lobe droit et le lobe gauche, reliés entre eux par un mince corps central dit l'isthme (Figure 1). La thyroïde est une glande de petite taille mesurant environ 4 cm en largeur et 3 cm en hauteur (pesant entre 15 et 30 g), à peine palpable, en contact avec la trachée et l'œsophage en arrière. Les quatre glandes parathyroïdes placées sur sa face postérieure jouent un rôle dans le métabolisme phosphocalcique (1).

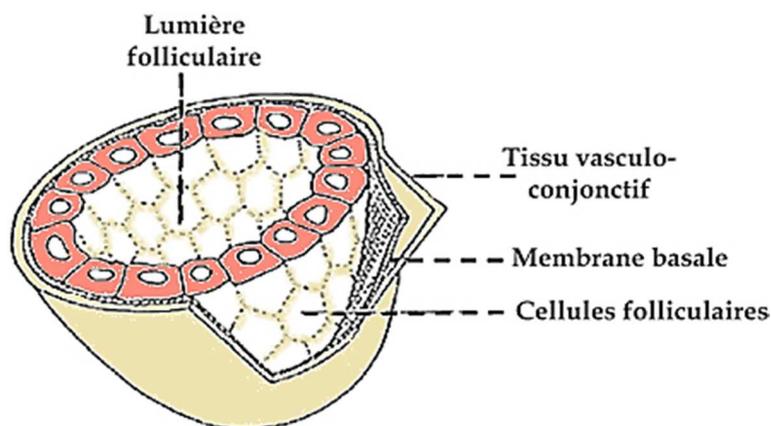


**Figure 1: Localisation de la thyroïde chez l'Homme**

La fonction endocrine de la glande thyroïdienne est assurée principalement par des cellules spécialisées, les thyrocytes ou cellules folliculaires, qui représentent plus de 99 % du parenchyme thyroïdien total et qui sont impliquées dans la synthèse des hormones thyroïdiennes  $T_3$  et  $T_4$ . Il

s'agit de cellules bipolaires (pôle basal et pôle apical) à double fonctionnement : exocrine vers la colloïde et endocrine vers la circulation sanguine (1). La thyroïde comporte par ailleurs des cellules claires (cellules C ou parafolliculaires ou cellules à calcitonine) responsables de la synthèse et de la sécrétion de la calcitonine qui intervient dans la régulation du métabolisme phosphocalcique, ainsi que des cellules endothéliales formant la paroi des vaisseaux sanguins irrigant la glande thyroïdienne et des fibroblastes (1).

L'étude histologique de la glande thyroïdienne montre que les thyrocytes s'organisent en monocouches de cellules épithéliales polarisées, entourant une cavité remplie d'une substance, appelée colloïde, pour former des follicules qui constituent l'unité fonctionnelle de la thyroïde (Figure 2). La colloïde est une substance visqueuse sécrétée par les thyrocytes et très riche en thyroglobuline (Tg) qui est la matrice de l'hormonosynthèse (1).

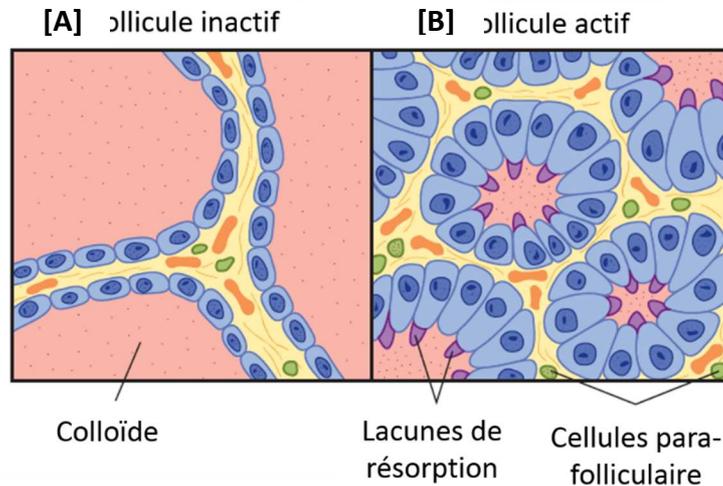


**Figure 2: Follicule thyroïdien**

Les follicules sont d'un diamètre moyen de l'ordre de 200 micromètres (30 à 500  $\mu\text{m}$ ). On peut distinguer deux aspects du follicule thyroïdien (1) (Figure3):

- Follicules en activité (30 à 50  $\mu\text{m}$ ) : avec des cellules folliculaires volumineuses et une colloïde réduite contenant des lacunes de résorption. Les thyrocytes en activité produisent les hormones thyroïdiennes :  $T_3$  et  $T_4$ .

- Follicules inactifs (200 à 500  $\mu\text{m}$ ): les thyrocytes sont en repos, l'épithélium thyroïdien est aplati et la colloïde est importante.



**Figure 3: Histologie d'une glande thyroïde de mammifère. (A)** Structure de follicules thyroïdiens à l'état inactif avec de grandes cavités colloïdales et des thyrocytes en repos. **(B)** Structure de follicules thyroïdiens à l'état actif avec des cavités colloïdales étroites et des thyrocytes en activité.

## 2. Hormones thyroïdiennes

Le rôle physiologique de la thyroïde est la synthèse des hormones thyroïdiennes. Les principaux acteurs impliqués dans l'hormonosynthèse sont: 1) le transporteur de l'iode ( Sodium/iodide ou Natrium Iodide Symporter 'NIS') situé à la membrane basale du thyrocyte, 2) la thyroperoxydase ou peroxydase thyroïdienne (TPO), 3) le système générateur d' $\text{H}_2\text{O}_2$  essentiel à l'activité peroxydasique soit la NADPH oxydase Dual Oxidase 2 (DUOX2), 4) la matrice de l'hormonogénèse soit la Thyroglobuline (Tg) et 5) les canaux potentiels de l'iodure situés au pôle apical du thyrocyte c'est à dire la Pendrine, l'AIT (Apical Iodide Transporter) et ANO1 (Anoctamin-1).

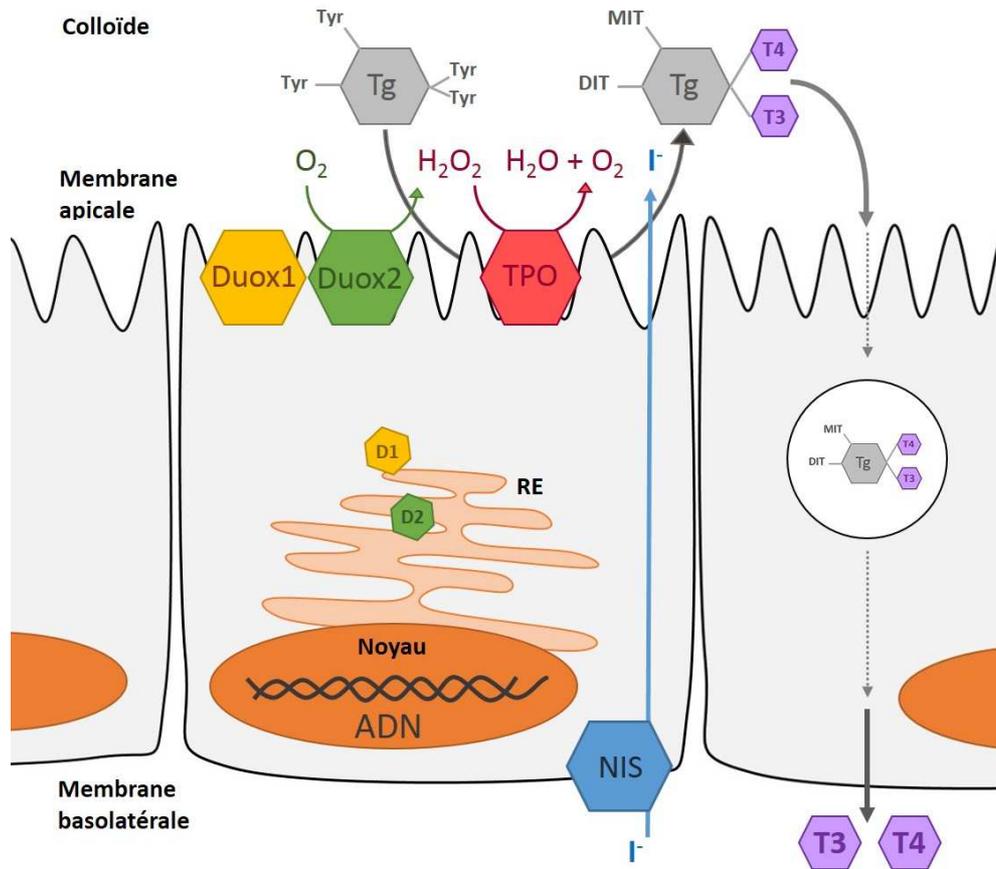
L'expression de ces protéines ainsi que la prolifération et la différenciation des thyrocytes sont sous le contrôle de la TSH 'Thyroid Stimulating Hormone' via son récepteur 'R-TSH'. Un adressage différentiel des acteurs de l'hormonosynthèse vers la membrane apicale ou basale de la cellule est nécessaire pour la synthèse des hormones thyroïdiennes. En effet, le R-TSH et le NIS se localisent au niveau de la membrane basale en contact

avec la circulation sanguine tandis que la TPO, enzyme catalysant la biosynthèse des hormones, et la NADPH oxydase DUOX2 se localisent au niveau de la membrane apicale en contact avec la colloïde. La thyroglobuline (Tg) est quant à elle sécrétée et stockée dans la cavité contenant la colloïde.

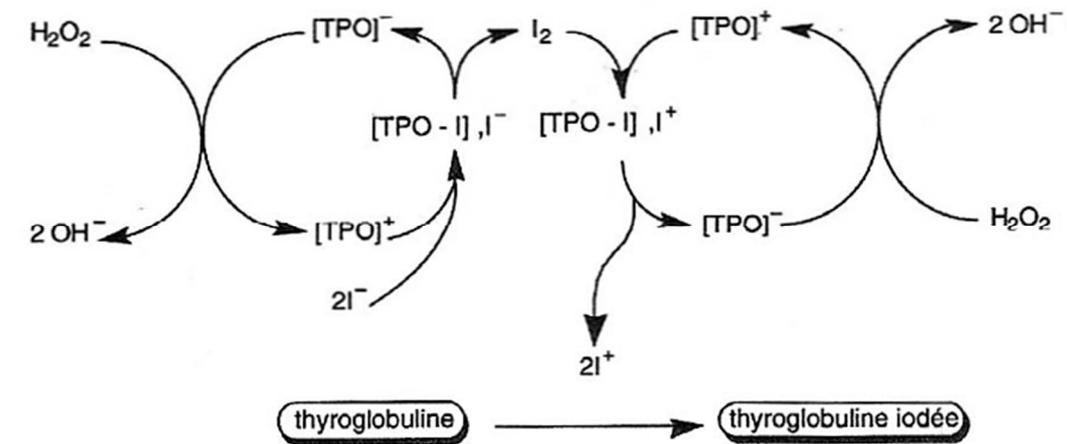
## 2.1 La Biosynthèse des hormones thyroïdiennes et l'organification de l'iode

La synthèse des hormones thyroïdiennes commence par la captation de l'iode ( $I^-$ ) à partir de la circulation sanguine au moyen d'un transporteur appelé NIS, localisé à la membrane basale du thyrocyte (2). Une fois à l'intérieur du thyrocyte, l'iode ainsi capté est transporté du cytoplasme vers la lumière folliculaire à travers la membrane apicale par transport passif *via* un canal (AIT, Pendrine, ANO1) (3).

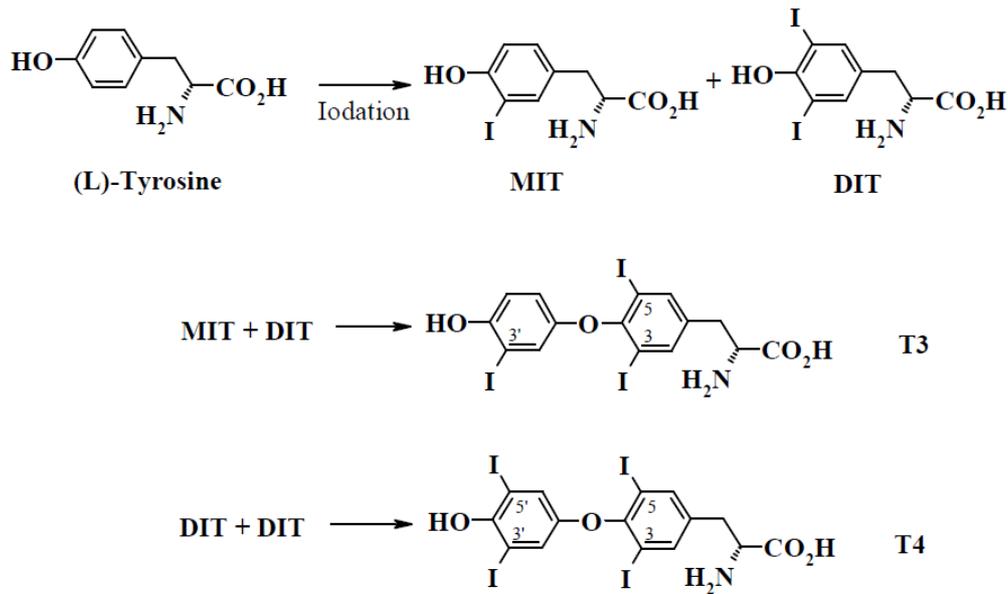
Dans la lumière folliculaire et à la surface apicale du thyrocyte, le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) produit par la NADPH oxydase DUOX2 active la thyroperoxydase (TPO) qui catalyse l'oxydation de l'iode (4) (Figure 4). L'iode oxydé se fixe alors simultanément en position 5 et/ou 3 sur le radical de la tyrosine au niveau des sites hormonogéniques de la thyroglobuline (Tg) formant ainsi des dérivés monoiodés (MIT ou 3-monoiodotyrosine) et diiodés (DIT ou 3-5-diiiodotyrosines), qui sont les précurseurs des hormones thyroïdiennes. Ensuite, la TPO activée par l' $H_2O_2$  catalyse le couplage de deux groupes DIT formant ainsi l'hormone  $T_4$  (la Tétrai-iodo-thyronine ou thyroxine = 3,5,3',5' tétra-iodothyronine), tandis que le couplage entre un groupe DIT et un groupe MIT forme l'hormone  $T_3$  (tri-iodothyronine) (Figure 5). Ainsi les hormones thyroïdiennes  $T_3$  et  $T_4$  restent liées à la Tg sous forme inactive, jusqu'à leur libération dans la circulation sanguine. La thyroglobuline iodée est, quant à elle, stockée dans la lumière folliculaire, réservoir à iode et à hormones thyroïdiennes (4) (Figure 6).



**Figure 4:** Les principaux acteurs de l'hormonosynthèse et les différentes étapes de synthèse des hormones thyroïdiennes



**Figure 5:** Processus oxydatif de l'iodation de la thyroglobuline



**Figure 6: Formation et structure des hormones thyroïdiennes T<sub>3</sub> et T<sub>4</sub>.** La première étape de la formation des hormones thyroïdiennes est la formation des précurseurs MIT (Monoiodotyrosine) et DIT (Diiodotyrosine) via l'iodation de résidus tyrosyls de la thyroglobuline (Tg). Ainsi, les hormones T<sub>3</sub> et T<sub>4</sub> sont formées respectivement par le couplage d'une molécule MIT avec une molécule DIT ou de deux molécules DIT.

## 2.2 Acteurs de l'hormonosynthèse :

**Tableau 1 : Les acteurs de l'hormonosynthèse thyroïdienne**

Acteur de l'hormonosynthèse	Localisation au niveau du chromosome	Nature et taille de la protéine
<b>NIS</b>	Bras court du chromosome 19, position p12-13.2	Membranaire Immature : 70 kDa Mature : 90 – 110 kDa
<b>Duox2</b>	Bras long du chromosome 15 en position 15.3	Membranaire 165 -175 kDa
<b>TPO</b>	Bras court du chromosome 2 en position 25	Membranaire 105 -110 kDa
<b>Tg</b>	Bras long du chromosome 8	Soluble 660 kDa

### a. L'iodure élément majeur de la synthèse des hormones thyroïdiennes

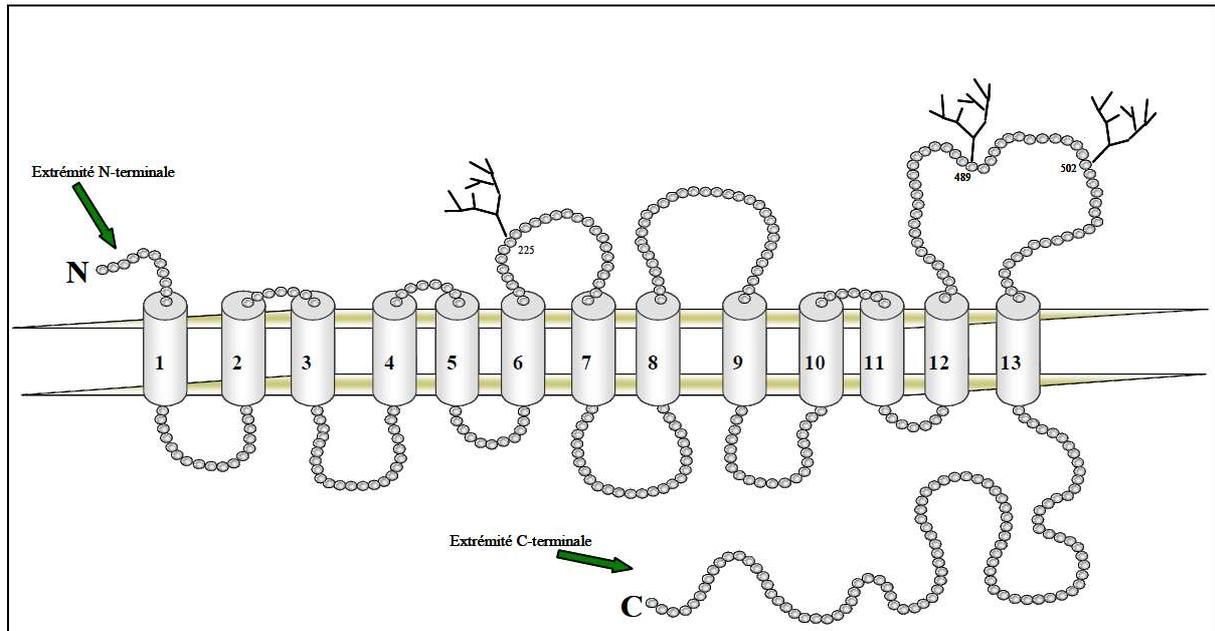
L'iode est un élément chimique appartenant au groupe des halogènes, de symbole « I » et de numéro atomique 53. L'iode est un oligo-élément indispensable à la synthèse des hormones thyroïdiennes T<sub>3</sub> et T<sub>4</sub> (5). Le corps d'un adulte sain contient 15 à 20 mg d'iode dont 70 à 80% est concentré dans

la thyroïde (6). L'iode sous sa forme organique ( $I_2$ ) est absorbé au niveau du tractus intestinal. En fonction des besoins physiologiques, l'iodure ( $I^-$ ) absorbé au niveau de l'estomac et le duodénum, est concentré principalement par les thyrocytes et secondairement par les glandes salivaires, le placenta et les glandes mammaires (6). La source principale de l'iode pour l'organisme est l'alimentation, en particulier celle comportant crustacés et poissons, ajoutée au sel de table supplémenté en iode (7). La quantité recommandée d'iode absorbé par jour dépend de l'âge, du sexe, et de l'état physiologique de l'individu. Chez l'adulte, l'apport journalier optimal doit être de 150  $\mu\text{g}$ . Lors d'une grossesse ou pendant l'allaitement, les besoins augmentent à 200  $\mu\text{g}/\text{jour}$ , alors que les besoins d'un enfant sont compris entre 90 et 120  $\mu\text{g}$  d'iode par jour (8). Il existe également une source endogène d'iode résultant notamment de la désiodation périphérique et intra-thyroïdienne des hormones thyroïdiennes  $T_3$  et  $T_4$ . Chez l'homme, la carence en iode est associée à des troubles sévères de la croissance et à divers désordres mentaux (crétinisme) qui ont été observés en particulier chez les populations éloignées des régions maritimes, notamment en montagne (9).

i. Le transporteur basal de l'iode : NIS (Natrium Iodide Symporter)

Le transport de l'iode de l'interstitium vers le cytoplasme des thyrocytes est réalisé grâce au symporteur Sodium/Iodure ou NIS. La protéine NIS est codée par le gène SLC5A5, membre de la famille des gènes SLC5A (pour Solute Carrier Family 5A). Ce gène, qui contient 14 introns et 15 exons, est situé au niveau du bras court du chromosome 19, position p12-13.2 (10). Le NIS humain est une protéine constituée de 643 acides aminés, dont la séquence codante a été déterminée et clonée sur la base de son homologie avec celle du Rat (11), dont le clonage a été réalisé en premier à partir d'ADNc issus de la lignée cellulaire de rat FRTL5 (Fischer rat thyroid line)(12).

La structure secondaire proposée de la protéine NIS humaine possède 13 domaines transmembranaires (I à XIII), avec une extrémité N-terminale extracellulaire et une extrémité C-terminale intracellulaire (Figure 7) (13).

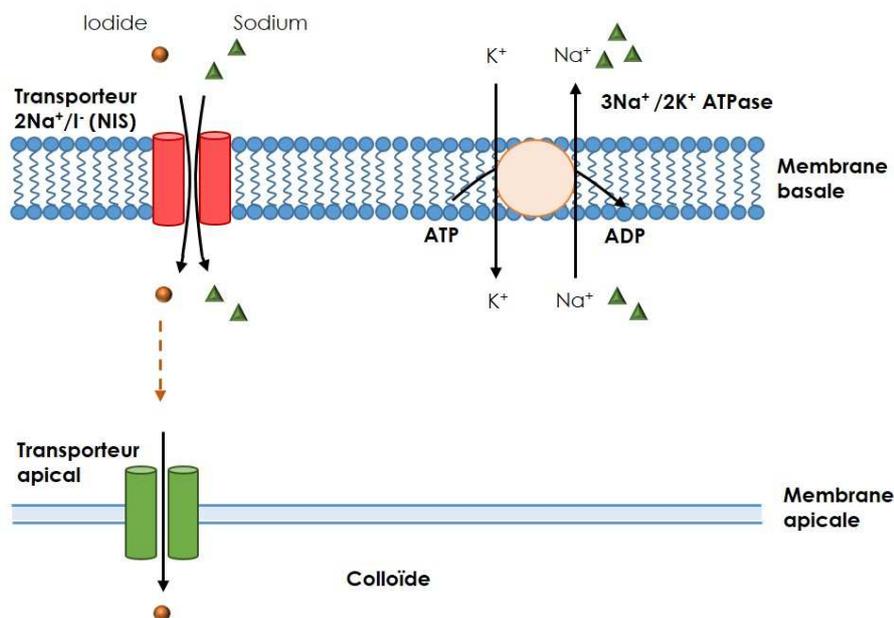


**Figure 7 : Topologie du transporteur sodium/iodure NIS humain.** La figure présente la structure secondaire du NIS formée de 13 segments transmembranaires avec les trois sites de N-glycosylation en position : Asn225, Asn485 et Asn502. Les flèches vertes indiquent les extrémités intra ou extracellulaire confirmées expérimentalement.

La protéine NIS peut subir des modifications post-traductionnelles comme la glycosylation, et la phosphorylation. L'étape de glycosylation a lieu principalement au niveau du réticulum endoplasmique (RE) et continue dans l'appareil de Golgi. Elle détermine la trans-localisation membranaire de la protéine NIS mature et fonctionnelle (14). Trois sites de N-glycosylation sur des résidus Asparagine ont été caractérisés: Asn225, Asn485 et Asn502 (15, 16). Le taux de glycosylation détermine alors la taille de la protéine NIS, qui peut être de 70 kDa pour une protéine non ou partiellement glycosylée, jusqu'à 90 - 110 kDa pour une protéine hautement glycosylée (16). Le NIS possède également plusieurs sites potentiels de phosphorylation spécifiques pour plusieurs kinases. Il s'agit essentiellement de résidus thréonine dont on peut énumérer, entre autres: les résidus Thr557 et Thr571 et aussi Thr274 et Thr553, cibles des protéines kinases A et C (PKA et PKC) respectivement (17). Une étude chez le rat a identifié de nouveaux sites de phosphorylation sur des résidus Serine de la protéine rNIS comme : Ser43, Ser227, Ser581. Ceux-ci ne sont pas forcément conservés chez l'homme. Cependant, très peu d'études ont été menées sur l'état de phosphorylation du NIS humain (18). La

phosphorylation régule essentiellement la fonction de captation de l'iode du NIS, ainsi que sa stabilité conformationnelle et structurale à la membrane basale du thyrocyte. Le NIS peut être également régulé négativement. En effet, la protéine PBF (Pituitary tumor-transforming gene 'PTTG'-binding factor) en favorisant la rétention intracellulaire du NIS empêche sa régulation post-traductionnelle ainsi que son transport à la membrane où il est actif (19-21).

Le NIS permet le transport actif des ions iodures contre leur gradient grâce au flux des ions  $\text{Na}^+$  dans le sens de leur gradient électrochimique. Deux cations de sodium  $\text{Na}^+$  sont nécessaires pour l'entrée d'un ion iodure  $\text{I}^-$ . Ainsi, le NIS utilise la translocation des ions  $\text{Na}^+$  via le gradient électrochimique généré par la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, pour effectuer le co-transport de l'iode lequel, après avoir atteint le cytoplasme, est ensuite transféré à la lumière folliculaire par des canaux situés au niveau de la membrane apicale du thyrocyte (22) (Figure 8).



**Figure 8 : Transport de l'iode vers l'intérieur du thyrocyte.** La figure présente un schéma explicatif du processus de transport actif de l'iode via le NIS (Natrium Iodide Symporter) dans le thyrocyte. Deux cations de sodium  $\text{Na}^+$  entrent simultanément qu'un ion iodure  $\text{I}^-$ . Les ions  $\text{Na}^+$  sont relargués vers l'extérieur du thyrocyte via le gradient électrochimique généré par la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase. L'iode absorbé traverse le cytoplasme et ensuite il est transféré vers la lumière folliculaire par des canaux situés au niveau de la membrane apicale du thyrocyte.

En plus des cellules folliculaires de la thyroïde (5), le NIS est également exprimé dans plusieurs autres tissus dont les glandes salivaires, la muqueuse gastrique et les glandes mammaires en lactation (15).

ii. Le transport apical de l'iode :

Plusieurs canaux ont été décrits dans la littérature pour leur rôle dans l'efflux de l'iode à travers la membrane apicale du thyrocyte vers la lumière folliculaire. Deux canaux potentiels ont, dans un premier temps été décrits : la Pendrine et l'AIT (Apical Iodide Transporter).

La Pendrine est une glycoprotéine membranaire hautement hydrophobe située à la membrane apicale des thyrocytes (23). Elle appartient à la famille des SLC26A, et est codée par le gène SLC26A4 qui est localisée sur le chromosome en position 7q21-31 (24). La Pendrine comporte 780 acides aminés et contient trois sites de glycosylation extracellulaires sur des résidus d'Asparagine (23, 25). La structure secondaire proposée de la Pendrine possède 12 domaines transmembranaires avec les deux extrémités N- et C-terminales du côté intracellulaire (26). Les études fonctionnelles initiales de la Pendrine faites dans des ovocytes de *Xenopus* ont démontré qu'elle peut assurer le transport des ions chlorure et iodure à travers la membrane (27). Plusieurs éléments ont suggéré un rôle dans le transport de l'iode au pôle apical : 1- sa capacité à transporter l'iodure, 2- sa localisation à la membrane apicale des thyrocytes (23, 28) et 3- un défaut d'organification de l'iode observée chez les patients ayant une mutation inactivante dans le gène SLC26A4 codant la Pendrine et responsable du syndrome de Pendred (28). Cependant d'autres arguments au contraire indiquent que la Pendrine n'est pas essentielle pour ce transport comme, par exemple, l'argument soulignant que les souris déficiente pour la Pendrine ont un fonctionnement normal de la thyroïde (29).

L'AIT ou Apical Iodide Transporter est un autre transporteur potentiellement impliqué dans le transport apical de l'iode. Il est codé par le gène SLC5A8 (chromosome 12q23). L'AIT a été identifié et cloné par *Rodriguez et Coll*, à partir d'ADNc issus de cellules rénales humaines. Sa séquence

primaire est composée de 610 acides aminés. De manière intéressante, sa structure secondaire présente 70% de similarité avec le NIS (30). L'étude immunohistochemique de tissus thyroïdiens humains a montré une localisation apicale au niveau des thyrocytes et l'étude de son activité a mis en évidence sa capacité à transporter l'iode. Ces éléments ont conduit à son appellation « Apical Iodide Transporter » (30, 31).

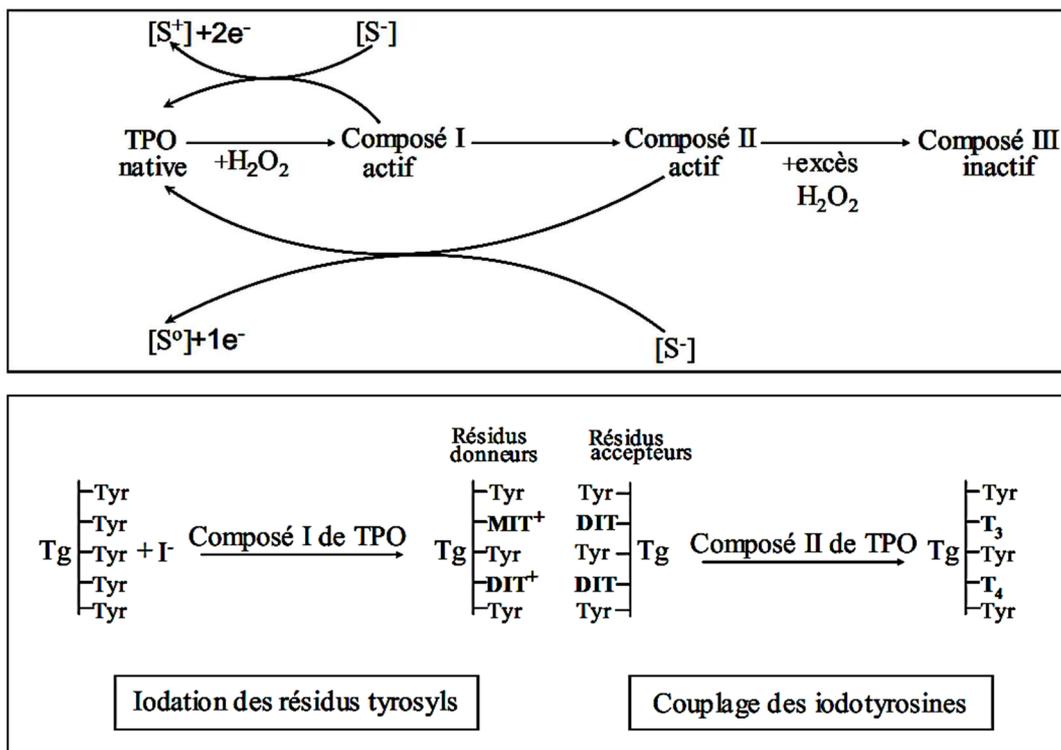
Récemment un autre canal a été identifié. Il s'agit de l'Anoctamin-1 ou TMEM16A, (ANO1) un canal dépendant du calcium capable d'exporter l'iode à partir de cellules thyroïdiennes. Il semble que ce canal soit principalement celui impliqué dans la libération de l'iode dans la lumière folliculaire (32).

#### b. La peroxydase thyroïdienne ou la thyroperoxydase (thyroid peroxidase : TPO)

Le gène qui code la TPO humaine est localisé au niveau du bras court du chromosome 2 en position 25. La TPO est une hémoprotéine membranaire glycosylée d'un poids moléculaire d'environ 105 à 110 kDa. Insérée dans les microvillosités de la membrane apicale du thyrocyte, elle est formée d'un court segment transmembranaire carboxy-terminal, et d'un long segment N-terminal extracellulaire orienté vers l'espace colloïdal en contact avec la Tg. Le domaine N-Terminal contient cinq sites potentiels de N-glycosylation (33). La protéine TPO possède une zone d'homologie avec la myéloperoxydase (MPO) au niveau de son extrémité N-terminale extracellulaire (34), qui contient en particulier deux histidines: une proximale : l'Histidine 494 et l'autre distale : l'Histidine 239, susceptible de coordonner l'hème de l'enzyme TPO (35). L'hème forme le centre redox ou actif de la TPO qui est composé d'une partie organique (4 noyaux pyrroles : la porphine) et d'un ion métallique (le fer ferrique :  $Fe^{3+}$ ) (36). Par ailleurs, l'incorporation de la molécule de l'hème joue un rôle important dans l'adressage de la TPO humaine à la membrane apicale (37).

Durant le cycle peroxydasique, le transfert des électrons est assuré par le centre redox : Fer + Porphyrine symbolisé par (Fe,Po) (36). Suite à

l'oxydation de la TPO par l' $\text{H}_2\text{O}_2$ , l'enzyme native ( $\text{Fe}^{\text{III}},\text{Po}$ ) perd 2 électrons (Figure 9A). Le premier électron est arraché du fer qui passe de l'état ferrique ( $\text{Fe}^{\text{III}}$ ) à l'oxoferyl ( $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ ) et le second électron est arraché de la porphyrine. Le composé I ainsi formé ( $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O},\text{Po}^{\circ+}$ ) est très instable. Il peut arracher 2 électrons à un substrat pour reformer la TPO native comme il peut arracher 1 électron à un substrat pour former un composé II stable ( $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O},\text{Po}$ ). En présence d'un excès d' $\text{H}_2\text{O}_2$ , le composé II peut se transformer en un composé III inactif : Oxoferroperoxydase ( $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{O}_2,\text{Po}$ ) (38). Les composés I et II actifs de la TPO catalysent l'iodation des résidus tyrosyls de la thyroglobuline (Tg) et leur couplage hormonogène, pour former la T3 et la T4 suite à la condensation de deux molécules MIT et DIT ou deux DIT respectivement (Figure 9B).



**Figure 9 :** Le cycle peroxydasique et le couplage hormonogène des résidus tyrosyls. **(A)** : Oxydation de la TPO par l' $\text{H}_2\text{O}_2$  et formation des composés de la TPO. **(B)** : Les composés I et II actifs de la TPO catalysent l'iodation des résidus tyrosyls de la thyroglobuline (Tg) et leur couplage hormonogène

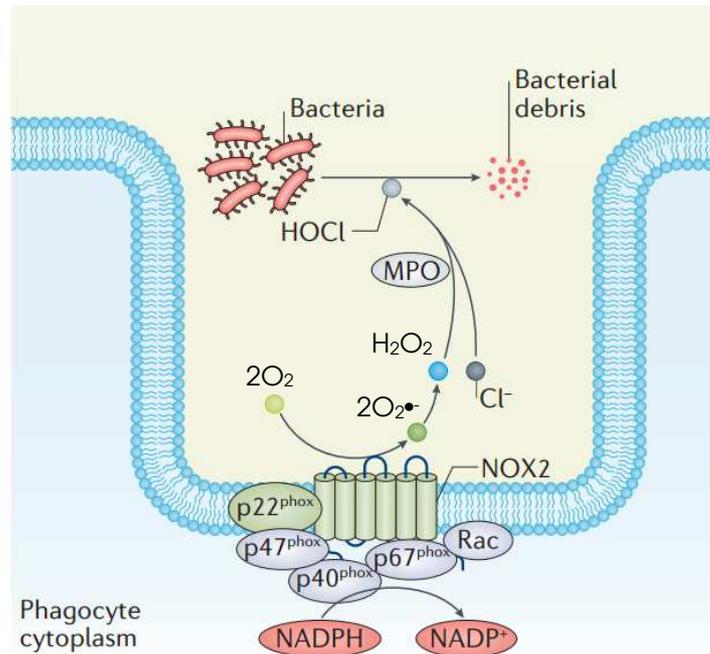
### c. Le système générateur d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> thyroïdien : DUOX2

L'activité catalytique de la thyroperoxydase requiert le peroxyde d'hydrogène (39). La production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est régulée positivement par la TSH (40) et par le calcium (41). L'enzyme responsable de la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est la NADPH oxydase DUOX2. Le gène qui code la DUOX2 est localisé au niveau du bras long du chromosome 15 en position 15.3.

Les NADPH oxydases ou NADPH oxydoréductases sont des flavoprotéines à hème capables d'oxyder le NADPH cytosolique, de transférer deux électrons *via* le co-facteur FAD à deux hèmes transmembranaires pour réduire deux molécules d'oxygènes de l'autre côté de la membrane et former ainsi de l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) qui lui peut dismuter spontanément ou en présence d'une superoxyde dismutase (SOD) en peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (42).



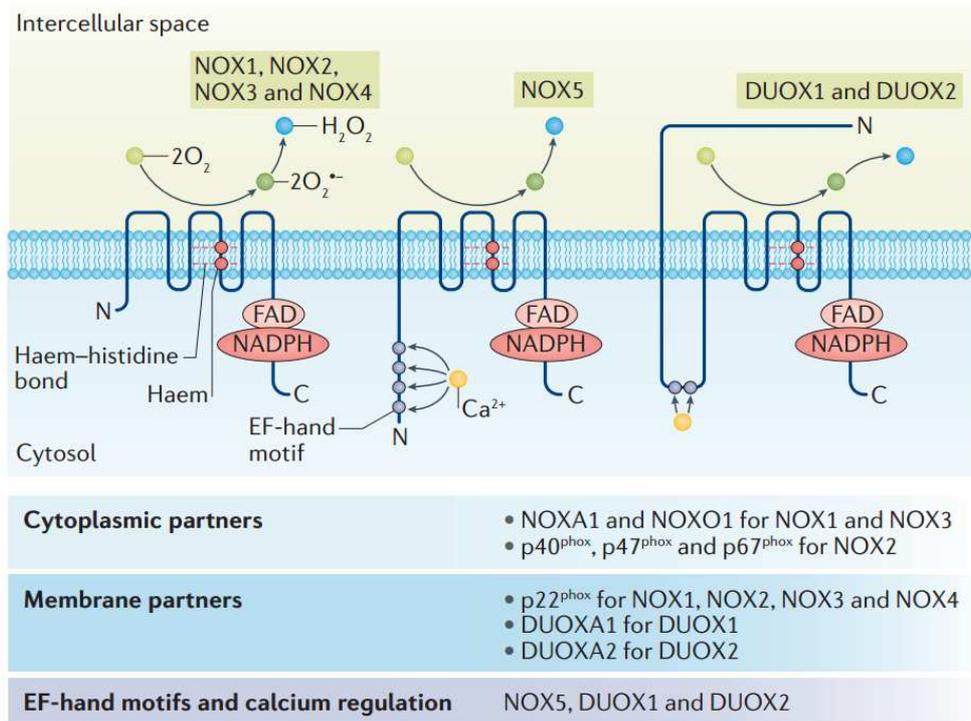
La NADPH oxydase des phagocytes (gp91<sup>phox</sup> ou Nox2) est la NADPH oxydase qui a été identifiée la première. Cette NADPH oxydase joue un rôle primordial dans la défense immunitaire innée; et un déficit dans la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par la NOX2 est associée à la maladie granulomateuse chronique (43, 44) (Figure 10). C'est la plus connue et donc la plus étudiée (45).



**Figure 10 : Le rôle de NOX2 dans la défense phagocytaire de l'immunité innée (46).**

Dans des conditions de repos, l'oxydase phagocytaire NOX2, forme avec la p22<sup>phox</sup> un hétérodimère membranaire non-actif connu sous le nom de flavocytochrome b558. Après stimulation, les facteurs cytosoliques p67<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup> et les protéines Rac (Rac1 ou Rac2) sont transférés vers la membrane plasmique et associées au flavocytochrome. Cette translocation conduit à la formation d'un complexe NADPH oxydase activé. Dans le phagocyte, la génération de ROS par ce complexe NOX2 actif conduit à la production d'acide hypochloreux (HOCl) par la myéloperoxydase (MPO), ce qui contribue à la destruction des bactéries.

Au début des années 2000 six homologues ont été découverts. Ces protéines constituent dorénavant la famille des NOX/DUOX composée de 7 membres: NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 et DUOX2 (Figure 11) (47). Les cinq NOXs : NOX1, NOX2 (ou gp91<sup>phox</sup>), NOX3, NOX4 et NOX5 sont des protéines à six segments transmembranaires. Les deux DUOXs : DUOX1 et DUOX2, identifiées en premier lieu dans la thyroïde et clonées respectivement par De *Deken et al* (48) et Dupuy *et al* (49), se différencient des autres membres de la famille par la présence d'un septième domaine transmembranaire suivi d'un large domaine N-terminal extra-cellulaire présentant une homologie avec la TPO (région TPO-like), d'où le nom de DUOX pour dual oxydase faisant référence à une dualité d'homologie avec la fois les NADPH oxydases et les peroxydases. Les protéines NOX5, DUOX1 et DUOX2 possèdent des sites potentiels de liaison du calcium dites EF-hand, impliqués dans la régulation de la génération de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (46) (Figure 11).



**Figure 11 : La famille des NADPH oxydases (NOXs/DUOXs) (46).** **DUOX1**: Dual-oxydase 1, **DUOX2**: Dual-oxydase 2, **FAD**: Flavine adénine dinucléotide, **DUOXA**: Dual Oxidase Activator, **NOXA**: NADPH Oxidase Activator, **NOXO**: NADPH Oxidase Organisator, **p22<sup>phox</sup>**, **p40<sup>phox</sup>**, **p47<sup>phox</sup>**, **p67<sup>phox</sup>**. P : protéine. 22-40-47-67 : masse moléculaire prédite en kDa.

Les NADPH oxydases : NOX1, NOX2 et la NOX3 ont besoin de partenaires cytosoliques pour s'activer (NOXA1 et NOXO1 pour NOX1 et NOX3 ; p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> et p67<sup>phox</sup> pour NOX2). Par ailleurs, NOX2, NOX4 et les deux DUOXs requièrent des partenaires membranaires pour leur activité et leur maturation (p22<sup>phox</sup> pour NOX2 et NOX4 ; DUOXA1 et DUOXA2 pour DUOX1 et 2, respectivement) (Tableau 2).

**Tableau 2: La distribution tissulaire et les fonctions de la famille de la NADPH oxydase (46).**

NOX	ROS species	Tissue expression	Function	Involvement in human diseases
NOX1	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Digestive tract, vascular system	Host defence, blood pressure regulation, proliferation of smooth muscle (speculative)	NA
NOX2	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Phagocytes, vascular system	Host defence (verified), signalling (speculative)	Chronic granulomatous disease
NOX3	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Inner ear	Otoconia formation (verified)	NA
NOX4	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Kidney, thyroid, vascular system, heart, skeletal muscle, fibroblast	Vasoregulation, signalling (speculative)	NA
NOX5	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Lymph node, testis	Spermatogenesis (speculative)	NA
DUOX1	• Immature*: O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> • Mature†: H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Thyroid, respiratory tract, digestive tract, salivary glands, skin	Host defence, signalling (speculative)	NA
DUOX2	• Immature*: O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> • Mature†: H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Thyroid, respiratory tract, digestive tract, salivary glands	Thyroid hormone synthesis (verified), host defence (speculative)	Congenital hypothyroidism

**NOX1** est également connu sous oxidase1 mitogène parce que sa première fonction identifiée était dans la croissance cellulaire. **NOX4** est également nommé Renox (oxydase rénale) car elle a été identifiée la première fois dans le rein. Les Duoxs sont appelées aussi Thox (thyroïde-oxydase), car elles ont été identifiées la première fois dans la glande thyroïde. **Immature\*** désigne des protéines en l'absence de leur facteur de maturation. **Mature †** se réfère à des protéines en présence de leur facteur de maturation. **DUOX**: dual-oxidase; **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**: le peroxyde d'hydrogène; **NA**: not applicable; **NOX**: la NADPH oxydase; **O<sub>2</sub><sup>•-</sup>**: l'anion superoxyde.

Les NADPH oxydases sont exprimées dans une grande variété de tissus où elles régulent la fonction cellulaire à un niveau moléculaire via une réaction d'oxydo-réduction (46). A travers leur capacité de générer les ROS (reactive oxygen species), les NOXs jouent un rôle dans diverses fonctions physiologiques: défense immunitaire, régulation de la pression artérielle, signalisation et prolifération cellulaire...etc (Tableau 2).

La thyroïde exprime 3 NOXs ainsi que leurs partenaires : DUOX1 et son facteur de maturation DUOX1A1, DUOX2 et son facteur de maturation DUOX2A1 ainsi que NOX4 et la protéine p22<sup>phox</sup>. Parmi les deux DUOXs, DUOX2, est considérée comme la forme dominante au niveau de la thyroïde (46). Le rôle physiologique de DUOX1 dans la thyroïde reste inconnu à ce jour. En revanche le rôle physiologique de DUOX2 dans la biosynthèse des hormones thyroïdiennes est démontré par l'identification de patients souffrant d'hypothyroïdie due à des mutations du gène *DUOX2* (50) (Tableau 2). Par ailleurs, aucune fonction physiologique n'est également attribuée jusqu'à maintenant à la NADPH oxydase NOX4 dans la thyroïde.

#### d. La Thyroglobuline (Tg) et ses sites hormonogéniques

Le gène qui code pour la thyroglobuline humaine (Tg) est localisé au niveau du bras long du chromosome 8. Il code pour une protéine de 2749aa. Il s'agit d'un homodimère glycoprotéique soluble de 660 kDa. La Tg, constituée de deux sous-unités de 330 kDa, est une protéine spécifique de la thyroïde. Elle est stockée dans la lumière folliculaire où elle constitue jusqu'à 95% des protéines de la colloïde (51). La Tg est une pro-hormone qui contient des résidus tyrosines (Tyr) susceptibles d'être iodées. Elle contient des séquences consensus qui peuvent favoriser l'iodation notamment: Glu/Asp-Tyr, et Ser/Thr-tyr-Ser qui favorisent respectivement la formation de T<sub>4</sub> et T<sub>3</sub> après le couplage de certains résidus tyrosines iodés (52). *Lamas L. et Col.*, ont identifié les sites hormonogéniques sur le monomère de la thyroglobuline humaine (52). En fait, 14 acides aminés iodés sur résidus tyrosine, ont été localisés sur la structure primaire de la Tg, dont 5 sont des iodothyronines (T<sub>4</sub> et T<sub>3</sub>), et 9 sont des iodotyrosines (MIT et DIT). Sur l'ensemble des résidus tyrosine iodés, les Tyr<sup>130-847-1447</sup> sont des résidus dits donneurs c'est à dire susceptibles de donner leur iodotyrosines aux résidus Tyr<sup>5-685-2553</sup> dits accepteurs, aussi nommés sites hormonogéniques, pour former les iodothyronines (52).

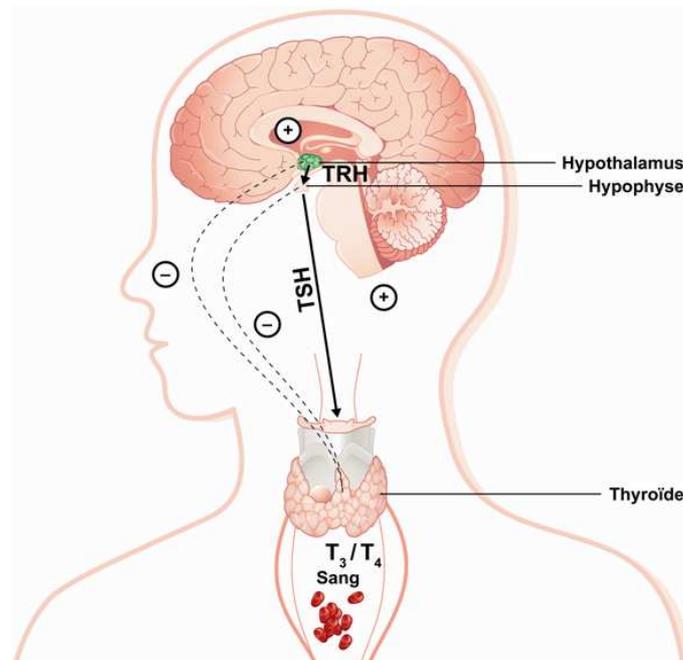
La Tg assure également le stockage de l'iode et des HT, ce qui permet à la thyroïde d'assurer un fonctionnement normal et donc de lui conférer un état dit euthyroïdien et par la même de compenser une éventuelle déficience alimentaire en iode (1).

### 2.3 Régulation de l'hormonosynthèse:

La fonction de la glande thyroïde dépend principalement de l'hypothalamus, de l'hypophyse et de l'apport en iode.

Le contrôle hypothalamo-hypophysaire de la synthèse des hormones thyroïdiennes est assuré par l'hormone hypophysiotrope (TRH : thyrotropin-releasing hormone), synthétisée au niveau de l'hypothalamus, qui stimule après sécrétion la synthèse d'une autre hormone dite l'hormone thyroïdienne (TSH : Thyroïdostimuline ou Thyroid stimulating hormone), au niveau de l'hypophyse antérieure (Figure 12). D'une part, une diminution de la

concentration plasmatique des hormones thyroïdiennes entraîne, sous l'action de TRH, une potentialisation de la sécrétion de la TSH qui participe à la régulation transcriptionnelle de l'expression des principaux acteurs de la biosynthèse des hormones thyroïdiennes, via la liaison spécifique de la TSH à son récepteur R-TSH. Néanmoins cette régulation transcriptionnelle peut se faire indépendamment de l'action TSH, via des facteurs de transcription comme Nkx-2.1 (aussi connu comme TTF-1), FOXE1 (connu comme TTF-2) et Pax8 (53, 54). D'autre part l'iode joue également un rôle autorégulateur sur sa propre captation par les thyrocytes ainsi que sur la synthèse des hormones thyroïdiennes. Cependant, les mécanismes de ces effets régulateurs demeurent encore mal connus et complexes.



**Figure 12: Contrôle hypothalamo-hypophysaire de la fonction thyroïdienne**

a. Régulation transcriptionnelle:

i. Régulation transcriptionnelle via le R-TSH

Le gène qui code le récepteur de la TSH (R-TSH) est localisé au niveau du bras long du chromosome 14. Il code une protéine de 764 acides aminés. Le R-TSH est un récepteur couplé à la protéine G, partageant la même structure classique de la famille des récepteurs serpentine, avec sept segments transmembranaires et un domaine amino-terminal extracellulaire

volumineux contenant six sites potentiels de N-glycosylation. Ce dernier détermine la spécificité de liaison hormonale du récepteur au ligand TSH (55, 56), tandis que le couplage à la protéine G se fait par la partie carboxy-terminale intracellulaire.

La TSH joue un rôle majeur dans la physiologie thyroïdienne. En se liant à son récepteur, elle induit l'activation de plusieurs voies de signalisation dont la voie de l'AMP cyclique (AMPC), et la voie de la phospholipase C (PLC) (57).

L'activation de la voie AMPC, se fait par l'intermédiaire de la protéine  $G_s$ , qui active l'adénylate cyclase, laquelle engendre une augmentation de la concentration intracellulaire en AMPC (58). La cible connue 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 alors activées. La voie AMPC induit en particulier l'expression du gène *SCL5A5* codant le NIS (59), en promouvant notamment la phosphorylation par la PKA d'un facteur de transcription de la famille CREB qui va réguler la transcription du gène en se fixant à un élément de réponse de type CRE (cAMP response element) situé dans la partie « enhancer » de la région promotrice du gène, dite NUE (NIS Upstream Enhancer). La TSH contrôle l'expression non seulement du gène codant le NIS mais aussi celle des autres marqueurs de différenciation thyroïdienne tel que la thyroglobuline (Tg), la thyroperoxydase (TPO) et le récepteur TSH (TSHR).

Quant à la deuxième voie de signalisation par la phospholipase C (PLC), il a été observé *in vitro* avec des thyrocytes humains qu'elle est activée avec une concentration en TSH 10 fois plus élevée que celles favorisant l'activation de la voie AMPC. L'activation de la voie des phospho-inositides se fait via la sous-unité  $\alpha$  de la protéine  $G_{q/11}$  qui va à son tour activer la PLC- $\beta$ . Ceci conduit à la formation de seconds messagers : le DAG (Diacylglycerol) (60) et l'IP3 (inositol 1,4,5-triphosphate (61, 62) ce qui entraîne la libération de calcium du réticulum endoplasmique (RE). Cette voie régule notamment l'exocytose et la production d' $H_2O_2$ .

## ii. Régulation transcriptionnelle via des facteurs de transcription

Les facteurs de transcription TTF-1 (Thyroid Transcriptional Factor 1, NKX2-1), TTF-2 (Thyroid Transcriptional Factor 2, FOXE1), PAX8 (Paired box 8) et plus récemment HHEX (Haematopoietically-expressed homeobox protein), exprimés simultanément dans la thyroïde, ont été montrés être impliqués collectivement dans la régulation de la fonction et du développement de la glande thyroïde (63). TTF-1 et PAX8 sont les plus étudiés pour leurs rôles fonctionnels dans la régulation de l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse des hormones thyroïdiennes, comme : NIS, Tg, TPO et R-TSH (53). Les promoteurs des gènes de la Tg et de la TPO présentent notamment trois sites de liaison pour TTF-1, et un seul site de liaison pour PAX8 (64). Par ailleurs, PAX8 est impliqué dans la régulation transcriptionnelle du gène NIS de rat (65, 66).

### b. Autorégulation de la captation de l'iode

L'iode peut avoir un double effet sur la synthèse des hormones thyroïdiennes : il est activateur à faible concentration et inhibiteur à forte concentration. En 1948, *J. Wolf et I.L. Chaikoff*, ont observé que l'augmentation d'iode plasmatique bloque transitoirement son organification et donc la synthèse des hormones (67). Ce processus est connu comme l'effet Wolff-Chaikoff. Depuis, certaines cibles de l'iode ont été identifiées. *Corvilain B et Col.*, ont montré que l'excès d'iode inhibe la génération d' $H_2O_2$  stimulée par la TSH dans des coupes de thyroïde de chien (68). Plus tard, *Morand S et Col.*, ont montré que cet effet se faisait par une régulation négative de l'expression de la forme mature de la NADPH oxydase DUOX2, responsable de la production d' $H_2O_2$  (69).

## 2.4 Sécrétion et transport des hormones thyroïdiennes

Pour que les hormones thyroïdiennes exercent leur fonction au niveau de l'organisme, elles doivent être libérées de la Tg et sécrétées dans la circulation sanguine pour agir au niveau de leurs cibles tissulaires périphériques. Selon le besoin physiologique de l'organisme humain, environ

100 µg d'hormones sont secrétées par la thyroïde tous les jours. Les hormones thyroïdiennes sont majoritairement secrétées sous forme de  $T_4$ , alors que seulement 10 % est secrétée sous forme de  $T_3$  (70).

La Tg mature contenant les hormones thyroïdiennes stockée dans la colloïde, est internalisée sous l'action de la TSH dans le thyrocyte, par un mécanisme d'endocytose. Les vésicules d'endocytose fusionnent ensuite avec les lysosomes, et la protéolyse de la Tg-( $T_3$  - $T_4$ ), par des enzymes lysosomiales, permet la libération des hormones thyroïdiennes ( $T_3$  et  $T_4$ ) ainsi que les résidus MIT et DIT dans la circulation sanguine. Le squelette peptidique de la Tg est ensuite dégradé dans les lysosomes. Les iodotyrosines (MIT-DIT) sont désiodées par des iodotyrosines déshalogénases microsomiales (DEHAL1), permettant ainsi le recyclage des ions iodures dans le thyrocyte (71).

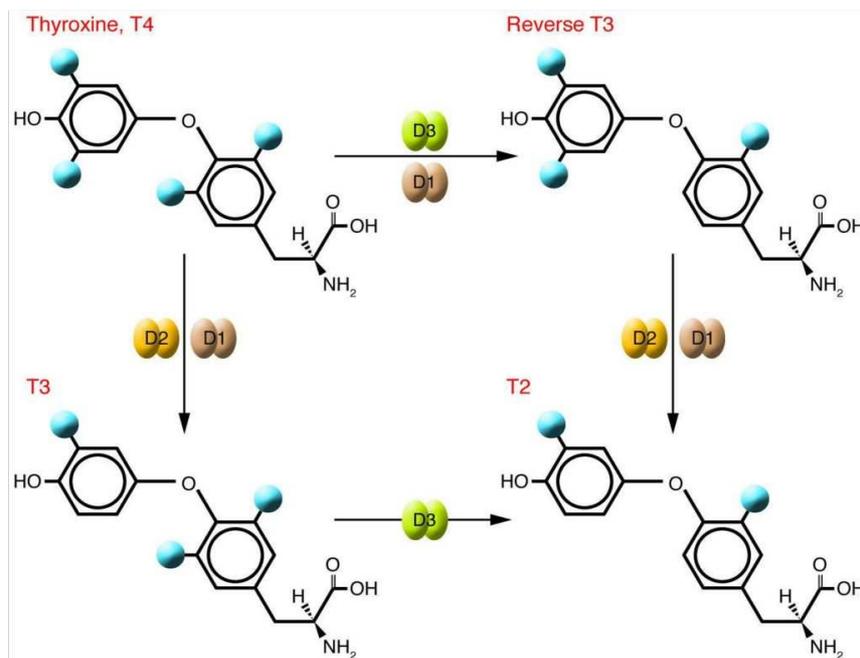
Les hormones thyroïdiennes sont des hormones généralement lipophiles, quasiment insolubles dans l'eau. Une fois libérées dans la circulation sanguine, elles sont très rapidement liées à des protéines sériques pour être transportées vers leurs cibles tissulaires. La partie majoritaire de ces hormones se lie à la Thyroxin-Binding Globulin (TBG) qui transporte 70 % des hormones thyroïdiennes, alors que 10% à 15% se lie à la transthyrétine (TTR) ou Thyroxin Binding Prealbumine (TBPA), puis vient l'albumine qui présente une affinité beaucoup plus faible. Cependant seule une concentration de 0,5 % des hormones thyroïdiennes secrétées se trouve sous forme libre dans la circulation (72).

## 2.5 Métabolisme des hormones thyroïdiennes

La thyroïde secrète majoritairement de la thyroxine ( $T_4$ ). Néanmoins la 3,3',5-tri-iodothyronine ( $T_3$ ) est la forme active des hormones thyroïdiennes qui se lie activement aux récepteurs nucléaires des cellules cibles (73). Le métabolisme des hormones thyroïdiennes est donc déterminé par la concentration intracellulaire en  $T_3$  qui dépend de trois différents paramètres, la concentration en  $T_3$  dans la circulation sanguine, le transport des hormones thyroïdiennes à travers la membrane cytoplasmique des cellules cibles et le

processus de la désiodation de la pro-hormone  $T_4$  en  $T_3$ , en présence des iodothyronine désiodases.

Trois désiodases ont été caractérisées comme des séléno-protéines homologues : 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). Ces trois iodothyronines désiodase se distinguent par leur distribution tissulaire, leur spécificité catalytique, et leur fonctions physiologiques (74, 75). En général, la D1 et la D2 sont des enzymes activatrices, dont le rôle principal est la conversion de  $T_4$  en  $T_3$  active. Alors que la D3 catalyse la dégradation ou bien l'inactivation de  $T_4$  en  $T_3$  inverse ( $rT_3$ ), ainsi que la  $T_3$  en  $3,3'T_2$  (76) (Figure 13).



**Figure 13 :** Les réactions de bases des trois désiodinases D1, D2 et D3

### 3. Rôle des hormones thyroïdiennes

Les principaux effets des hormones thyroïdiennes se produisent par l'intermédiaire des récepteurs nucléaires qui induisent des changements dans l'expression des gènes cibles. Bien que les hormones thyroïdiennes soient secrétées sous deux formes Tétrai-iodothyronine ( $T_4$ ) et Tri-iodothyronine ( $T_3$ ), cette dernière, étant la forme active, se lie aux récepteurs d'hormones

thyroïdiennes (TRs). Il s'agit de deux isoformes différentes: TR $\alpha$  et TR $\beta$ . L'isoforme TR $\alpha$  est fortement exprimée dans le tissu cardiaque, les muscles et les tissus adipeux, alors que l'isoforme TR $\beta$  est principalement exprimée dans le foie. Les TRs agissent comme des facteurs de transcription dépendants du ligand, contrôlant l'expression de gènes impliqués dans plusieurs fonctions physiologiques régulées par les hormones thyroïdiennes.

Les Hormones thyroïdiennes sont indispensables au métabolisme général de l'organisme, elles participent à la régulation de la consommation de l'énergie et la thermorégulation facilitant la thermogenèse adaptative (77). Le métabolisme du glucose est également influencé par le taux des hormones thyroïdiennes, leur l'excès engendre une action hyperglycémiant, due à la stimulation de la production de glucose au niveau hépatique, ainsi que la réduction, en partie, du taux d'insuline secrété et accélération de sa dégradation. Ce déséquilibre glycémique permet de suspecter un rôle diabétogène aux hormones thyroïdiennes (78). Par ailleurs, ces hormones agissent sur les mécanismes clés du métabolisme des lipides, régulant à la fois la lipolyse et la lipogenèse (79), et participant également à la réduction du taux de cholestérol, via une stimulation de l'expression du récepteur des lipoprotéines à basse densité (LDL-R) dans le foie (80).

Aussi, les hormones thyroïdiennes jouent un rôle critique dans le développement et la maturation du système nerveux central (SNC) du fœtus (81). Cette fonction est assurée par les dérivés de la tyrosine de la mère traversant librement la barrière placentaire, avant que la thyroïde du fœtus n'acquière son autonomie. Les hormones thyroïdiennes agissent sur la mise en place des connexions neuronales et la stabilisation des contacts synaptiques, et favorisent également la myélinisation des neurones pour la maturation du SNC, qui continue jusqu'aux premiers mois de la vie post-natale (82, 83). Néanmoins, la croissance et le développement du fœtus pendant la période intra-utérine, est normale grâce à l'apport maternel en T<sub>3</sub> et T<sub>4</sub>. Durant la période postnatale, la croissance de l'organisme reste étroitement dépendante des hormones thyroïdiennes. D'ailleurs le bon fonctionnement de la thyroïde d'enfant devient indispensable à la maturation osseuse et

l'ossification du cartilage par l'action direct de ces hormones (84), ou indirectement en agissant en synergie avec l'hormone de croissance (GH), dont elles favorisent la sécrétion. Les hormones thyroïdiennes potentialisent également l'effet de l'insulin-like growth factor-1 (IGF-1) (85).

#### 4. Les pathologies de la thyroïde :

La thyroïde peut être le siège de plusieurs pathologies telles que l'hyperthyroïdie, l'hypothyroïdie, l'auto-immunité et le cancer.

Les cancers de la thyroïde sont les cancers endocriniens les plus fréquents à prédominance féminine, dont une augmentation alarmante a été enregistrée récemment. La prise en charge des cancers de la thyroïde, diagnostic et traitement par l'iode radioactif, est possible grâce à l'expression fonctionnelle du symporteur NIS dans les tumeurs primaires et les métastases. L'expression du système d'organification de l'iode par les cellules thyroïdiennes cancéreuses favorise également la rétention de l'iode radioactif dans les tumeurs permettant ainsi leur éradication par radiothérapie métabolique. Cependant, la transformation des thyrocytes est souvent associée à une dédifférenciation (perte de l'expression des acteurs de l'hormono-synthèse y-compris le NIS) (86), aboutissant à une résistance aux traitements par la radiothérapie métabolique. Ainsi la compréhension des mécanismes moléculaires de la dédifférenciation, qui sont encore mal connus, permettra une meilleure prise en charge des cancers thyroïdiens résistants.

## **II. Carcinome thyroïdien**

### 1. Généralités :

Généralement, lorsqu'une tumeur est bénigne, on parle d'adénome, qui est présentée dans la plupart des cas par des petits nodules thyroïdiens, chauds ou froids selon la capacité de leurs cellules à concentrer l'iode radioactif (87). Dans le cas de tumeurs malignes, il s'agit donc de carcinomes thyroïdiens.

Les tumeurs de la thyroïde peuvent être divisées en tumeurs primaires et secondaires ou rarement métastatiques. Les tumeurs thyroïdiennes proviennent généralement des cellules épithéliales folliculaire de la thyroïde (88). Une classification histologique des tumeurs épithéliales selon l'organisation mondiale de la santé (OMS) est indiqué dans le tableau 3 (89).

**Tableau 3 : Classification des tumeurs épithéliales de la thyroïde selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS) (88-90)**

	Origine cellulaire	Type de Carcinome
<b>Tumeurs Epithéliales</b>	Thyrocytes (Cellules folliculaires) (99%)	Carcinomes Papillaires (PTC) (> 80%)
		Carcinomes vésiculaires ou folliculaires (FTC) (5 - 10%)
		Carcinomes anaplasiques ou indifférenciés (ATC) (< 5%)
	Cellules C ou para-folliculaires (1%)	Carcinomes médullaires (2%)

### 1.1 Classification histologique des cancers thyroïdiens :

Les carcinomes thyroïdiens représentent 1 % de la totalité des cancers (88, 91). Ces cancers sont à prédominance féminine et touchent 2 femmes sur un homme (88); et les hormones sexuelles femelles semblent favoriser cette susceptibilité (92, 93).

La plupart des cancers de la thyroïde se développent en trois types principaux : les cancers papillaires thyroïdiens (PTC) et les cancers folliculaires thyroïdiens (FTC) qui sont des cancers dits différenciés et les cancers anaplasiques thyroïdiens (ATC) qui sont des cancers indifférenciés. Quant aux cancers médullaires de la thyroïde (MTC), ils proviennent des cellules para-folliculaires de la thyroïde ou cellules (C) (88) (Tableau 3).

Dans ce chapitre (II), je ne détaillerai que les cancers thyroïdiens de souche folliculaire puisque mon sujet de thèse ne concerne que les cancers papillaires, formes les plus fréquentes de ces cancers.

### a. Cancers de la thyroïde d'origine folliculaire

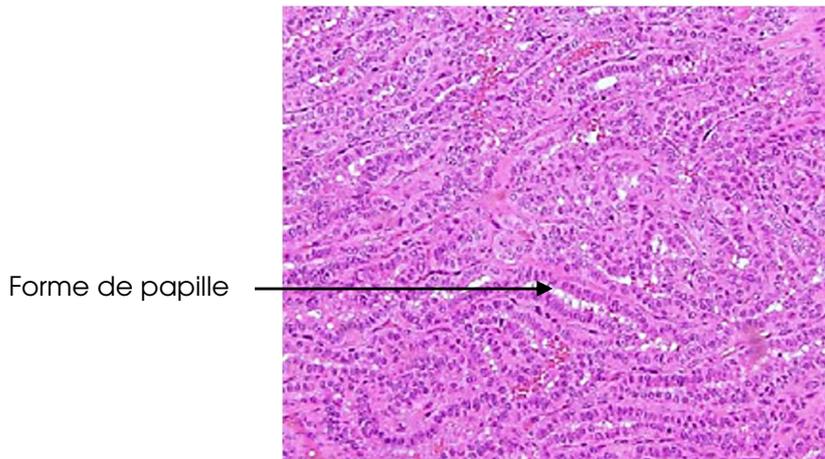
A travers le monde, le taux l'incidence standardisé du cancer thyroïdien, entre 1998 et 2002, a augmenté de 5 fois chez l'homme et de 10 fois chez la femme (94). En France, l'incidence totale est passée de 1,1 cas pour 100 000 personnes en 1980 à 5,5 cas en 2012 chez l'homme et de 2,8 cas pour 100 000 en 1980 à 13,8 cas en 2012 chez la femme (95). Quant au Maroc, selon le registre des cancers du grand Casablanca (2005 – 2007) et de Rabat (2006 2008), le cancer de la thyroïde chez les femmes est classé respectivement en 3<sup>ème</sup> et 6<sup>ème</sup> rang (6,7 et 3,9 par 100 000 personnes).

Les nodules thyroïdiens sont des tumeurs très fréquentes provenant des cellules folliculaires de la thyroïde (Thyrocyte), et l'utilisation de méthodes de détection plus sensibles révèle la présence de nodules dans la thyroïde d'une personne sur deux. Heureusement, environ 95 % de ces nodules, sont des tumeurs bénignes et seulement 5 % sont susceptibles d'évoluer vers des tumeurs malignes (96).

#### i. Les cancers papillaires de la thyroïde (PTC) :

Les cancers papillaires de la thyroïde qui représentent plus de 80% des cancers thyroïdiens, sont des tumeurs malignes d'origine épithéliales, de souche folliculaire et classés selon leurs caractéristiques morphologiques. Ces tumeurs peuvent être multifocales, avoir des structures papillaires et/ou folliculaires (vésiculaire), et ils comportant des modifications nucléaires caractéristiques. Leurs noyaux sont vitreux, grands, pâles, irréguliers et fendus avec des pseudo-inclusions (97). Ces caractéristiques nucléaires constituent un marqueur de diagnostic spécifique des cancers papillaires (PTCs), même si l'architecture est entièrement vésiculaire (98). Ces tumeurs se présentent comme des nodules blanchâtres infiltrants ou encapsulés (figure 14). Ils peuvent se propager par voie lymphatique vers les ganglions lymphatiques locorégionaux, mais les invasions vasculaires sont rares (97). Donc relativement très peu de métastases à distance ont été enregistrées pour ce type de cancers (5 à 7% au moment du diagnostic) (98). Le cancer de type papillaire de la thyroïde (PTC) est d'évolution lente, et très souvent découvert

à un stade précoce. Il apparaît le plus fréquemment chez des patients dont l'âge est entre 20 et 50 ans, avec un pronostic généralement meilleur chez les patients de moins de 45 ans et chez les femmes. Pour les personnes de plus de 45 ans les lésions sont plus grandes avec une infiltration plus importante, des invasions extra-thyroïdiennes, des métastases à distance, une invasion vasculaire et une histologie peu différenciée.



**Figure 14: Aspect microscopique du cancer thyroïdien papillaire (99).** La figure montre une vue microscopique d'une coupe de tissu cancéreux issu d'un cancer papillaire de la thyroïde (PTC), après coloration à l'Hématoxine & Eosine (H&E) au grossissement x200.

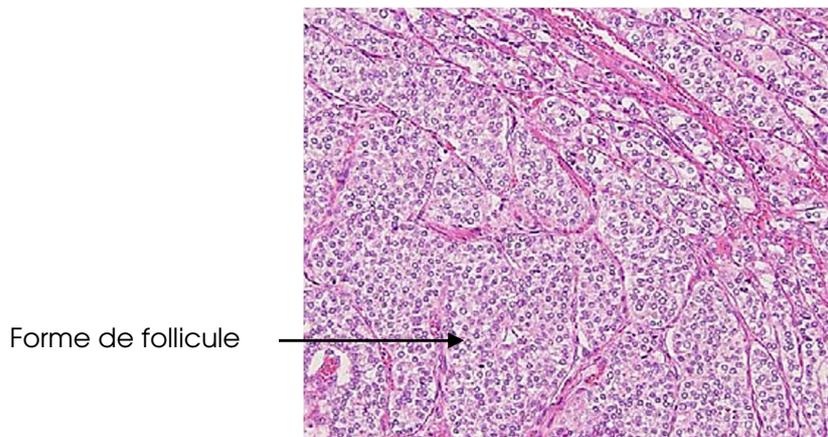
Les cellules, de ce type de cancers, conservent généralement leur structure glandulaire d'origine et continuent de fixer l'iode, pour cette raison les PTCs sont des cancers dits différenciés (100). Dans ces carcinomes différenciés, on retrouve souvent des cellules tumorales autour d'un noyau fibrovasculaire. Deux variantes dans ce type de cancer ont été identifiées : 1/ La variante classique qui est la plus répandue, elle se caractérise par la présence de papilles. Ils sont le plus souvent invasifs et dépourvus de capsule. Ils sont kystiques ou multifocaux respectivement dans 10% et 25 à 30% des cas (101). 2/ les variantes de structure vésiculaire qui possèdent une architecture entièrement vésiculaire, ressemblent aux carcinomes folliculaires, mais avec des caractéristiques nucléaires des PTCs. Elles se développent généralement à partir de nodules pré-existants et environ le un tiers d'entre elles est encapsulé (101).

ii. Les cancers folliculaires de la thyroïde (FTC) :

Les cancers folliculaires représentent de 5 à 15% des cancers thyroïdiens. Il s'agit des tumeurs épithéliales maligne avec une différenciation folliculaire mais qui ne représentent pas les caractéristiques des noyaux papillaires (89).

Les carcinomes folliculaires sont des tumeurs à croissance lente dont la majorité est sous forme de cancers encapsulés avec une légère invasion de cette capsule (99). Les cancers de cette catégorie ont un aspect histologique très similaire à la structure des adénomes folliculaires et ils causent rarement des métastases à distance.

Dans les FTCs, les thyrocytes gardent leur aspect folliculaire ou vésiculaire (Figure 15). C'est un cancer dit également différencié, assez fréquent dans les régions carencées en iode qui survient généralement chez les individus atteignant la cinquantaine.

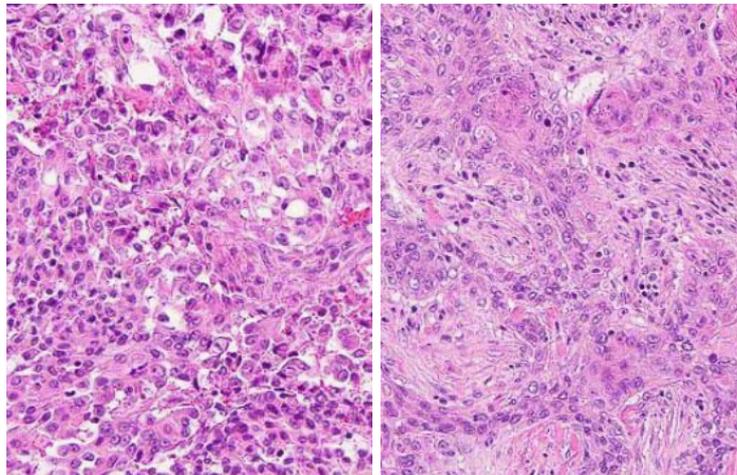


**Figure 15: Aspect microscopique du cancer thyroïdien folliculaire (99).** La figure montre une vue microscopique d'une coupe de tissu cancéreux issu d'un cancer folliculaire de la thyroïde (FTC), après coloration l'Hématoxine & Eosine (H&E) au grossissement x200

iii. Les cancers anaplasiques de la thyroïde (ATC) :

Les cancers anaplasiques ou indifférenciés correspondent à moins de 5% des cancers de la thyroïde (89). Ils surviennent le plus souvent chez des personnes de 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> âge, et 70% des patients sont des femmes (102). Plus de 50% des carcinomes anaplasiques évoluent à partir d'un carcinome différencié (papillaire ou folliculaire) (97). Ils sont très invasifs et forment des

métastases pulmonaires, osseuses et lymphatiques (locales et distantes). L'évolution est rapide et les chances de survie sont très faibles. Ils sont alors de très mauvais pronostic. Au moment du diagnostic, la maladie s'est généralement propagée de telle manière qu'elle est incurable avec une durée moyenne de survie d'environ 6 mois après diagnostic (103) (figure 16).



**Figure 16: Aspect microscopique de deux types de cancer thyroïdien anaplasiques (99).** La figure montre une vue microscopique de coupes de deux tissus cancéreux issus de cancers anaplasiques de la thyroïde (ATC), après coloration Hématoxine & Eosine (H&E) au grossissement x200.

Ces cancers gardent peu de ressemblance histologique avec la structure folliculaire d'une thyroïde normale et leurs cellules conservent peu de propriétés des cellules folliculaires normales. Ces tumeurs, très virulentes, n'exprimant plus le NIS ni le système d'organification de l'iode ne répondent plus à la radiothérapie métabolique et sont souvent fatales (99, 102).

Le carcinome peu différencié comporte certaines ressemblances morphologiques et comportementales avec les carcinomes bien différenciés, comme les carcinomes papillaires et folliculaires. Cela suggère un état cancéreux intermédiaire susceptible d'évoluer vers un état plus agressif indifférencié ou anaplasique dont les mécanismes restent mal connus (86).

## 1.2 La Prise en charge clinique des cancers de la thyroïde d'origine folliculaire: Diagnostic et traitement

### a. Diagnostic :

Le cancer de la thyroïde est souvent sous forme de nodule asymptomatique durant ses premiers stades de développement, détecté seulement par palpation. À mesure que la tumeur grossit, le nodule devient visible sous forme d'un gonflement à l'avant du cou. Le dosage des hormones thyroïdiennes ( $T_3$  et  $T_4$ ) et de la TSH permet de déceler d'éventuelles anomalies thyroïdiennes. L'échographie cervicale permet d'identifier le nombre des nodules, leurs tailles et dimensions. La scintigraphie réalisée après administration de l'iode radioactif ( $I^{125}$ ) à faible dose distingue les nodules dits chauds ou froids, selon qu'ils fixent ou non l'isotope radioactif.

### b. Traitement des cancers thyroïdiens d'origine folliculaire :

#### iv. Chirurgie :

Après un diagnostic positif de la tumeur, la chirurgie est le traitement le plus couramment utilisé pour le cancer de la thyroïde. Au cours de l'intervention, on procédera à l'ablation totale ou partielle de la thyroïde (Thyroïdectomie totale ou partielle) selon l'examen de la biopsie.

#### v. Traitement à l'iode radioactif

Le traitement des cancers de la thyroïde par de fortes doses de l'iode radioactif est effectué à l'hôpital, en isolement dans une chambre privée où le patient séjourne 2 ou 3 jours. L'iode 131 ( $I^{131}$ ), isotope de l'iode dont le nombre de masse est égal à 131, est communément utilisé car il possède une courte demi-vie (8 jours), au lieu de 42 jours pour l'isotope  $I^{125}$ . Les cellules thyroïdiennes cancéreuses différenciées, captent l'iode radioactif grâce au symporteur NIS. L'émission locale des rayonnements (90%  $\beta$  et 10  $\gamma$ ) détruit toutes ces cellules qui ont fixé l' $I^{131}$ .

vi. Radiothérapie externe

On a moins souvent recours à la radiothérapie externe qu'au traitement à l'iode radioactif pour le cancer de la thyroïde. La radiothérapie externe peut être indiquée dans les cas de cancer avancé de forme papillaire ou folliculaire ou lorsqu'une tumeur de type anaplasique ne peut être enlevée par voie chirurgicale.

vii. Chimiothérapie

Les chimiothérapies n'ont pas prouvé leur efficacité dans le traitement des cancers thyroïdiens différenciés et leur bénéfice sur la survie n'est pas démontré. Ce type de traitement doit être envisagé uniquement en cas de développement incontrôlable après échec de toutes les autres possibilités de traitement. La réponse espérée est au mieux une réponse partielle et transitoire dans 20 % des cas en utilisant la doxorubicine seule ou en association avec le cisplatine, sans qu'il ait été montré un allongement de la survie. Un certain nombre d'essais thérapeutiques par des molécules anti-angiogéniques et par des anti-tyrosines kinase sont en cours d'évaluation (104-106).

viii. Hormonothérapie ou hormonosubstitution

Vu le rôle important que jouent les HT dans l'organisme, le traitement des cancers de la thyroïde est toujours associé à une hormonosubstitution (LT<sub>4</sub> : Lévothyroxine) pour remplacer celles qui étaient produites auparavant par la thyroïde et empêcher des altérations du métabolisme contrôlé par les hormones thyroïdiennes.

## 2. Altérations génétiques et anomalies moléculaires des cancers thyroïdiens

D'une manière similaire à plusieurs autres cancers solides, les cancers thyroïdiens peuvent être également initiés par des altérations génétiques ou des changements épigénétiques affectant l'expression de différents oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs (107, 108). De ce fait, le

diagnostic moléculaire des cancers de la thyroïde a connu un avancement, qui a pu fournir des stratégies de traitement personnalisé et plus efficace.

Les altérations génétiques ou anomalies moléculaires les plus détectées dans le cas des carcinomes thyroïdiens affectent essentiellement la voie MAPK (RAS/RAF/MEK/ERK) (90, 109), mais aussi la voie PI3K/AKT (109, 110). Des réarrangements chromosomiques donnant naissance à des protéines de fusion oncogéniques, ou des mutations ponctuelles au niveau d'oncogènes tels que *RAS* et *BRAF* sont à l'origine d'une activation constitutive de ces voies de signalisation cellulaires.

## 2.1 Les réarrangements chromosomiques

### a. Les réarrangements *RET/PTC*

RET est un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase (RTK) dont la stimulation est dépendante de sa liaison à un ligand. La phosphorylation de certains résidus tyrosines engendre la transduction de signaux cellulaires (111). L'activité des récepteurs à tyrosine kinase est étroitement régulée. Lorsque ce contrôle est perdu, ces récepteurs peuvent devenir des oncogènes puissants.

Dans les cancers papillaires de la thyroïde, on distingue le plus souvent des réarrangements chromosomiques impliquant les gènes *RET* (rearranged during transfection) dits *RET/PTC*. Ces réarrangements, détectés pour la première fois par *Grieco et coll.*, en 1990, et trouvés spécifiquement exprimés dans les cancers papillaires (PTCs), sont appelés en conséquence les réarrangements « *RET/PTC* » (112). Ils sont plus fréquents chez les sujets jeunes, en particulier après exposition aux irradiations thérapeutiques ou accidentelles. Cette incidence s'explique cependant assez bien en raison d'une cassure double-brin de l'ADN à l'origine du réarrangement.

Ces réarrangements sont dus à des translocations ou inversions chromosomiques, impliquant le gène *RET* et un gène hétérologue, aboutissant à la formation d'un gène chimérique (112) codant pour une protéine de fusion constitutivement active. Il existe plusieurs réarrangements *RET/PTC* obtenus par fusion du domaine tyrosine kinase de RET (en 10q11-2)

avec la séquence 5' terminale de différents gènes. Les deux réarrangements constituant 90% de l'ensemble des réarrangements *RET/PTC* sont les réarrangements *RET/PTC1* et *RET/PTC3* obtenus lors d'une inversion intrachromosomique. Le plus répandu, *in vivo*, est *RET/PTC1*. Ces réarrangements conduisent à une expansion clonale et donc à une transformation néoplasique des cellules folliculaires. *RET/PTC1* serait plus fréquent dans les micro-cancers et les tumeurs papillaires classiques alors que *RET/PTC3* prédomine dans les cancers papillaires solides et les cancers à grandes cellules « tall cells » assez évolutifs (113, 114).

#### b. Le réarrangement *PAX8/PPAR $\gamma$*

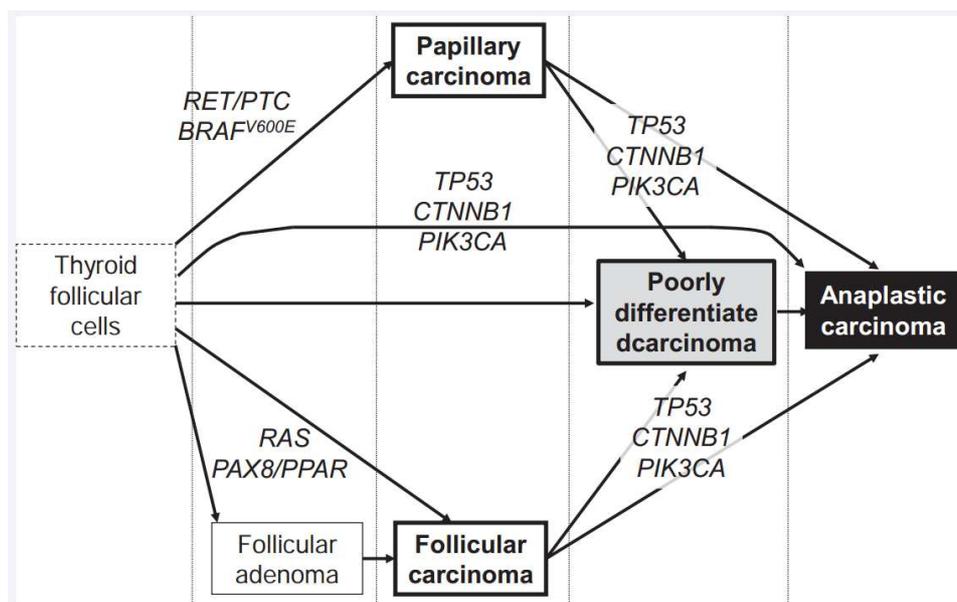
Il s'agit d'un réarrangement chromosomique identifié spécifiquement dans les cancers folliculaires de la thyroïde, en 2000 par *Kroll et Col.*, (115). Il est fortement associé à la malignité de ce type de tumeurs (116).

Cette translocation qui se fait entre les deux chromosomes 2 et 3 consiste en une fusion entre le fragment 2q19 comportant la partie du gène *PAX8* codant le domaine de liaison à l'ADN, et le fragment 3p25 contenant la quasi-totalité de la séquence codante du récepteur nucléaire *PPAR $\gamma$*  (peroxisome proliferator-activated receptor). Cette fusion donne ainsi naissance à une nouvelle séquence codant pour une protéine oncogénique *PPFP* (*PAX8/PPAR* fusion protein) qui conserve à la fois des propriétés du facteur de transcription *PAX8* (liaison à l'ADN) et du récepteur *PPAR $\gamma$*  (liaison récepteur-ligand) (115, 117).

Les mécanismes par lesquels *PPFP* induit la tumorigenèse thyroïdienne peuvent s'expliquer d'une part par une dérégulation des voies de signalisation impliquant *PAX8*, facteur de transcription indispensable à l'expression des gènes de différenciation thyroïdienne qui régule également la transcription de l'ARNm du gène *PPFP* néoformé (115), et d'autre part, par une interférence dans les voies contrôlées par le récepteur *PPAR $\gamma$*  en exerçant notamment une inhibition de son activité transcriptionnelle. Cela se traduit par une réduction de l'apoptose, une augmentation des transitions du cycle cellulaire et une perte de l'adhésion cellulaire (115).

## 2.2 Autres anomalies moléculaires :

Le gène *CTNNB1* (catenin beta 1) code pour une protéine impliquée dans la voie de signalisation WNT- $\beta$ -catenin et il est principalement muté dans les cancers anaplasiques (ATCs) (118). Le gène *TP53* code pour le suppresseur de tumeur p53, qui est impliqué dans plusieurs variétés de cancers solides. La mutation du gène *TP53* est majoritairement observée dans les cancers thyroïdiens très peu différenciés ou indifférenciés (ATCs), avec une fréquence d'apparition entre 70 à 80% (119, 120). La présence des mutations *TP53* ou *CTNNB1* exclusivement dans les ATCs ou bien les cancers peu différenciés, suggère que ces altérations génétiques peuvent être associées aux mécanismes de la dédifférenciation impliquée dans la progression des cancers thyroïdiens d'origine folliculaire vers des états plus agressifs non différenciés (Figure 17).



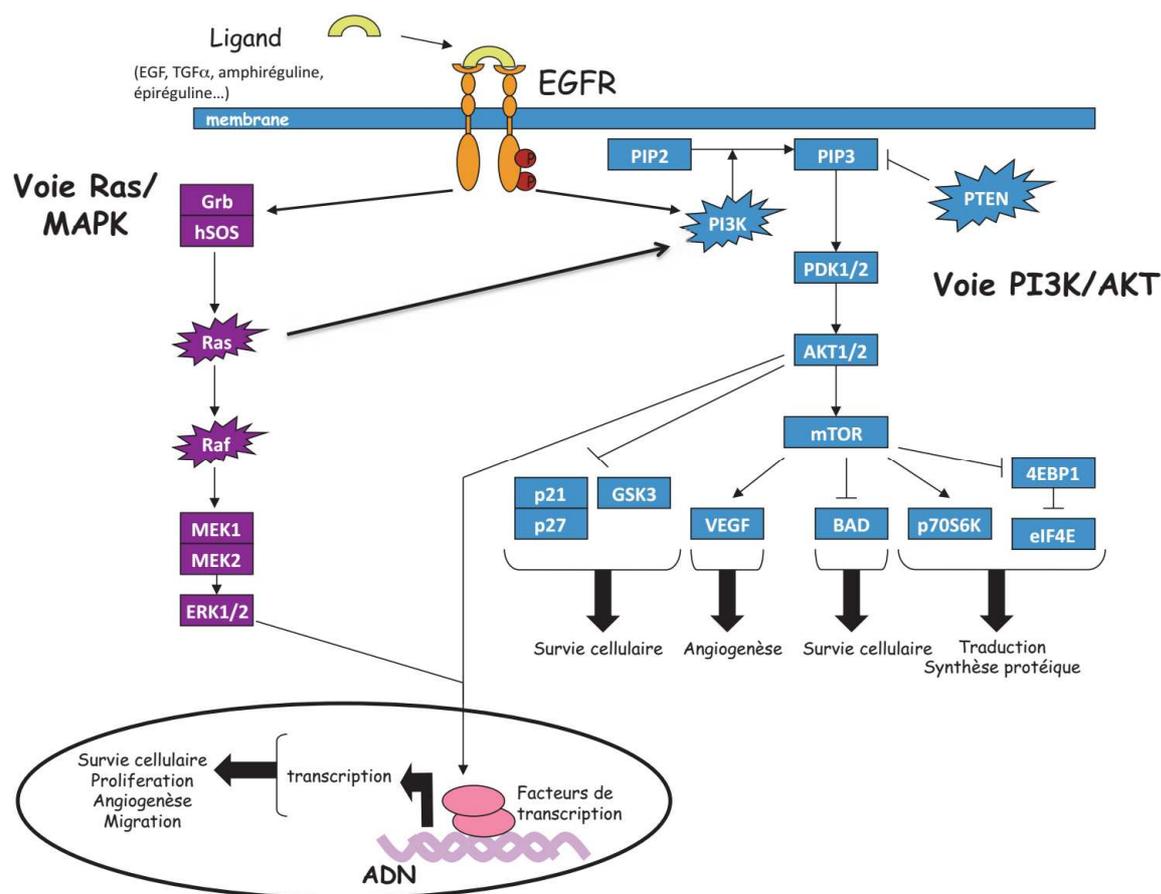
**Figure 17:** Etapes de progression putatif des tumeurs thyroïdiennes dérivées de cellules folliculaires et des mutations génétiques associées.

Le gène suppresseur de tumeurs *PTEN* est un régulateur négatif de la voie de signalisation PI3K-AKT par inhibition de la fonction de la PI3K (Figure 18). La mutation de *PTEN* contribue à la tumorigenèse thyroïdienne en favorisant le développement des cancers thyroïdiens d'origine folliculaire, ainsi que cela est décrit dans le syndrome de Cowden. Il s'agit d'une maladie autosomale non héréditaire, causée par des mutations germinales

du gène *PTEN* (121). La maladie de Cowden est considérée comme un syndrome de prédisposition aux cancers, étroitement associée à l'augmentation du risque de développer un cancer de la thyroïde, du sein ou de l'endomètre. L'altération du gène *PTEN* est généralement observée dans 40% des FTCs. Par ailleurs, une inactivation de ce gène par l'hyperméthylation de son promoteur, a été également rapportée dans les FTCs et les ATCs (122, 123).

## 2.3 Les mutations somatiques de la voie de signalisation MAP kinase

La voie MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) (RAS/RAF/MEK/ERK) est, en général, activée via un récepteur membranaire à activité tyrosine-kinase tels que l'EGFR, qui est lui-même stimulé par un ligand spécifique (facteur de croissance ou une cytokine), pour transmettre le signal extracellulaire à l'intérieur de la cellule (124). La liaison du ligand à son récepteur induit une autophosphorylation qui conduit ainsi à l'activation d'une cascade de phosphorylations successives de nombreuses protéines kinase intracytoplasmiques en aval. La voie RAS/MAPK constitue, avec la voie PI3K (Phosphatidyl Inositol 3-Kinase) /AKT, une des voies de transmission du signal les mieux connues aboutissant à la mise en jeu de facteurs de transcription capables d'activer la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, mais aussi dans l'invasion et la migration cellulaires, l'angiogenèse et la survie cellulaire. Plusieurs études ont démontré que la voie RAS/MAPK est anormalement activée dans de nombreux cancers, à cause de la survenue de mutations somatiques, particulièrement au niveau des proto-oncogènes codant pour les protéines RAS ou RAF, ce qui en font des cibles thérapeutiques potentiellement importantes (125) (Figure 18).

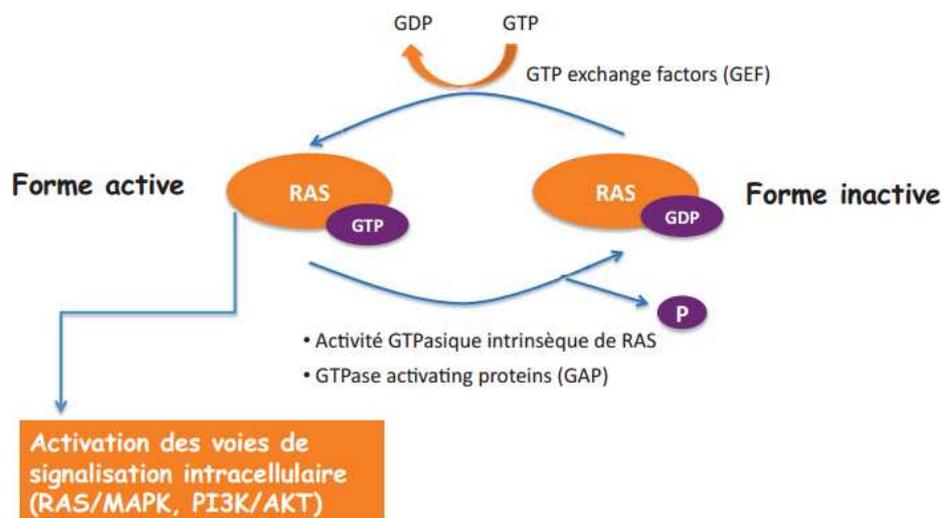


**Figure 18 :** Schéma simplifié des voies de signalisation RAS/MAPK et PI3K/AKT (125).

### a. Les mutations du gène ras

La famille des proto-oncogènes *RAS* comporte trois gènes isoformes bien caractérisés *H-RAS*, *N-RAS* et *K-RAS* : pour « Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog », « Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog » et « neuroblastoma RAS viral oncogene homolog » respectivement. Les protéines issues de ces gènes ont un poids moléculaire de 21 kDa, d'où leurs noms p21. Elles sont localisées à la face interne de la membrane cytoplasmique, insérées dans la couche phospholipidique membranaire par leur extrémité C terminale. Il s'agit de protéine à activité GTPasique, impliquées dans la transmission de stimuli extracellulaires vers le noyau *via* des récepteurs membranaires, intervenant ainsi dans la régulation de plusieurs mécanismes cellulaires tels que la prolifération, la différenciation, l'apoptose et la migration cellulaire (125). Les protéines *RAS* jouent le rôle de

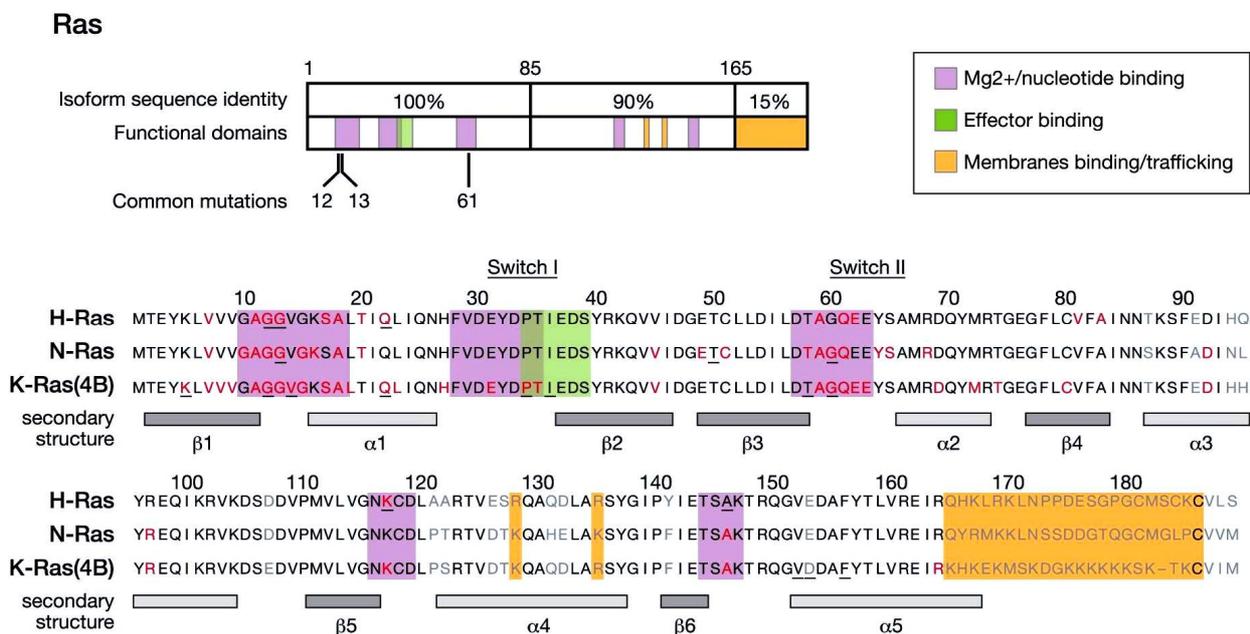
commutateurs dans des voies de signalisation, elles sont soumises à un cycle GDP/GTP où elles alternent entre deux états : actif ou inactif selon leur liaison au GTP ou bien au GDP respectivement. A l'état actif, elles sont liées au GTP (Guanosine TriPhosphate), ce qui permet l'interaction transitoire de RAS avec d'autres effecteurs intracellulaires et l'activation des voies de signalisation, dont RAS/MAPK mais aussi PI3K/AKT (Figure 19) (125). Quand le gène *ras* est muté, l'activité GTPase de la protéine reste inhibée, conduisant ainsi à une activation constitutive des voies de signalisation en aval, totalement indépendante de la fixation du ligand au récepteur membranaire, qui favorise la tumorigenèse thyroïdienne (126).



**Figure 19 : Forme active et inactive de la protéine RAS (125).** L'activation des protéines RAS survient lors du remplacement du GDP par le GTP et inversement, leur inactivation est provoquée par l'hydrolyse du GTP en GDP par des protéines de régulation telles que les GAP (GTPase-Activating Proteins), ainsi que par l'activité GTPase intrinsèque de la protéine RAS

Les mutations ponctuelles *RAS* touchent les trois isoformes du gène *ras* : *H-RAS*, *K-RAS* et *N-RAS* (Figure 20). Elles sont identifiées aussi bien dans les cancers de la thyroïde que dans d'autres cancers solides. La mutation *K-RAS*, touchant les codons 12 ou 13, est dominante dans la majorité des cancers, alors que les mutations *N-RAS* et *H-RAS* affectant le codon 61 restent les mutations les plus enregistrées dans les cancers thyroïdiens. Les mutations *RAS* apparaissent dans à peu près 10% de la totalité des cancers thyroïdiens avec une prédominance de 40 à 50% dans les cancers folliculaires (FTCs) (127). Elles

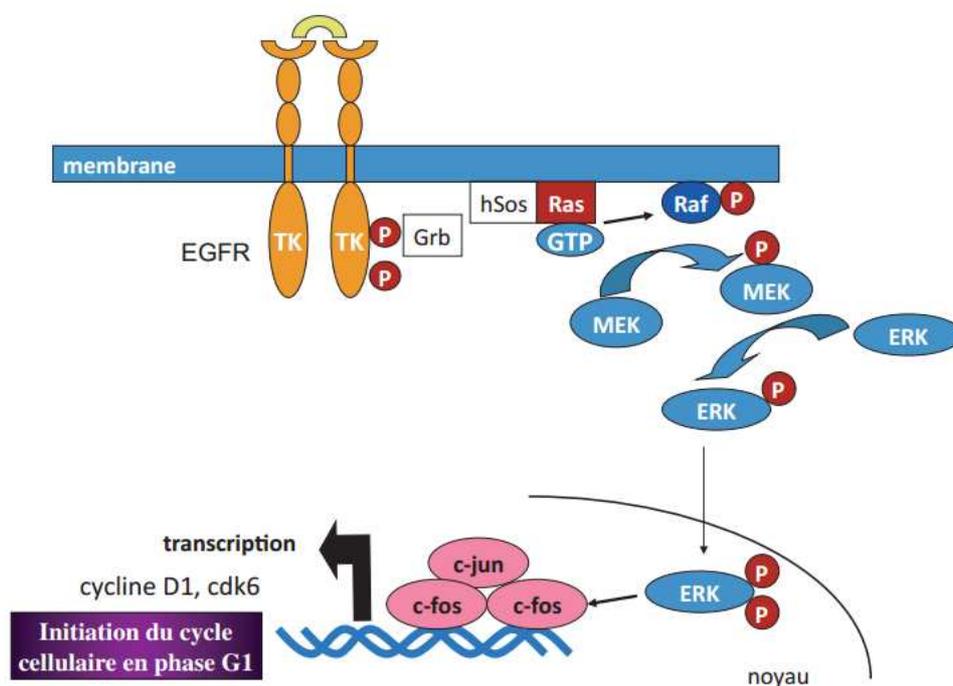
sont également détectées dans 10 à 20% des cancers papillaires (PTCs) de variante folliculaire (128), et très rarement détectée dans les PTCs de variante classique.



La présence de 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. Les cancers papillaires et folliculaires porteurs de mutations *ras* sont susceptibles d'évoluer en cancers anaplasiques par un processus de dédifférenciation (130). De plus, plusieurs études ont montré une corrélation significative entre mutation *RAS* et le comportement métastatique des cancers folliculaires et papillaires exprimant l'oncogène *RAS* (90, 131).

## b. Les mutations BRAF

BRAF appartient à la famille des protéines RAF (sérine : thréonine kinase). Trois formes de RAF existent: ARAF, BRAF et CRAF ; codées respectivement par les gènes *ARAF*, *BRAF* et *CRAF*. La protéine BRAF est une kinase cytosolique qui joue un rôle clé dans l'activation de la voie MAPK (RAS/RAF/MEK/ERK). Elle transmette les signaux *via* MEK1/2 (MAPK/ERK kinase 1/2) entre les protéines RAS activées et p42/p44 MAP kinase ou ERK1/2 (125) (Figure 21).

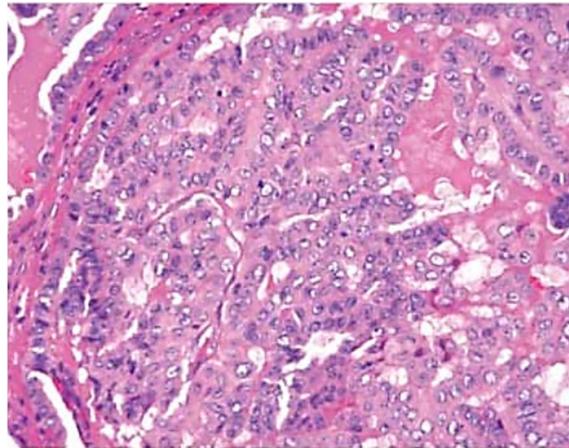


**Figure 21: Schéma de l'activation de la voie de signalisation Ras/Ras/MEK/ERK (125).** L'activation de la voie des MAPK débute par l'activation et le recrutement à la membrane par RAS de la protéine RAF. Cette première protéine kinase est responsable de l'activation par phosphorylation de la MAPK-kinase ou MEK (MAPK-ERK-Kinase). À son tour, MEK active de manière hautement spécifique, par double phosphorylation, ERK, ce qui entraîne sa translocation au niveau du noyau et l'expression de gènes précoces codant pour des facteurs de transcription (c-FOS) et autres (c-MYC, c-JUN ou JUNB).

La découverte de mutation ponctuelle qui affecte le gène *BRAF*, a été faite pour la première fois en 2002 par *Davies et Coll.*, (132). La mutation *BRAF<sup>T1799A</sup>* qui est une transversion, représente plus de 95% de la totalité des mutations identifiées de ce gène. Elle se traduit par la substitution d'une valine par l'acide glutamique à la position 600 (V600E), d'où son appellation par

$BRAF^{V600E}$  (Figure 22). L'insertion de l'acide glutamique en position adjacente à la Ser599 (sérine 599 : site actif de phosphorylation) rompt des interactions hydrophobes, mettant la kinase dans une conformation catalytique qui entraîne sa phosphorylation d'une manière constitutive (133).

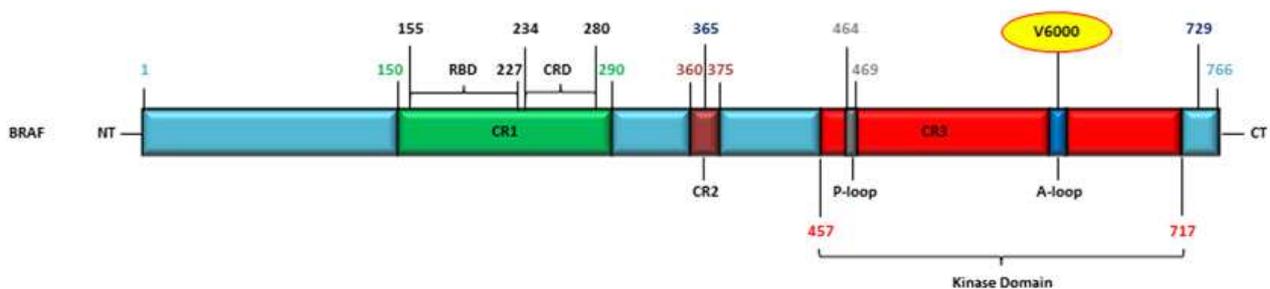
La mutation  $BRAF^{V600E}$  a été identifiée comme mutation majeure dans plusieurs cancers humains, tels que les mélanomes, le cancer colorectal, le cancer ovarien, le cancer des poumons et le cancer de la thyroïde (132, 134-136). La mutation  $BRAF^{V600E}$  a été décrite pour la première fois dans les cancers thyroïdiens en 2003 (137, 138), plus particulièrement dans les cancers papillaires et anaplasiques avec une fréquence moyenne de 44% et 24%, respectivement (139).



**Figure 22: Aspect microscopique du cancer thyroïdien papillaire avec mutation  $BRAF^{V600E}$  (140).** Vue microscopique d'une coupe de tissu cancéreux issu d'un cancer papillaire de la thyroïde avec la mutation  $BRAF^{V600E}$  (PTC) montrant la morphologie des noyaux, après coloration à l'Hématoxine & Eosine (H&E) au grossissement x400.

Actuellement, plus de 40 mutations du gène *BRAF* ont été rapportés, dont la majorité survient dans le domaine kinase et la boucle d'activation de la protéine, ce qui engendre une activation potentialisée et ainsi une augmentation direct de la phosphorylation de MEK (132). Paradoxalement, bien que l'analyse *in vitro* de l'effet d'autres mutations du gène *Braf*, ait démontré que ces mutations réduisent l'activité MEK contrairement à la mutation V600E, il n'en demeure pas moins que ces mutations confèrent suffisamment d'activité kinase pour transphosphoryler et activer la protéine CRAF *via* d'une heterodimérisation (141, 142). C'est le cas notamment de la

protéine mutée BRAF<sup>FD594V</sup>, appelée également "kinase-dead", qui ne possède normalement pas d'activité catalytique. Cette kinase BRAF, inactive donc d'un point de vue catalytique, peut néanmoins se lier à CRAF et potentialiser ainsi l'effet des mutations Ras oncogéniques et stimuler davantage la cascade de signalisation de MAPK et favoriser la croissance tumorale (143). Ce phénomène met en évidence le risque de cibler BRAF d'un point de vue thérapeutique dans des tumeurs mutées pour RAS. Enfin, une altération génétique rare dans le gène *BRAF* résultant d'un réarrangement chromosomique a également été identifiée. Celle-ci conduit à la formation d'une protéine de fusion appelée *AKAP9-BRAF* qui a perdu le domaine autorégulateur de *BRAF*, ce qui se traduit par une activation constitutive de la kinase (144).



**Figure 23: Représentation schématique de la structure de BRAF avec les différents domaines.** La structure est caractérisée par trois régions CR1, CR2 et CR3 conservées dans les trois membres de la famille RAF (*ARAF*, *BRAF* et *CRAF*) dont des fonctions distinctes. Le domaine CR1 contient le domaine RAS-liaison (RBD), ce qui est essentiel pour le recrutement de tous les trois membres de la famille RAF par un RAS activé, du cytoplasme vers la membrane plasmique. La zone CR1 comporte également le domaine riche en cystéine (CRD), qui sert de RBD secondaire pour renforcer la liaison de RAS. Le CR2 lie avec souplesse le domaine CR1 au domaine CR3, et il est également nécessaire pour la régulation négative des kinases RAF. Les sites de liaison des protéines régulatrices (marquées en bleu) sont situés dans le domaine CR2, mais aussi à l'extrémité C-terminale de la kinase. La plus grande sous-unité, CR3, sert du domaine kinase. Elle contient la boucle - P de liaison phosphate et la boucle - A d'activation. Le résidu V600 le plus important de BRAF est également situé dans la boucle - A.

### 3. L'implication de la voie de signalisation TGF- $\beta$ /Smad dans les PTCs

#### 3.1 Généralités

La super-famille du TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor), constituée de divers groupes de protéines (TGF- $\beta$ , BMP 'Bone Morphogenic Protein', les

Activines et GDF ('Growth Differentiation Factors'), joue un rôle primordial dans l'homéostasie tissulaire (145). La dérégulation des voies de signalisation activées par ces protéines est associée à des anomalies du développement et aussi à de nombreuses pathologies telles que le cancer et la fibrose (146). Dans la présente étude nous nous focaliserons plus particulièrement sur la voie de signalisation TGF $\beta$ .

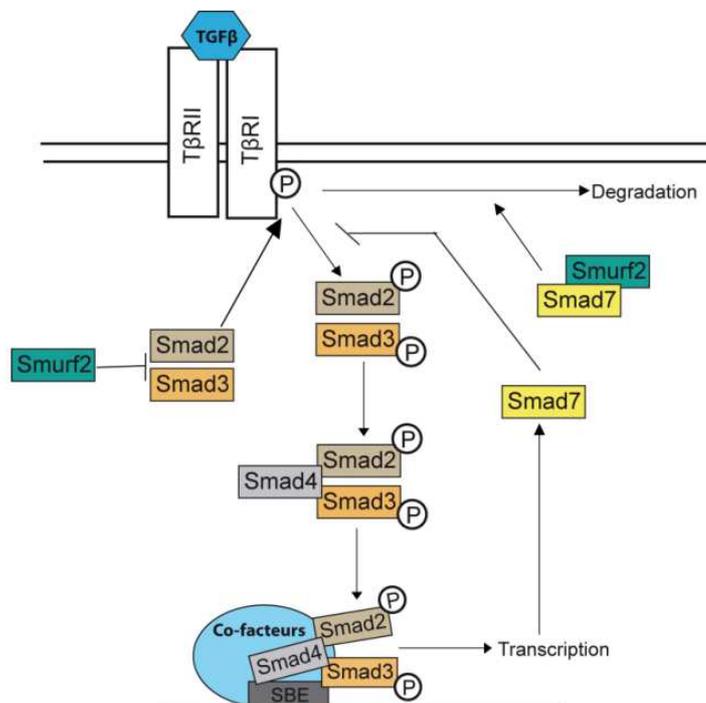
La protéine mature du TGF- $\beta$  est synthétisée sous forme d'un précurseur inactif, il s'agit d'un homodimère de deux polypéptides de 12,5 kDa liés par un pont disulfure. Cette forme de protéine, dite également forme latente, est généralement secrétée comme étant associée à une autre protéine dite LAP (Latency-associated peptide) (147). La protéine active du TGF- $\beta$  sera ensuite libérée sous l'action de différentes protéases. Trois isoformes du TGF- $\beta$  sont décrits dans la littérature: TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 et TGF- $\beta$ 3.

Les membres de la famille du TGF- $\beta$  se lient sur des récepteurs dimériques de type I et II à activité sérine/thréonine kinase, auxquels il se rajoute un troisième type de récepteur non nécessaire à l'activation de la voie de signalisation dit type III. Ce dernier permet d'augmenter la spécificité pour un ligand ou bien il régule la disponibilité du ligand pour les récepteurs de type I et II. Cette liaison induit l'activation de la voie de signalisation en aval via la phosphorylation des protéines Smads (Similar to the 'mothers against decapentaplegic' MAD). Il existe 3 catégories de protéines Smads : 1) les Smads qui se lient au récepteur 'Receptor Regulated Smads : R-Smad' (Smad 1, 2, 3, 5 et 8), 2) Smad commun aux cascades de signalisation initiées par la famille de TGF- $\beta$  'co-mediator Smad : Co-Smad' (Smad4), et 3) les Smads inhibitrices 'Antagonistic or inhibitory Smads : I-Smad' (Smad 6 et 7).

### 3.2 Description de la signalisation TGF- $\beta$ /Smad :

Le TGF- $\beta$  actif se lie d'abord au T $\beta$ RII (TGF- $\beta$  receptor II) et induit, via son activité sérine thréonine kinase, la phosphorylation du T $\beta$ RI (TGF- $\beta$  receptor I) qui phosphoryle à son tour les protéines Smad 2 et 3 (R-Smads) (148). Ces dernières s'associent ensuite au Smad4 (Co-Smad) et le complexe (R-Smads / Co-Smad) transloque dans le noyau où il régule l'expression de nombreux

gènes cibles du TGF- $\beta$  (149). L'expression du gène codant pour la protéine inhibitrice Smad 7 (I-Smad) est également régulée par cette voie de signalisation. Cette I-Smad empêche l'activation des R-Smads selon deux mécanismes différents : 1) soit par compétition en se liant au récepteur T $\beta$ RI inhibant ainsi la phosphorylation des Smad2 et 3, 2) soit en interagissant avec l'ubiquitine ligase Smurf 2 (Smad Ubiquitin regulatory factor 2), et s'associant ensuite avec le T $\beta$ RI induisant ainsi sa dégradation (145) (Figure 24). Dans des conditions physiologiques, cette cascade de signalisation s'arrête par déphosphorylation des protéines Smads, qui retournent dans le cytosol où elles sont dégradées par le protéasome (145, 150).



**Figure 24: Voie de signalisation du TGF- $\beta$ .** Les étapes de la transduction du signal intracellulaire lors de l'activation de la voie de signalisation TGF- $\beta$  : Le TGF- $\beta$  actif une fois lié au récepteur T $\beta$ RII phosphoryle le récepteur T $\beta$ RI qui phosphoryle à son tour les protéines Smad 2 et Smad 3. Ces dernières s'associent ensuite au Smad4 et le complexe transloque dans le noyau où il va se lier spécifiquement aux domaines SBE : Smad Binding Element.

### 3.3 Autres voies de signalisation activées via le TGF- $\beta$

Deux voies de signalisation sont activées par le TGF- $\beta$  et sont complètement indépendantes des protéines Smads. La première, qui implique l'activation de l'inositol 1,4,5-triphosphate 3-kinase (PI3K) et la

protéine kinase B (Akt), régule la survie cellulaire (151, 152) et la deuxième médiée par les protéines Ras qui activent la voie de signalisation MAP Kinase (MAPK) (153).

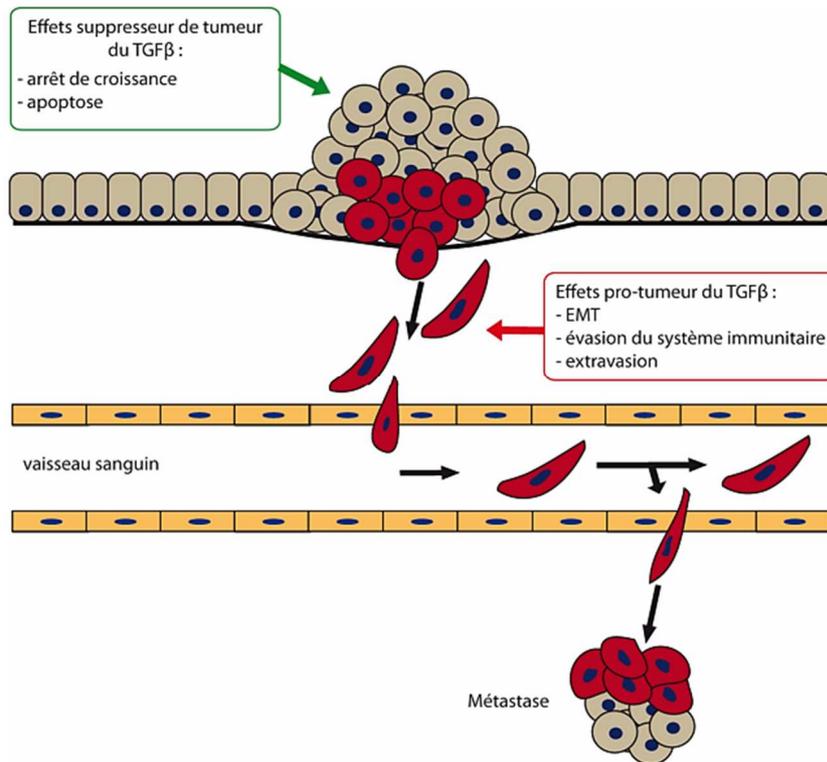
### 3.4 Régulation de la fonction thyroïdienne par le TGF- $\beta$

La voie de signalisation du TGF- $\beta$  est impliquée dans la régulation de la prolifération et de la différenciation thyroïdienne. Dans les cellules thyroïdiennes porcines, le TGF- $\beta$ 1 inhibe l'expression du récepteur de la TSH (RTSH) et diminue la production de l'AMP cyclique altérant ainsi les fonctions de la TSH (154). Dans la lignée cellulaire thyroïdienne de rat 'FRTL-5', le TGF- $\beta$ 1 inhibe le transport de l'iodure *via* inhibition de l'expression du NIS, en bloquant la voie de la protéine kinase A (PKA) (155-157). Aussi, dans le même modèle cellulaire, le TGF- $\beta$ 1 diminue l'expression d'autres marqueurs de différenciation thyroïdienne comme la Tg et RTSH (158). La régulation négative du TGF- $\beta$ 1 sur l'expression du NIS (messager et protéine) a été confirmée en utilisant une autre lignée thyroïdienne de rat 'PCCL3' (159). Cette régulation négative par le TGF- $\beta$  est expliquée en partie par la diminution de l'expression du facteur de transcription PAX8 (159, 160).

Dans les cellules thyroïdiennes humaines, le TGF- $\beta$  inhibe l'action de la TSH et de l'AMP cyclique, sur l'absorption de l'iodure et l'expression de la peroxydase thyroïdienne (TPO) (161).

### 3.5 Rôle du TGF- $\beta$ dans la carcinogenèse thyroïdienne :

D'après la littérature, le TGF- $\beta$  apparaît jouer un rôle paradoxal dans la carcinogenèse, car il peut être suppresseur de tumeur ou pro-tumoral ; et les mécanismes moléculaires impliqués dans ces deux rôles sont encore mal connus (162, 163). Au début de la tumorigenèse, le TGF- $\beta$  inhiberait la croissance des cellules tumorales ; cependant dans les stades avancés du cancer, la tumeur détournerait la signalisation du TGF- $\beta$  en sa faveur (prolifération cellulaire et invasion) (Figure 25).



**Figure 25: Le rôle du TGF- $\beta$  dans le processus de la carcinogénèse, d'après *Heldin et al.*, 2009 (164).** Dans les étapes précoces de carcinogénèse, le TGF- $\beta$  a un rôle inhibiteur de tumeur en bloquant la prolifération cellulaire et en induisant l'apoptose. Les cellules tumorales détournent ensuite la voie de signalisation à leur avantage et le TGF- $\beta$  induit alors l'EMT et favorise le développement métastatique des tumeurs.

Dans cette étude nous détaillerons plus particulièrement, l'effet tumorigène du TGF- $\beta$  dans les cancers papillaires de la thyroïde (PTCs). Une diminution de Smad7 (I-Smad) dans les noyaux des PTCs humains invasif et surexprimant le TGF- $\beta$  a été observée suggérant une suractivation de la voie de signalisation du TGF- $\beta$  suite à la levée du contrôle négatif exercé par Smad7 dans les PTCs (165). Il a été démontré dans une autre étude que le front périphérique invasif des tumeurs humaines (PTCs) surexprime le TGF- $\beta$  et des acteurs de l'EMT (Epithelimesenchymal transition) par rapport au centre de la tumeur, suggérant ainsi le rôle du TGF- $\beta$  dans l'invasivité des PTCs (166). *Riesco-Eizaguirre et al.*, ont confirmé ce rôle invasif du TGF- $\beta$  et ont montré aussi une association entre la sur-activation de la voie de signalisation du TGF- $\beta$  (haute expression du TGF- $\beta$ /T $\beta$ RII/pSmad2) avec l'invasivité des PTCs humains exprimant l'oncogène BRAF<sup>V600E</sup> (167). De plus, les auteurs ont établi dans cette étude un lien direct entre l'expression de l'oncogène BRAF<sup>V600E</sup>,

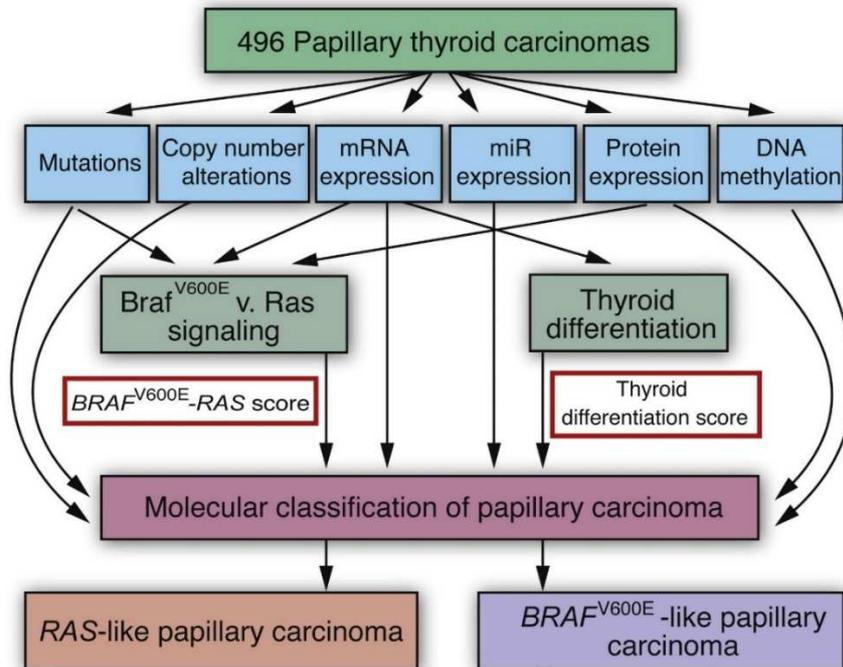
l'activation de la voie de signalisation du TGF- $\beta$  et la répression de l'expression du gène *SCLC5A* codant le NIS. En utilisant la lignée cellulaire thyroïdienne de rat (PCCL3) exprimant de manière conditionnelle l'oncogène BRAF<sup>V600E</sup> les auteurs montrent que l'expression du NIS est négativement régulée par BRAF<sup>V600E</sup> via l'augmentation de la sécrétion du TGF- $\beta$ . Cette corrélation négative observée entre l'expression du TGF- $\beta$ 1 et le NIS est également observée dans les PTCs humains.

#### 4. Meilleure compréhension de la pathogenèse moléculaire des PTCs: Nouvelle classification

La compréhension de la pathogenèse des cancers différenciés de la thyroïde, représentés majoritairement par les PTCs, a été largement améliorée au cours de la dernière décennie. Une étude très récente portant sur une caractérisation génomique intégrale des cancers papillaires de la thyroïde, réalisée sur une large cohorte composée de 495 cas de PTCs, a proposé une nouvelle classification de ce type de cancer en sous-groupes moléculaires, dans le but d'améliorer la prise en charge de ces cancers. L'analyse des mutations somatiques retrouvées dans les PTCs permet d'identifier des mutations pilotes, qui caractérisent les différents sous-types de tumeurs. Il apparaît que les mutations affectant la voie de signalisation MAP Kinase, constituent l'essentiel de la nouvelle classification moléculaire des PTCs.

Les tumeurs résistantes et dédifférenciées contrôlées par l'oncogène BRAF<sup>V600E</sup> ne répondent plus au rétrocontrôle négatif exercé par ERK sur RAF, ce qui entraîne une forte activation de la voie de signalisation MAPK (168). En revanche, les tumeurs contrôlées par l'oncogène RAS répondent au rétrocontrôle de la voie ERK, et présentent par conséquent une activation plus faible de la voie de signalisation MAPK. Cette différence dans le degré d'activation de la voie MAPK, se traduit par des différences phénotypiques au niveau des PTCs. Par exemple, l'expression des gènes de différenciation thyroïdienne impliqués dans le captage et le métabolisme de l'iode, est considérablement réduite dans les tumeurs mutées BRAF<sup>V600E</sup>, comparées aux

tumeurs mutées RAS, où elle est largement conservée (169). Pour mieux définir cette relation, deux scores ont été établis dans cette étude : le score BRAF<sup>V600E</sup>-RAS (BRS) et le score de différenciation thyroïdienne (TDS). Le score BRAF<sup>V600E</sup>-RAS (BRS) est établi à partir d'une analyse comparative de l'expression de 71 gènes (signatures) entre les tumeurs mutées BRAF<sup>V600E</sup> et celles mutées RAS. Le score de différenciation thyroïdienne (TDS), quant à lui, est déterminé en comparant le niveau d'expression de 16 gènes impliqués dans le métabolisme de l'iode et la fonction thyroïdienne. Une forte corrélation entre les deux scores (TDS et BRS) a été observée à l'issue de l'analyse des tumeurs PTCs (169). Ainsi les PTCs ayant un profil muté RAS ont globalement un score TDS élevé, reflétant la préservation d'un état différencié. Alors que les PTCs mutés BRAF ont en revanche un score TDS moins élevé, reflétant un état de dédifférenciation plus avancé dans ce sous-groupe. Ces nouvelles données confortent la puissance pronostique et prédictive de l'oncogène BRAF<sup>V600E</sup> (170) avec lequel il est généralement observé que la dédifférenciation affecte négativement la réponse d'une tumeur donnée à la radiothérapie métabolique. D'ailleurs, les cancers métastatiques réfractaires à la thérapie par l'iode radioactif, sont généralement mutés BRAF<sup>V600E</sup> (86). Ainsi, l'activation constitutive et puissante de la voie MAPK par l'oncogène BRAF<sup>V600E</sup> régule négativement l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme de l'iode (171, 172) (Figure 26).



**Figure 26 : Schéma explicatif de la nouvelle classification des PTCs (169).** Graphique résumant les différents principes sur lesquels elle a été basée la nouvelle classification des cancers papillaires de la thyroïde (PTC).

La voie MAPK est la voie majeure impliquée dans la tumorigenèse thyroïdienne. Néanmoins, les mécanismes moléculaires impliqués dans la carcinogenèse thyroïdienne et la résistance de certains cancers de la thyroïde à la radiothérapie métabolique restent complexes et encore mal connus (109). Plusieurs études soupçonnent fortement l'implication du stress oxydatif (173) dans ces mécanismes.

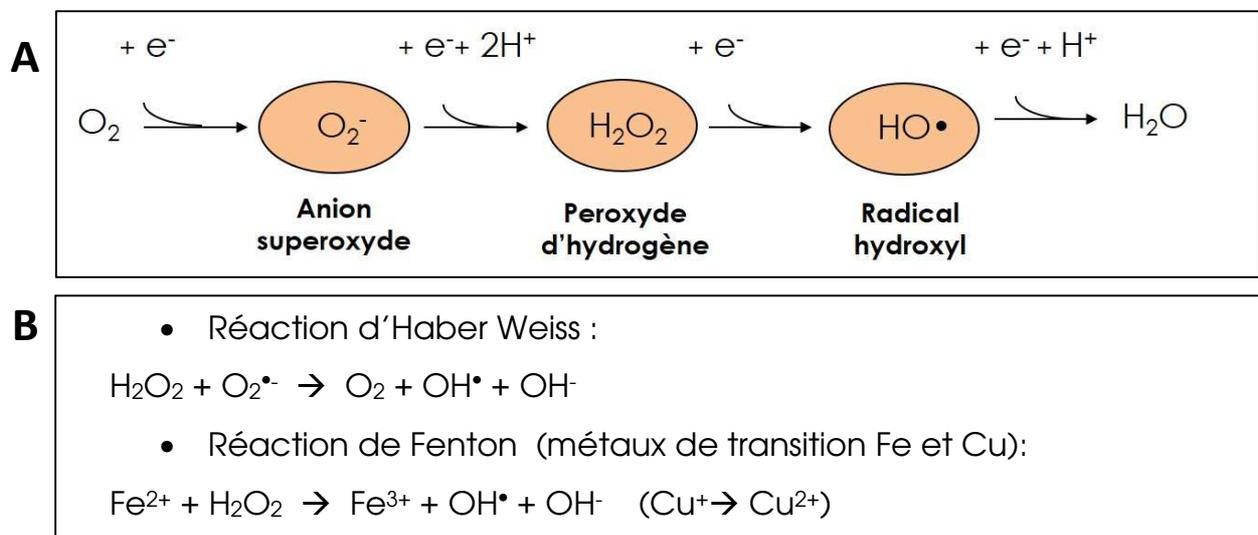
### III. Stress Oxydatif et cancer de la thyroïde:

#### 1. Généralités :

##### 1.1. Les espèces réactives de l'oxygène :

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS : « Reactive oxygen species ») sont de petites molécules hautement réactives dérivées de l'oxygène. Il s'agit de radicaux libres comme l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ) et le radical hydroxyle ( $\cdot OH$ ) ; et d'autres molécules non-radicales tels que le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ) et l'acide

hypochloreux (HOCl). Les ROS radicalaires ont un ou plusieurs électrons non appariés et sont, de ce fait, très instables et réactives. Les ROS sont générées dans les processus d'aérobies tels que la respiration cellulaire, l'exposition aux infections microbiennes impliquant l'activation des phagocytes, également pendant une activité physique intense ou l'action de polluants/toxines tels que la fumée de cigarette, l'alcool, les rayonnements ionisants et UV, les pesticides et l'ozone (174). Les cellules produisent les ROS par une variété de systèmes enzymatiques, notamment par les NADPH oxydases, la xanthine oxydase, la cyclo-oxygénase et par certains complexes de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale au cours de la phosphorylation oxydative qui produit l'ATP (175). Dans une situation physiologique, il existe un équilibre entre la production de ROS et leur désintoxication par les systèmes anti-oxydants tels que la catalase, la superoxyde dismutase, le glutathion peroxydase et les peroxyredoxines qui contribuent au maintien d'une homéostasie d'oxydo-réduction cellulaire (176-178) (Figure 27):



**Figure 27: Espèces réactives de l'oxygène. (A)** : Formation des espèces réactives de l'oxygène. **(B)** : Formation du radical hydroxyle HO• lors de la réduction de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> via la réaction d'Haber Weiss et la réaction de Fenton.

L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est un oxydant stable, électriquement neutre. Il peut donc diffuser librement à l'intérieur des cellules où il régule des voies de signalisation mais il peut également participer à la communication intercellulaire. Récemment, des transporteurs spécifiques (aquaporines) ont été identifiés

comme transporteurs d' $\text{H}_2\text{O}_2$  capables de médier l'activation des voies de signalisation intracellulaires (46, 179).

## 1.2. Rôle physiologique des ROS

Les ROS n'ont pas qu'un effet délétère, elles sont impliquées dans divers processus vitaux de la cellule. En grande quantité, les ROS assurent un rôle immunitaire microbicide au niveau des muqueuses du tractus respiratoire et digestif (46). Elles sont également impliquées dans la synthèse des hormones thyroïdiennes, et un défaut dans la production des ROS est à l'origine d'une hypothyroïdie congénitale (180). A des concentrations basses et modérées, les ROS jouent un rôle dans la prolifération et la signalisation cellulaire ainsi que dans la régulation de l'expression de gènes au travers de processus d'oxydo-réduction (181, 182). En réponse à des facteurs de croissance, une augmentation transitoire des taux d' $\text{H}_2\text{O}_2$  intracellulaire est observée. L' $\text{H}_2\text{O}_2$  extracellulaire peut, quant à lui, mimer une stimulation par des facteurs de croissance et activer ainsi la prolifération cellulaire (183). Ainsi, l' $\text{H}_2\text{O}_2$  est un puissant médiateur intracellulaire et intercellulaire de la transduction du signal. En effet, l' $\text{H}_2\text{O}_2$  est capable d'oxyder les cystéines catalytiques des protéines tyrosine phosphatases, ce qui conduit à leur inactivation et par conséquent à une augmentation des taux de phosphorylation intracellulaires par les kinases (184, 185). L' $\text{H}_2\text{O}_2$  module la signalisation cellulaire et régule le cycle cellulaire en inactivant respectivement des phosphatases telles que PTEN et Cdc25C (la phosphatase 3 inductrice de la phase M). Les ROS modulent aussi l'état redox de certains facteurs de transcription (NF $\kappa$ B, AP-1, p53 etc..) (186), affectant ainsi la fixation de ces facteurs de transcriptions aux promoteurs de certains gènes et donc le niveau d'expression génétique (182).

## 1.3. Le stress oxydatif :

Le stress oxydatif est un déséquilibre dans l'homéostasie d'oxydo-réduction qui résulte soit d'une augmentation de la production de ROS, soit d'une diminution de la défense cellulaire en antioxydants (46). Une situation

pathologique (infection, inflammation etc..), peut entraîner un déséquilibre de l'homéostasie redox et installer un stress oxydatif chronique induisant ainsi des effets délétères. Ainsi, les ROS peuvent causer des dommages au niveau de macromolécules biologiques (protéines, lipides, glucides et acides nucléiques). Les lipides peuvent subir une oxydation par le radical  $\text{OH}\cdot$ ; et l'oxydation des acides gras polyinsaturés, en particulier l'acide arachidonique, conduit à la formation du malondialdéhyde (MDA), utilisé comme marqueur de la peroxydation lipidique (187). L'oxydation des lipides perturbe la structure membranaire des cellules et altère la signalisation cellulaire ainsi que la perméabilité ionique des membranes. L'oxydation des protéines est susceptible de perturber leurs fonctions en inactivant par exemple des sites catalytiques et/ou en favorisant la formation d'agrégats par des ponts disulfures, lesquels affectent ainsi la structure secondaire et tertiaire des protéines (188). L'impact du stress oxydatif sur l'ADN est préjudiciable en raison de son effet négatif sur la transcription et la réplication (189). Un stress oxydatif chronique peut causer des dommages à l'ADN tels que des cassures simples et doubles brins de l'ADN; l'oxydation des bases azotés de l'ADN. Si ces dommages ne sont pas fidèlement réparés, des mutations et des aberrations chromosomiques peuvent apparaître favorisant ainsi une instabilité génomique (96, 190). Le marqueur de l'oxydation de l'ADN le plus communément étudié est la 8 oxo deoxyguanosine ou 8-hydroxydésoxyguanosine (8 oxo-dG) (33). L'oxydation des bases nucléiques de l'ARN se produit de façon similaire, l'indice le plus pertinent étant l'homologue de la 8-hydroxydésoxyguanosine : la 8- hydroxyguanosine (34).

#### 1.4. Stress oxydatif et les carcinomes thyroïdiens:

D'une manière générale, les cellules cancéreuses produisent plus de ROS que les cellules non-cancéreuses (191, 192) et l'analyse des tissus tumoraux révèle des taux plus élevés de dommages à l'ADN que dans les tissus normaux (193, 194). Cependant, les mécanismes par lesquels les cellules cancéreuses augmentent la production de radicaux libres qui contribuent aux lésions de l'ADN restent à déterminer.

Une augmentation des niveaux nucléaires de 8-oxo-dG a été trouvée dans les adénomes folliculaires humains et les carcinomes thyroïdiens (195), ce qui renforce l'idée que le stress oxydatif pourrait être un événement précoce au cours de la transformation cellulaire thyroïdienne en cellules tumorales. De manière intéressante il a été observé que, comparée aux autres organes, la glande thyroïde chez la souris présente un niveau de dommages oxydatifs à l'ADN plus élevé, et ceci est associé à un niveau élevé de l'expression de l'ARNm codant la 8-oxoguanine DNA glycosylase, ou encore OGG1, qui est l'enzyme impliqué dans le mécanisme de réparation des bases oxydées (96, 196).

Bien que les lésions à l'ADN soient généralement réparées efficacement, certaines lésions oxydatives de l'ADN peuvent être difficiles à réparer et dans certaines circonstances, conduire à la formation de cassures double-brin à l'ADN (DSBs) et donc à de l'instabilité génétique (197, 198). Une exposition des thyrocytes humaines à l' $H_2O_2$  induit la formation de DSBs (190, 199) et consécutivement le réarrangement chromosomique oncogénique *RET/PTC1* (199), qui est un événement précoce dans la transformation des cellules folliculaires de la thyroïde (200). Lors de l'exposition à l' $H_2O_2$ , les cellules thyroïdiennes augmentent l'expression des gènes antioxydants, se protégeant ainsi du stress oxydatif (201). Un affaiblissement du processus de détoxification peut favoriser l'effet mutagène de l' $H_2O_2$ . Ainsi un déséquilibre dans l'homéostasie redox peut représenter une première étape dans la cancérogenèse thyroïdienne.

Si la présence de dommages oxydatives à l'ADN dans les cancers de la thyroïde reste une évidence, la source des ROS à l'origine de ces dommages demeure inconnue. Les NADPH oxydases, en tant que systèmes générateurs de ROS, sont suspectées y jouer un rôle (46). La thyroïde exprime 3 NADPH Oxydases : DUOX2 impliquée dans la synthèse des hormones thyroïdiennes (49) ainsi que DUOX1 et NOX4 dont le rôle physiologique dans la thyroïde reste inconnu (46, 47). Une augmentation de la NADPH oxydase DUOX1 a été récemment observée dans les cancers thyroïdiens radio-induits suggérant un rôle dans la radiocarcinogenèse (202). En outre, NOX4 est trouvée

augmentée dans les cancers de la thyroïde et son expression est régulée par l'oncogène RAS suggérant un rôle potentiel dans la tumorigenèse. Dans le chapitre suivant, je vais présenter en détail la NADPH oxydase NOX4 qui fait l'objet de mes travaux de recherche.

## 2. La NADPH oxydase 4 et le cancer de la thyroïde

### 2.1. Le système générateur de ROS : Nox4/p22<sup>phox</sup>

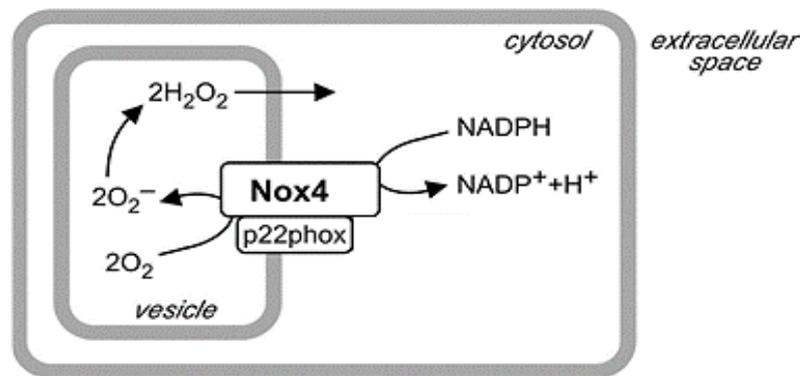
#### a. NADPH oxydase 4 (NOX4) : expression, activité et régulation

Le gène qui code la protéine NOX4 humaine est localisé sur le chromosome 11, en position 11q14.2-q21. NOX4 appartient à la famille des NADPH oxydases (NOXs) déjà décrite précédemment (l. 2.1. b.). Elle a été identifiée pour la première fois dans les cellules rénales par Geiszt et Col., en 2000 (203). Cette NADPH oxydase est l'une des isoformes de NOXs la plus largement exprimée dans différents types cellulaires. Parmi les cellules où elle est bien exprimée on peut citer les cellules endothéliales (204), les cellules musculaires lisses vasculaires (205), les cellules souches hématopoïétiques, les fibroblastes, les neurones (206), ainsi que les thyrocytes (207). Elle est la seule NOX qui possède une activité constitutive de génération de ROS c'est à dire une activité qui dépend directement du niveau de son expression (47). Dans les thyrocytes humains, l'expression de NOX4 est contrôlée au niveau transcriptionnel par la TSH (207).

L'hétérodimérisation de NOX4 avec la protéine membranaire p22<sup>phox</sup>, est indispensable à l'activité génératrice de ROS (208) (Figure 28). Une autre protéine régulatrice, non membranaire : la « polymérase  $\delta$ -interacting protein 2 » ou Poldip2, qui se lie à la p22<sup>phox</sup>, régule positivement l'activité de NOX4 (209). De manière intéressante, il a été observé que Poldip2 est fortement exprimé dans la thyroïde (*DUPUY C et al.*, données non publiées). Selon le contexte cellulaire, la petite GTPase Rac 1 (botulinum C3 liées à Ras toxine substrat 1) semble également être impliquée dans la régulation de l'activité de NOX4 (210).

Concernant le mécanisme de production de ROS, il a été montré que des modifications structurales dans une des boucles extra-cytosoliques de NOX4 (la E-boucle) peut changer une activité génératrice d' $\text{H}_2\text{O}_2$  en une activité génératrice d' $\text{O}_2^{\bullet-}$  (46, 211), il s'agit d'une caractéristique particulière qui distingue cette enzyme des autres protéines NOX. Cette E-boucle contient une histidine hautement conservée qui pourrait servir comme source de protons pour accélérer la dismutation spontanée de l' $\text{O}_2^{\bullet-}$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Plusieurs variants d'épissage de NOX4 ont été décrits, codant différentes protéines fonctionnelles (212). NOX4 est active non seulement à la membrane plasmique, mais aussi dans différents compartiments et organites intracellulaires tels que le réticulum endoplasmique, la mitochondrie et le noyau (213, 214). La présence de NOX4 dans l'environnement nucléaire pourrait être à l'origine de modifications redox qui influencent non seulement la liaison de facteurs de transcription à l'ADN et donc l'expression de gènes, mais également des activités enzymatiques liées à la signalisation des dommages à l'ADN ainsi qu'à leur réparation (46).



**Figure 28 :** Schéma représentatif de la protéine NOX4 et de son partenaire membranaire fonctionnel p22<sup>phox</sup>. La NADPH oxydase NOX4 forme avec la p22<sup>phox</sup> un hétérodimère membranaire. La génération de ROS par ce complexe conduit à la production du peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) à partir de deux molécules d'oxygène ( $2\text{O}_2$ ) réduit en deux anions superoxydes ( $2\text{O}_2^{\bullet-}$ ).

#### b. p22<sup>phox</sup> : partenaire fonctionnel de la NOX4 :

Le gène codant la protéine p22<sup>phox</sup> est situé au niveau du chromosome 16 en position 16q24. Il s'agit d'une protéine membranaire dont la masse moléculaire est de 22 kDa (d'où son nom p22). Etant le partenaire fonctionnel de plusieurs NADPH oxydase y compris NOX4, sa localisation subcellulaire est

de fait dépendante du lieu d'expression de ces dernières (208, 215, 216). La p22<sup>phox</sup> forme avec chacune des quatre NOXs (NOX1, NOX2, NOX3 et NOX4) auxquelles elle est associée un hétérodimère. L'expression de NOX4 stabilise celle de la protéine p22<sup>phox</sup> (208).

## 2.2. La NOX4 et le cancer de la thyroïde

L'implication des ROS dans la pathogenèse des cancers a été étudiée dans plusieurs tissus tumoraux. L'analyse de l'expression de NOX4 et de p22<sup>phox</sup> dans les tissus normaux et tumoraux de la thyroïde a montré que les deux protéines ont une expression augmentée dans les cancers papillaires de la thyroïde suggérant un rôle de cette NADPH oxydase dans la pathogenèse de ces cancers (207). L'expression conditionnelle de l'oncogène H-RAS<sup>V12</sup> dans les thyrocytes humains régule positivement le niveau de ROS généré par NOX4. Ces ROS, ainsi produites, induisent des dommages à l'ADN, lesquels contribuent à un stress réplcatif à l'origine de la senescence (217). Ceci a été également observé dans des fibroblastes humains (218).

Globalement le rôle de NOX4 dans la tumorigenèse a été jusqu'à présent peu étudié. Récemment il a été montré que NOX4 régule la production de cytokines telles que l'IL-6 et IL-8 dans les cellules cancéreuses rénales lors d'une hypoxie, induisant ainsi la migration cellulaire et l'invasion tumorale (219). NOX4 induit également la transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT) chez les cellules cancéreuses du sein. Le TGF $\beta$  secrété dans le milieu extracellulaire par les cellules du stroma induit l'expression de NOX4 qui stimule la migration des cellules épithéliale du cancer du sein et l'invasion (220). Par ailleurs, il a été montré que les ROS générés par NOX4 sont impliquées dans la régulation du taux de production du VEGF *via* l'expression du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  (221). L'ensemble de ces résultats ont mis en évidence le rôle de la NADPH oxydase NOX4 dans la régulation de l'angiogenèse et de la croissance tumorale.

# Objectifs du travail

La majorité des cancers de la thyroïde sont des cancers de type papillaires. Ceux-ci se caractérisent notamment par la présence chez l'adulte de la mutation BRAF<sup>V600E</sup> dans 45% des cas. La voie MAP kinase/ERK joue un rôle majeur dans la tumorigenèse et dans la progression des cancers papillaires, et BRAF en est un puissant activateur. La mutation V600E de BRAF, qui représente 90% des mutations de BRAF et qui est également présente dans 40% des mélanomes, est associée aux tumeurs thyroïdiennes les plus agressives avec des extensions extra-thyroïdiennes, des métastases et une mortalité augmentée chez les patients. Des études *in vivo* et *in vitro* ont démontré le rôle clé de BRAFV600E dans la promotion et la progression tumorales conduisant à une évolution vers les stades les plus indifférenciés tel que le cancer anaplasique (222). Il existe cependant peu d'informations concernant les cibles moléculaires de BRAF muté et des kinases qu'il active dont la dérégulation serait à l'origine de ce mauvais pronostic. Ainsi il n'est pas complètement compris de quelle manière l'expression de BRAF muté contribue au caractère agressif des cancers papillaires de la thyroïde incluant : une instabilité génétique, une altération de l'expression de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme de l'iode, en particulier, celui du transporteur de l'iode (NIS) dont l'expression est cruciale pour le traitement des patients par la radiothérapie métabolique à l'iode 131. Des études récentes ont montré que la voie du TGFβ contribue à la carcinogenèse et à la dédifférenciation des cancers papillaires thyroïdiens porteurs de la mutation BRAF<sup>V600E</sup>. Or, les ROS sont d'importants médiateurs des effets du TGFβ dans le développement de cancers. Plusieurs études ont mis en évidence que NOX4, en tant que système générateur de ROS, est régulé positivement par le TGFβ dans plusieurs cancers dont le cancer du sein (220, 223, 224). Bien que NOX4 ait été montré être surexprimé dans les cancers papillaires (207), son rôle dans la tumorigenèse thyroïdienne en général, et celle contrôlée par BRAF muté en particulier, reste à déterminer.

# Matériel & Méthodes

## I. Matériel Biologique :

### 1. Lignées cellulaires :

Trois lignées cellulaires thyroïdiennes sont utilisées dans la présente étude, deux cancéreuses d'origine humaine et une troisième normale issue du rat.

#### 1.1. Lignées cellulaires cancéreuses humaines :

En premier lieu nous avons utilisé une lignée tumorale thyroïdienne humaine porteuse de la mutation BRAF<sup>V600E</sup> issue d'un carcinome papillaire différencié, la lignée BCPAP (225, 226). Le profil génomique de cette lignée cellulaire ne révèle aucune contamination croisée avec d'autres lignées cellulaires (225). Elle constitue alors un modèle cellulaire pertinent pour l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement des tumeurs thyroïdiennes peu différenciées et porteuses de la mutation BRAF<sup>V600E</sup>. Afin de confirmer et valider nos résultats, nous avons utilisé une deuxième lignée cellulaire cancéreuse présentant la mutation BRAF<sup>V600E</sup>, issue d'un cancer papillaire non-différencié, nommée 8505C. Les deux lignées cellulaires 'BCPAP & 8505C' proviennent du Leibniz Institute DSMZ – « German Collection of Cell Cultures ».

#### 1.2. Lignée cellulaire thyroïdienne de rat :

Une troisième lignée cellulaire est également utilisée dans cette étude, dite PC-BRAF<sup>V600E</sup>, il s'agit d'un clone de cellules thyroïdiennes normales et bien différenciées de rat (lignée cellulaire PCCL3) exprimant l'oncogène BRAF<sup>V600E</sup> d'une manière conditionnelle dépendante de la doxycycline (167, 227).

## 2. Thyrocytes en culture primaire

Finalement l'étude a été complétée par la validation de l'ensemble des résultats dans des thyrocytes normaux humains en culture primaire que nous avons préparés au laboratoire à partir de tissu thyroïdien sain, selon le protocole décrit dans la partie des méthodes.

## **II. Méthodes:**

### 1. Culture cellulaire et conditions de culture:

Les cellules sont cultivées dans un milieu de culture approprié à chaque lignée cellulaire. Toutes les manipulations d'entretien quotidien des cellules, sont effectuées dans des conditions stériles sous une hotte à flux laminaire vertical. Les lignées cellulaires sont maintenues à 37°C dans une atmosphère saturée en humidité et contenant 5% de CO<sub>2</sub>. L'état des cellules ainsi que leur pourcentage de confluence sont contrôlés au microscope inversé à contraste de phase. Après chaque décongélation, la non-contamination des cellules par les mycoplasmes est vérifiée.

#### 1.1. BCPAP et 8505C :

Les lignées cellulaires BCPAP et 8505C, sont cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (4.5 g/l glucose) (Life Technologies). Le milieu de culture est complété par 10% (vol/vol) de sérum de veau foetal (SVF) (Life Technologies), et par 1% de mélange d'antibiotiques Pénicilline/Streptomycine (100 mg/ml; Life Technologies).

#### 1.2. PCCL3 exprimant conditionnellement l'oncogène BRAF<sup>V600E</sup> (PC-BRAF<sup>V600E</sup> cells):

Les cellules PC-BRAF<sup>V600E</sup> sont dérivées de la lignée cellulaire de thyroïde de rat PCCL3 de telle sorte à avoir une expression conditionnelle de l'oncogène BRAF<sup>V600E</sup> inductible par la doxycycline (227). Les cellules PC-BRAF<sup>V600E</sup> sont cultivées dans le milieu de culture Coon's modified Ham's - F12 (Life Technologies) supplémenté par 5% SVF (Life Technologies) sans

tétracycline (Tet-free) et en présence d'un mélange de six hormones : 1 U/l de TSH bovine (Sigma-Aldrich); 10 mg/l d'insuline humaine (Roche Applied Science); 10 mg/l de somatostatine (Sigma-Aldrich); 6 mg/l de transferrine humaine (Roche Applied Science);  $10^{-8}$  M d'hydrocortisone (Roche Applied Science); et 10 mg/l d'acétate glycyL-histidyllysine (Sigma-Aldrich).

### 1.3. Thyrocytes primaires :

Les thyrocytes en culture primaire sont préparée et entretenues selon le protocole décrit précédemment par l'équipe (202, 207). Brièvement, le tissu thyroïdien (3 à 5 g) est lavé dans le milieu de culture Coon's modified Ham's - F12 (Life Technologies), contenant les antibiotiques Pénicilline/Streptomycine (100 mg/ml; Life Technologies), puis couper en tout petit fragment à l'aide de ciseau/scalpel dans du tampon PBS (Phosphate Buffered Saline) pH 7,4 et sans Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) et Magnésium ( $\text{Mg}^{2+}$ ) (Life Technologies). Pour séparer les cellules épithéliales du tissu conjonctif, les fragments sont digérés avec de la collagénase I (100 U / ml) (Invitrogen) et de la Dispase II (2,4 U / ml) (Roche Applied Science) à 37 ° C pendant 35-40 min sous agitation. Le tissu digéré est filtré à travers une gaze stérile, puis les cellules sont lavées 2 à 3 fois dans du PBS pH 7,4 par centrifugations successives à 200 g pendant 5 min à température ambiante. Finalement, le milieu DMEM- F12 additionné de 5% (vol/vol) de sérum de veau foetal (SVF) (Life Technologies), 2 mM L-glutamine (Invitrogen), 1% d'acides aminés non essentiels (PAA Laboratories) et six hormones (milieu 6H): 1 U/l de TSH bovine (Sigma-Aldrich); 10 mg/l d'insuline humaine (Roche Applied Science); 10 mg/l de somatostatine (Sigma-Aldrich); 6 mg/l de transferrine humaine (Roche Applied Science);  $10^{-8}$  M hydrocortisone (Roche Applied Science); et 10 mg/l d'acétate glycyL-histidyllysine (Sigma-Aldrich). Les cultures primaires de cellules de la thyroïde forment une monocouche confluyente au bout de 5-7 jours. Dans ces conditions, les thyrocytes humains expriment tous les marqueurs de différenciation thyroïdienne.

#### 1.4. Traitement des cellules en culture :

Dans la présente étude, plusieurs manipulations sont réalisées en utilisant divers inhibiteurs et agents pharmacologiques, dont le protocole expérimental dépend de l'expérience réalisée, du type des cellules précédemment décrites et de l'inhibiteur et/ou agent pharmacologique lui-même, il s'agit de:

- Inhibiteurs de : la voie TGF- $\beta$ 1 (SB431542; Calbiochem), de la phosphorylation de Smad3 (SIS3; Sigma-Aldrich), de la voie de signalisation MAPK (U0126, Calbiochem), et de l'oncogène BRAFV600E (PLX4032; Selleckchem); Ils sont utilisés à une concentration de 10 $\mu$ M sur des cellules 30 à 50% confluenteensemencées dans les plaques de six puits, 2 $\mu$ l de l'inhibiteur 1000x concentré (1mM) est ajouté dans 2ml du milieu contenu dans chaque puit environ 12h après ensemencement.
- TGF- $\beta$ 1 recombinante humaine (Peprotech), est utilisée pour le traitement des thyrocytes en culture primaire à une concentration de 10 ng/ $\mu$ l afin de mimer l'effet de l'oncogène BRAFV600E qui induit la sécrétion du TGF- $\beta$  dans les lignées cellulaires (167).
- N-acétylcystéine (Sigma-Aldrich), agent connu pour son effet antioxydant. Il est utilisé dans notre étude à une concentration de 1 mM, pour évaluer l'effet des ROS générés par NOX4 sur l'expression du NIS au niveau protéique et transcriptionnel (ARNm).
- Et de la doxycycline (Sigma-Aldrich) : Les cellules PC-BRAFV600E sont traitées avec 1 g/ml de la doxycycline pendant 48h, pour induire l'expression conditionnée de l'oncogène BRAFV600E dans ce clone cellulaire.

Les cellules sont récupérées après traitement à différents temps de cinétique 3h, 6h, 10h/12h, 24h, 36h, 48h, et/ou 72h selon le type de l'expérimentation effectuée. Ensuite, les ARN totaux sont extraits pour étudier l'expression en ARNm par qRT-PCR ; ou bien une extraction des protéines (lysats totaux ou fractions membranaires) est effectuée afin d'analyser l'expression des protéines d'intérêt par western blot.

## 2. Transfection cellulaire :

Les cellules sont transfectées à 50% -60% de confluence, en utilisant le réactif de transfection INTERFERIN (Polyplus - Transfection) selon le protocole du fabricant, avec différents types de siRNA (stealth RNAi duplex) humain ou du rat selon le type de la lignée cellulaire à transfectées (Tableau 4) :

- Des siRNA (stealth RNAi duplex; Invitrogen) humains spécifiques dirigés contre NOX4,
- Un mélange de siRNA humains contrôle (Invitrogen),
- Des siRNA humains contre p22<sup>phox</sup>,
- Des siRNA humains contre BRAF,
- et des siRNA de rat contre NOX4 et contrôle (smart pool ; Dharmacon).

**Tableau 4 : Les Séquences des différents siRNA**

<i>Human siRNA control</i>	Stealth RNAi siRNA negative control (Life Technologies)
<i>Human siRNA NOX4</i>	Stealth RNAi duplex (Life Technologies) NOX4-1: 5'-GGAGAACCAGGAGAUUGUUGGAUAA-3' 5'-UUAUCCAACAAUCUCCUGGUUCUCC-3' NOX4-2: 5'-AGAGUGAAGACUUUGUUGAACUGAA-3' 5'-UUCAGUUCAACAAAGUCUUCACUGU-3' NOX4-3: 5'-CCUCAUGAUCACAGCCUCUACAUAU-3' 5'-AUAUGUAGAGGCUGUGAUCAUGAGG-3'
<i>Human siRNA p22<sup>phox</sup></i>	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'-UACCAGGAAUACUAUGUU-3'
<i>Rat siRNA control</i>	ON-TARGET plus nontargeting pool (Dharmacon)
<i>Rat siRNA NOX4</i>	ON-TARGET plus SMART pool (Dharmacon) 1: 5'-ACAGAAAGAUUCCGAGAUU-3' 2: 5'-CAUAUCACCGUGGGCAUAA-3' 3: 5'-GUGUGUGGCUGGAGGCAUU-3' 4: 5'-CCGUUGCAUCGAUACUAA-3'

## 3. Dosage des ROS intracellulaires :

### 3.1. Préparation des cellules :

Les cellules traitées sont récupérées par trypsinisation, et remises en suspension après centrifugation dans 0,5 ml de HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) et incubées avec 10 mM de une sonde sensible à l'état redox, 2', 7' -dichlorofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCFDA; Molecular Probes, Life Technologies) pendant 30 à 45 min dans l'obscurité à 37 °C. La fluorescence est mesurée par cytométrie en flux ou sepctrofluorimétrie.

### 3.2. Dosage des ROS intracellulaire au FACS C6 :

Le taux des ROS intracellulaires générés dans les cellules chargées avec l'agent fluorescent H<sub>2</sub>DCFDA est mesuré par cytométrie en flux sur le canal FL-1 du FACScan (C6) utilisant le logiciel Cflow. Le H<sub>2</sub>DCFDA non fluorescent diffuse facilement dans les cellules, où il est hydrolysé en dérivé polaire DHFC, qui est oxydé en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en dérivé FCD fortement fluorescent. Excitée à 488 nm, la forme oxydée émet une fluorescence verte dont le maximum d'intensité se situe vers 518 nm. Le ratio 518/488 nm des intensités de fluorescence mesurées nous permet d'évaluer la quantité de ROS produites. Les résultats sont exprimés en variations du taux de fluorescence émise par les cellules traitées comparée à celle émise par les cellules non traitées (contrôles).

## 4. L'analyse par Western-blot :

### 4.1. Préparation des extraits cellulaires

Après les différents temps d'incubations des traitements et/ou transfections, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS froid et directement solubilisés dans le tampon de lyse RIPA (Sigma-Aldrich) complémenté avec un mélange d'inhibiteurs de phosphatases et protéases (Roche Applied Science). Les échantillons protéiques sont récupérés après incubation des lysats pendant 1 heure avec agitation à 4°C et puis centrifugation à 10 000 rpm pendant 30 min. Les débris cellulaires sont sédimentés et les surnagants contenant les protéines sont ensuite récupérés et la teneur en protéines est dosée par la méthode de Bradford à l'aide du Kit Bio-Rad *RC DC™* protein assay. Les échantillons protéiques sont aliquotés et conservés à -20°C.

## 4.2. Analyse de l'expression des protéines par Western-blot

### a. Migration et électro-transfert :

Une quantité égale de protéines (20 à 25 µg) est mélangée avec du NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X) (Thermo Scientific) et du DTT dithiothreitol (10X) dans un volume final de 30 µl complété par le tampon de lyse (RIPA) utilisé pour la préparation des extraits des protéines. Les échantillons sont ensuite incubés à 70°C pendant 10 min sous agitation. Ces derniers ainsi que des marqueurs de poids moléculaires sont déposés dans les puits d'un gel préalablement coulé de polyacrylamide. Le gradient des gels, le temps de migration (180V) et le temps du transfert (à 30 V) varie selon la taille des protéines à détecter. Le tampon de migration est le Tris/Glycine (Tris 25mM pH 8,3 ; Glycine 192 mM ; SDS 0,1%). Après migration, les protéines sont électro-transférées sur membrane nitrocellulose 0,2 mm Protan BA 83. Le tampon du transfert est composé de : Tris base 20 mM ; Glycine 150 mM et Isopropanol 20%. Afin de vérifier la qualité du transfert, la membrane est colorée dans la solution de rouge Ponceau sigma (Ponceau S 0,1% dissout dans une solution de l'acide acétique à 5 % (v/v)).

### b. Hybridation et immuno-détection

Avant de réaliser l'hybridation de la membrane avec les anticorps spécifiques, il est important d'éviter toute possibilité de fixation non spécifique. La membrane est donc saturée par incubation pendant une heure dans du tampon TBS-T (TBS (TRIS/HCl pH 7.5 20 mM ; NaCl 500 mM); 0,05 % de Tween 20) et contenant 5 % de lait écrémé en poudre ou de la BSA. Après saturation, la membrane est alors incubée pendant une nuit à +4°C, en présence d'un anticorps spécifique de la protéine recherchée dans du TBS-T contenant 1,5 % de lait écrémé ou de la BSA, à une dilution appropriée. Après trois lavages dans du TBS-T, la membrane est incubée pendant 45 à température ambiante sous agitation en présence de l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase ou la phosphatase alcaline (dilué dans du TBS-T contenant 1,5 % de lait écrémé ou de la BSA). Les différents anticorps, leurs

spécificités, leurs concentrations et le temps d'incubation sont présentées dans le Tableau 5. La révélation est réalisée par le kit ECL (ECL Western blotting detection reagents. Amersham biosciences), ou par l'addition du substrat de la phosphatase alcaline.

**Tableau 5 : Liste et caractéristiques des anticorps primaires et secondaires employés**

Anticorps dirigé contre	Espèce	Dilution	Fournisseur
NOX4	Monoclonal de Lapin	1/1000	OriGene
pSmad3 (ser 423)	Monoclonal de Lapin	1/2000	Abcam
p22 <sup>phox</sup>	polyclonal de Lapin	1/1000	Santa Cruz Biotechnology, Inc
NIS	Monoclonal de Souris	1/500	Thermo Scientific
BRAF <sup>V600E</sup>	Monoclonal de Lapin	1/1000	Spring Bio
β-actine	Monoclonal de Lapin	1/5000	Sigma-Aldrich
vinculine	Monoclonal de Souris	1/5000	Abcam

## 5. Biotinylation des protéines de la surface cellulaire :

La biotinylation de surface est une technique qui consiste à marquer d'une manière covalente les protéines exprimées à la membrane plasmique des cellules en culture, soit en monocouche ou en suspension à la Biotine. La biotinylation utilise la capacité de la vitamine soluble biotine à se lier aux protéines. La biotine se lie à la protéine streptavidine ou l'avidine et est donc utile dans la biologie cellulaire permettant l'étude de l'expression des protéines cellulaire telles que des récepteurs.

Dans notre étude, nous avons choisi une biotine modifiée, la Sulfo-NHS-Biotin, qui a pour particularité de se fixer aux groupements amines des protéines et de ne pas pouvoir traverser la membrane plasmique. Les protéines membranaires ainsi couplées à la biotine pourront être purifiées par affinité grâce à l'avidine en utilisant le kit 'Cell Surface Protein Isolation Kit'

(Pierce, Life Technologies) et de l'agarose avidine (Sigma-Aldrich) selon le protocole décrit par le fabricant.

Brièvement, Les cellules en monocouche préalablement traitées sont lavées trois fois avec du PBS froid (+MgCl<sub>2</sub> +CaCl<sub>2</sub>) pH 8,0 (+4°C). Ensuite, les cellules sont incubées en présence de 1 mg/ml du cross-linker marqué à la Biotine (EZ-Link® Sulfo-NHS- Biotin) pendant 30 min à 4°C. Deux lavages sont effectués par la suite par du PBS (+MgCl<sub>2</sub> +CaCl<sub>2</sub>) 100 mM Glycine afin d'éliminer tout excès de la Biotine. Puis, les cellules sont solubilisées dans 100 µl du tampon de lyse destiné à l'extraction des protéines. Les échantillons protéiques sont récupérés après incubation des lysats pendant 1 heure sous agitation à 4°C et puis centrifugation à 70 000 x g à l'aide d'une Ultracentrifugeuse pendant 30 min à 4°C. Après trois lavages dans le même tampon de lyse utilisé précédemment, le surnageant est incubé pendant la nuit avec 100µl d'Agarose–Avidine à 4°C en rotation, Le lendemain, nous séparons les protéines biotinylées du reste des protéines non-marquées à la Biotine par centrifugation à 9 000 x g pendant 1 min à 4°C. Les billes d'agarose sont lavées à 4°C plusieurs fois avec le tampon de lyse et deux fois avec du PBS (+MgCl<sub>2</sub> +CaCl<sub>2</sub>) pH 8,0. Enfin l'élution ou la re-suspension est effectuée dans 100 µl du tampon de lyse complété par du LDS -Buffer (1X) et du DTT (1X) et 2 mM de la Biotine, après incubation pendant 1 heure à température ambiante sous agitation. L'expression des protéines d'intérêts est analysée par Western blot.

## 6. PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR) :

### 6.1. Extraction des ARN totaux

Les ARNs totaux sont extraits selon le protocole du «TRIzol» (Life Technologies) qui est basé sur la méthode de «Chomczynski and Sacchi». L'ARN est séparé de l'ADN dans des conditions acides en présence du guanidinium thiocyanate, acétate de sodium, phénole et chloroforme. L'ARN, récupéré dans la phase aqueuse, est précipité en présence de l'isoprpanole. Brièvement, les cellules contenues dans les puits des plaques à

6 puis et qui ont subi différents traitements sont lavées par le PBS et sont lysées dans 1 ml de TRIzol sous la hotte chimique. L'addition du chloroforme (200 µl) sous la hotte chimique suivie d'une centrifugation (1200 rpm ; 15 min ; 4°C), permet la séparation des trois phases : phase aqueuse (contient les ARN totaux), interphase (contient l'ADN et les protéines) et la phase organique. La phase aqueuse, qui contient les ARN totaux, est récupérée dans un tube eppendorf propre et les ARN sont précipités en présence de l'isopropanol (500 µl) après centrifugation (1200 rpm ; 10min ; 4°C). Après deux lavages par l'Éthanol 70%, le culot des ARN est séché sous une hotte à flux laminaire puis solubilisé dans l'eau (Rnase et Dnase free). La lecture spectrophotométrique (au Nanodrop) aux longueurs d'ondes 260 et 280 nm nous permet de quantifier les ARN (DO à 260 : 1 (0.04 µg/µl)) et contrôler leur pureté (le rapport DO260/DO280 doit être entre 1,8 et 2). Afin de contrôler la qualité des ARN, 1 µg d'ARN totaux est sujet à une migration sur gel d'agarose. Brièvement, sur 1µg d'ARN totaux (qsp 25 µl) on ajoute 5 µl de bleu de charge 6X (0,25% de Xylène Cyanol ; 30% de glycérol). Après, on dépose l'ensemble dans un gel d'agarose 1% (1g d'Agarose dans 100 ml de TBE 1X (90 mM Tris-Borate ; 0,02 M d'EDTA)). La migration s'effectue à 100 v pendant 20 min et la visualisation des ARNs se fait après incubation des gels dans le BET (Bromure d'Ethidium) sous rayonnements UV dans un « Gel imaging system». Le profil normal des ARNs non dégradés consiste à voir essentiellement 2 bandes des ARNs ribosomiaux non dégradés (28S et 18S).

## 6.2. RT-PCR (Reverse Transcription PCR):

La reverse transcription est une transcription inverse d'un acide ribonucléique (ARN) en ADN complémentaire (ADNc). C'est une technique utilisée pour évaluer l'expression des gènes. Une amorce de 'random hexamer' est utilisée pour amorcer la réverse transcription de tous les ARNm. La reverse transcriptase utilisée est la Maxima Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) qui est active à 60°C et comporte une activité Rnase H qui élimine les ARN qui ont servis comme matrices à la reverse transcriptase. Brièvement, 1 µg d'ARN totaux sont incubés pendant 60 min à 60°C dans un

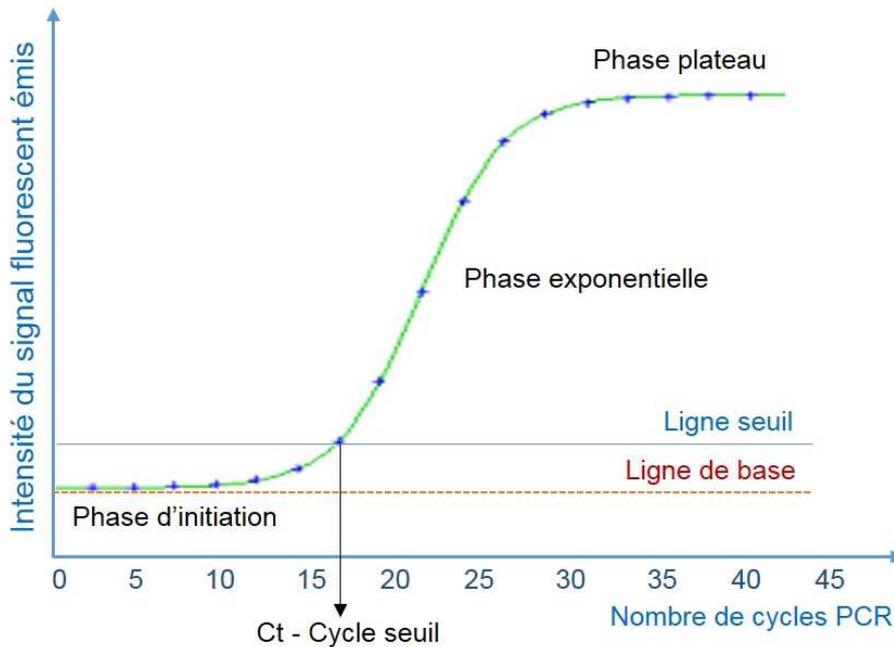
volume réactionnel de 20 µl contenant : ARN totaux (1 µg) ; 'random hexamer' (2,5 µM) ; dNTP (500 µM) ; Tampon de la Maxima Reverse Transcriptase (1X); la Maxima Reverse Transcriptase (10 U/ul) ; Eau Rnase et Dnase free (qsp 20 µl). Après, une incubation à 85°C pendant 5 min est nécessaire pour inactiver l'enzyme transcriptase.

### 6.3. Réaction en Chaîne par Polémyrase quantitative en temps réel : qRT-PCR

Le principe de la PCR quantitative est basé sur la possibilité de suivre au cours du temps « en temps réel » le processus de la PCR et alors la détection puis quantification de la fluorescence émise par l'agent fluorescent. La fluorescence émise est collectée à chaque cycle de la PCR et représente la quantité de produits amplifiés à cet instant, et le signal émis est proportionnel à la quantité du gène amplifié par PCR.

Plus l'échantillon analysé est concentré en gènes cibles à l'origine, moins il faudra de cycles pour atteindre un point pour lequel le signal fluorescent est significativement supérieur au bruit de fond. Ce point est défini comme le Ct (threshold cycle) et apparaît en début de phase exponentielle. Si l'on suit la fluorescence au cours du temps d'une PCR en temps réel, on observe une augmentation de cette fluorescence et donc du nombre de fragments PCR en 3 phases distinctes (Figure 29):

- Phase de bruit de fond : La quantité de fragment amplifié est insuffisante pour générer un signal fluorescent supérieur au bruit de fond (et donc la fluorescence générée).
- Phase exponentielle : La quantité de fragments amplifiés génère un signal fluorescent supérieur au seuil de détection de l'appareil, puis le nombre de produits amplifiés double à chaque cycle. En coordonnées logarithmiques, cette phase est représentée par une droite.
- Phase de plateau (ou de saturation) : certains composants de la réaction deviennent limitants (exemple la Taq). Et à ce stade le système ne permet plus une amplification exponentielle.



**Figure 29 :** Schéma d'une courbe de suivi d'une réaction PCR en temps réel ; représentant les différentes étapes du cycle d'amplification qRT-PCR

Dans la présente étude nous avons utilisé deux types d'agents de fluorescence :

- Le premier utilise une sonde interne fluorescente spécifique du produit amplifié, appelées sondes d'hydrolyse ou sondes Taqman (Applied Biosystems) utilisent l'activité 5' exonucléasique de la Taq polymérase pour hydrolyser une sonde fluorescente fixée sur sa cible. Cette cible se situe à l'intérieur d'un produit PCR amplifié par deux amorces. Elle s'hybride durant la phase d'hybridation – allongement de la PCR. Cette sonde contient un fluo rapporteur à son extrémité 5' dont l'émission est quenchée par un second fluorophore situé à l'extrémité 3'. Le système Taqman utilise une étape combinée d'hybridation et de polymérisation à 60-62°C.
- Le second type de format utilise les propriétés d'un fluorophore spécifique de l'ADN, dit le SyBerGreen, qui s'incorpore dans le petit sillon de la double hélice d'ADN et fluoresce. En PCR temps réel, on observe une augmentation du signal au cours de l'étape d'élongation et une chute de ce même signal au moment de la dénaturation. Avec ce type d'agent fluorescent, on mesure donc l'augmentation de fluorescence à la fin de

chaque étape d'élongation de chaque cycle. La spécificité de cette technique dépend complètement de la spécificité des amorces utilisées. La vérification de cette spécificité est réalisée à la fin de l'étape d'amplification grâce à la courbe de fusion : on observe la diminution de la fluorescence en fonction de l'augmentation de la température. Un pic de fusion d'un produit PCR va se distinguer facilement des pics de fusion de produits non spécifiques qui vont fondre à des températures plus faibles en des pics généralement plus larges.

Les oligonucléotides (amorces) sont achetés auprès de la boîte 'Eurofins Genomics'. Les Q-PCR sont réalisées sur l'équivalent de 10 ng d'ARN total par tube dans un volume final de 18 µl (117, 207). Chacune des amorces et des sondes est contrôlée pour les inter-réactions, et pour fournir une efficacité d'amplification optimale testée avec des courbes d'étalonnage construites à partir de pools d'ADNc de plusieurs tissus et lignées cellulaires qui ont été dilués en série dans de l'H<sub>2</sub>O DNase-free. Nous avons utilisé également deux gènes de ménage, GAPDH et 'TATA-box binding protein' (TBBP), qui sont préalablement validées comme gènes de contrôle interne dans les tissus de la thyroïde.

Les séquences des amorces et des sondes fluorescentes utilisées dans l'étude de l'expression des gènes cibles des deux espèces étudiés (homme et rat) sont présentées dans les tableaux ci-dessous Tableau 6 et 7.

**Tableau 6 : Liste des séquences des amorces et des sondes fluorescentes TaqMan utilisées pour la qRT-PCR afin d'analyser l'expression en ARNm des gènes humains**

Nom de l'amorce	Séquences des amorces	Sonde fluorescente TaqMan
<b>DUOX1</b>	5'-CCAGCAATCATCTATGGGGGC-3' (+)	5'-FAM- AGCAGCGTGGTGAAGGCCG AGC-3' TAMRA
	5'-TGGGGCCGCTGGAACC-3' (-)	
<b>DUOX2</b>	5'-CCGGCAATCATC TATGGAGGT-3' (+)	
	5'-CCTGGGGCCTCTGGAATT-3' (-)	
<b>NOX4 humaine</b>	5'-TGTCTTCTACATGCTGCTGACGTT-3' (+)	5'-FAM- CAAATAATTTAGATACCCAC CCTCCCGGC 3'-TAMRA
	5'-CTGAGAGCTGGTTTCGGTTAAGACT-3' (-)	
<b>p22<sup>phox</sup> humaine</b>	5'-GCGCTCACCCAGTGGTACTT-3' (+)	5'-FAM- TTGTGGCGGGCGTGTGGTGTG - 3' TAMRA
	5'-GGTGGAGCCCTTCTCCTCTT-3' (-)	
<b>NIS humain</b>	5'-CCATCCTGGATGACAACTTGG-3' (+)	5'-FAM- AGAACTCCCCACTGGAAACA AGAAGCCC-3' TAMRA
	5'-AAAAACAGACGATCCTCATTG- 3' (-)	
<b>TBBP humain</b>	5'-GAATATAATCCCAAGCGGTTTGC-3' (+)	5'-FAM- AGGATAAGAGAGCCACGAA CCACGGC- 3' TAMRA
	5'-CTTAGCTGGAAAACCCAACCTCTG- 3'(-)	
<b>Gene de ménage TBBP</b>	5'-GAATATAATCCCAAGCGGTTTGC-3' (+)	5'-FAM- AGGATAAGAGAGCCACGAA CCACGC- 3' TAMRA
	5'-CTTAGCTGGAAAACCCAACCTCTG-3' (-)	

**Tableau 7 : Liste des séquences des amorces utilisées dans la qRT-PCR par le Sybergreen afin d'analyser l'expression en ARNm des gènes.**

Nom de l'amorce	Séquences des amorces
<b>DUOX1 du rat</b>	5'-GATACCCAAAGCTGTACCTCG-3' (+)
	5'-GTCCTGTACCCAGATGAAG-3' (-)
<b>DUOX2 du rat</b>	5'-TGCTCTCAACCCCAAAGTG-3' (+)
	5'-TCTCAAACCAGTAGCGATCAC-3' (-)
<b>NIS du rat</b>	5'-GCTCATCCTGAACCAAGTGA-3' (+)
	5'-ACGAGCATTACCACAACCTG-3' (-)
<b>NOX4 du rat</b>	5'-TCCATCAAGCCAAGATTCTGAG-3' (+)
	5'-GGTTCCAGTCATCCAGTAGAG-3' (-)
<b>GAPDH du rat</b>	5'-TGATTCTACCCACGGCAAGT-3' (+)
	5'-AGCATCACCCATTGATGT-3' (-)

## 7. Analyse statistique :

Les analyses statistiques sont effectuées à l'aide du logiciel GraphPad. Le test Student (comparaison des moyennes), le F-test (test Fisher pour la comparaison des variances), ainsi que le test ANOVA à deux paramètres (two-way-ANOVA) sont utilisés dans l'ensemble des analyses statistiques. Le niveau de signification est fixé à  $p < 0,05$  pour un intervalle de confiance de 95%. Les analyses comparatives des niveaux d'expression des gènes à travers la base de données TCGA sont présentées sous forme de médianes  $\pm$  (valeur minimale et maximale).

# Présentation de l'article

## Résumé de l'article

**Objectifs :** L'oncogène BRAF<sup>V600E</sup>, un puissant activateur de la voie MAP kinase, est détecté dans 40 - 60% des cancers thyroïdiens papillaires (PTC) qui représentent 80% de la totalité des cancers thyroïdiens. Il est associé à une diminution/perte des gènes impliqués dans l'organification de l'iode, tels que le Sodium/Iodide Symporter (NIS), et alors aussi aux cancers thyroïdiens les plus agressifs réfractaires à la radiothérapie métabolique. L'inhibition de la voie MAP kinase induite constitutivement par l'oncogène BRAF<sup>V600E</sup> ne permet pas seule de rétablir l'expression du NIS, chez des patients atteints d'un cancer de la thyroïde porteur de la mutation BRAF<sup>V600E</sup>. Ce qui suggère que d'autres mécanismes compensatoires peuvent contribuer à cette radorésistance. Des études récentes ont démontré que le TGFβ joue un rôle clé dans le développement des cancers, suggérant ainsi un rôle potentiel du TGFβ fonctionnel dans les cancers thyroïdiens induits par l'oncogène BRAF<sup>V600E</sup>. **Résultats :** Dans la présente étude en utilisant deux lignées humaine issu de cancers thyroïdiens mutés BRAF<sup>V600E</sup>, et une lignée cellulaire thyroïdienne de rat exprimant conditionnellement l'oncogène BRAF<sup>V600E</sup>; PCCL3, nous avons montré d'une part que l'expression de la NOX4 au niveau transcriptionnel est régulée positivement par l'oncogène BRAF<sup>V600E</sup> via l'activation de la voie de signalisation TGFβ/Smad3. D'une manière plus intéressante, l'inhibition spécifique de l'expression de NOX4 par des SiRNA permet de réinduire l'expression du NIS et ainsi le levé de sa répression induite par l'oncogène BRAF<sup>V600E</sup>. **Innovation et Conclusion :** Nos résultats établissent alors un lien de corrélation positive entre BRAF<sup>V600E</sup> et NOX4, ce que nous avons confirmé par une analyse comparative de l'expression de la NOX4 chez l'homme, effectuée sur une cohorte de à peu près 200 échantillons issus de PTC mutés BRAF<sup>V600E</sup> et Non-muté BRAF<sup>V600E</sup>, à partir de la base de données TCGA. Egalement l'analyse de tumeurs thyroïdiennes humaines et murines porteuses de la mutation BRAF<sup>V600E</sup> a prouvé que le niveau d'expression de la NOX4 est inversement corrélé à la différenciation thyroïdienne, suggérant que les autres gènes impliqués dans la différenciation thyroïdienne, en plus du gène NIS, peuvent être réprimé par des mécanismes

sensibles à l'état redox, sous l'effet des ROS produites par la NOX4. Donc cette étude ouvre une nouvelle opportunité d'optimisation de la thérapie métabolique des cancers thyroïdiens par l'iode radioactif  $I^{131}$ .

Mot clés: Cancer thyroïdien papillaire (PTC), radiothérapie métabolique, Natrium Iodide Symporter (NIS), l'oncogène BRAF<sup>V600E</sup>, NADPH oxydase 4 (NOX4), ROS.

# Introduction de l'article :

## La NADPH Oxydase NOX4 est un médiateur critique de la régulation négative de l'expression du sodium/Iodide Symporter induite par l'oncogène BRAF<sup>V600E</sup> dans les cancers papillaires de la thyroïde

L'incidence des cancers de la thyroïde a augmenté durant les dernières années dans le monde d'une manière alarmante. Cette incidence est deux fois plus élevée chez la femme que chez l'homme. La majorité des cancers de la thyroïde sont des cancers différenciés de type papillaires (80% des patients). Ceux-ci se caractérisent notamment par la présence chez l'adulte des mutations BRAF dans 40 - 60% des cas, et la mutation ponctuelle la plus détectée est la mutation BRAF<sup>T1799A</sup> qui code pour la protéine kinase oncogénique constitutivement active BRAF<sup>V600E</sup> (139). Cette mutation est associée à une invasivité et agressivité plus importante des tumeurs et donc un pronostic plus faible de cette maladie (170). Elle est également associée à la dédifférenciation des cellules thyroïdiennes avec une diminution de l'expression des gènes impliqués dans la fonction thyroïdienne (169).

La capacité d'accumulation de l'iode par la thyroïde est assurée par le symporteur sodium iode (NIS pour Natrium Iodide Symporter) : une glycoprotéine membranaire localisée à la membrane basolatérale des thyrocytes. Cette propriété à capter l'iode circulant a été utilisée pendant longtemps dans le diagnostic et le traitement des différentes pathologies de la thyroïde. Elle permet le diagnostic et le traitement des cancers de la thyroïde avec l'iode radioactif ( $I^{131}$ ), et on parle de la thérapie à l'iode radioactif ou bien radiothérapie métabolique. Cependant, en raison d'une altération de l'expression de ce transporteur membranaire (NIS) dans certaines tumeurs et métastases, certains patients ne peuvent pas bénéficier de cette thérapie. Ils sont dits cancers réfractaires à la radiothérapie métabolique et sont de ce fait radiorésistants. Afin d'améliorer l'efficacité du

traitement des cancers thyroïdiens résistants à la radiothérapie métabolique, il est important de bien comprendre les mécanismes impliqués dans la régulation négative de l'expression du NIS.

Les tumeurs mutées BRAF<sup>V600E</sup> sont souvent associées à une diminution importante ou une perte complète de l'expression du NIS. La voie MAP kinase/ERK joue un rôle majeur dans la tumorigenèse et dans la progression des cancers papillaires, et BRAF est un puissant activateur de cette voie. La présence d'une mutation BRAF prédit une grande sensibilité des cancers humains aux inhibiteurs de MEK (228). Ainsi, des lignées cellulaires cancéreuses de la thyroïde mutées BRAF<sup>V600E</sup> sont démontrées sensibles aux inhibiteurs de la voie MAP kinases (MAPK) (228, 229), et de petites molécules d'inhibitrices de BRAF ou de MEK peuvent restaurer la capacité des thyrocytes à absorber l'iode radioactif dans les tumeurs thyroïdiennes de souris transgéniques avec une expression conditionnelle de l'oncogène BRAF<sup>V600E</sup> induite par la doxycycline (171). Cependant, il a été également observé que l'inhibition de la voie MEK ne corrige pas la répression de l'expression du NIS fonctionnel induite par BRAF<sup>V600E</sup> dans une lignée cellulaire de la thyroïde de rat (167). Et lors d'une étude clinique pilote chez des patients atteints de cancers thyroïdiens métastatiques porteurs de la mutation BRAF et réfractaires à la radiothérapie métabolique, l'inhibition de la voie MAPK n'inhibe pas complètement la progression du cancer et les effets induits par l'oncogène BRAF<sup>V600E</sup>. En effet, sur neuf patients, seulement un seul a pu bénéficier d'une radiothérapie à l'iode 131 à l'issue du traitement par le Selumetinib, un inhibiteur des kinases MEK1 et MEK2 (230). Plusieurs études ont montré que le TGF- $\beta$  joue un rôle important dans ce processus. TGF- $\beta$  est surexprimée dans les tumeurs humaines (162), y compris les tumeurs malignes de la thyroïde (231), et est un facteur pro-oncogène et pro-métastatique puissant. Son rôle dans le processus de carcinogenèse et dans la signalisation cellulaire est complexe, et le contexte cellulaire semble être un facteur déterminant de l'issue finale de la signalisation TGF- $\beta$  dans les cellules normales et tumorales.

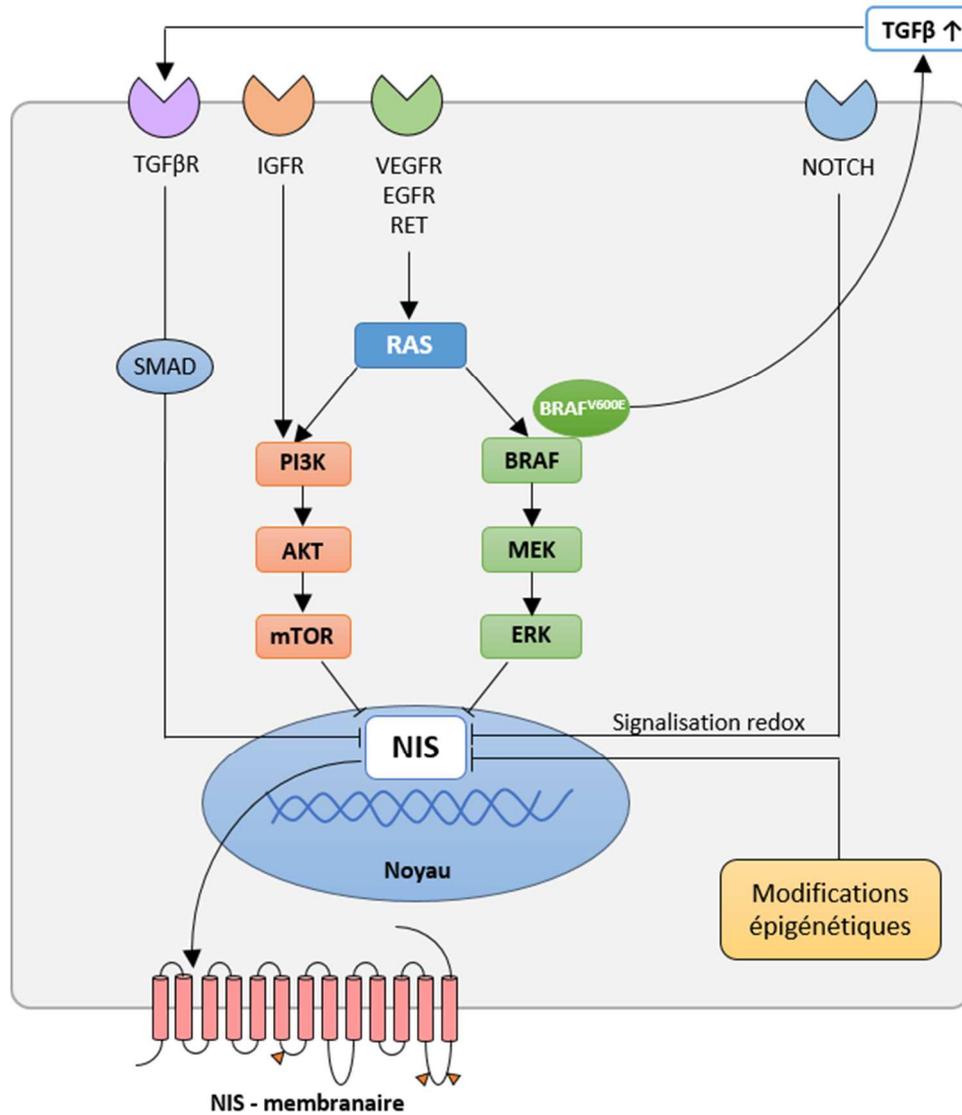
Le TGF- $\beta$  est d'abord montré jouer un rôle important en tant que régulateur local de la fonction thyroïdienne en inhibant la croissance et la différenciation cellulaire dans plusieurs espèces (161, 232, 233). Il peut être un puissant inhibiteur de l'expression des gènes spécifiques de la fonction thyroïdienne, tels que le NIS, la thyroglobuline (Tg), et thyroperoxydase (TPO) (155, 158, 159).

L'expression de l'oncogène BRAF<sup>V600E</sup> induit la production de TGF- $\beta$ 1 fonctionnel, ce qui conduit à l'activation d'une boucle autocrine TGF- $\beta$  qui sert de médiateur, au moins en partie, des effets de oncogéniques de BRAF<sup>V600E</sup>, en particulier la diminution de l'expression du NIS (167), la migration cellulaire, l'invasivité et l'EMT (234). Cependant, le mécanisme moléculaire à la base cette activation de la boucle autocrine TGF- $\beta$  induite par BRAF<sup>V600E</sup> et son implication dans le développement des cancers de la thyroïde n'est pas encore démontrée. Des observations récentes suggèrent que les espèces réactives de l'oxygène (ROS) jouent un rôle important dans l'EMT et la migration cellulaire induites par le TGF- $\beta$ 1, dans plusieurs types de cellules.

Les NADPH oxydases (NOXS et DUOXs) produisent des ROS dans une grande variété de tissus (47). Les cellules cancéreuses produisent des niveaux élevés de ROS et, dans certains cas, une production importante des ROS est liée à une dérégulation de l'expression des NOX/DUOX, comme il été démontré par exemple dans le cancer de la prostate (47), le mélanome (235), et le glioblastome (236). Parmi les NADPH oxydases, la NOX4 est essentiellement exprimée dans un certain nombre de tumeurs telles que le cancer papillaire de la thyroïde (207). Des études récentes ont démontré NOX4 comme étant un nouvel effecteur clé de la voie de signalisation TGF- $\beta$  dans les cancers (237). Ce qui nous mène à considérer NOX4 comme un candidat potentiel pour un système de production de ROS contrôlé par la boucle-TGF- $\beta$  induite par BRAF<sup>V600E</sup> dans les cancers de la thyroïde. Dans cette étude, nous montrons que la NADPH oxydase NOX4 est régulée par BRAF<sup>V600E</sup> d'une manière dépendante de la voie TGF- $\beta$ /Smad3 dans les cellules cancéreuses de la thyroïde, et que la production de ROS par NOX4 joue un rôle crucial dans la diminution ou la perte de l'expression du NIS

induite par la mutation BRAF. Les résultats obtenus sont confirmés dans des échantillons de tissus de patients atteints de cancers de la thyroïde présentant la mutation BRAF<sup>V600E</sup> et chez la souris avec des tumeurs thyroïdiennes induites par la mutation BRAF<sup>V600E</sup>, en montrant ainsi une corrélation positive entre une expression accrue de NOX4 et la présence de la mutation BRAF<sup>V600E</sup>. D'une manière plus intéressante, les tumeurs mutées BRAF ont un score de différenciation thyroïdienne (TDS) inversement corrélée au niveau d'expression de NOX4. Ce qui soutient le modèle où les ROS produites par NOX4 inhibent l'expression des gènes impliqués dans la différenciation de la thyroïde au cours de la tumorigenèse.

En outre, les modifications épigénétiques telles que la méthylation de l'ADN contrôlent le niveau de transcription des gènes et jouent un rôle primordial dans la carcinogenèse. Une hyperméthylation aberrante du gène NIS corrélée à une diminution de l'expression de l'ARNm du NIS est observée dans les cancers de la thyroïde (238, 239). De manière réciproque, une réexpression du NIS est obtenue après traitement de lignées thyroïdiennes tumorales par des inhibiteurs d'ADN méthyltransférases (DNMT), enzymes catalysant la méthylation de cytosines présentes dans des séquences de dinucléotides CpG regroupées sous forme d'îlots dans la région promotrice du gène, tels que la 5-Azacidine et le Sodium butyrate (240). Également, plusieurs études suggèrent que l'activité du promoteur de NIS est dépendante de l'état redox de la cellule (173). Le Resveratrol, agent antioxydant (241), induit l'expression des facteurs de transcription, TTF1, TTF2 et PAX8, impliqués dans la régulation transcriptionnelle de l'expression du NIS, ce qui engendre une augmentation du taux d'expression du NIS au niveau transcriptionnel (242, 243).



**Figure 30:** Les mécanismes moléculaires de la régulation négative de l'expression du NIS, d'après Spitzweg, C., et al (109).

## ORIGINAL RESEARCH COMMUNICATION

# NADPH Oxidase NOX4 Is a Critical Mediator of BRAF<sup>V600E</sup>-Induced Downregulation of the Sodium/Iodide Symporter in Papillary Thyroid Carcinomas

Naïma Azouzi,<sup>1,4,\*</sup> Jérémy Cailloux,<sup>1-3,\*</sup> Juliana M. Cazarin,<sup>1-3,5</sup> Jeffrey A. Knauf,<sup>6</sup> Jennifer Cracchiolo,<sup>6</sup> Abir Al Ghuzlan,<sup>1-3</sup> Dana Hartl,<sup>2</sup> Michel Polak,<sup>7-10</sup> Aurore Carré,<sup>7,8</sup> Mohammed El Mzibri,<sup>4</sup> Abdelkarim Filali-Maltouf,<sup>1,11</sup> Abderrahmane Al Bouzidi,<sup>1,2</sup> Martin Schlumberger,<sup>1-3</sup> James A. Fagin,<sup>6</sup> Rabii Ameziane-El-Hassani,<sup>1,2,4,†</sup> and Corinne Dupuy<sup>1-3,†</sup>

**Abstract**

**Aims:** The BRAF<sup>V600E</sup> oncogene, reported in 40%–60% of papillary thyroid cancer (PTC), has an important role in the pathogenesis of PTC. It is associated with the loss of thyroid iodide-metabolizing genes, such as sodium/iodide symporter (NIS), and therefore with radioiodine refractoriness. Inhibition of mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway, constitutively activated by BRAF<sup>V600E</sup>, is not always efficient in resistant tumors suggesting that other compensatory mechanisms contribute to a BRAF<sup>V600E</sup> adaptive resistance. Recent studies pointed to a key role of transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) in BRAF<sup>V600E</sup>-induced effects. The reactive oxygen species (ROS)-generating NADPH oxidase NOX4, which is increased in PTC, has been identified as a new key effector of TGF- $\beta$  in cancer, suggestive of a potential role in BRAF<sup>V600E</sup>-induced thyroid tumors. **Results:** Here, using two human BRAF<sup>V600E</sup>-mutated thyroid cell lines and a rat thyroid cell line expressing BRAF<sup>V600E</sup> in a conditional manner, we show that NOX4 upregulation is controlled at the transcriptional level by the oncogene *via* the TGF- $\beta$ /Smad3 signaling pathway. Importantly, treatment of cells with NOX4-targeted siRNA downregulates BRAF<sup>V600E</sup>-induced NIS repression. **Innovation and Conclusion:** Our results establish a link between BRAF<sup>V600E</sup> and NOX4, which is confirmed by a comparative analysis of NOX4 expression in human (TCGA) and mouse thyroid cancers. Remarkably, analysis of human and murine BRAF<sup>V600E</sup>-mutated thyroid tumors highlights that the level of NOX4 expression is inversely correlated to thyroid differentiation suggesting that other genes involved in thyroid differentiation in addition to NIS might be silenced by a mechanism controlled by NOX4-derived ROS. This study opens a new opportunity to optimize thyroid cancer therapy. *Antioxid. Redox Signal.* 00, 000–000.

<sup>1</sup>UMR 8200 CNRS, Villejuif, France.

<sup>2</sup>Institut Gustave Roussy, Villejuif, France.

<sup>3</sup>Université Paris-Saclay, Orsay, France.

<sup>4</sup>Unité de Biologie et Recherche Médicale, Centre National de l'Énergie, des Sciences et des Techniques Nucléaires, Rabat, Morocco.

<sup>5</sup>Laboratório de Fisiologia Endócrina Doris Rosenthal, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>6</sup>Department of Medicine and Human Oncology and Pathogenesis Program, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, New York.

<sup>7</sup>INSERM U1016, Paris, France.

<sup>8</sup>Imagine Institute, Paris, France.

<sup>9</sup>Pediatric Endocrinology, Gynaecology and Diabetology Unit, Hôpital Universitaire Necker-Enfants Malades, AP-HP, Paris, France.

<sup>10</sup>Université Paris Descartes–Sorbonne Paris Cité, Paris, France.

<sup>11</sup>Laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire, Faculté des Sciences, Université Mohammed V, Rabat, Morocco.

<sup>12</sup>Equipe de recherche en pathologie tumorale, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Mohammed V, Rabat, Morocco.

\*These two authors contributed equally and should be considered joint first authors.

†These two authors contributed equally to this work.

**Innovation**

Our results establish a link between BRAF<sup>V600E</sup> and NOX4, which is confirmed by a comparative analysis of NOX4 expression in human (TCGA) and mouse thyroid cancers. Remarkably, analysis of human and murine BRAF<sup>V600E</sup>-mutated thyroid tumors highlights that the level of NOX4 expression is inversely correlated to thyroid differentiation, suggesting that other genes involved in thyroid differentiation in addition to NIS might be silenced by a mechanism controlled by NOX4-derived ROS.

**Introduction**

**P**APILLARY THYROID CANCER (PTC) is the most frequent histologic type of human thyroid carcinoma (26). BRAF mutations are found in 40%–60% of the cases (7) and the most frequent is the BRAF<sup>T1799A</sup> point mutation that encodes the BRAF<sup>V600E</sup> oncogenic constitutively active protein kinase (50). This mutation is associated with more extensive disease, a higher rate of recurrence, and decreased survival (51). It is also associated with thyroid cell dedifferentiation with a decreased expression of thyroid functional genes (7).

The property of thyroid cells to accumulate iodide is mediated by the sodium/iodide symporter (NIS) (13). This is clinically highly relevant because it enables treatment of thyroid cancers with radioiodine. However, BRAF<sup>V600E</sup>-positive tumors are often associated with a significant decrease or a complete loss of NIS expression.

BRAF mediates the signal transduction of the mitogen-activated protein kinase (MEK)-extracellular-signal regulated kinase (ERK) pathway and the presence of a BRAF mutation predicts for a high sensitivity to MEK inhibitors in human cancers (28). Thus, BRAF<sup>V600E</sup>-positive thyroid cancer cell lines are sensitive to the growth suppressive effects of mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway inhibitors (28, 38) and small-molecule BRAF or MEK inhibitors restore radioiodine incorporation in the thyroid tumors of transgenic mice with doxycycline-inducible expression of BRAF<sup>V600E</sup> (8). However, it has been also observed that MEK inhibition did not rescue BRAF<sup>V600E</sup>-induced functional NIS repression in a rat thyroid cell line (41) and in some patients harboring thyroid cancer with BRAF mutation indicating that the MAPK pathway inhibition did not always fully revert cancer progression and BRAF<sup>V600E</sup>-induced effects (19). A possible explanation is that MAPK signaling is incompletely inhibited in some BRAF-mutant tumors because of relief of negative feedback effects on upstream components of the pathway (30, 35). The strong activation of the MAPK pathway also activates additional pathway(s) contributing to dedifferentiation and epithelial–mesenchymal transition (EMT) in tumors harboring oncogenic BRAF.

Several studies have shown an important role of transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ ) in this process. TGF- $\beta$  is overexpressed in human tumors (40), including thyroid malignancies (31, 47), and is a potent pro-oncogenic and prometastatic factor. Its role in cancer biology and in cell signaling is complex, and the cellular context appears to be a crucial determinant of the ultimate outcome of TGF- $\beta$  signaling in normal and tumor cells. TGF- $\beta$  was first shown to

play a major role as a local modulator of thyroid by inhibiting both growth and differentiation in several species (17, 44, 46). It can be a potent repressor of the expression of thyroid-specific functional genes, such as the NIS, thyroglobulin (Tg), and thyroperoxydase (TPO) (11, 24, 37). BRAF<sup>V600E</sup> expression induces the production of functional TGF- $\beta$ 1, which leads to a TGF- $\beta$ -driven autocrine loop that mediates, at least in part, the effects of the BRAF<sup>V600E</sup> oncoprotein, in particular the decreased expression of NIS (41) and the promotion of cell migration, invasiveness, and EMT (25). However, the molecular basis of the BRAF<sup>V600E</sup>-induced TGF- $\beta$ 1-loop in the development of thyroid cancers remains unclear.

Recent observations suggest that reactive oxygen species (ROS) play an important role in the TGF- $\beta$ 1-induced EMT and cell mobility of many cell types. The NADPH oxidases (NOXs and DUOXs) generate ROS in a wide variety of tissues (4). Cancer cells produce high levels of ROS, and in some cases, the source of these ROS has been linked to NOX/DUOX deregulation as reported for prostate cancer (4), melanoma (52), and glioblastoma (20). Among the NADPH oxidases, NOX4 is prominently expressed in a number of tumors such as papillary thyroid cancers (48) and recent studies underscored NOX4 as a new key effector of TGF- $\beta$  in cancers (5). This led us to consider NOX4 as a potential candidate for an ROS producing system regulated by the BRAF<sup>V600E</sup>-induced TGF- $\beta$ -loop.

In this report, we show that NADPH oxidase NOX4 is regulated by BRAF<sup>V600E</sup> in a TGF- $\beta$ -Smad3-dependent pathway in thyroid cancer cells, and that NOX4-dependent ROS generation has a critical role in NIS repression induced by mutated BRAF. We confirmed our findings in both patient tissue samples from thyroid cancers harboring the BRAF<sup>V600E</sup> mutation and in mouse BRAF<sup>V600E</sup>-induced thyroid tumors by showing a positive correlation with enhanced thyroid NOX4 expression. Strikingly, BRAF-mutated tumors have a thyroid differentiation score (TDS) inversely correlated to NOX4 expression level supporting a model where NOX4-derived ROS silence the transcription of genes involved in thyroid differentiation during tumorigenesis.

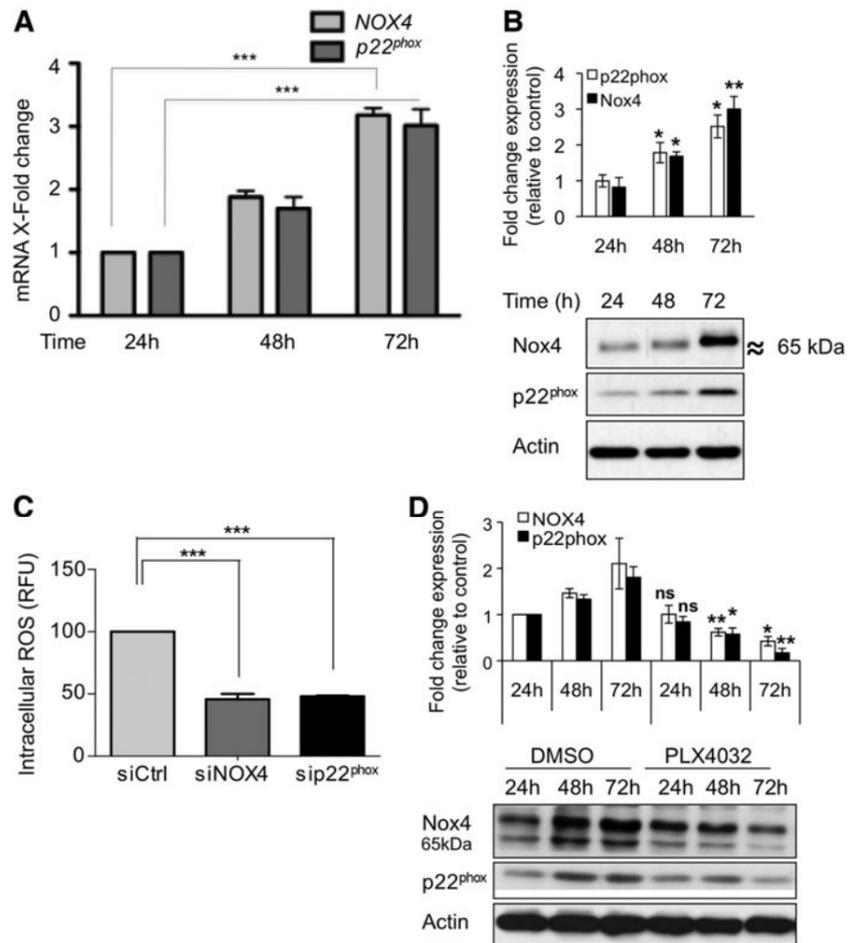
**Results***Activated BRAF oncogene promotes ROS generation via the NADPH oxidase NOX4*

p22<sup>phox</sup> forms a functional heterodimeric complex with NOX4, and accordingly, we evaluated by real-time quantitative polymerase chain reaction (QPCR) the time course changes in the levels of both mRNAs in two human thyroid cancer cell lines harboring the BRAF<sup>V600E</sup> mutation (BCPAP and 8505C). Figure 1A and Supplementary Figure S1A (Supplementary Data are available online at [www.liebertpub.com/ars](http://www.liebertpub.com/ars)) show that the expression of NOX4 and p22<sup>phox</sup> mRNAs increased with time in culture in the two cell lines. This was associated with an increased expression of both NOX4 and p22<sup>phox</sup> proteins in both cell lines (Fig. 1B and Supplementary Fig. S1B). Thyroid cells also express two other NADPH oxidases generating H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at the apical plasma membrane: DUOX2, which is involved in thyroid hormone biosynthesis, and DUOX1, whose physiologic role in this tissue is still unknown. The mRNA levels of two DUOXs were not increased in these experimental conditions (Supplementary Fig. S1C). Knocking down NOX4 or p22<sup>phox</sup> with

## NOX4 IS INVOLVED IN BRAFV600E-INDUCED NIS REPRESSION

3

**FIG. 1. Expression of NADPH oxidase NOX4 and its functional partner p22<sup>phox</sup> under the control of BRAF<sup>V600E</sup> oncogene.** Time course expression of NOX4 and p22<sup>phox</sup> in BCPAP. (A) NOX4 and p22<sup>phox</sup> mRNA were quantified by real-time quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR). (B) NOX4 and p22<sup>phox</sup> proteins were analyzed by Western blot as described in the Materials and Methods section. Densitometric quantification of Nox4 and p22<sup>phox</sup> levels normalized to actin levels and presented as fold change compared with the basal level (24 h). (C) Intracellular ROS detection in BCPAP cells by DCF fluorescence using flow cytometry 48 h after knocking down of NOX4 or p22<sup>phox</sup> with specific siRNA (10 nM). The relative fluorescence units (RFU) are normalized to 100 in the control. (D) Immunoblot detection of NOX4 and p22<sup>phox</sup> in BCPAP cells after pharmacological inhibition of BRAF<sup>V600E</sup> oncogene by PLX4032 (10  $\mu$ M). Densitometric quantification of Nox4 and p22<sup>phox</sup> levels normalized to actin levels and presented as fold change compared with vehicle-treated cells for 24 h. Student *t*-test is realized by comparing PLX versus DMSO for each corresponding time of the kinetic. Values are mean  $\pm$  SE. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, and \*\*\**p* < 0.001. ROS, reactive oxygen species.



specific siRNA reduced the intracellular level of ROS in both cell lines (Fig. 1C and Supplementary Fig. S1D, E). Treatment of cells for 72 h with the BRAF<sup>V600E</sup> kinase inhibitor PLX4032 led to downregulation of NOX4 and p22<sup>phox</sup> protein levels, indicating that mutated BRAF regulated both protein expressions in these two tumor cell lines (Fig. 1D and Supplementary Fig. S2A).

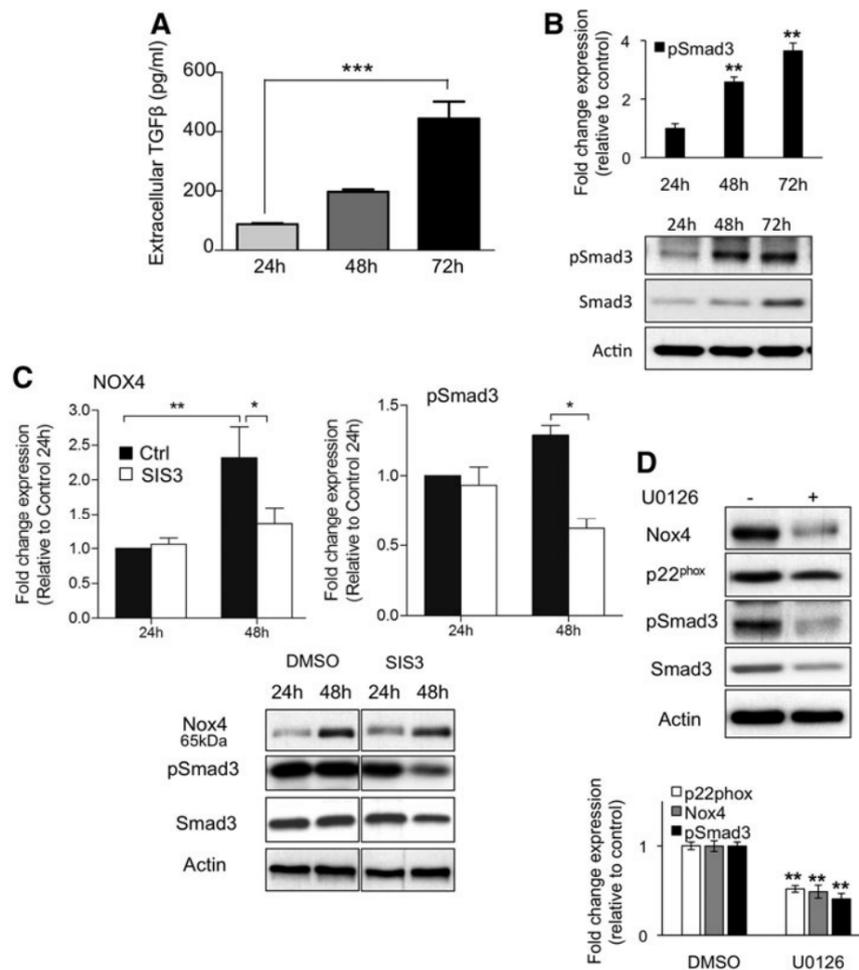
#### BRAF<sup>V600E</sup> induced TGF- $\beta$ secretion

We analyzed at different time points the cell culture supernatants for the presence of TGF- $\beta$ 1 (Fig. 2A). BCPAP cells produced TGF- $\beta$ 1 and this was associated with an increase in both total and phosphorylated form of Smad3, consistent with activation of the TGF- $\beta$ 1/Smad signaling pathway (Fig. 2B). Treatment of cells with a TGF- $\beta$  receptor inhibitor (SB431542) strongly decreased mRNA expression of NOX4 indicating that TGF- $\beta$ 1 regulates the protein at the transcriptional level (Supplementary Fig. S2B). Treatment of BCPAP cells with PLX4032 inhibited TGF- $\beta$ 1 secretion, total and phosphorylation of Smad3 (Supplementary Fig. S2C, D). Therefore, we conclude that mutated BRAF controls TGF- $\beta$  secretion. Downregulation of BRAF by RNA interference confirmed the results (Supplementary Fig. S3A).

In 8505C cells, phospho-Smad3 level, which transiently increased during the 72-h incubation, and total Smad3 protein level were also inhibited by PLX4032 (Supplementary Fig. S2E).

#### TGF- $\beta$ regulates NOX4 via Smad3 activation

To determine the role of phospho-Smad3 on NOX4, we treated BCPAP and 8505C cells with SIS3, a specific inhibitor of phospho-Smad3 (21). Immunoblot analysis showed that SIS3 decreased both total and phosphorylated form of Smad3 (Fig. 2C and Supplementary Fig. S3B) and downregulated NOX4 mRNA and protein levels in both cell lines (Fig. 2C; Supplementary Figs. S2B, and S3B, C). As expected, the level of ROS was also reduced by treatment with both compounds that inhibited TGF- $\beta$ 1 signaling (Supplementary Fig. S3D). Taken together, these results show that the TGF- $\beta$ 1 signaling pathway upregulates NOX4 in BRAF<sup>V600E</sup>-mutated thyroid cells at the transcriptional level in a Smad3-dependent manner. As shown in Figure 2D and Supplementary Figure S4A, the MEK inhibitor U0126 impaired both phosphorylation and expression of Smad3 as expressions of NOX4 and p22<sup>phox</sup> in two BRAF-mutated thyroid cancer cell lines. This was associated with a



**FIG. 2. BRAF<sup>V600E</sup> oncogene upregulates NOX4 via TGF- $\beta$ 1 signaling pathway in papillary thyroid cancer cell line.** (A) Quantitative detection of secreted and accumulated TGF- $\beta$ 1 in the extracellular medium of BCPAP cells using ELISA test. (B) Western blot analysis of total and phospho Smad3 proteins in BCPAP cells at indicated time of culture. Densitometric quantification of phospho Smad3 levels normalized to actin levels and presented as fold change compared with the basal level (24h). (C) Immunoblot detection of Nox4, Smad3, and phospho-Smad3 proteins in BCPAP cells treated with SIS3 (10  $\mu$ M). Densitometric quantification of Nox4 and phospho-Smad3 levels normalized to actin levels and presented as fold change compared with vehicle-treated cells or inhibitor-treated cells for 24 h. Student *t*-test is realized by comparing SIS3 versus DMSO for each corresponding time of the kinetic. (D) Inhibition of NOX4, p22<sup>phox</sup>, Smad3, and phospho-Smad3 protein expressions by the specific inhibitor of MAPK pathway U0126 (10  $\mu$ M). Proteins were visualized by Western blot in BCPAP cells treated with U0126 for 48 h. Densitometric quantification of Nox4, p22<sup>phox</sup>, and phospho-Smad3 levels normalized to actin levels and presented as fold change compared with vehicle-treated cells for 48 h. Values are mean  $\pm$  SE. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, and \*\*\**p* < 0.001. TGF- $\beta$ 1, transforming growth factor  $\beta$ 1.

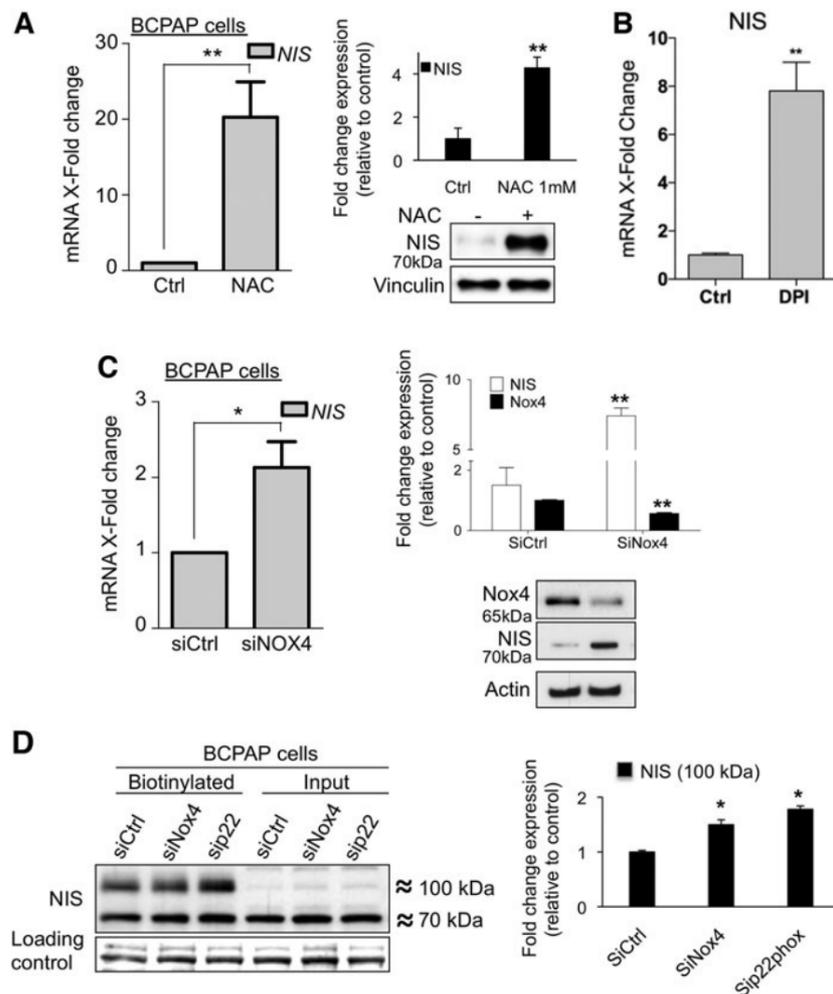
decreased intracellular level of ROS (Supplementary Fig. S4B). Therefore, Smad3 activation and BRAF<sup>V600E</sup>-induced NADPH oxidase expression were both MEK dependent.

#### NOX4-dependent ROS generation downregulates NIS expression in BRAF-mutated cell lines

Based on these results, we postulated that NOX4-dependent ROS generation might play a role in regulating NIS expression in BRAF-mutated thyroid cells. We first analyzed the effect of the ROS scavenger N-acetyl cysteine (NAC) on NIS expression in BCPAP cells. As shown in

Figure 3A, the ROS scavenger increased the NIS at both mRNA and protein levels indicating that ROS are involved in NIS repression at the transcriptional level. DPI, an inhibitor of flavoproteins such as NADPH oxidases, also induced NIS mRNA expression (Fig. 3B). As expected, knocking down NOX4 with specific siRNA reinduced NIS mRNA and protein levels (Fig. 3C). The same results were obtained in 8505C cells (Supplementary Fig. S4C). We next analyzed the cell surface expression of NIS, as membrane localization of the symporter is essential to its function. Cell surface biotinylation experiments were carried out with a nonpermeable crosslinker on both cell lines. Sulfo-NHS-biotin treatment revealed that a fraction of NIS protein, detected as two bands

**FIG. 3. ROS generating NOX4 downregulates the NIS in both BRAF<sup>V600E</sup>-mutated thyroid cell lines.** (A) Expression of NIS (mRNA and protein) 24h after treatment of BCPAP cells with 1 mM of N-acetyl-cysteine (NAC). Densitometric quantification of NIS protein level normalized to vinculin level and presented as fold change compared with vehicle-treated cells for 24 h. (B) Expression of NIS (mRNA) 24h after treatment of BCPAP cells with 2  $\mu$ M of diphenyleneiodonium (DPI). (C) Expression of NIS (mRNA and protein) 48 h after knocking down of NOX4 in BCPAP cells. Densitometric quantification of Nox4 and NIS levels normalized to actin levels and presented as fold change compared with siRNA control-treated cells for 48 h (D) Western blot analysis of cell surface NIS expression in BCPAP cells, 48 h after knocking down of NOX4 or p22<sup>phox</sup> by RNA interference. Red Ponceau staining at a corresponding molecular weight area of NIS protein was used as loading control. Densitometric quantification of NIS (hyperglycosylated form of 100 kDa) levels normalized to loading control levels and presented as fold change compared with siRNA control-treated cells for 48 h. Values are mean  $\pm$  SE. \* $p$  < 0.05 and \*\* $p$  < 0.01. NIS, sodium/iodide symporter.



corresponding to the hypo- and hyperglycosylated forms (29), was increased at the cell surface after NOX4 and p22<sup>phox</sup> inactivation, respectively (Fig. 3D and Supplementary Fig. S4D). Collectively, these data show for the first time that a NOX4-dependent ROS generation is involved in BRAF<sup>V600E</sup>-induced NIS repression *via* the TGF- $\beta$ /Smad3 signaling pathway.

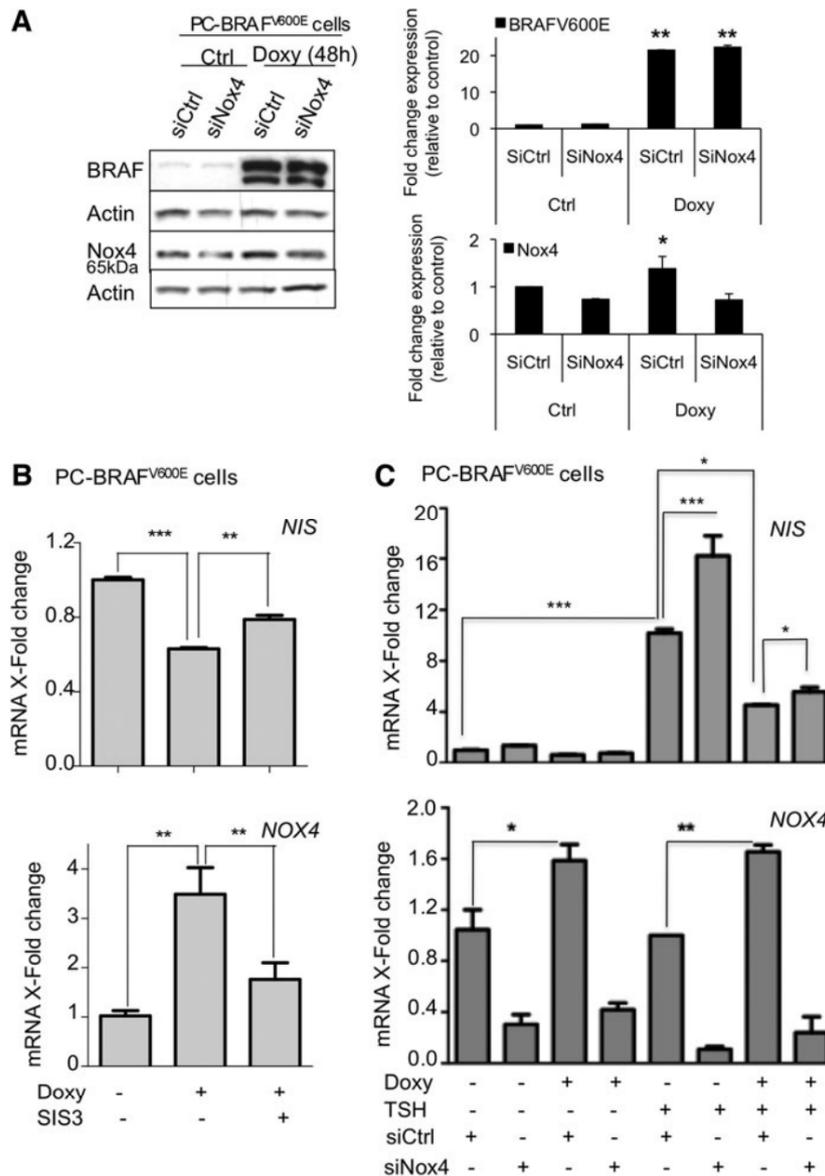
#### BRAF<sup>V600E</sup> induced NOX4 expression through Smad signaling in thyroid PCCL3 cells

We next investigated the effect of acute BRAF<sup>V600E</sup> expression on NOX4 expression in thyroid cells. To this end, we used the doxycycline-inducible BRAF<sup>V600E</sup> thyroid PCCL3 cells where mutated BRAF was previously shown to decrease NIS expression through the TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway (41). Importantly, induction of BRAF<sup>V600E</sup> by doxycycline, which led to activation of Smad3 phosphorylation (Supplementary Fig. S5A), upregulated NOX4 protein and mRNA levels (Fig. 4A, C). Treatment with the Smad3-specific inhibitor (SIS3) abolished the BRAF induction of NOX4 mRNA induction in these cells, which counteracted repression of NIS mRNA level by doxycycline (Fig. 4B). This

underscored that acute BRAF<sup>V600E</sup> activation upregulated NOX4 at the transcriptional level in a Smad3-dependent manner. To determine the role of NOX4 in BRAF<sup>V600E</sup>-induced repression of NIS, we performed interference RNA experiments. As shown in Figure 4C, NOX4 knockdown dampened the doxycycline-induced repression of thyroid stimulating hormone (TSH)-induced NIS expression. Of note, in the absence of doxycycline, NOX4-inactivated PCCL3 cells displayed a significant increase of NIS mRNA expression after TSH stimulation, indicating that NOX4 may also participate in the regulation of NIS mRNA level expression in normal thyroid cells. Expression of DUOX1 and DUOX2 mRNA levels was not affected by doxycycline treatment (Supplementary Fig. S5B).

#### TGF- $\beta$ downregulates Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter via NOX4 in human thyrocytes

To investigate whether NOX4 and p22<sup>phox</sup> are regulated by TGF- $\beta$ 1 in normal human primary thyroid follicular epithelial cells, we analyzed the time course effect of TGF- $\beta$ 1 on both NOX4 and p22<sup>phox</sup> mRNA by real-time (RT)-qPCR. Figure 5A shows that TGF- $\beta$ 1 increased NOX4 mRNA in a time-dependent manner. This was associated with increased



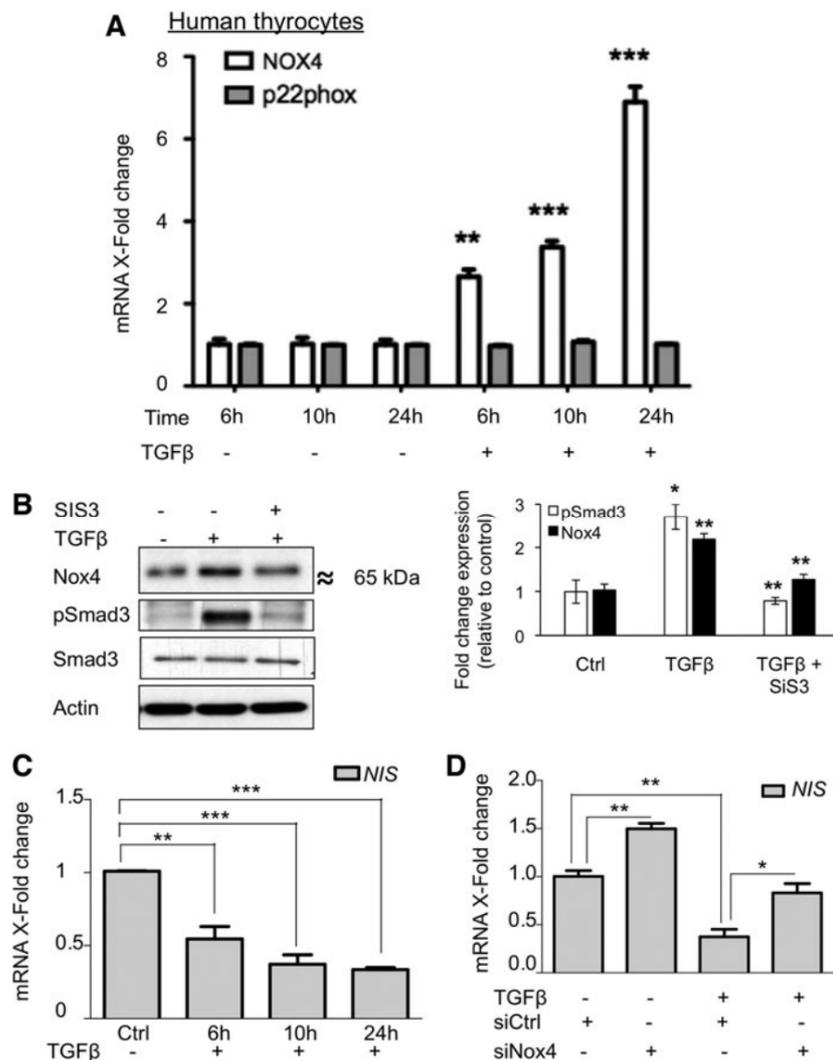
**FIG. 4. NOX4 induced by BRAF<sup>V600E</sup> via Smad3 signaling pathway downregulates NIS in thyroid PCCL3 cells.** (A) Western blot analysis of BRAF<sup>V600E</sup> and NOX4 protein expressions in PC-BRAF<sup>V600E</sup> cells treated for 48 h with or without doxycycline (1  $\mu$ g/ml). Densitometric quantification of BRAF<sup>V600E</sup> levels normalized to actin levels and presented as fold change compared with vehicle-treated cells for 48 h in the absence of doxycycline. (B) QRT-PCR analysis of NIS and NOX4 mRNA levels in PC-BRAF<sup>V600E</sup> cells treated for 48 h with or without doxycycline (1  $\mu$ g/ml) and SIS3 (10  $\mu$ M). (C) qRT-PCR analysis of NIS and NOX4 mRNA levels in PC-BRAF<sup>V600E</sup> cells treated for 48 h in the absence or presence of TSH (1 mU/l, doxycycline [1  $\mu$ g/ml] and specific siRNAs [10 nM]). Values are mean  $\pm$  SE. \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01, and \*\*\* $p$  < 0.001. TSH, thyroid stimulating hormone.

phospho-Smad3 and NOX4 protein, and inhibited by the Smad3-specific inhibitor (SIS3) (Fig. 5B). NIS mRNA was downregulated by TGF- $\beta$ 1 (Fig. 5C) and SIS3 counteracted this effect (Supplementary Fig. S6A, B). Of note, TGF- $\beta$ 1 did not increase DUOX1 and DUOX2 mRNA levels in these cells (Supplementary Fig. S6C). These data indicate that TGF- $\beta$ 1 regulates NOX4 expression *via* a Smad3-dependent pathway in human thyrocytes. We next analyzed the effect of NOX4 inactivation on NIS mRNA level in both control and TGF- $\beta$ 1-treated thyrocytes. Figure 5D shows that NOX4 inactivation counteracted the inhibitory effect of TGF- $\beta$ 1 on NIS mRNA in the presence of TSH. This was related to a significant decrease in intracellular ROS level (Supplementary Fig. S6D). Taken together, these data show that NOX4 plays a key role in TGF- $\beta$ 1-induced downregulation of NIS in normal human thyrocytes.

#### NOX4 is increased in BRAF-mutated papillary thyroid carcinomas

From The Cancer Genome Atlas (TCGA), it is now possible to perform combined analysis of gene expression as a function of different driver mutation groups that lead to different pathologies with distinct signaling and differentiation characteristics (7). BRAF<sup>V600E</sup> status has been characterized in 390 of the 496 PTCs, and we compared NOX4 mRNA expression levels in BRAF<sup>WT</sup>-PTCs ( $n$  = 170) and BRAF<sup>MUT</sup>-PTCs ( $n$  = 220). NOX4 was significantly increased in PTCs harboring BRAF mutation (Fig. 6A) and this was associated with a significant decrease of NIS mRNA expression level (Fig. 6B). In BRAF-mutated PTCs, a high NOX4 mRNA level mostly correlated with a low NIS mRNA level (Fig. 6C). In addition, an inverse and highly significant correlation was

**FIG. 5. NOX4 is involved in TGF- $\beta$ -induced downregulation of NIS in human thyrocytes.** (A) Time course expression of NOX4 and p22<sup>phox</sup> mRNAs (qRT-PCR) in human thyrocytes treated with human recombinant TGF- $\beta$  (10 ng/ml). (B) Western blot analysis of NOX4, Smad3, and phospho-Smad3 in human thyrocytes treated for 12 h in the absence or presence of human recombinant TGF- $\beta$  (10 ng/ml) and SIS3 (10  $\mu$ M). Densitometric quantification of Nox4 and phospho-Smad3 levels normalized to actin levels and presented as fold change compared with untreated cells. Student *t*-test is realized by comparing TGF- $\beta$  with Ctrl and TGF- $\beta$ +SIS3 with TGF- $\beta$ . (C) Time course analysis of expression of NIS mRNA (qRT-PCR) in human thyrocytes treated or not by human recombinant TGF- $\beta$  (10 ng/ml for 12 h) in the presence of specific siRNAs (10 nM for 48 h). Values are mean  $\pm$  SE. \**p*<0.05, \*\**p*<0.01, and \*\*\**p*<0.001.



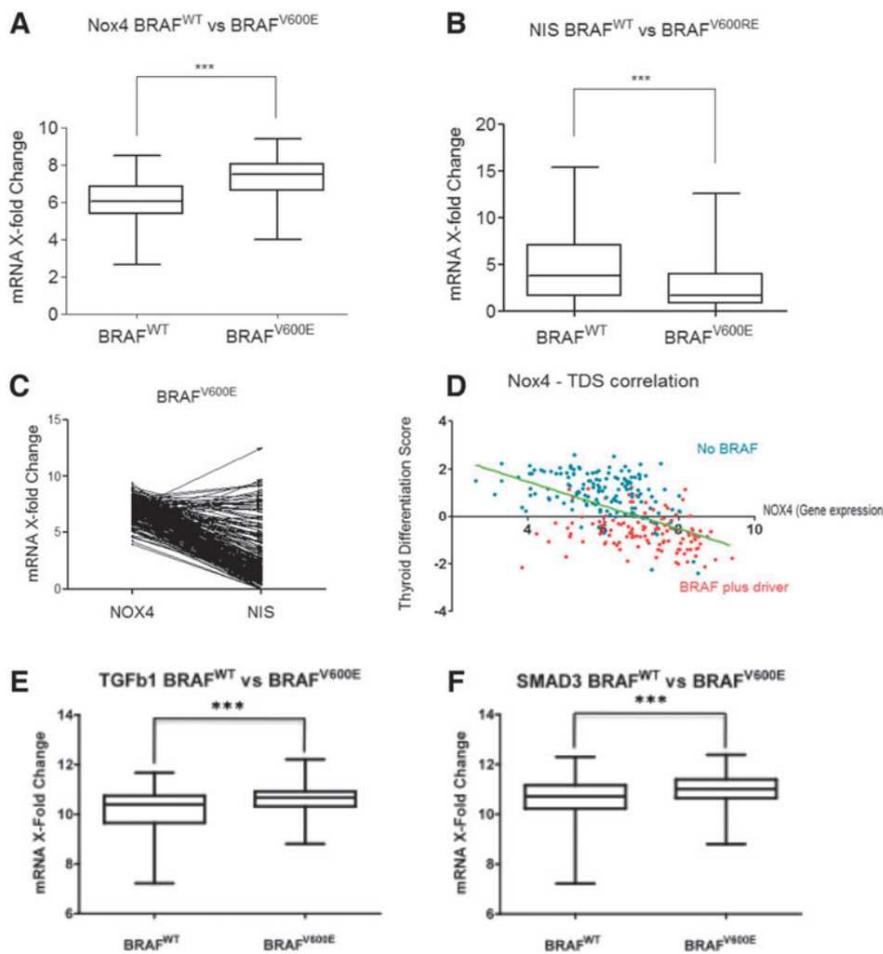
found between NOX4 expression and the TDS (7) (Fig. 6D). Importantly, both TGF- $\beta$ 1 and Smad3 mRNA were found to be significantly increased in BRAF-mutated PTCs (Fig. 6E, F). A *BRAF*<sup>V600E</sup>-RAS score (BRS) has been also previously developed to quantify the extent to which the gene expression profile of a given tumor resembles either the *BRAF*<sup>V600E</sup> or RAS mutant profiles (7). We found that a higher level of NOX4 expression was associated with a negative score that characterizes the *BRAF*<sup>V600E</sup>-like samples (Supplementary Fig. S6E). In addition, the ERK activation level, which is highly correlated to BRS (7), was associated with an increased expression of NOX4 gene (Supplementary Fig. S6F). Overall, these data support a role of NOX4 in thyroid tumors driven by *BRAF*<sup>V600E</sup>, in particular, a role in mechanisms leading to thyroid dedifferentiation. A schematic model summarizing all the steps involved in NOX4 regulation is presented in Figure 7A.

Since dedifferentiation during tumorigenesis might follow the inverse gene expression pattern observed during normal differentiation, we wondered whether ontogenic changes of

mRNA expression of thyroid differentiation markers, such as NIS and TPO, could be associated with a modulation of the expression level of *NOX4* gene. To this end, we analyzed by quantitative PCR, mRNA expression for *NOX4*, *TPO*, and *NIS* genes in thyroid tissues during human development between 8 and 12 gestational weeks (GW). While a significant increase in NIS and TPO mRNA levels was detected at 10 GW in accordance with the onset of thyroid function (43), no modulation of the expression of NOX4 mRNA level was observed in these conditions (Fig. 7B), meaning that only an increase of NOX4 may impact expression.

#### *NOX4* mRNA level is inversely correlated to the thyroid differentiation score in genetically engineered mouse models of thyroid cancer

The profiles of gene expression have been previously established for different mouse PTC models induced by knockin mutations of drivers such as *BRAF*<sup>V600E</sup> (14) and *H-RAS*<sup>G12V</sup> in the context of NF2, PTEN, or p53 loss (15).



**FIG. 6. High level of NOX4 mRNA is correlated with low level of NIS mRNA and low TDS in papillary thyroid cancer (PTC) harboring BRAF<sup>V600E</sup> mutation.** A homogeneous cohort of 390 PTCs (170 BRAF<sup>WT</sup> PTCs and 220 BRAF<sup>V600E</sup> PTCs) were included in this analysis. Correlative analysis between NOX4 mRNA (A) or NIS mRNA levels (B) and BRAF<sup>V600E</sup> mutation in 390 PTCs. Correlation of NOX4 mRNA level and NIS mRNA level in 220 PTCs harboring BRAF<sup>V600E</sup> mutation (C). Correlative analysis between BRAF<sup>V600E</sup> mutation and TDS in 390 PTCs (D). Correlative analysis between TGF- $\beta$ 1 mRNA (E) or Smad3 mRNA levels (F) and BRAF<sup>V600E</sup> mutation in 390 PTCs. TDS, Thyroid Differentiation Score. To see this illustration in color, the reader is referred to the web version of this article at [www.liebertpub.com/ars](http://www.liebertpub.com/ars)

These tumors present phenotypic differences ranging from differentiated (PTC) to poorly differentiated thyroid cancers (PDTc) and undifferentiated (anaplastic carcinoma ATC). Analysis of the gene expression data clearly shows that the NOX4 mRNA level was increased mostly in BRAF-mutated tumors (Fig. 8A), which significantly correlated with increased expression of TGF- $\beta$ 1 mRNA and with activation of TGF- $\beta$ /Smad3 signaling pathway (Fig. 8B and Supplementary Fig. S7A, B, C). Strikingly, BRAF-mutated tumors had a very low TDS, which, as observed in their human counterparts, was strongly inversely associated with NOX4 mRNA levels (Fig. 8C, D).

## Discussion

### *NOX4 as a new effector of BRAF<sup>V600E</sup> and TGF- $\beta$ 1 oncogenic signaling in PTC*

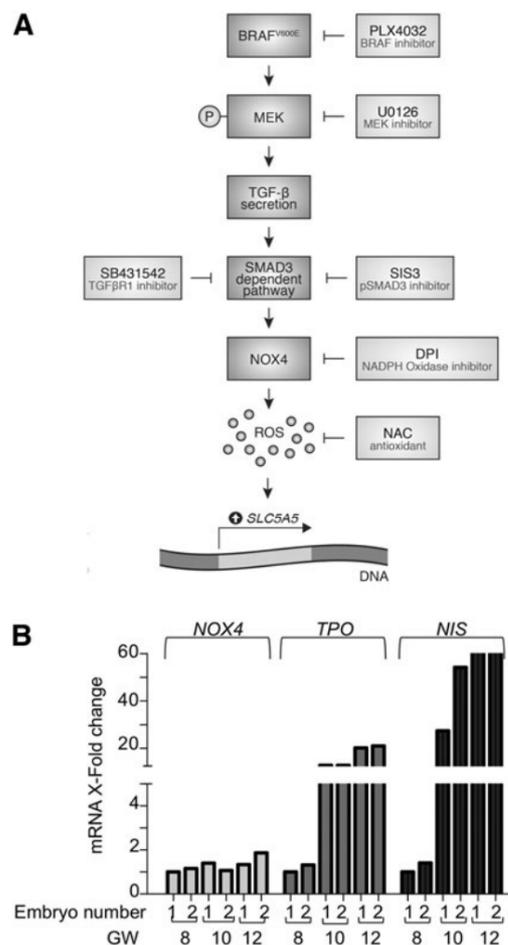
The BRAF<sup>T1799A</sup> mutation, which encodes BRAF<sup>V600E</sup>, is the most common genetic event in human papillary thyroid cancers (7). BRAF is a potent activator of the MAPK/ERK pathway and, as such, a critical regulator of normal growth, differentiation, and oncogenic transformation. TGF- $\beta$  pathway activation is strongly associated with thyroid cancer progression in mice (25). Overexpression of TGF- $\beta$  in human

thyroid tumors is consistent with this role and led us to explore downstream mechanisms that may account for these effects in thyroid malignancies. ROS are known to be important effectors of the TGF- $\beta$  pathway at the molecular level and to induce EMT and cell mobility in many cell types (36, 53). NOX4-dependent ROS production mediates TGF- $\beta$ -induced effects such as fibrosis (3) and EMT (6). We have previously shown that NOX4 is overexpressed in human papillary thyroid cancers, but its functional consequences have not been previously explored (48).

The present study shows that NOX4 expression is significantly higher in human and mouse papillary thyroid cancers harboring the BRAF<sup>V600E</sup> mutation (Figs. 6 and 8). Using two human BRAF<sup>V600E</sup> thyroid cancer cell lines and a rat thyroid cell line expressing BRAF<sup>V600E</sup> in a conditional manner, we show that NOX4 upregulation is controlled at the transcriptional level by the BRAF<sup>V600E</sup> oncogenic protein *via* the TGF- $\beta$ /Smad3 signaling pathway. Inhibitors targeting specifically this pathway impaired NOX4 expression and consequently the intracellular ROS production in all thyroid cells tested, including normal human thyrocytes. Smad3 is a transcription factor known as an effector of TGF- $\beta$ 1. Recent data describe the identification of a Smad-binding element involved in TGF- $\beta$ 1 regulation of the *NOX4* gene promoter

## NOX4 IS INVOLVED IN BRAFV600E-INDUCED NIS REPRESSION

9



**FIG. 7. Oncogenic BRAF-dependent regulation of NOX4.** (A) A schematic model of all the steps involved in the oncogenic BRAF-dependent regulation of NOX4. Our data show that BRAF<sup>V600E</sup> upregulates NOX4 expression *via* the TGF-β1/Smad3 signaling pathway in thyroid cancer cells. The NOX4-dependent ROS production plays a key role in SLC5A5 gene repression. Consequently, it might be involved in the absence of radioiodide uptake by BRAF-mutated cancer cells. The targets of different inhibitors used in this study are indicated. (B) Ontogenic changes of mRNA expression of NIS, TPO, and NOX4. qRT-PCR analysis of NOX4, TPO, and NIS mRNA expression in 6 human thyroids at 8, 10, or 12 weeks of development. GW, gestational week; TPO, thyroperoxydase.

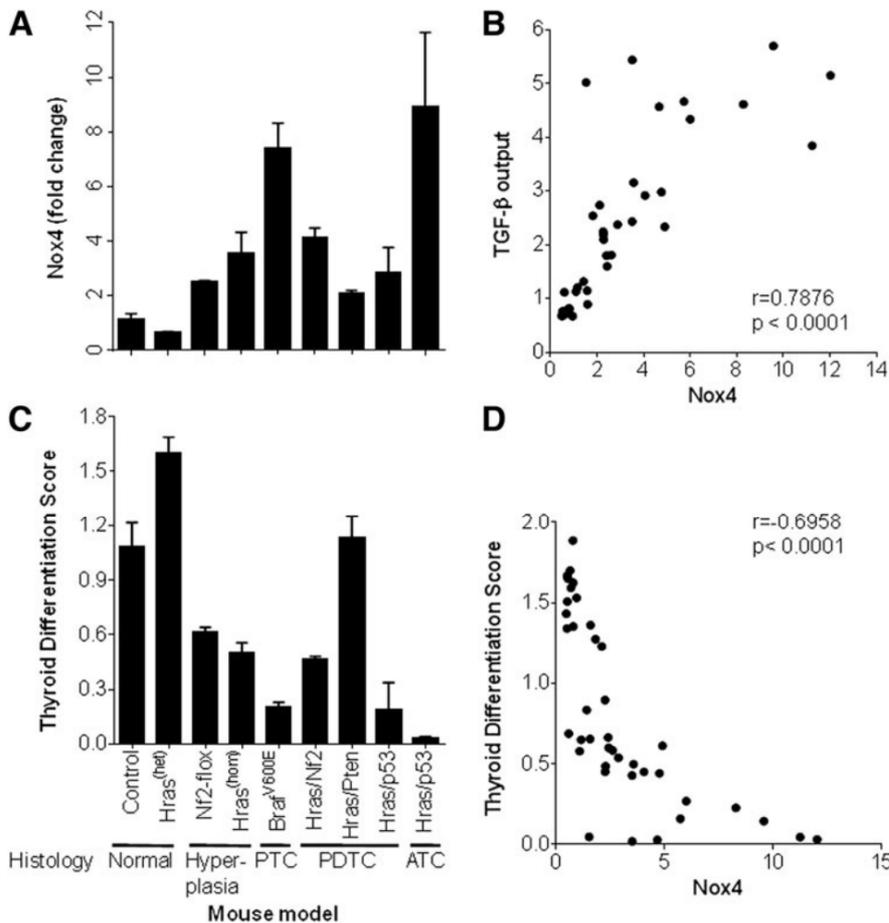
(6). Thus, NOX4 transcriptional regulation by TGF-β1 in thyroid cells is likely due to an increase of NOX4 promoter activity by the binding of Smad3. NOX4 heterodimerization with p22<sup>phox</sup> is sufficient to enhance its ROS generating activity and does not require cytosolic subunits that are essential for other NOX isoforms (4). NOX4 is the only NOX with a constitutive ROS generating activity that depends directly on its gene expression. The protein p22<sup>phox</sup> tightly interacts with NOX4 (1). Except for a few cases and what was observed in BCPAP and 8505C cells, p22<sup>phox</sup> is not consistently regulated by TGF-β1 at the transcriptional level. NOX4 has the capacity to stabilize p22<sup>phox</sup> and therefore to increase its

intracellular protein level (1). Thus, unlike NOX4, p22<sup>phox</sup> mRNA expression is not the limiting factor for both p22<sup>phox</sup> protein expression and formation of the active NADPH oxidase.

The MAPK pathway contributes to the progression of BRAF<sup>V600E</sup>-induced thyroid cancer. Constitutive activation of the MAPK pathway is required for optimal TGF-β signaling in mouse thyroid cancer cells induced by BRAF<sup>V600E</sup> (25). However, in the rat thyroid cell line expressing conditionally BRAF<sup>V600E</sup>, the involvement of the MEK-ERK pathway in the mutant BRAF-induced TGF-β effects appeared to be selective. Indeed, unlike BRAF<sup>V600E</sup>-induced EMT, mutant BRAF-induced NIS repression was an MEK-ERK independent process (41). In the present study, MEK inhibition impaired Smad3 activation and NADPH oxidase expression in both BRAF<sup>V600E</sup> thyroid cancer cell lines indicating that BRAF<sup>V600E</sup>-induced NOX4 expression that relied on the autocrine TGF-β loop is MEK-ERK dependent.

#### Regulation of NIS mRNA transcription

Since BRAF<sup>V600E</sup>-induced repression of NIS was previously shown to be dependent of TGF-β, we wondered whether NOX4-dependent ROS generation, regulated by TGF-β1, could be involved in this mechanism. Using antioxidant (NAC) and RNA interference-mediated NOX4 knock-down, we show for the first time that NIS gene expression could be controlled at the transcriptional level by a potential redox-sensitive mechanism in thyroid cancer cells. Our results highlight that BRAF-induced TGF-β1 represses NIS gene expression through a NOX4-dependent pathway downstream of Smad3. An alternative mechanism to explain NIS repression by TGF-β1 has been previously proposed. This involved a functional interaction between the transcription factor PAX8, a critical mediator of NIS gene transcription, and Smad3, resulting in inhibition of PAX8 transcriptional activity (11). However, in light of these new data, Smad3 might also contribute to the inhibition of the action of PAX8 by an oxidation process through an upregulation of NOX4-derived ROS. Moreover, a redox regulation of PAX8, involved in its DNA-binding activity, has been previously described in rat thyroid FRTL-5 cells (23). Furthermore, analysis of results obtained with human and murine tumor tissues underscore that the level of NOX4 expression is inversely correlated to thyroid differentiation, suggesting that, beyond NIS, other genes involved in thyroid differentiation might be silenced by a general mechanism finely controlled by NOX4-derived ROS. This mechanism could involve redox-sensitive epigenetic modifications, such as DNA methylation and histone acetylation (18). Hypermethylation of the NIS promoter is observed in BRAF<sup>V600E</sup> harboring PTC (10, 42), and the use of demethylating agents has been shown to restore decreased iodine uptake to cells with methylated promoter regions *in vivo*. ROS 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 (33). It was, in particular, observed that oxidative damage could contribute to the relocalization of a silencing complex containing DNA methyl transferases (DNMTs) (39). The molecular mechanisms of a potential redox-sensitive control by NOX4-derived ROS of genes involved in thyroid differentiation



**FIG. 8. High level of NOX4 mRNA is correlated with low thyroid differentiation score in genetically engineered mouse models of thyroid cancer.** Gene expression profiling of GEM models of thyroid hyperplasia or the indicated thyroid cancer phenotypes. **(A)** Fold change in NOX4 expression compared to normal thyroid controls calculated from Affymetrix expression array data. **(B)** Association of NOX4 expression levels with the TGF- $\beta$  transcriptional output score. Pearson correlation was used to calculate  $r$ - and  $p$ -values. **(C)** Thyroid differentiation score for each mouse model. **(D)** Correlation between thyroid differentiation score and NOX4 expression. Pearson correlation was used to calculate  $r$ - and  $p$ -values.

have to be further investigated. Interestingly, the increases in NIS and TPO mRNA expressions during human thyroid differentiation were not associated with a modulation of NOX4 mRNA, suggesting that the onset of human fetal thyroid function is not dependent on the level of NOX4.

#### NOX4 as a potential therapeutic target?

A clinical study using the MAPK inhibitor selumetinib to reverse refractoriness to radioiodine in patients with radioiodine refractory metastatic thyroid cancer partially restored radioactive iodine (RAI) incorporation in patients with BRAF-mutated tumors, but yielded much better results in patients with RAS-mutated tumors (10). Analysis of human PTC (TCGA) shows that the NOX4 expression level is correlated to ERK activation. Interestingly, we have recently shown that overexpression of oncogenic H-RAS<sup>V12</sup> upregulates NOX4 in thyroid cells (49). This underscores that NOX4 expression in thyroid tumors may depend on the degree of MAPK activation. It was recently shown that BRAF<sup>V600E</sup> PTCs are a heterogeneous group of tumors with variable degrees of thyroid differentiation (7). Since the level of NOX4 appears to be correlated with thyroid dedifferentiation in BRAF<sup>V600E</sup> PTC, it would be of importance to evaluate the potential role of NOX4 as an RAI therapy response predictive

marker in patients with metastatic thyroid cancers. Moreover, this study identifies NOX4 as a potential therapeutic target through its role in NIS repression. Specific inhibitors might be used in association with MAPK inhibitors to potentiate their effect on RAI therapy.

#### Materials and Methods

##### Cell culture and reagents

Human thyroid cancer cell lines harboring the BRAF<sup>V600E</sup> mutation (BCPAP and 8505C cells) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (4.5 g/l glucose) (Life Technologies) supplemented with 10% (vol/vol) FCS (Life Technologies) and penicillin/streptomycin (100 mg/ml; Life Technologies). Primary human thyroid cells were cultured as previously described (2).

PC-BRAF<sup>V600E</sup> cells were derived from the rat thyroid cell line PCCL3 to obtain doxycycline-inducible expression of BRAF<sup>V600E</sup> (34). PC-BRAF<sup>V600E</sup> cells were cultured in Coon's modified Ham's F-12 medium supplemented with 5% Tet-free FCS (Life Technologies) and a six-hormone mixture, including TSH and insulin. Inhibitor of TGF- $\beta$ 1 pathway (SB431542; Calbiochem), inhibitor of Smad3 phosphorylation (SIS3; Sigma-Aldrich), inhibitor of MAPK pathway (U0126; Calbiochem), inhibitor of BRAF<sup>V600E</sup>

(PLX4032; Selleckchem); recombinant human TGF- $\beta$ 1 (Peprotech), N-acetyl-cysteine (Sigma-Aldrich), and doxycycline (Sigma-Aldrich) were used in this study.

#### Transfection of small interfering RNAs

Cells were transfected at 50%–60% confluence with specific human siRNA against NOX4 (stealth RNAi duplex; Invitrogen), scrambled siRNA control (Invitrogen), or siRNA against p22<sup>phox</sup>, siRNA against BRAF, and rat siRNA against NOX4 (smart pool from Dharmacon) using the INTERFERIN transfection reagent (Polyplus-Transfection) according to the manufacturer's protocol (Supplementary Table S2).

#### Measurement of intracellular ROS

The peroxide-sensitive fluorescent probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCFDA; Molecular Probes, Life Technologies) was used to assess the generation of intracellular ROS.

#### Western blot analysis and ELISA test

Cells were solubilized in the RIPA lysis buffer (Sigma-Aldrich) supplemented with a mixture of phosphatase and protease inhibitors (Roche Applied Science). Immunodetection was performed as described previously (48) using as primary antibody anti-NOX4 (OriGene); anti-pSmad3 (ser 423) (Abcam); anti-Smad3 (Abcam); anti-p22<sup>phox</sup> (Santa Cruz Biotechnology, Inc.); anti-NIS (Thermo Scientific); anti-BRAF<sup>V600E</sup> (Spring); anti- $\beta$ -actin (Sigma-Aldrich), and anti-Vinculin (Abcam). The proteins were visualized by enhanced chemiluminescence (Amersham) using secondary antibodies conjugated to HRP: goat anti-rabbit IgG-HRP antibody (Southern Biotech) and goat anti-mouse IgG-HRP antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc). Secreted TGF- $\beta$  was measured by the ELISA test according to the manufacturer's protocol (Promega).

#### Cell surface biotinylation

Membrane-associated proteins were prepared using the Cell Surface Protein Isolation Kit (Pierce, Life Technologies) and avidin agarose (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's protocol.

#### Real-time qRT-PCR

Total RNA was extracted from cells using the TRIzol reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. The quality of RNA preparation, based on the 28S/18S rRNAs ratio, was assessed using the RNA 6000 Nano Lab-On-chip (Agilent Technologies). Total RNA (1  $\mu$ g) was reverse-transcribed using Maxima Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) and random hexamer primers in a total reaction volume of 20  $\mu$ l of PCR buffer according to the manufacturer's protocol for 60 min at 60°C. Real-time qRT-PCR was performed as described previously (48). Sequences of primer pairs and TaqMan probes were as follows: Human DUOX1 primer: sense, 5'-CCAGCAA TCATCTATGGGGGC-3' and antisense, 5'-TGGGGCC GCTGGAACC-3'; DUOX2 primer: sense, 5'-CCGGCAA TCATC TATGGAGGT-3' and antisense, 5'-CCTTGGGG CCTCTGGAATT-3'; the same TaqMan fluorescent probe

for DUOX1 and DUOX2: 5' FAM-AGCAGCGTGGTGA AGGCGGAGC-3' TAMRA; NOX4 primer: sense, 5'-TGT CTTCTACATGCTGCTGACGTT-3' and antisense, 5'-CTG AGAGCTGGTTTCGGTTAAGACT-3'; TaqMan fluorescent probe: 5'-FAM-CAAACCTAATTTAGATACCCACCCTC CCGGC-TAMRA; Human p22<sup>phox</sup> primer: sense, 5'-GCG CTTCACCCAGTGGTACTT-3' and antisense, 5'-GGTGG AGCCCTTCTTCTCTT-3'; TaqMan fluorescent probe: 5'-FAM-TTGTGGCGGGCGTGTGTTGTGTG-TAMRA; Human NIS primer: sense, 5'-CCATCCTGGATGACAACCTT GG-3' and antisense, 5'-AAAAACAGACGATCCTCATTG-3'; TaqMan fluorescent probe: 5'-FAM-AGAAGTCCCA CTGGAAACAAGAAGCCC-TAMRA; Human TBBP primer: sense, 5'-GAATATAATCCCAAGCGGTTTGC-3' and antisense, 5'-CTTAGCTGGAAAACCAACTTCTG-3'; TaqMan fluorescent probe: 5'-FAM-AGGATAAGAGA GCCACGAACCACGGC-TAMRA; Housekeeping gene TBBP primer: sense, 5'-GAATATAATCCCAAGCGGTT TGC-3' and antisense, 5'-CTTAGCTGGAAAACCAAC TTCTG-3'; TaqMan fluorescent probe: 5'-FAM-AGG ATAAGAGAGCCACGAACCACGGC-TAMRA. Oligonucleotides were purchased from Eurofins Genomics.

For PC-BRAF<sup>V600E</sup> cells, real-time qRT-PCR was performed with FastStart Universal SYBR Green Master (Roche). The sequence of primer pairs were as follows: rat DUOX1: sense, 5'-GATACCCAAAGCTGTACCTCG-3' and antisense, 5'-GTCCTTGTACCCAGATGAAG-3'; rat DUOX2: sense, 5'-TGCTCTCAACCCAAAGTG-3' and antisense, 5'-TCTCAAACCAGTAGCGATCAC-3'; rat NIS: sense, 5'-GCTCATCCTGAACCAAGTGA-3' and antisense, 5'-ACGAGCATTACCACAACCTG-3'; rat NOX4: sense, 5'-TCCATCAAGCCAAGATTCTGAG-3' and antisense, 5'-GGTTTCCAGTCATCCAGTAGAG-3'; rat GAPDH: sense, 5'-TGATTCTACCCACGGCAAGT-3' and antisense, 5'-AGCATCACCCCATTTGATGT-3'.

#### Expression arrays

Samples were processed and hybridized on Affymetrix MOE 430A 2.0 arrays by the MSKCC Genomic core facility. Gene expression data of all samples were log<sub>2</sub>-transformed and quantile-normalized with Partek GS software. Fold change was calculated compared to the average expression of normal thyroid tissues (TPO-Cre negative or wild-type animals). We determined the TDS and TGF- $\beta$  transcriptional output scores from thyroid specimens of different mouse models by measuring expression of genes involved in thyroid hormone biosynthesis or that are transcriptionally regulated by the TGF- $\beta$  pathway (Supplementary Table S1). Score = Average of all genes (Invlog10), where each gene = log<sub>2</sub>(gene)/log<sub>2</sub>(controls). Genes used for the TDS were the mouse homologues of the human gene list used to develop the TDS in the TCGA article on papillary thyroid carcinoma (7). The TGF- $\beta$  score was based on genes upregulated by TGF- $\beta$  in mouse primary hepatocytes (12) that were concomitantly upregulated in LSL-Braf/TPO-Cre PTCs relative to normal thyroid tissue. Of note, we confirmed that these murine Braf-induced PTCs have increased activation of the TGF- $\beta$  pathway (Supplementary Fig. S7A, B). For genes with multiple probes in the expression array, we used the probe with the highest standard deviation between samples of different characteristics to calculate scores. Correlations between

Nox4 expression and TGF- $\beta$  output and TDS were calculated in GraphPad using Pearson correlation.

#### Human embryonic tissue samples

Human embryonic and fetal thyroid was extracted from tissue fragments that were obtained immediately after elective termination of pregnancy between 7 and 12 weeks of gestation in compliance with the French bioethics legislation. Approval was obtained from Agence de Biomedecine, the French competent authority, along with maternal written consent. The number of sampled thyroid tissues per GW was as follows: 2 at 8 GW; 2 at 10 GW; and 2 at 12 GW. Tissue samples were snap-frozen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  before RNA analysis. Total RNA was purified from frozen thyroid tissues using RNeasy extraction, according to the manufacturer's instruction (QIAGEN).

#### Mouse genetic models

*TPO-Cre* mice express Cre recombinase under the control of the thyroid peroxidase gene promoter, which is active only in thyroid follicular cells beginning at E14.5 (27). *FR-Hras<sup>G12V</sup>* mice conditionally express a latent *Hras<sup>G12V</sup>* allele under the regulatory control of its endogenous gene promoter (9). To generate triple transgenic mice, *TPO-Cre/FR-Hras* mice were bred with *Nf2<sup>fllox2</sup>* (16), *Trp53<sup>fllox2</sup>* (22), or *Pten<sup>fllox2</sup>* mice (45). Mice with homozygous loss of *Nf2* develop thyroid hyperplasia, whereas *Hras<sup>G12V</sup>/Nf2*-null and *Hras<sup>G12V</sup>/Pten*-null develop PDTC. *Hras<sup>G12V</sup>/p53* null develop either PDTC or anaplastic thyroid cancer (15). *TPO-Cre* mice crossed with *LSL-Braf<sup>V600E</sup>* (32), which harbor conditional knockin allele of *Braf<sup>V600E</sup>*, result in development of PTC with short latency (14). Both male and female mice were used. Animal care and all procedures were approved by the MSKCC Institutional Animal Care and Use Committee.

#### Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Instat software for analysis of variance and the Student *t*-test, with the level of significance set at  $p < 0.05$ .

#### Acknowledgments

This work was supported by grants from Electricité de France (EDF), Ligue Contre le Cancer (comité du Val-de-Marne), Programmes Internationaux de Coopération Scientifique (PICS), CNRS-France/CNRS-Maroc, PHC Volubilis/Toubkal, International Atomic Energy Agency (IAEA), NIH grants RO1-CA50706, P50-CA172012, P30-CA008748, and Programme d'appui à la recherche sectorielle (CNRST/Maroc). Naima AZOUZI was supported by University Paris-Saclay, Jérémy Cailloux was the recipient of a doctoral fellowship of the French Ministry of Research and Technology, and Juliana M. Cazarin was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

#### Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

#### References

- Ambasta RK, Kumar P, Griendling KK, Schmidt HH, Busse R, and Brandes RP. Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase. *J Biol Chem* 279: 45935–45941, 2004.
- Ameziane-El-Hassani R, Talbot M, de Souza Dos Santos MC, Al Ghuzlan A, Hartl D, Bidart JM, De Deken X, Miot F, Diallo I, de Vathaire F, Schlumberger M, and Dupuy C. NADPH oxidase DUOX1 promotes long-term persistence of oxidative stress after an exposure to irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 5051–5056, 2015.
- Barnes JL and Gorin Y. Myofibroblast differentiation during fibrosis: role of NAD(P)H oxidases. *Kidney Int* 79: 944–956, 2011.
- Bedard K and Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87: 245–313, 2007.
- Boudreau HE, Casterline BW, Burke DJ, and Leto TL. Wild-type and mutant p53 differentially regulate NADPH oxidase 4 in TGF- $\beta$ -mediated migration of human lung and breast epithelial cells. *Br J Cancer* 110: 2569–2582, 2014.
- Boudreau HE, Casterline BW, Rada B, Korzeniowska A, and Leto TL. 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: 1489–1499, 2012.
- Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell* 159: 676–690, 2014.
- Chakravarty D, Santos E, Ryder M, Knauf JA, Liao XH, West BL, Bollag G, Kolesnick R, Thin TH, Rosen N, Zanzonico P, Larson SM, Refetoff S, Ghossein R, and Fagin JA. Small-molecule MAPK inhibitors restore radioiodine incorporation in mouse thyroid cancers with conditional BRAF activation. *J Clin Invest* 121: 4700–4711, 2011.
- Chen X, Mitsutake N, LaPerle K, Akeno N, Zanzonico P, Longo VA, Mitsutake S, Kimura ET, Geiger H, Santos E, Wendel HG, Franco A, Knauf JA, and Fagin JA. Endogenous expression of *Hras(G12V)* induces developmental defects and neoplasms with copy number imbalances of the oncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 7979–7984, 2009.
- Choi YW, Kim HJ, Kim YH, Park SH, Chwae YJ, Lee J, Soh EY, Kim JH, and Park TJ. B-RafV600E inhibits sodium iodide symporter expression via regulation of DNA methyltransferase 1. *Exp Mol Med* 46: e120, 2014.
- Costamagna E, Garcia B, and Santisteban P. 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: 3439–3446, 2004.
- Coulouarn C, Factor VM, and Thorgeirsson SS. Transforming growth factor-beta gene expression signature in mouse hepatocytes predicts clinical outcome in human cancer. *Hepatology* 47: 2059–2067, 2008.
- Dai G, Levy O, and Carrasco N. Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature* 379: 458–460, 1996.
- Franco AT, Malaguarnera R, Refetoff S, Liao XH, Lundsmith E, Kimura S, Pritchard C, Marais R, Davies TF, Weinstein LS, Chen M, Rosen N, Ghossein R, Knauf JA, and Fagin JA. Thyrotrophin receptor signaling dependence of Braf-induced thyroid tumor initiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 1615–1620, 2011.
- Garcia-Rendueles ME, Ricarte Filho JC, Untch B, Landa I, Knauf JA, Voza F, Smith VE, Ganly I, Taylor BS, Persaud Y, Oler G, Fang Y, Jhanwar SC, Viale A, Heguy A,

- Huberman KH, Giancotti F, Ghossein R, and Fagin JA. NF2 loss promotes oncogenic RAS-induced thyroid cancers via YAP-dependent transactivation of RAS proteins and sensitizes them to MEK inhibition. *Cancer Discov* 5: 1178–1193, 2015.
16. Giovannini M, Robanus-Maandag E, van der Valk M, Niwa-Kawakita M, Abramowski V, Goutebroze L, Woodruff JM, Berns A, and Thomas G. Conditional biallelic Nf2 mutation in the mouse promotes manifestations of human neurofibromatosis type 2. *Genes Dev* 14: 1617–1630, 2000.
  17. Grubeck-Loebenstien B, Buchan G, Sadeghi R, Kissonerghis M, Londei M, Turner M, Pirich K, Roka R, Niederle B, Kassal H, Waldhäusl W, and Feldmann M. Transforming growth factor beta regulates thyroid growth. Role in the pathogenesis of nontoxic goiter. *J Clin Invest* 83: 764–770, 1989.
  18. Hayes P and Knaus UG. Balancing reactive oxygen species in the epigenome: NADPH oxidases as target and perpetrator. *Antioxid Redox Signal* 18: 1937–1945, 2013.
  19. Ho AL, Grewal RK, Leboeuf R, Sherman EJ, Pfister DG, Deandreis D, Pentlow KS, Zanzonico PB, Haque S, Gavane S, Ghossein RA, Ricarte-Filho JC, Domínguez JM, Shen R, Tuttle RM, Larson SM, and Fagin JA. Selumetinib-enhanced radioiodine uptake in advanced thyroid cancer. *N Engl J Med* 368: 623–632, 2013.
  20. Hsieh CH, Wu CP, Lee HT, Liang JA, Yu CY, and Lin YJ. NADPH oxidase subunit 4 mediates cycling hypoxia-promoted radiation resistance in glioblastoma multiforme. *Free Radical Bio Med* 53: 649–658, 2012.
  21. Jinnin M, Ihn H, and Tamaki K. Characterization of SIS3, a novel specific inhibitor of Smad3, and its effect on transforming growth factor-beta1-induced extracellular matrix expression. *Mol Pharmacol* 69: 597–607, 2006.
  22. Jonkers J, Meuwissen R, van der Gulden H, Peterse H, van der Valk M, and Berns A. Synergistic tumor suppressor activity of BRCA2 and p53 in a conditional mouse model for breast cancer. *Nat Genet* 29: 418–425, 2001.
  23. Kambe F, Nomura Y, Okamoto T, and Seo H. Redox regulation of thyroid-transcription factors, Pax-8 and TTF-1, is involved in their increased DNA-binding activities by thyrotropin in rat thyroid FRTL-5 cells. *Mol Endocrinol* 10: 801–812, 1996.
  24. Kawaguchi A, Ikeda M, Endo T, Kogai T, Miyazaki A, and Onaya T. 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: 789–794, 1997.
  25. Knauf JA, Sartor MA, Medvedovic M, Lundsmith E, Ryder M, Salzano M, Nikiforov YE, Giordano TJ, Ghossein RA, and Fagin JA. Progression of BRAF-induced thyroid cancer is associated with epithelial-mesenchymal transition requiring concomitant MAP kinase and TGFbeta signaling. *Oncogene* 30: 3153–3162, 2011.
  26. Kondo T, Ezzat S, and Asa SL. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nat Rev Cancer* 6: 292–306, 2006.
  27. Kusakabe T, Kawaguchi A, Kawaguchi R, Feigenbaum L, and Kimura S. Thyrocyte-specific expression of Cre recombinase in transgenic mice. *Genesis* 39: 212–216, 2004.
  28. Leboeuf R, Baumgartner JE, Benezra M, Malaguarnera R, Solit D, Pratilas CA, Rosen N, Knauf JA, and Fagin JA. BRAFV600E mutation is associated with preferential sensitivity to mitogen-activated protein kinase kinase inhibition in thyroid cancer cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 2194–2201, 2008.
  29. Levy O, De la Vieja A, Ginter CS, Riedel C, Dai G, and Carrasco N. N-linked glycosylation of the thyroid Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter (NIS). Implications for its secondary structure model. *J Biol Chem* 273: 22657–22663, 1998.
  30. Lito P, Pratilas CA, Joseph EW, Tadi M, Halilovic E, Zubrowski M, Huang A, Wong WL, Callahan MK, Merghoub T, Wolchok JD, de Stanchina E, Chandralapaty S, Poulidakos PI, Fagin JA, and Rosen N. Relief of profound feedback inhibition of mitogenic signaling by RAF inhibitors attenuates their activity in BRAFV600E melanomas. *Cancer Cell* 22: 668–682, 2012.
  31. Matoba H, Sugano S, Yamaguchi N, and Miyachi Y. Expression of transforming growth factor-beta1 and transforming growth factor-beta Type-II receptor mRNA in papillary thyroid carcinoma. *Horm Metab Res* 30: 624–628, 1998.
  32. Mercer K, Giblett S, Green S, Lloyd D, DaRocha Dias S, Plumb M, Marais R, and Pritchard C. Expression of endogenous oncogenic V600EB-raf induces proliferation and developmental defects in mice and transformation of primary fibroblasts. *Cancer Res* 65: 11493–11500, 2005.
  33. Mishra PK, Raghuram GV, Jain D, Jain SK, Khare NK, and Pathak N. Mitochondrial oxidative stress-induced epigenetic modifications in pancreatic epithelial cells. *Int J Toxicol* 33: 116–129, 2014.
  34. Mitsutake N, Knauf JA, Mitsutake S, Mesa C Jr., Zhang L, and Fagin JA. Conditional BRAFV600E expression induces DNA synthesis, apoptosis, dedifferentiation, and chromosomal instability in thyroid PCCL3 cells. *Cancer Res* 65: 2465–2473, 2005.
  35. Montero-Conde C, Ruiz-Llorente S, Dominguez JM, Knauf JA, Viale A, Sherman EJ, Ryder M, Ghossein RA, Rosen N, and Fagin JA. Relief of feedback inhibition of HER3 transcription by RAF and MEK inhibitors attenuates their antitumor effects in BRAF-mutant thyroid carcinomas. *Cancer Discov* 3: 520–533, 2013.
  36. Nawshad A, Lagamba D, Polad A, and Hay ED. Transforming growth factor-beta signaling during epithelial-mesenchymal transformation: implications for embryogenesis and tumor metastasis. *Cells Tissues Organs* 179: 11–23, 2005.
  37. Nicolussi A, D'Inzeo S, Santulli M, Colletta G, and Coppa A. TGF-beta control of rat thyroid follicular cells differentiation. *Mol Cell Endocrinol* 207: 1–11, 2003.
  38. Nucera C, Lawler J, Hodin R, and Parangi S. The BRAFV600E mutation: what is it really orchestrating in thyroid cancer? *Oncotarget* 1: 751–756, 2010.
  39. O'Hagan HM, Wang W, Sen S, Destefano Shields C, Lee SS, Zhang YW, Clements EG, Cai Y, Van Neste L, Easwaran H, Casero RA, Sears CL, and Baylin SB. Oxidative damage targets complexes containing DNA methyltransferases, SIRT1, and polycomb members to promoter CpG Islands. *Cancer Cell* 20: 606–619, 2011.
  40. Pardali K and Moustakas A. Actions of TGF-beta as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. *Biochim Biophys Acta* 1775: 21–62, 2007.
  41. Riesco-Eizaguirre G, Rodríguez I, De la Vieja A, Costamagna E, Carrasco N, Nistal M, and Santisteban P. The BRAFV600E oncogene induces transforming growth factor beta secretion leading to sodium iodide symporter repression and increased malignancy in thyroid cancer. *Cancer Res* 69: 8317–8325, 2009.

42. Stephen JK, Chitale D, Narra V, Chen KM, Sawhney R, and Worsham MJ. DNA methylation in thyroid tumorigenesis. *Cancers (Basel)* 3: 1732–1743, 2011.
43. Szinnai G, Lacroix L, Carré A, Guimiot F, Talbot M, Martinovic J, Delezoide AL, Vekemans M, Michiels S, Caillou B, Schlumberger M, Bidart JM, and Polak M. Sodium/iodide symporter (NIS) gene expression is the limiting step for the onset of thyroid function in the human fetus. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 70–76, 2007.
44. Taton M, Lamy F, Roger PP, and Dumont JE. General inhibition by transforming growth factor beta 1 of thyrotropin and cAMP responses in human thyroid cells in primary culture. *Mol Cell Endocrinol* 95: 13–21, 1993.
45. Trotman LC, Niki M, Dotan ZA, Koutcher JA, Di Cristofano A, Xiao A, Khoo AS, Roy-Burman P, Greenberg NM, Van Dyke T, Cordon-Cardo C, and Pandolfi PP. Pten dose dictates cancer progression in the prostate. *PLoS Biol* 1: E59, 2003.
46. Tsushima T, Arai M, Saji M, Ohba Y, Murakami H, Ohmura E, Sato K, and Shizume K. Effects of transforming growth factor-beta on deoxyribonucleic acid synthesis and iodine metabolism in porcine thyroid cells in culture. *Endocrinology* 123: 1187–1194, 1988.
47. Vasko V, Espinosa AV, Scouten W, He H, Auer H, Liyanarachchi S, Larin A, Savchenko V, Francis GL, de la Chapelle A, Saji M, and Ringel MD. Gene expression and functional evidence of epithelial-to-mesenchymal transition in papillary thyroid carcinoma invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 2803–2808, 2007.
48. Weyemi U, Caillou B, Talbot M, Ameziane-El-Hassani R, Lacroix L, Lagente-Chevallier O, Al Ghuzlan A, Roos D, Bidart JM, Virion A, Schlumberger M, and Dupuy C. Intracellular expression of reactive oxygen species-generating NADPH oxidase NOX4 in normal and cancer thyroid tissues. *Endocr Relat Cancer* 17: 27–37, 2010.
49. Weyemi U, Lagente-Chevallier O, Boufraquech M, Prenois F, Courtin F, Caillou B, Talbot M, Dardalhon M, Al Ghuzlan A, Bidart JM, Schlumberger M, and Dupuy C. ROS-generating NADPH oxidase NOX4 is a critical mediator in oncogenic H-Ras-induced DNA damage and subsequent senescence. *Oncogene* 31: 1117–1129, 2012.
50. Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 12: 245–262, 2005.
51. Xing M, Alzahrani AS, Carson KA, Viola D, Elisei R, Bendlova B, Yip L, Mian C, Vianello F, Tuttle RM, Robenshtok E, Fagin JA, Puxeddu E, Fugazzola L, Czarniecka A, Jarzab B, O'Neill CJ, Sywak MS, Lam AK, Riesco-Eizaguirre G, Santisteban P, Nakayama H, Tufano RP, Pai SI, Zeiger MA, Westra WH, Clark DP, Clifton-Bligh R, Sidransky D, Ladenson PW, and Sykorova V. Association between BRAF V600E mutation and mortality in patients with papillary thyroid cancer. *JAMA* 309: 1493–1501, 2013.
52. Yamaura M, Mitsushita J, Furuta S, Kuniwa Y, Ashida A, Goto Y, Shang WH, Kubodera M, Kato M, Takata M, Saida T, and Kamata T. NADPH oxidase 4 contributes to transformation phenotype of melanoma cells by regulating G2-M cell cycle progression. *Cancer Res* 69: 2647–2654, 2009.
53. Zavadil J and Böttinger EP. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 24: 5764–5774, 2005.

Address correspondence to:

Dr. Corinne Dupuy  
UMR8200 CNRS Institut Gustave Roussy  
114 rue Edouard Vaillant  
Villejuif 94805  
France

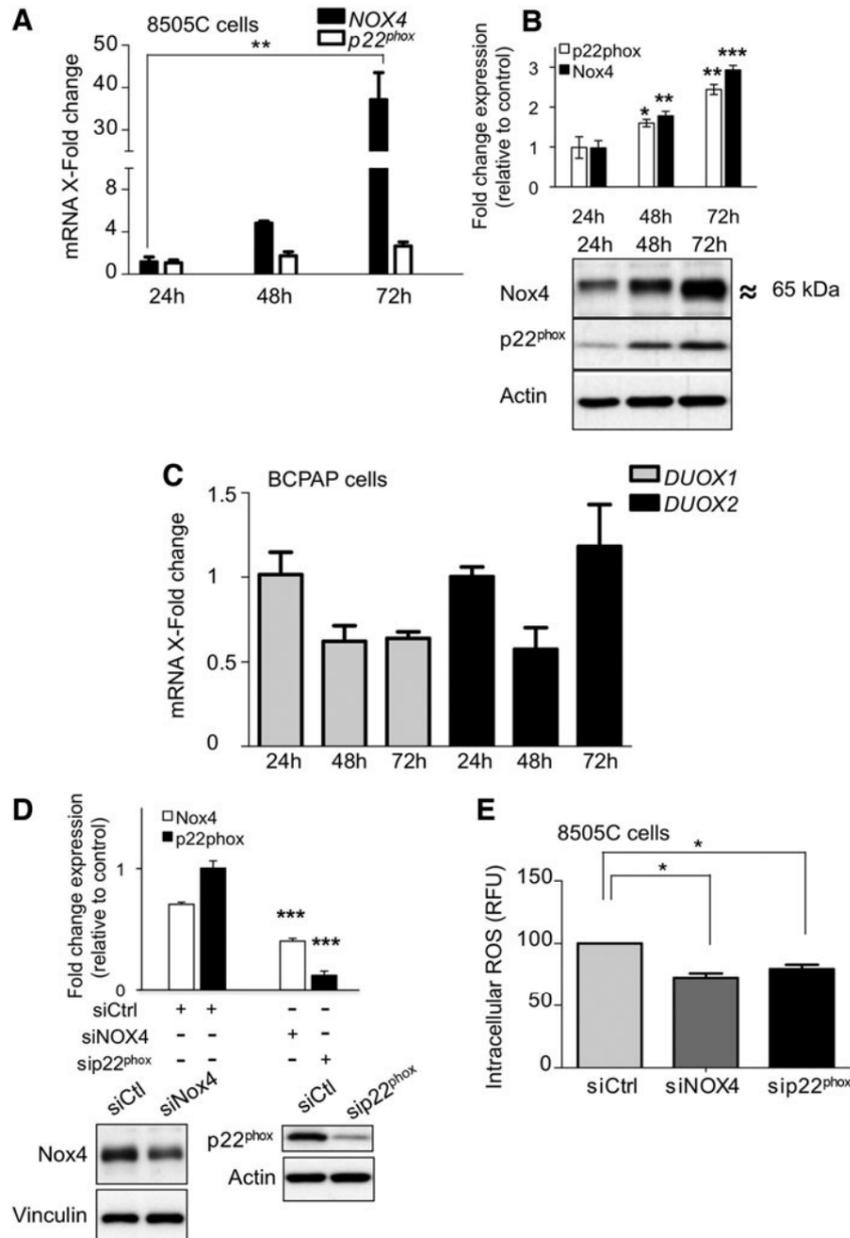
E-mail: corinne.dupuy@gustaveroussy.fr

Date of first submission to ARS Central, December 31, 2015; date of final revised submission, July 6, 2016; date of acceptance, July 6, 2016.

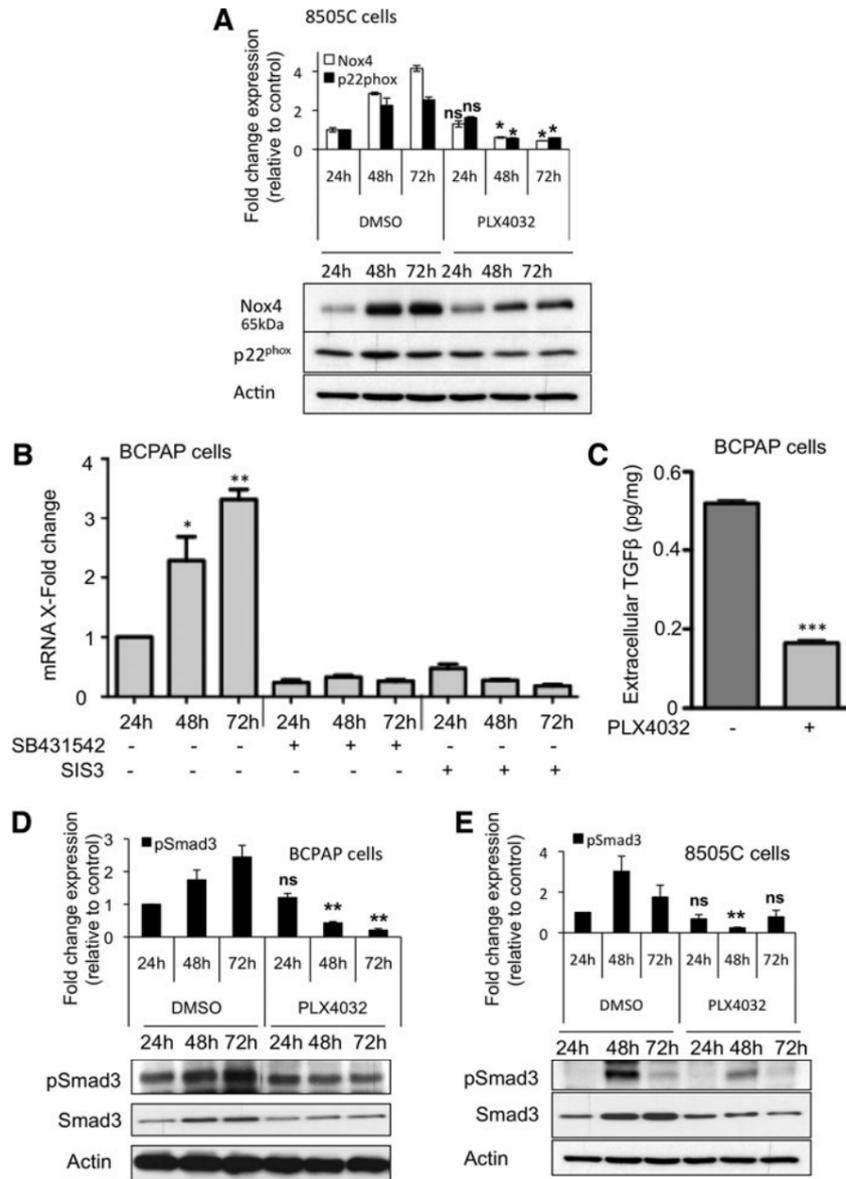
#### Abbreviations Used

BSA = bovine serum albumin  
DUOX = dual oxidase  
DUOXA = DUOX activator  
EMT = epithelial–mesenchymal transition  
ERK = extracellular signal-regulated kinase  
MAPK = mitogen-activated protein kinase  
MEK = mitogen-activated protein kinase kinase  
NAC = N-acetyl-cysteine  
NADPH = reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate  
NIS = sodium/iodide symporter  
NOX = NADPH oxidase  
PTC = papillary thyroid cancer  
ROS = reactive oxygen species  
RT = reverse transcription  
siRNA = small interfering RNA

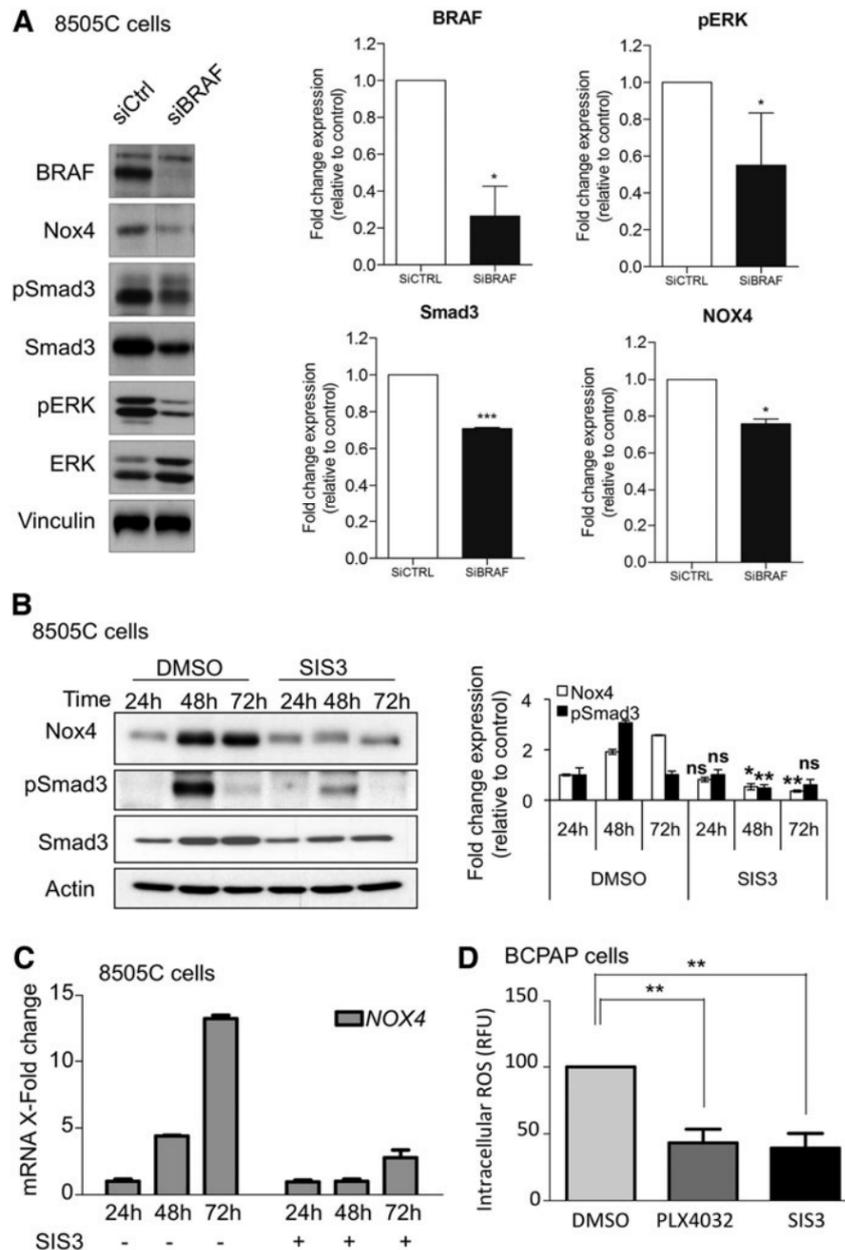
## Supplementary Data



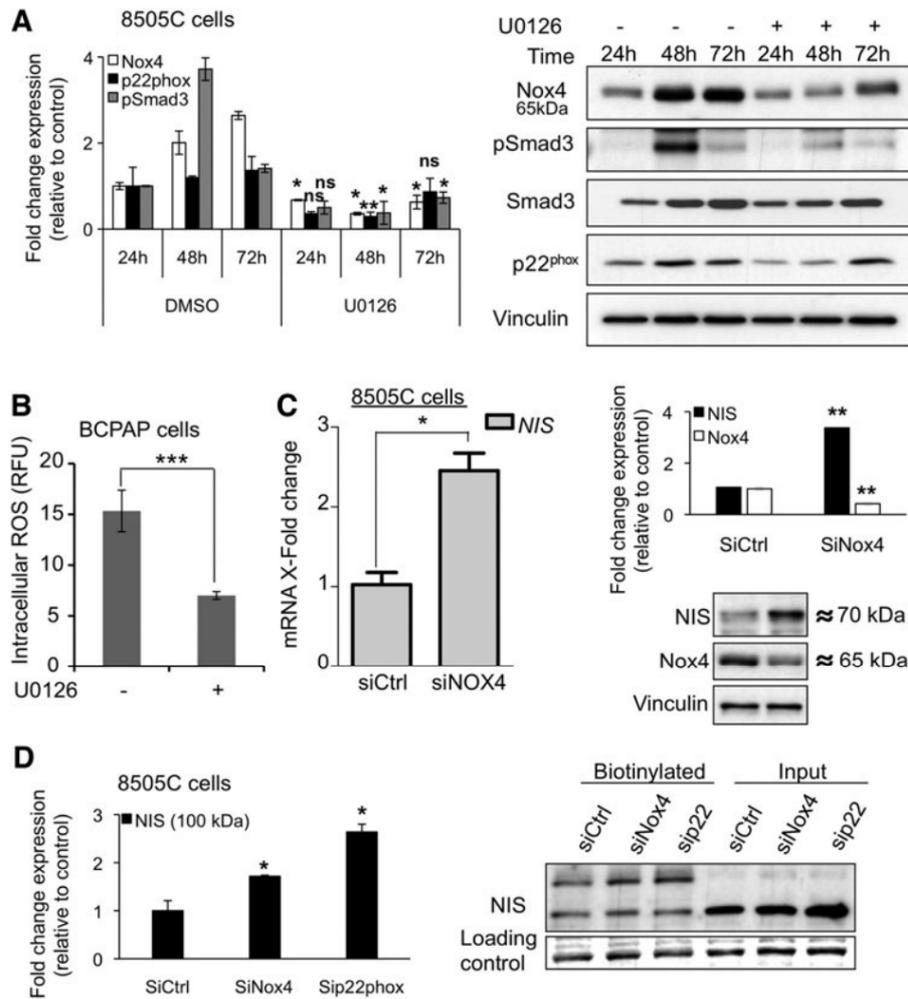
**SUPPLEMENTARY FIG. S1. Expression of NADPH oxidase NOX4 and its functional partner p22<sup>phox</sup> under the control of BRAF<sup>V600E</sup> oncogene.** Time course expression of NOX4 and p22<sup>phox</sup> in 8505C cells. (A) NOX4 and p22<sup>phox</sup> mRNA were quantified by real-time quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). (B) NOX4 and p22<sup>phox</sup> proteins were analyzed by Western blot as described in the Materials and Methods section. Densitometric quantification of Nox4 and p22<sup>phox</sup> levels normalized to actin levels and presented as fold change compared with the basal level (24 h). (C) Time course analysis of DUOX1 and DUOX2 mRNA expressions by qRT-PCR in BCPAP cells at indicated time culture. (D) Nox4 and p22<sup>phox</sup> expressions after treatment of cells with siRNA directed against Nox4 or p22<sup>phox</sup>, respectively. Densitometric quantification of Nox4 and p22<sup>phox</sup> levels normalized to vinculin or actin levels and presented as fold change compared with siRNA control-treated cells. (E) Intracellular ROS detection in 8505C cells by DCF fluorescence using flow cytometry 48 h after knocking down of NOX4 or p22<sup>phox</sup> with specific siRNA (10 nM). The RFU are normalized to 100 in the control. Values are mean  $\pm$  SE. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$ . RFU, relative fluorescence units; ROS, reactive oxygen species.



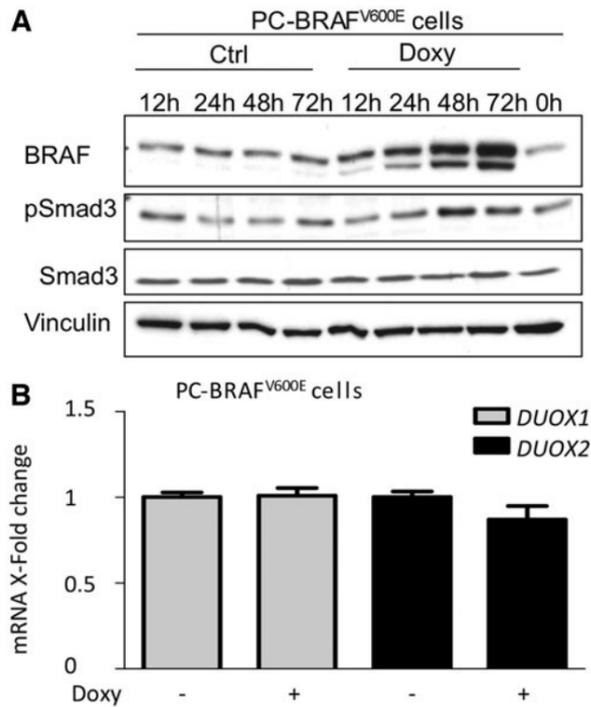
**SUPPLEMENTARY FIG. S2. BRAF<sup>V600E</sup> oncogene upregulates NOX4 via TGF-β1 signaling pathway in papillary thyroid cancer cell line.** (A) Immunoblot detection of NOX4 and p22<sup>phox</sup> in 8505C cells after pharmacological inhibition of BRAF<sup>V600E</sup> oncogene by PLX4032 (10 μM). Densitometric quantification of Nox4 and p22<sup>phox</sup> levels normalized to actin levels and presented as fold change compared with vehicle-treated cells for 24 h. Student *t*-test is realized by comparing PLX *versus* DMSO for each corresponding time of the kinetic. (B) Time course expression of NOX4 mRNAs in BCPAP cells at indicated time culture in the absence or presence of specific inhibitors of TGF-β1 pathway SB431542 (10 μM) or of Smad3 (SIS3 10 μM). (C) Quantitative detection of secreted TGF-β1 in the extracellular medium of BCPAP cells in the absence or presence of PLX4032 (10 μM) for 72 h. (D) Western blot analysis of Smad3 and phospho Smad3 at indicated time of culture of BCPAP cells treated with PLX4032 (10 μM). Densitometric quantification of phospho-Smad3 levels normalized to actin levels and presented as fold change compared with vehicle-treated cells for 24 h. Student *t*-test is realized by comparing PLX *versus* DMSO for each corresponding time of the kinetic. (E) Time-dependent expression of Smad3 and phospho Smad3 in 8505C cells treated or not with PLX4032 (10 μM). Densitometric quantification of phospho-Smad3 levels normalized to actin levels and presented as fold change compared with vehicle-treated cells for 24 h. Student *t*-test is realized by comparing PLX *versus* DMSO for each corresponding time of the kinetic. Values are mean ± SE. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, and \*\*\**p* < 0.001. TGF-β1, transforming growth factor β1.



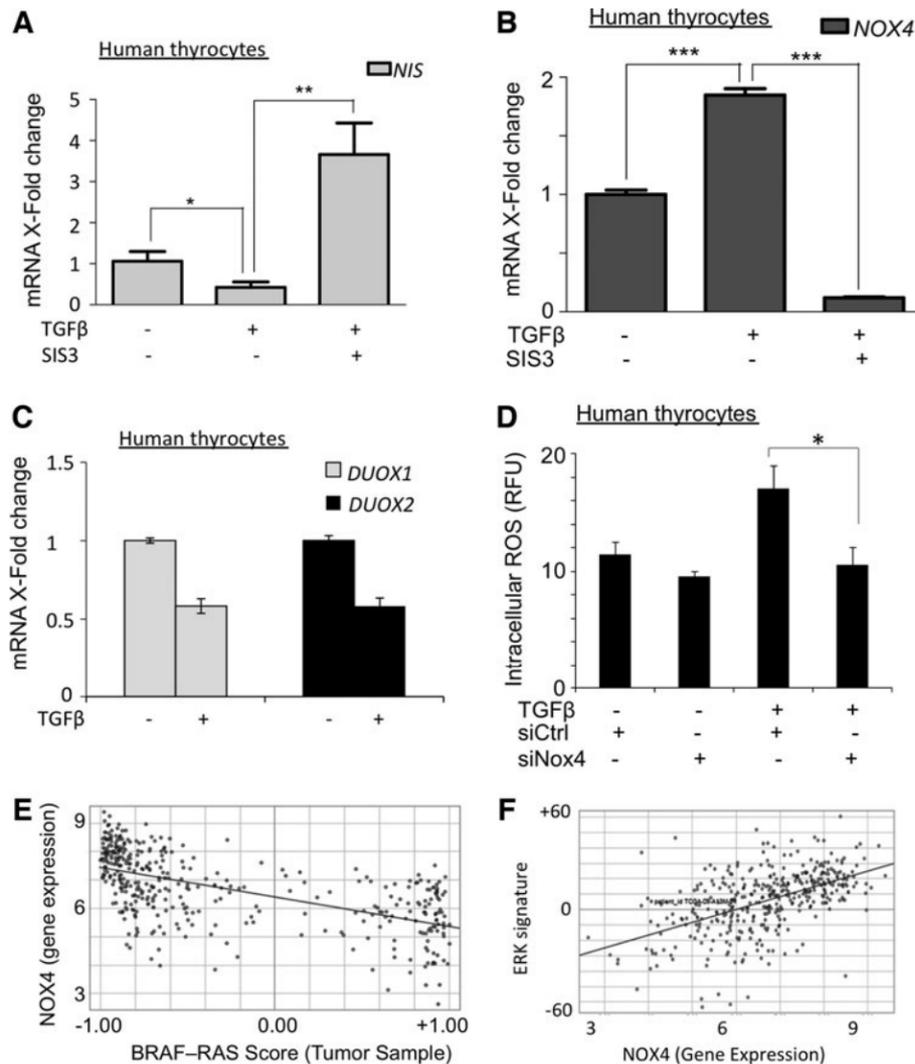
**SUPPLEMENTARY FIG. S3. Mutated BRAF upregulates NOX4 via the TGF $\beta$ 1/Smad3 signaling pathway. (A)** Western blot analysis of BRAF, Nox4, Smad3, phospho-Smad3, phospho-ERK, and ERK expressions in 8505C cells 48 h after knocking down of BRAF by RNA interference. Densitometric quantification of protein levels normalized to vinculin levels and presented as fold change compared with siRNA control-treated cells for 48 h. **(B)** Time-dependent expressions of Nox4, Smad3, and phospho Smad3 in 8505C cells treated or not with SIS3 (10  $\mu$ M). Densitometric quantification of Nox4 and phospho-Smad3 levels normalized to actin levels and presented as fold change compared with vehicle-treated cells for 24 h. Student *t*-test is realized by comparing SIS3 versus DMSO for each corresponding time of the kinetic. **(C)** Time course expression of NOX4 mRNA analyzed by qRT-PCR in 8505C cells treated or not with SIS3 (10  $\mu$ M). **(D)** Intracellular ROS detection by DCF fluorescence using flow cytometry in BCPAP cells treated for 48 h with PLX4032 (10  $\mu$ M) or SIS3 (10  $\mu$ M). The RFU are normalized to 100 in the control. Values are mean  $\pm$  SE. \**p* < 0.05 and \*\**p* < 0.01. ERK, extracellular signal-regulated kinase.



**SUPPLEMENTARY FIG. S4. NOX4 downregulates the NIS in both BRAF<sup>V600E</sup>-mutated thyroid cell lines. (A)** Time-dependent expressions of NOX4, p22<sup>phox</sup>, Smad3, and phospho-Smad3 in 8505C cells treated or not with U0126 (10  $\mu$ M). Densitometric quantification of Nox4, p22<sup>phox</sup>, and phospho-Smad3 levels normalized to vinculin levels and presented as fold change compared with vehicle-treated cells for 24 h. Student *t*-test is realized by comparing U0126 versus DMSO for each corresponding time of the kinetic. **(B)** Intracellular level of ROS measured at 48 h in BCPAP cells treated or not with U0126 (10  $\mu$ M). The detection was done by DCF fluorescence using flow cytometry. **(C)** Expression of NIS (mRNA and protein) 48 h after knocking down of Nox4 in 8505C cells. Densitometric quantification of Nox4 and NIS levels normalized to vinculin levels and presented as fold change compared with siRNA control-treated cells for 48 h. **(D)** Western blot analysis of cell surface NIS expression in 8505C cells 48 h after knocking down of NOX4 or p22<sup>phox</sup> by RNA interference. Red Ponceau staining at a corresponding molecular weight area of NIS protein was used as loading control. Densitometric quantification of NIS (hyperglycosylated form of 100 kDa) levels normalized to loading control levels and presented as fold change compared with siRNA control-treated cells for 48 h. Values are mean  $\pm$  SE. \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01, and \*\*\* $p$  < 0.001. NIS, sodium/iodide symporter.

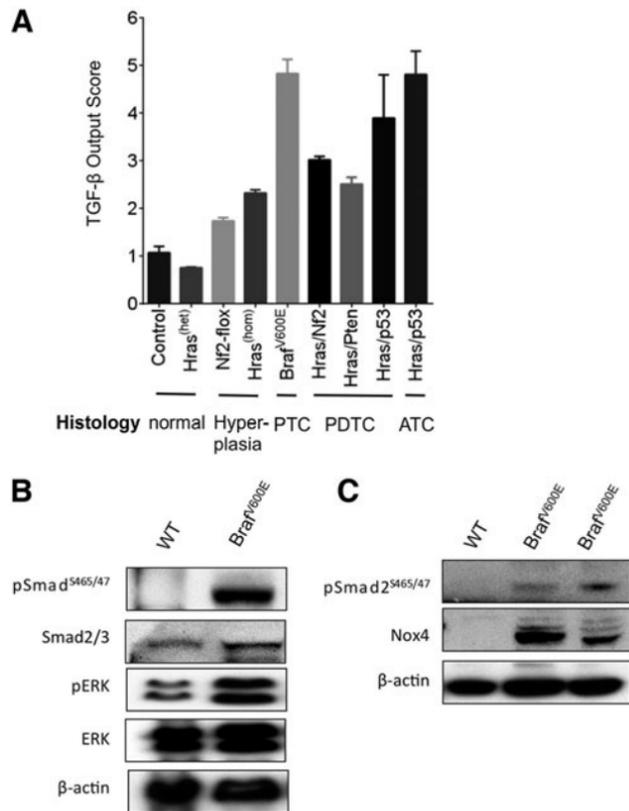


**SUPPLEMENTARY FIG. S5. BRAF<sup>V600E</sup> does not regulate DUOX1 and DUOX2 at the transcriptional level in thyroid PCCL3 cells.** (A) Time course analysis of BRAF<sup>V600E</sup>, Smad3, and phospho-Smad3 expressions in PC BRAF<sup>V600E</sup> cells treated with 1  $\mu$ g/ml of doxycycline. Vinculin was used as a loading control. (B) qRT-PCR analysis of DUOX1 and DUOX2 mRNA levels in PC-BRAF<sup>V600E</sup> cells in the absence or presence of doxycycline (1  $\mu$ g/ml) for 48 h.



**SUPPLEMENTARY FIG. S6. NOX4 is involved in TGF- $\beta$ -induced downregulation of NIS in human thyrocytes.**

(A) Expression of NIS mRNA evaluated by qRT-PCR in human thyrocytes treated or not for 12 h with human recombinant TGF- $\beta$  (10 ng/ml) and SIS3 (10  $\mu$ M). (B) qRT-PCR analysis of NOX4 mRNA level in human thyrocytes treated in the absence or presence of human recombinant TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml for 12 h) with or without SIS3 (10  $\mu$ M). (C) qRT-PCR analysis of DUOX1 and DUOX2 mRNA levels in human thyrocytes treated or not for 12 h with human recombinant TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml). (D) Intracellular level of ROS measured at 48 h in human thyrocytes treated with control or specific siRNAs in the absence or presence of human recombinant TGF- $\beta$ 1. Values are mean  $\pm$  SE. \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01, and \*\*\* $p$  < 0.001. Analysis of TCGA data. Correlative analysis between NOX4 gene expression and BRAF-RAS score in human PTC (E). Correlative analysis between NOX4 gene expression and ERK activation (F). ERK, extracellular signal-regulated kinase; PTC, papillary thyroid cancer; TCGA, The Cancer Genome Atlas.



**SUPPLEMENTARY FIG. S7. High level of NOX4 mRNA is correlated with high level of TGF- $\beta$  mRNA in genetically engineered mouse models of thyroid cancer.** (A) TGF- $\beta$  output score in different thyroid cancer mouse models. B-C Activation of TGF- $\beta$  pathway in papillary thyroid cancers of 13-week-old LSL-Braf<sup>V600E</sup>/TPO-Cre (Braf<sup>V600E</sup>) mice. Protein lysates were prepared from thyroids of wild-type and LSL-Braf<sup>V600E</sup>/TPO-Cre mice and subjected to Western blotting for the indicated proteins. (B) Increased phosphorylation of Smad2 in Braf<sup>V600E</sup>-induced PTCs compared to wild-type thyroids. (C) Increased phospho-Smad in Braf<sup>V600E</sup>-induced PTC is associated with higher NOX4 protein levels. TPO, thyroperoxydase.

**Supplementary Table S1:** Genes used in calculation of TGF $\beta$  output and thyroid differentiation (TDS) scores.

TGF $\beta$	TDS
Abcb1b	Dio1
Acvr1	Dio2
Acvr1b	Nkx2-1
Bmpr2	Pax8
Btg1	Slc26a4
Cda	Slc5a5
Cldn4	Slc5a8
Ddi2 /// Rsc1a1	Tg
Ddit4	Thra
Dyrk3	Thrb
Foxq1	Tpo
Gadd45a	Tshr
Gadd45g	
Gcnt2	
Hmga2	
Id2	
Ier3	
Jag1	
Lgmn	
Lpgat1	
Lrp1	
Ndel1	
Nrp1	
Pcdh1	
Pdcd10	
Pdlim7	
Prg4	
Rdh10	
Relb	
Serpine1	
Sh3bp2	
Skil	
Slc25a37	
Smad7	
Snx30	
Sox4	
Svil	
Tex10	
Tex10	
Tfpi2	
Tmsb4x	
Tnfrsf1b	
Trib3	
Ubr2	
Zcchc10	
Zfp125	
Zfp3612	

# Discussion générale

- La NOX4 est un nouvel acteur de la signalisation oncogénique induite par BRAF<sup>V600E</sup> et le TGF- $\beta$ 1 dans les PTCs :

La mutation BRAF<sup>T1799A</sup>, qui code pour l'oncogène BRAF<sup>V600E</sup> est l'altération génétique la plus commune des cancers papillaires de la thyroïde (169). C'est un puissant activateur de la voie de signalisation MAPK/ERK et, par conséquent, un régulateur critique de la croissance cellulaire, de la différenciation et de la transformation oncogénique. Par ailleurs, l'activation de la voie du TGF $\beta$  est également fortement associée à la progression et au développement des cancers de la thyroïde porteurs de la mutation BRAF chez la souris (234). Puisque la surexpression du TGF- $\beta$  dans les tumeurs thyroïdiennes humaines semble compatible avec ce rôle cela nous a conduits à explorer les mécanismes en aval qui contribuent à ces effets dans les tumeurs malignes de la thyroïde chez l'homme. Les ROS sont connus pour leur rôle d'effecteurs dans la voie de signalisation du TGF $\beta$  en participant notamment à l'induction de la transition épithelio-mésenchymateuse (EMT) et à la migration cellulaire dans plusieurs types cellulaires (244, 245). Les ROS produites par la NADPH oxydase NOX4 ont été démontrées être impliquées dans les effets du TGF $\beta$  tels que la fibrose (246) et l'EMT (220).

L'équipe a précédemment mis en évidence que NOX4 est surexprimée dans les cancers papillaires de la thyroïde (PTCs), cependant son rôle dans la pathogenèse de ce type de cancer demeure inconnu (207). Dans cette étude nous montrons que l'expression de NOX4 est particulièrement élevée dans les PTCs porteurs de la mutation BRAF<sup>V600E</sup>, non seulement chez l'homme mais également chez la souris. En utilisant deux lignés cellulaires cancéreuses humaines porteuses de la mutation BRAF<sup>V600E</sup> et une lignée cellulaire de thyroïde de rat exprimant BRAF<sup>V600E</sup> de manière conditionnelle, nous mettons en évidence que la régulation de l'expression de NOX4 est contrôlée au niveau transcriptionnel par l'oncogène BRAF<sup>V600E</sup> via l'activation de la voie de signalisation du TGF $\beta$  dépendante de Smad3. Ainsi, les inhibiteurs pharmacologiques ciblant spécifiquement cette voie de signalisation altèrent

l'expression de *INOX4*, et donc la génération de ROS intracellulaires, dans toutes les cellules thyroïdiennes testées, y compris dans les thyrocytes normaux humains après stimulation par le TGF $\beta$ . La protéine Smad3 est un facteur de transcription connu en tant qu'effecteur du TGF- $\beta$ 1. Des données récentes décrivent l'identification d'un élément de liaison de la protéine Smad3 au niveau du promoteur du gène *NOX4* qui est impliqué dans sa régulation transcriptionnelle par le TGF- $\beta$ 1 (220). Par conséquent, il n'est pas exclu que la régulation de *NOX4* par le TGF- $\beta$ 1 dans les cellules thyroïdiennes soit due à une augmentation de l'activité du promoteur du gène via la liaison du facteur Smad3.

La NADPH oxydase *NOX4* est la seule isoforme dont l'activité est associée directement à son niveau d'expression. En outre, l'hétérodimérisation de *NOX4* avec son partenaire fonctionnel, la p22<sup>phox</sup> est essentielle et suffisante pour augmenter son activité enzymatique de production de ROS. Ainsi, contrairement aux autres NOXs, elle ne nécessite pas la présence de facteurs cytosoliques pour être active (47, 208). A l'exception de quelques cas, tels que ceux observés avec les cellules BCPAP et 8505C, la p22<sup>phox</sup> n'est généralement pas régulée par le TGF- $\beta$ 1 au niveau transcriptionnel. L'augmentation du niveau de la protéine p22<sup>phox</sup> par le TGF- $\beta$ 1, mise en évidence dans la majorité des cas, est souvent due à une stabilisation de la protéine par son interaction avec *NOX4* (208).

La voie MAP kinase contribue à la progression des cancers induits par l'oncogène BRAF<sup>V600E</sup>. Il a été montré qu'une activation constitutive de cette voie est requise pour une activation optimale de la voie de signalisation du TGF- $\beta$  induite par BRAF<sup>V600E</sup> dans les cellules cancéreuses de thyroïde murines (234). Cependant, dans la lignée de rat exprimant de manière conditionnelle BRAF<sup>V600E</sup>, l'implication de la voie MEK-ERK dans les effets du TGF- $\beta$  a été montrée être sélective. En effet, contrairement à l'EMT, la régulation négative de l'expression du NIS était décrite comme étant un processus indépendant de la voie MEK-ERK (167). Dans notre étude, il apparaît que l'inhibition de la voie MEK altère l'activation de Smad3 et diminue l'expression de la NADPH oxydase dans les deux lignées cellulaires humaines porteuses de la mutation

BRAF<sup>V600E</sup> indiquant que l'expression de NOX4 induite par l'oncogène, *via* une boucle autocrine de stimulation par le TGF- $\beta$ , est dépendante de la voie MEK-ERK.

- La régulation de l'expression de l'ARNm du NIS

Puisque la régulation négative de l'expression du NIS induite par l'oncogène BRAF<sup>V600E</sup> a été montrée dans une précédente étude être dépendante du TGF- $\beta$ 1, il nous a paru important d'analyser si les ROS générées par NOX4 sous l'effet du TGF- $\beta$ 1, pouvaient être impliquées dans ce mécanisme. En utilisant un antioxydant tel que le N-acetyl cystéine (NAC) ou en inhibant l'expression de NOX4 par ARN interférence, nous montrons pour la première fois que l'expression du gène *SLC5A5* codant le NIS pourrait être contrôlé au niveau transcriptionnel par un mécanisme redox dans les cellules cancéreuses thyroïdiennes. Nos résultats mettent en évidence que le TGF- $\beta$ 1, induit par BRAF<sup>V600E</sup>, réprime l'expression du gène *SLC5A5* via les ROS produites par NOX4 sous l'effet de l'activation de la voie de signalisation dépendante de Smad3.

De manière intéressante, il a été précédemment décrit que le TGF- $\beta$ 1 peut réguler négativement l'expression du NIS selon un mécanisme qui implique une interaction fonctionnelle entre les deux facteurs de transcription : PAX8, régulateur critique de la transcription du gène codant le NIS, et Smad3. Cette interaction entraîne une inhibition de l'activité de transcription de PAX8 (159). A la lumière de nos nouvelles données, il est envisageable que Smad3 puisse aussi contribuer à l'inhibition de l'action de PAX8 par un mécanisme d'oxydation, au travers de la production de ROS par NOX4. En outre, une régulation redox de PAX8 a été décrite dans les cellules thyroïdiennes du rat FRTL5 (247). Par ailleurs, l'analyse des résultats obtenus avec les tissus tumoraux humains et murins met en évidence que le niveau d'expression de NOX4 est inversement corrélé à la différenciation thyroïdienne, ce qui suggère que, au-delà du gène codant le NIS, l'expression d'autres gènes impliqués dans cette différenciation peut être éteinte par un mécanisme finement contrôlé par les ROS produites par NOX4.

Ce mécanisme pourrait impliquer des modifications épigénétiques sensibles à l'état redox tels que la méthylation de l'ADN et l'acétylation des histones (248). Une hyperméthylation du promoteur du gène codant le NIS est observée dans les cas de PTCs porteurs de la mutation BRAF<sup>V600E</sup> (249, 250), et l'utilisation d'agents déméthylants restaure le captage de l'iode par les cellules où la région promotrice est méthylée *in vivo*. De manière intéressante, il a été montré que les ROS engendrent un déséquilibre épigénétique en affectant les mécanismes de déméthylation de l'ADN, par la génération de lésions à l'ADN (251). Ainsi des dommages oxydatifs contribueraient à la relocalisation d'un complexe de répression contenant les ADN méthyle transférases (DNMTs) aux régions promotrices impactées (252). Les mécanismes moléculaires impliqués dans un contrôle redox potentiel de l'expression de gènes impliqués dans la différenciation thyroïdienne *via* la génération de ROS par NOX4 doivent être maintenant investigués.

De manière importante, l'augmentation de l'expression des ARNm codant le NIS et la thyroperoxydase (TPO), observée au cours de l'ontogenèse thyroïdienne, n'est pas associée à une diminution de l'expression de NOX4 dans la thyroïde foetale suggérant que la régulation de la fonction thyroïdienne lors du développement foetal humain ne dépend pas de NOX4.

- La NOX4, une cible thérapeutique potentielle ?

Dans une étude clinique, l'utilisation d'un inhibiteur de la voie MAPK tel que le Selumetinib, chez des patients atteints de cancers papillaires métastatiques et réfractaires à la radiothérapie métabolique, n'a restauré que partiellement l'incorporation de l'iode radioactif dans les tumeurs de patients mutées BRAF, en revanche le traitement a donné de bien meilleurs résultats chez des patients ayant des tumeurs porteuses de la mutation RAS (249). Or, l'Analyse des cas de PTCs humains faite à partir des données « TCGA » montre que le niveau d'expression de NOX4 est corrélé au niveau d'activation de la voie ERK. Notre équipe a récemment montré que la surexpression de l'oncogène H-RAS<sup>V12</sup> régule l'augmentation du taux d'expression de NOX4 dans les cellules thyroïdiennes (217). Ceci souligne que

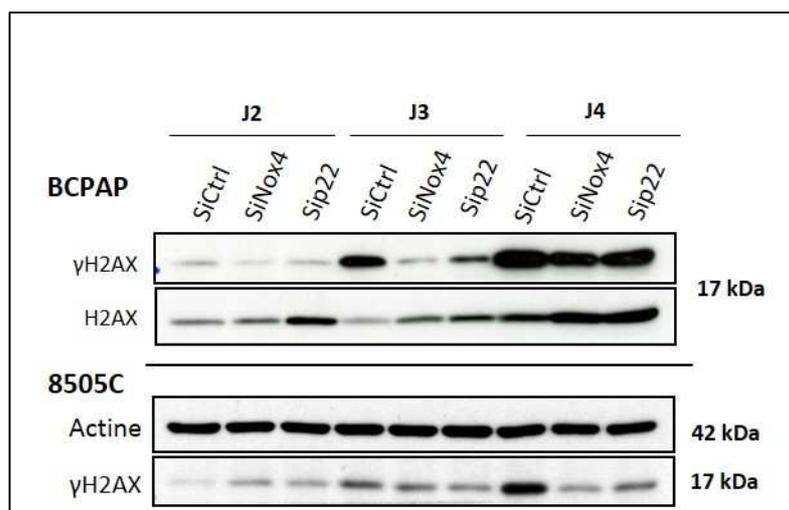
l'expression de NOX4 dans les tumeurs de la thyroïde peut dépendre du degré d'activation de la voie MAPK kinase. Les cas de PTCs porteurs de l'oncogène BRAF<sup>V600E</sup> constituent un groupe hétérogène de tumeurs avec des degrés variables de différenciation (169). Puisque le niveau d'expression de NOX4 semble être corrélé avec le niveau de dédifférenciation thyroïdienne dans les PTCs mutés BRAF<sup>V600E</sup>, il serait particulièrement important d'évaluer l'impact potentiel de NOX4 en tant que marqueur prédictif à la réponse à la radiothérapie métabolique chez des patients atteints de cancers thyroïdiens métastatiques.

En outre, cette étude identifie NOX4 comme une cible thérapeutique potentielle à travers son rôle dans la régulation négative de l'expression du transporteur de l'iode NIS. Il serait particulièrement intéressant d'évaluer l'effet d'inhibiteurs spécifiques de la NOX4 en association avec des inhibiteurs de la voie MAPK kinase sur la potentialisation de la radiothérapie métabolique.

# Conclusions & Perspectives

Lors de notre étude nous avons montré que l'oncogène BRAF<sup>V600E</sup> *via* la voie du TGF- $\beta$  dépendante de Smad3 régule l'expression de la NADPH oxydase NOX4 dans les cellules issues des cancers papillaires.

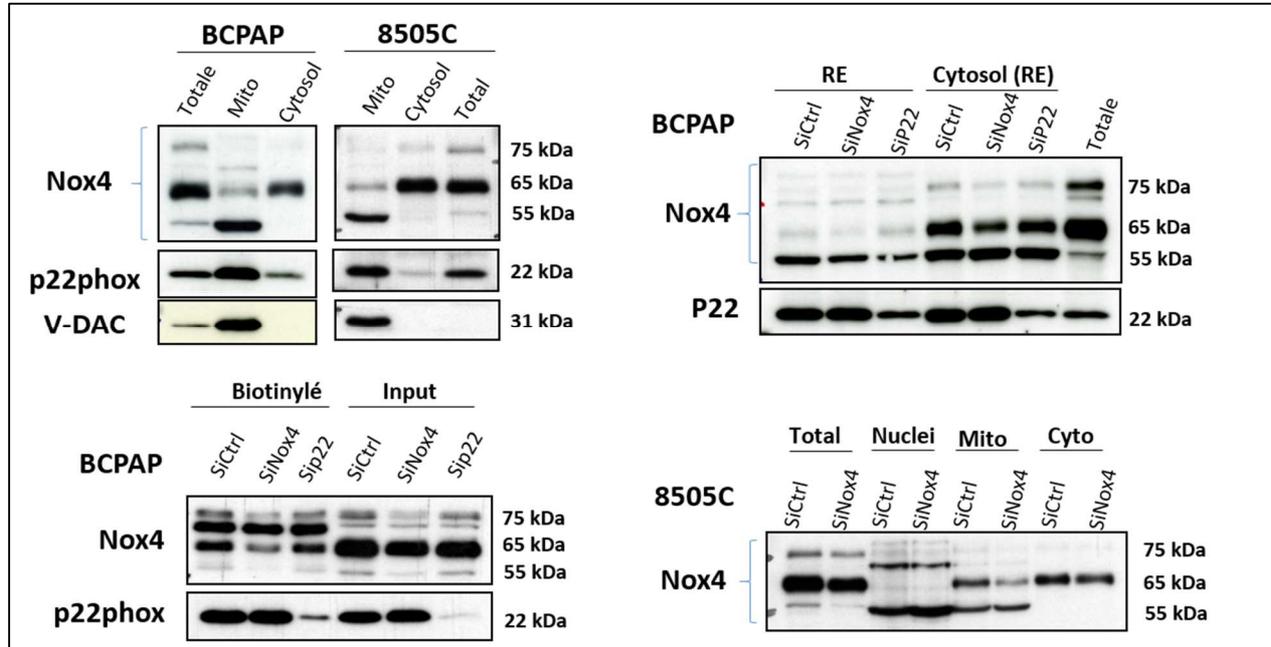
Les perspectives concernant cette étude portent sur l'identification et la caractérisation du mécanisme par lequel les ROS produites par NOX4 altèrent la régulation de l'expression du gène codant le NIS. Le caractère réversible de l'extinction de l'expression du gène SLC5A5 (NIS) par NOX4 suggère l'intervention d'un mécanisme épigénétique. En effet, une hyperméthylation aberrante du gène SLC5A5 (NIS) corrélée à une diminution de l'expression de l'ARNm du NIS a été observée dans les cancers de la thyroïde (238, 239). De manière réciproque, une réexpression du NIS est obtenue après traitement de lignées thyroïdiennes tumorales par des inhibiteurs d'ADN méthyltransférases (DNMT), enzymes catalysant la méthylation de cytosines présentes dans des séquences de dinucléotides CpG regroupées sous forme d'îlots dans la région promotrice du gène (240). Collectivement, ces données confirment que l'expression du NIS est contrôlée par méthylation. Les ROS induisent des altérations épigénétiques. Une étude récente a montré que les ROS en provoquant des lésions oxydatives à l'ADN, comme la 8-oxoguanine, favorisent le recrutement des DNMTs, en particulier DNMT1 et DNMT3B, aux sites de chromatine endommagée, contribuant ainsi à la méthylation aberrante de certains gènes et donc à leur extinction (252). Nos résultats préliminaires montrent que les deux lignées cellulaires BCPAP et 8505C expriment la forme phosphorylée de l'histone H2AX ( $\gamma$ H2AX), un marqueur des dommages à l'ADN et que l'inhibition de NOX4 par ARN interférence diminue de manière significative l'expression de ce marqueur (Figure 31). Notre hypothèse est que NOX4 en produisant des ROS induit des lésions oxydatives à l'ADN qui favorisent la méthylation d'îlots CpG localisés dans la région promotrice du NIS contribuant ainsi à son extinction.



**Figure 31:** L'expression du  $\gamma$ H2AX dans les deux lignées cellulaires BCPAP et 8505C.

Afin de répondre à cette hypothèse, il serait également important de d'étudier l'expression subcellulaire de la protéine NOX4. Dans différents modèles cellulaires, NOX4 est active non seulement à la membrane plasmique, mais aussi dans d'autres compartiments et organites intracellulaires, comme le réticulum endoplasmique, les mitochondries et le noyau (213, 214). Plusieurs variants d'épissage de NOX4 ont été décrits (212). Nous avons observé une expression de la protéine NOX4 dans trois fractions cellulaires issues de cellules PTCs comprenant respectivement le noyau, le réticulum endoplasmique et les mitochondries. Dans les cancers du sein et de l'ovaire, une isoforme de 73 kDa de NOX4 a été identifiée au niveau des mitochondries et est décrite comme étant une protéine de nature oncogénique (253). Lors de cette étude, l'analyse de l'expression de NOX4 par Western-blot identifie trois isoformes de la protéine NOX4 de poids moléculaires approximatifs de 55 kDa, 65 kDa et 75 kDa (Figure 32). L'isoforme 55 kDa est retrouvée majoritairement au niveau des fractions mitochondriales, nucléaires et endoplasmiques. Ainsi NOX4 serait une source de ROS dans ces trois compartiments cellulaires. La présence de NOX4 dans l'environnement nucléaire pourrait induire des changements de l'état redox lesquels pourraient moduler l'expression du gène SLC5A5 (NIS) selon divers mécanismes affectant l'ADN lui-même, les histones, les interactions ADN-protéines et les modifications post-traductionnelles. Les fonctions des trois

isoformes doivent être étudiées dans les cellules tumorales thyroïdiennes (BCPAP et 8505C), afin de mieux comprendre le rôle oncogénique de NOX4 dans le développement des PTCs.



**Figure 32:** L'expression de la NOX4 dans les différents compartiments cellulaires des deux lignées cellulaires BCPAP et 8505C.

# Références bibliographiques

1. Leclère J. , et al., *La Thyroïde - Des Concepts À La Pratique Clinique, 2ème Édition*. Ed.ELSEVIER, 2001.
2. Eskandari S., et al., *Thyroid Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter. Mechanism, stoichiometry, and specificity*. J Biol Chem, 1997. **272**: p. 27230-27238.
3. Nilsson, M., et al., *Iodide transport in primary cultured thyroid follicle cells: evidence of a TSH-regulated channel mediating iodide efflux selectively across the apical domain of the plasma membrane*. Eur J Cell Biol, 1990. **52**(2): p. 270-81.
4. Riesco-Eizaguirre G. and Santisteban P., *A perspective view of sodium iodide symporter research and its clinical implications*. Eur J Endocrinol 2006. **155**: p. 495-512.
5. Miot, F., et al., *Chapter 2 Thyroid Hormone Synthesis And Secretion*, in *Endotext*, L.J. De Groot, et al., Editors. 2000: South Dartmouth (MA).
6. Zimmermann, M.B., *Iodine deficiency*. Endocr Rev, 2009. **30**(4): p. 376-408.
7. Patrick, L., *Iodine: deficiency and therapeutic considerations*. Altern Med Rev, 2008. **13**(2): p. 116-27.
8. Gallois M., *L'hypothyroïdie : quand la thyroïde se dérègle ?* thèse de diplôme d'Etat de docteur en pharmacie de Lille 2, 2008.
9. Eastman, C.J. and M. Zimmermann, *The Iodine Deficiency Disorders*, in *Endotext*, L.J. De Groot, et al., Editors. 2000: South Dartmouth (MA).
10. Smanik, P.A., et al., *Expression, exon-intron organization, and chromosome mapping of the human sodium iodide symporter*. Endocrinology, 1997. **138**(8): p. 3555-8.
11. Smanik, P.A., et al., *Cloning of the human sodium Iodide symporter*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **226**(2): p. 339-45.
12. Dai, G., O. Levy, and N. Carrasco, *Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter*. Nature, 1996. **379**(6564): p. 458-60.
13. Levy, O., et al., *Characterization of the thyroid Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter with an anti-COOH terminus antibody*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(11): p. 5568-73.
14. Chung, T., et al., *Glycosylation of Sodium/Iodide Symporter (NIS) Regulates Its Membrane Translocation and Radioiodine Uptake*. PLoS One, 2015. **10**(11): p. e0142984.
15. Dohán, O., et al., *The Sodium/Iodide Symporter (NIS): Characterization, Regulation, and Medical Significance*. Endocrine Reviews, 2003. **24**(1): p. 48-77.
16. Levy, O., et al., *N-linked glycosylation of the thyroid Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter (NIS). Implications for its secondary structure model*. J Biol Chem, 1998. **273**(35): p. 22657-63.
17. HUC, S., *Caractérisation moléculaire et structurale de l'extrémité C-Terminale du co-transporteur Sodium/Iode Humain (hNIS), implication de ce domaine dans la régulation du transporteur*. 2007, Université Montpellier I.
18. Vadysirisack, D.D., et al., *Identification of in vivo phosphorylation sites and their functional significance in the sodium iodide symporter*. J Biol Chem, 2007. **282**(51): p. 36820-8.
19. Boelaert, K., et al., *PTTG and PBF repress the human sodium iodide symporter*. Oncogene, 2007. **26**(30): p. 4344-56.
20. Smith, V.E., et al., *A novel mechanism of sodium iodide symporter repression in differentiated thyroid cancer*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 18): p. 3393-402.

21. Smith, V.E., J.A. Franklyn, and C.J. McCabe, *Expression and function of the novel proto-oncogene PBF in thyroid cancer: a new target for augmenting radioiodine uptake*. *J Endocrinol*, 2011. **210**(2): p. 157-63.
22. Carrasco, N., *Iodide transport in the thyroid gland*. *Biochim Biophys Acta*, 1993. **1154**(1): p. 65-82.
23. Royaux, I.E., et al., *Pendrin, the protein encoded by the Pendred syndrome gene (PDS), is an apical porter of iodide in the thyroid and is regulated by thyroglobulin in FRTL-5 cells*. *Endocrinology*, 2000. **141**(2): p. 839-45.
24. Everett, L.A., et al., *Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS)*. *Nat Genet*, 1997. **17**(4): p. 411-22.
25. Porra, V., et al., *Characterization and semiquantitative analyses of pendrin expressed in normal and tumoral human thyroid tissues*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002. **87**(4): p. 1700-7.
26. Gillam, M.P., et al., *Functional characterization of pendrin in a polarized cell system. Evidence for pendrin-mediated apical iodide efflux*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(13): p. 13004-10.
27. Scott, D.A., et al., *The Pendred syndrome gene encodes a chloride-iodide transport protein*. *Nat Genet*, 1999. **21**(4): p. 440-3.
28. Bidart, J.M., et al., *Expression of pendrin and the Pendred syndrome (PDS) gene in human thyroid tissues*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000. **85**(5): p. 2028-33.
29. Calebiro, D., et al., *Absence of primary hypothyroidism and goiter in Slc26a4 (-/-) mice fed on a low iodine diet*. *J Endocrinol Invest*, 2011. **34**(8): p. 593-8.
30. Rodriguez, A.M., et al., *Identification and characterization of a putative human iodide transporter located at the apical membrane of thyrocytes*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002. **87**(7): p. 3500-3.
31. Lacroix, L., et al., *Expression of the apical iodide transporter in human thyroid tissues: a comparison study with other iodide transporters*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. **89**(3): p. 1423-8.
32. Twyffels, L., et al., *Anoctamin-1/TMEM16A is the major apical iodide channel of the thyrocyte*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2014. **307**(12): p. C1102-12.
33. Fayadat, L., et al., *Human thyroperoxidase is largely retained and rapidly degraded in the endoplasmic reticulum. Its N-glycans are required for folding and intracellular trafficking*. *Endocrinology*, 1998. **139**(10): p. 4277-85.
34. Haapala, A.M., et al., *Antibody reactivity against thyroid peroxidase and myeloperoxidase in autoimmune thyroiditis and systemic vasculitis*. *Scand J Immunol*, 1997. **46**(1): p. 78-85.
35. Taurog, A. and M. Wall, *Proximal and distal histidines in thyroid peroxidase: relation to the alternatively spliced form, TPO-2*. *Thyroid*, 1998. **8**(2): p. 185-91.
36. Virion, A., *Iodation de la thyroglobuline et formations des résidus hormonaux. Inhibition par les antithyroïdiens de synthèse*, in *La Thyroïde des concepts à la pratique clinique*. 2001, Lectère J, Orgiazzi J, Rousset B, Schlienger JL, Wémeau JL. p. p40-45.
37. Fayadat, L., et al., *Role of heme in intracellular trafficking of thyroperoxidase and involvement of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generated at the apical surface of thyroid cells in autocatalytic covalent heme binding*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(15): p. 10533-8.
38. Ameziame-El-Hassani, R., *Etude de l'activité intrinsèque du système générateur d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> thyroïdien, de son expression le long du tractus digestif et de l'antigénicité d'un fragment C-terminal de la thyroglobuline*. 2005, Université Mohamed V Rabat: Rabat.
39. Nunez, J. and J. Pommier, *Formation of thyroid hormones*. *Vitam Horm*, 1982. **39**: p. 175-229.

40. Corvilain, B., et al., *Role of the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and the phosphatidylinositol-Ca<sup>2+</sup> cascades in mediating the effects of thyrotropin and iodide on hormone synthesis and secretion in human thyroid slices.* J Clin Endocrinol Metab, 1994. **79**(1): p. 152-9.
41. Deme, D., et al., *NADPH-dependent generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in a thyroid particulate fraction requires Ca<sup>2+</sup>.* FEBS Lett, 1985. **186**(1): p. 107-10.
42. Ameziane-El-Hassani, R., et al., *Dual oxidase-2 has an intrinsic Ca<sup>2+</sup>-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating activity.* J Biol Chem, 2005. **280**(34): p. 30046-54.
43. Bjorgvinsdottir, H., L. Zhen, and M.C. Dinauer, *Cloning of murine gp91phox cDNA and functional expression in a human X-linked chronic granulomatous disease cell line.* Blood, 1996. **87**(5): p. 2005-10.
44. Zhen, L., et al., *Gene targeting of X chromosome-linked chronic granulomatous disease locus in a human myeloid leukemia cell line and rescue by expression of recombinant gp91phox.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(21): p. 9832-6.
45. Hitt, N.D. and M.E. Kleinberg, *Identification of neutrophil NADPH oxidase proteins gp91-phox, p22-phox, p67-phox, and p47-phox in mammalian species.* Am J Vet Res, 1996. **57**(5): p. 672-6.
46. Ameziane-El-Hassani, R., M. Schlumberger, and C. Dupuy, *NADPH oxidases: new actors in thyroid cancer?* Nat Rev Endocrinol, 2016.
47. Bedard, K. and K.H. Krause, *The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology.* Physiol Rev, 2007. **87**(1): p. 245-313.
48. De Deken, X., et al., *Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family.* J Biol Chem, 2000. **275**(30): p. 23227-33.
49. Dupuy, C., et al., *Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cdnas.* J Biol Chem, 1999. **274**(52): p. 37265-9.
50. Moreno, J.C., et al., *Genetic basis of hypothyroidism: recent advances, gaps and strategies for future research.* Trends Endocrinol Metab, 2003. **14**(7): p. 318-26.
51. Malthièry, Y.S., F. , *La Tyroglobuline: La Prohormone Thyroïdienne*, in *La Thyroïde des concepts à la pratique clinique.* 2001, Lectère. J.; Orgiazzi. J.; Rousset. B.; Schlienger. JL.; Wémeau. JL.,. p. p.22-26.
52. Lamas, L., et al., *Consensus sequences for early iodination and hormonogenesis in human thyroglobulin.* J Biol Chem, 1989. **264**(23): p. 13541-5.
53. Christophe, D., *The control of thyroid-specific gene expression: what exactly have we learned as yet?* Mol Cell Endocrinol, 2004. **223**(1-2): p. 1-4.
54. Kimura, S., *Thyroid-specific transcription factors and their roles in thyroid cancer.* J Thyroid Res, 2011. **2011**: p. 710213.
55. Lectère J. , et al., *La thyroïde des concepts à la pratique clinique.* Ed.ELSEVIER, 2001(2ème édition): p. 57-64.
56. Kleinau, G. and G. Krause, *Thyrotropin and homologous glycoprotein hormone receptors: structural and functional aspects of extracellular signaling mechanisms.* Endocr Rev, 2009. **30**(2): p. 133-51.
57. Laurent, E., et al., *Dual activation by thyrotropin of the phospholipase C and cyclic AMP cascades in human thyroid.* Mol Cell Endocrinol, 1987. **52**(3): p. 273-8.
58. de Lloyd, A., et al., *TSH receptor activation and body composition.* J Endocrinol, 2010. **204**(1): p. 13-20.

59. Kogai, T., et al., *Regulation by thyroid-stimulating hormone of sodium/iodide symporter gene expression and protein levels in FRTL-5 cells*. *Endocrinology*, 1997. **138**(6): p. 2227-32.
60. Chazenbalk, G.D., et al., *The functional expression of recombinant human thyrotropin receptors in nonthyroidal eukaryotic cells provides evidence that homologous desensitization to thyrotropin stimulation requires a cell-specific factor*. *Endocrinology*, 1990. **127**(3): p. 1240-4.
61. Raspe, E., et al., *ATP, bradykinin, TRH and TSH activate the Ca(2+)-phosphatidylinositol cascade of human thyrocytes in primary culture*. *Mol Cell Endocrinol*, 1991. **81**(1-3): p. 175-83.
62. Van Sande, J., et al., *Somatic and germline mutations of the TSH receptor gene in thyroid diseases*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995. **80**(9): p. 2577-85.
63. Fernandez, L.P., A. Lopez-Marquez, and P. Santisteban, *Thyroid transcription factors in development, differentiation and disease*. *Nat Rev Endocrinol*, 2015. **11**(1): p. 29-42.
64. Di Palma, T., et al., *The paired domain-containing factor Pax8 and the homeodomain-containing factor TTF-1 directly interact and synergistically activate transcription*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(5): p. 3395-402.
65. Ohno, M., et al., *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*, 1999. **19**(3): p. 2051-60.
66. Presta, I., et al., *Recovery of NIS expression in thyroid cancer cells by overexpression of Pax8 gene*. *BMC Cancer*, 2005. **5**: p. 80.
67. Wolff J. and Chaikoff I. L., *Plasma inorganic iodide as a homeostatic regulator of thyroid function*. *J. Biol. Chem*, 1948. **174**: p. 555-564.
68. Corvilain B., et al., *The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating system modulates protein iodination an activity of pentose phosphate pathway in dog thyroid*. *Endocrinology*, 1991. **128**(2): p. 779-85.
69. Morand S., et al., *Effect of iodide on nicotinamide adenine dinucléotide phosphate oxidase activity and Duox2 protein expression in isolated porcine thyroid follicles*. *Endocrinology*, 2003. **144**(4): p. 1241-8.
70. Dunn, J.T. and A.D. Dunn, *Update on intrathyroidal iodine metabolism*. *Thyroid*, 2001. **11**(5): p. 407-14.
71. Gnidehou S., et al., *Iodotyrosine dehalogenase 1 (DEHAL1) is a transmembranaire protein involved in the recycling of iodide close to the thyroglobulin iodination site*. *FASEB J*, 2004. **18**(13): p. 1574-1576.
72. Nussey, S. and S. Whitehead, in *Endocrinology: An Integrated Approach*. 2001: Oxford.
73. Yen, P.M., *Physiological and molecular basis of thyroid hormone action*. *Physiol Rev*, 2001. **81**(3): p. 1097-142.
74. Bianco, A.C. and B.W. Kim, *Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(10): p. 2571-9.
75. Gereben, B., et al., *Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling*. *Endocr Rev*, 2008. **29**(7): p. 898-938.
76. Bianco, A.C., et al., *Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases*. *Endocr Rev*, 2002. **23**(1): p. 38-89.
77. Mullur, R., Y.Y. Liu, and G.A. Brent, *Thyroid hormone regulation of metabolism*. *Physiol Rev*, 2014. **94**(2): p. 355-82.

78. Potenza, M., M.A. Via, and R.T. Yanagisawa, *Excess thyroid hormone and carbohydrate metabolism*. *Endocr Pract*, 2009. **15**(3): p. 254-62.
79. Oppenheimer, J.H., et al., *Functional relationship of thyroid hormone-induced lipogenesis, lipolysis, and thermogenesis in the rat*. *J Clin Invest*, 1991. **87**(1): p. 125-32.
80. Lopez, D., et al., *Activation of the hepatic LDL receptor promoter by thyroid hormone*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1771**(9): p. 1216-25.
81. Legrand, J., *Thyroid hormone effects on growth and development*, in *Thyroid Hormone Metabolism*. 1986, Dekker Inc: New York. p. 503-534.
82. Chan, S. and M.D. Kilby, *Thyroid hormone and central nervous system development*. *J Endocrinol*, 2000. **165**(1): p. 1-8.
83. Di Liegro, I., *Thyroid hormones and the central nervous system of mammals (Review)*. *Mol Med Rep*, 2008. **1**(3): p. 279-95.
84. Williams, G.R., *Thyroid hormone actions in cartilage and bone*. *Eur Thyroid J*, 2013. **2**(1): p. 3-13.
85. Miell, J.P., et al., *Effects of hypothyroidism and hyperthyroidism on insulin-like growth factors (IGFs) and growth hormone- and IGF-binding proteins*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1993. **76**(4): p. 950-5.
86. Sabra, M.M., et al., *Clinical outcomes and molecular profile of differentiated thyroid cancers with radioiodine-avid distant metastases*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013. **98**(5): p. E829-36.
87. Bomeli, S.R., S.O. LeBeau, and R.L. Ferris, *Evaluation of a thyroid nodule*. *Otolaryngol Clin North Am*, 2010. **43**(2): p. 229-38, vii.
88. Nikiforov, Y., P.W. Biddinger, and L.D.R. Thompson, *Diagnostic pathology and molecular genetics of the thyroid*. 2nd ed. 2012, Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. xi, 436 p.
89. DeLellis, R.A., *Pathology and genetics of tumours of endocrine organs*. World Health Organization classification of tumours. 2004, Lyon: IARC Press. 320 p.
90. Nikiforov, Y.E. and M.N. Nikiforova, *Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer*. *Nat Rev Endocrinol*, 2011. **7**(10): p. 569-80.
91. Ferlay, J., et al., *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008*. *Int J Cancer*, 2010. **127**(12): p. 2893-917.
92. McTiernan, A., N.S. Weiss, and J.R. Daling, *Incidence of thyroid cancer in women in relation to known or suspected risk factors for breast cancer*. *Cancer Res*, 1987. **47**(1): p. 292-5.
93. Zivaljevic, V., et al., *Case-control study of female thyroid cancer--menstrual, reproductive and hormonal factors*. *Eur J Cancer Prev*, 2003. **12**(1): p. 63-6.
94. Kilfoy, B.A., et al., *International patterns and trends in thyroid cancer incidence, 1973-2002*. *Cancer Causes Control*, 2009. **20**(5): p. 525-31.
95. Rogel, A.C., M.; Uhry, Z.; Lacour, B.; Schwartz, C.; Pascal, L.; , *Évolution de l'incidence du cancer de la thyroïde en France métropolitaine*. 2010.
96. Krohn, K., J. Maier, and R. Paschke, *Mechanisms of disease: hydrogen peroxide, DNA damage and mutagenesis in the development of thyroid tumors*. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 2007. **3**(10): p. 713-20.
97. Liska J., et al., *Thyroid tumors: histological classification and genetic factors involved in the development of thyroid cancer*. *Endocr Regul*, 2005. **39**: p. 73-83.
98. LiVolsi, V.A., *Papillary thyroid carcinoma: an update*. *Mod Pathol*, 2011. **24 Suppl 2**: p. S1-9.
99. Katoh, H., et al., *Classification and general considerations of thyroid cancer*. *Annals of Clinical Pathology*, 2015. **3**(1): p. 1045.

100. Willem J.P, *Les pathologies de la thyroïdes, les comprendre, les traiter*. Editions du Dauphin, 2010. **172**.
101. Di Cristoaro, J., *Marqueurs moléculaires des tumeurs différenciées thyroïdiennes de souche folliculaire. Corrélations épidémiologiques & applications diagnostiques*, in *Faculté de Médecine*. 2005, Université de la Méditerranée - Aix - Marseille II France.
102. Kebebew, E., et al., *Anaplastic thyroid carcinoma. Treatment outcome and prognostic factors*. *Cancer*, 2005. **103**(7): p. 1330-5.
103. Untch, B.R. and J.A. Olson, Jr., *Anaplastic thyroid carcinoma, thyroid lymphoma, and metastasis to thyroid*. *Surg Oncol Clin N Am*, 2006. **15**(3): p. 661-79, x.
104. Baudin, E. and M. Schlumberger, *New therapeutic approaches for metastatic thyroid carcinoma*. *Lancet Oncol*, 2007. **8**(2): p. 148-56.
105. Chougnet, C., et al., *Molecular targeted therapies for patients with refractory thyroid cancer*. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 2010. **22**(6): p. 448-55.
106. Sherman, S.I., *Tyrosine kinase inhibitors and the thyroid*. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2009. **23**(6): p. 713-22.
107. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. *Cell*, 2000. **100**(1): p. 57-70.
108. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell*, 2011. **144**(5): p. 646-74.
109. Spitzweg, C., et al., *Advanced radioiodine-refractory differentiated thyroid cancer: the sodium iodide symporter and other emerging therapeutic targets*. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 2014. **2**(10): p. 830-842.
110. Hou, P., et al., *Genetic alterations and their relationship in the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in thyroid cancer*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(4): p. 1161-70.
111. Santoro, M., et al., *Minireview: RET: normal and abnormal functions*. *Endocrinology*, 2004. **145**(12): p. 5448-51.
112. Grieco, M., et al., *PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and is frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas*. *Cell*, 1990. **60**(4): p. 557-63.
113. Cetta, F., et al., *Different significance of ret/PTC(1) and ret/PTC(3) rearrangements in thyroid carcinogenesis: lesson from two subgroups of patients with papillary thyroid carcinomas showing the highest incidence of ret/PTC activation*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001. **86**(3): p. 1429.
114. Nikiforov, Y.E., *RET/PTC rearrangement in thyroid tumors*. *Endocr Pathol*, 2002. **13**(1): p. 3-16.
115. Kroll, T.G., et al., *PAX8-PPARgamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma (corrected)*. *Science*, 2000. **289**(5483): p. 1357-60.
116. Eberhardt, N.L., et al., *The role of the PAX8/PPARgamma fusion oncogene in the pathogenesis of follicular thyroid cancer*. *Mol Cell Endocrinol*, 2010. **321**(1): p. 50-6.
117. Lacroix, L., et al., *Follicular thyroid tumors with the PAX8-PPARgamma1 rearrangement display characteristic genetic alterations*. *Am J Pathol*, 2005. **167**(1): p. 223-31.
118. Garcia-Rostan, G., et al., *Frequent mutation and nuclear localization of beta-catenin in anaplastic thyroid carcinoma*. *Cancer Res*, 1999. **59**(8): p. 1811-5.
119. Donghi, R., et al., *Gene p53 mutations are restricted to poorly differentiated and undifferentiated carcinomas of the thyroid gland*. *J Clin Invest*, 1993. **91**(4): p. 1753-60.

120. Fagin, J.A., et al., *High prevalence of mutations of the p53 gene in poorly differentiated human thyroid carcinomas*. J Clin Invest, 1993. **91**(1): p. 179-84.
121. Gustafson, S., et al., *Cowden syndrome*. Semin Oncol, 2007. **34**(5): p. 428-34.
122. Alvarez-Nunez, F., et al., *PTEN promoter methylation in sporadic thyroid carcinomas*. Thyroid, 2006. **16**(1): p. 17-23.
123. Schagdarsurengin, U., et al., *CpG island methylation of tumor-related promoters occurs preferentially in undifferentiated carcinoma*. Thyroid, 2006. **16**(7): p. 633-42.
124. Campbell, S.L., et al., *Increasing complexity of Ras signaling*. Oncogene, 1998. **17**(11 Reviews): p. 1395-413.
125. Lièvre, A. and P. Laurent-Puig, *La voie de signalisation RAS/MAPK*. Cancéro digest, 2010. **II**(1).
126. Liu, Z., et al., *Highly prevalent genetic alterations in receptor tyrosine kinases and phosphatidylinositol 3-kinase/akt and mitogen-activated protein kinase pathways in anaplastic and follicular thyroid cancers*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(8): p. 3106-16.
127. Schlumberger, M., *Molecular epidemiology of thyroid cancer*. Cancer Treat Res, 2004. **122**: p. 107-20.
128. Zhu, Z., et al., *Molecular profile and clinical-pathologic features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. An unusually high prevalence of ras mutations*. Am J Clin Pathol, 2003. **120**(1): p. 71-7.
129. Prior, I.A., P.D. Lewis, and C. Mattos, *A comprehensive survey of Ras mutations in cancer*. Cancer Res, 2012. **72**(10): p. 2457-67.
130. Nikiforov, Y.E., *Genetic alterations involved in the transition from well-differentiated to poorly differentiated and anaplastic thyroid carcinomas*. Endocr Pathol, 2004. **15**(4): p. 319-27.
131. Nikiforov, Y.E., *Molecular diagnostics of thyroid tumors*. Arch Pathol Lab Med, 2011. **135**(5): p. 569-77.
132. Davies, H., et al., *Mutations of the BRAF gene in human cancer*. Nature, 2002. **417**(6892): p. 949-54.
133. Caronia, L.M., J.E. Phay, and M.H. Shah, *Role of BRAF in thyroid oncogenesis*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(24): p. 7511-7.
134. Mercer, K.E. and C.A. Pritchard, *Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1653**(1): p. 25-40.
135. Pollock, P.M. and P.S. Meltzer, *A genome-based strategy uncovers frequent BRAF mutations in melanoma*. Cancer Cell, 2002. **2**(1): p. 5-7.
136. Singer, G., et al., *Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma*. J Natl Cancer Inst, 2003. **95**(6): p. 484-6.
137. Cohen, Y., et al., *BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma*. J Natl Cancer Inst, 2003. **95**(8): p. 625-7.
138. Namba, H., et al., *Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(9): p. 4393-7.
139. Xing, M., *BRAF mutation in thyroid cancer*. Endocr Relat Cancer, 2005. **12**(2): p. 245-62.
140. Bullock, M., et al., *Utilization of a MAB for BRAF(V600E) detection in papillary thyroid carcinoma*. Endocr Relat Cancer, 2012. **19**(6): p. 779-84.
141. Garnett, M.J., et al., *Wild-type and mutant B-RAF activate C-RAF through distinct mechanisms involving heterodimerization*. Mol Cell, 2005. **20**(6): p. 963-9.

142. Wan, P.T., et al., *Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF*. Cell, 2004. **116**(6): p. 855-67.
143. Heidorn, S.J., et al., *Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF*. Cell, 2010. **140**(2): p. 209-21.
144. Ciampi, R., et al., *Oncogenic AKAP9-BRAF fusion is a novel mechanism of MAPK pathway activation in thyroid cancer*. J Clin Invest, 2005. **115**(1): p. 94-101.
145. Pisarev, M.A., L. Thomasz, and G.J. Juvenal, *Role of transforming growth factor beta in the regulation of thyroid function and growth*. Thyroid, 2009. **19**(8): p. 881-92.
146. Horbelt, D., A. Denkis, and P. Knaus, *A portrait of Transforming Growth Factor beta superfamily signalling: Background matters*. Int J Biochem Cell Biol, 2012. **44**(3): p. 469-74.
147. Annes, J.P., J.S. Munger, and D.B. Rifkin, *Making sense of latent TGFbeta activation*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 2): p. 217-24.
148. Massague, J., *TGF-beta signal transduction*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 753-91.
149. Massague, J., J. Seoane, and D. Wotton, *Smad transcription factors*. Genes Dev, 2005. **19**(23): p. 2783-810.
150. Massague, J. and R.R. Gomis, *The logic of TGFbeta signaling*. FEBS Lett, 2006. **580**(12): p. 2811-20.
151. Moustakas, A. and C.H. Heldin, *Non-Smad TGF-beta signals*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 16): p. 3573-84.
152. Derynck, R. and Y.E. Zhang, *Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling*. Nature, 2003. **425**(6958): p. 577-84.
153. Stover, D.G., B. Bierie, and H.L. Moses, *A delicate balance: TGF-beta and the tumor microenvironment*. J Cell Biochem, 2007. **101**(4): p. 851-61.
154. Delorme, N., et al., *TGFbeta1 effects on functional activity of porcine thyroid cells cultured in suspension*. J Endocrinol, 2002. **173**(2): p. 345-55.
155. Kawaguchi, A., et al., *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, 1997. **7**(5): p. 789-94.
156. Pang, X.P., M. Park, and J.M. Hershman, *Transforming growth factor-beta blocks protein kinase-A-mediated iodide transport and protein kinase-C-mediated DNA synthesis in FRTL-5 rat thyroid cells*. Endocrinology, 1992. **131**(1): p. 45-50.
157. Pekary, A.E. and J.M. Hershman, *Tumor necrosis factor, ceramide, transforming growth factor-beta1, and aging reduce Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter messenger ribonucleic acid levels in FRTL-5 cells*. Endocrinology, 1998. **139**(2): p. 703-12.
158. Nicolussi, A., et al., *TGF-beta control of rat thyroid follicular cells differentiation*. Mol Cell Endocrinol, 2003. **207**(1-2): p. 1-11.
159. Costamagna, E., B. Garcia, and P. Santisteban, *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, 2004. **279**(5): p. 3439-46.
160. Kang, H.C., et al., *Pax-8 is essential for regulation of the thyroglobulin gene by transforming growth factor-beta1*. Endocrinology, 2001. **142**(1): p. 267-75.
161. Taton, M., et al., *General inhibition by transforming growth factor beta 1 of thyrotropin and cAMP responses in human thyroid cells in primary culture*. Mol Cell Endocrinol, 1993. **95**(1-2): p. 13-21.

162. Pardali, K. and A. Moustakas, *Actions of TGF-beta as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1775**(1): p. 21-62.
163. Cantelli, G., et al., *TGF-beta-Induced Transcription Sustains Amoeboid Melanoma Migration and Dissemination*. *Curr Biol*, 2015. **25**(22): p. 2899-914.
164. Heldin, C.H., M. Landstrom, and A. Moustakas, *Mechanism of TGF-beta signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition*. *Curr Opin Cell Biol*, 2009. **21**(2): p. 166-76.
165. Eloy, C., et al., *TGF-beta/Smad pathway and BRAF mutation play different roles in circumscribed and infiltrative papillary thyroid carcinoma*. *Virchows Arch*, 2012. **460**(6): p. 587-600.
166. Vasko, V., et al., *Gene expression and functional evidence of epithelial-to-mesenchymal transition in papillary thyroid carcinoma invasion*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(8): p. 2803-8.
167. Riesco-Eizaguirre, G., et al., *The BRAFV600E oncogene induces transforming growth factor beta secretion leading to sodium iodide symporter repression and increased malignancy in thyroid cancer*. *Cancer Res*, 2009. **69**(21): p. 8317-25.
168. Pratilas, C.A., et al., *(V600E)BRAF is associated with disabled feedback inhibition of RAF-MEK signaling and elevated transcriptional output of the pathway*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(11): p. 4519-24.
169. Cancer Genome Atlas Research, N., *Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma*. *Cell*, 2014. **159**(3): p. 676-90.
170. Xing, M., et al., *Association between BRAF V600E mutation and mortality in patients with papillary thyroid cancer*. *JAMA*, 2013. **309**(14): p. 1493-501.
171. Chakravarty, D., et al., *Small-molecule MAPK inhibitors restore radioiodine incorporation in mouse thyroid cancers with conditional BRAF activation*. *J Clin Invest*, 2011. **121**(12): p. 4700-11.
172. Franco, A.T., et al., *Thyrotrophin receptor signaling dependence of Braf-induced thyroid tumor initiation in mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(4): p. 1615-20.
173. Puppin, C., et al., *Transcriptional regulation of human sodium/iodide symporter gene: a role for redox factor-1*. *Endocrinology*, 2004. **145**(3): p. 1290-3.
174. Pisoschi, A.M. and A. Pop, *The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review*. *Eur J Med Chem*, 2015. **97**: p. 55-74.
175. Drose, S. and U. Brandt, *Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain*. *Adv Exp Med Biol*, 2012. **748**: p. 145-69.
176. Gutteridge, J.M., *Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection*. *Chem Biol Interact*, 1994. **91**(2-3): p. 133-40.
177. Lukosz, M., et al., *Nuclear redox signaling*. *Antioxid Redox Signal*, 2010. **12**(6): p. 713-42.
178. Veal, E.A., A.M. Day, and B.A. Morgan, *Hydrogen peroxide sensing and signaling*. *Mol Cell*, 2007. **26**(1): p. 1-14.
179. Miller, E.W., B.C. Dickinson, and C.J. Chang, *Aquaporin-3 mediates hydrogen peroxide uptake to regulate downstream intracellular signaling*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(36): p. 15681-6.
180. Moreno, J.C., et al., *Inactivating mutations in the gene for thyroid oxidase 2 (THOX2) and congenital hypothyroidism*. *N Engl J Med*, 2002. **347**(2): p. 95-102.
181. Zuo, L., et al., *Biological and physiological role of reactive oxygen species--the good, the bad and the ugly*. *Acta Physiol (Oxf)*, 2015. **214**(3): p. 329-48.

182. Holmstrom, K.M. and T. Finkel, *Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(6): p. 411-21.
183. Burdon, R.H., D. Alliangana, and V. Gill, *Hydrogen peroxide and the proliferation of BHK-21 cells*. Free Radic Res, 1995. **23**(5): p. 471-86.
184. Boivin, B., et al., *A modified cysteinyl-labeling assay reveals reversible oxidation of protein tyrosine phosphatases in angiomyolipoma cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(29): p. 9959-64.
185. Meng, T.C., T. Fukada, and N.K. Tonks, *Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo*. Mol Cell, 2002. **9**(2): p. 387-99.
186. Ray, P.D., B.W. Huang, and Y. Tsuji, *Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling*. Cell Signal, 2012. **24**(5): p. 981-90.
187. Del Rio, D., A.J. Stewart, and N. Pellegrini, *A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2005. **15**(4): p. 316-28.
188. Squier, T.C., *Oxidative stress and protein aggregation during biological aging*. Exp Gerontol, 2001. **36**(9): p. 1539-50.
189. Morel, Y. and R. Barouki, *Repression of gene expression by oxidative stress*. Biochem J, 1999. **342 Pt 3**: p. 481-96.
190. Driessens, N., et al., *Hydrogen peroxide induces DNA single- and double-strand breaks in thyroid cells and is therefore a potential mutagen for this organ*. Endocr Relat Cancer, 2009. **16**(3): p. 845-56.
191. Aykin-Burns, N., et al., *Increased levels of superoxide and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediate the differential susceptibility of cancer cells versus normal cells to glucose deprivation*. Biochem J, 2009. **418**(1): p. 29-37.
192. Szatrowski, T.P. and C.F. Nathan, *Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells*. Cancer Res, 1991. **51**(3): p. 794-8.
193. Bartkova, J., et al., *DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis*. Nature, 2005. **434**(7035): p. 864-70.
194. Nakashima, M., et al., *Foci formation of P53-binding protein 1 in thyroid tumors: activation of genomic instability during thyroid carcinogenesis*. Int J Cancer, 2008. **122**(5): p. 1082-8.
195. Karger, S., et al., *Distinct pattern of oxidative DNA damage and DNA repair in follicular thyroid tumours*. J Mol Endocrinol, 2012. **48**(3): p. 193-202.
196. Maier, J., et al., *Deoxyribonucleic acid damage and spontaneous mutagenesis in the thyroid gland of rats and mice*. Endocrinology, 2006. **147**(7): p. 3391-7.
197. Sedelnikova, O.A., et al., *Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis*. Mutat Res, 2010. **704**(1-3): p. 152-9.
198. Richardson, C. and M. Jasin, *Frequent chromosomal translocations induced by DNA double-strand breaks*. Nature, 2000. **405**(6787): p. 697-700.
199. Ameziane-El-Hassani, R., et al., *Role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in RET/PTC1 chromosomal rearrangement produced by ionizing radiation in human thyroid cells*. Cancer Res, 2010. **70**(10): p. 4123-32.
200. Viglietto, G., et al., *RET/PTC oncogene activation is an early event in thyroid carcinogenesis*. Oncogene, 1995. **11**(6): p. 1207-10.
201. Versteyhe, S., et al., *Comparative analysis of the thyrocytes and T cells: responses to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and radiation reveals an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced antioxidant transcriptional program in thyrocytes*. J Clin Endocrinol Metab, 2013. **98**(10): p. E1645-54.

202. Ameziane-El-Hassani, R., et al., *NADPH oxidase DUOX1 promotes long-term persistence of oxidative stress after an exposure to irradiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(16): p. 5051-6.
203. Geiszt, M., et al., *Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(14): p. 8010-4.
204. Ago, T., et al., *Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase*. Circulation, 2004. **109**(2): p. 227-33.
205. Wingler, K., et al., *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, 2001. **31**(11): p. 1456-64.
206. Vallet, P., et al., *Neuronal expression of the NADPH oxidase NOX4, and its regulation in mouse experimental brain ischemia*. Neuroscience, 2005. **132**(2): p. 233-8.
207. Weyemi, U., et al., *Intracellular expression of reactive oxygen species-generating NADPH oxidase NOX4 in normal and cancer thyroid tissues*. Endocr Relat Cancer, 2010. **17**(1): p. 27-37.
208. Ambasta, R.K., et al., *Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase*. J Biol Chem, 2004. **279**(44): p. 45935-41.
209. Lyle, A.N., et al., *Poldip2, a novel regulator of Nox4 and cytoskeletal integrity in vascular smooth muscle cells*. Circ Res, 2009. **105**(3): p. 249-59.
210. Gorin, Y., et al., *Nox4 mediates angiotensin II-induced activation of Akt/protein kinase B in mesangial cells*. Am J Physiol Renal Physiol, 2003. **285**(2): p. F219-29.
211. Takac, I., et al., *The E-loop is involved in hydrogen peroxide formation by the NADPH oxidase Nox4*. J Biol Chem, 2011. **286**(15): p. 13304-13.
212. Goyal, P., et al., *Identification of novel Nox4 splice variants with impact on ROS levels in A549 cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **329**(1): p. 32-9.
213. Block, K., Y. Gorin, and H.E. Abboud, *Subcellular localization of Nox4 and regulation in diabetes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(34): p. 14385-90.
214. Lee, W.J., et al., *Nepsilon-carboxymethyllysine-mediated endoplasmic reticulum stress promotes endothelial cell injury through Nox4/MKP-3 interaction*. Free Radic Biol Med, 2014. **74**: p. 294-306.
215. Kawahara, T., et al., *Point mutations in the proline-rich region of p22phox are dominant inhibitors of Nox1- and Nox2-dependent reactive oxygen generation*. J Biol Chem, 2005. **280**(36): p. 31859-69.
216. Ueno, N., et al., *The NADPH oxidase Nox3 constitutively produces superoxide in a p22phox-dependent manner: its regulation by oxidase organizers and activators*. J Biol Chem, 2005. **280**(24): p. 23328-39.
217. Weyemi, U., et al., *ROS-generating NADPH oxidase NOX4 is a critical mediator in oncogenic H-Ras-induced DNA damage and subsequent senescence*. Oncogene, 2012. **31**(9): p. 1117-29.
218. Ogrunc, M., et al., *Oncogene-induced reactive oxygen species fuel hyperproliferation and DNA damage response activation*. Cell Death Differ, 2014. **21**(6): p. 998-1012.
219. Fitzgerald, J.P., et al., *Nox4 mediates renal cell carcinoma cell invasion through hypoxia-induced interleukin 6- and 8- production*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e30712.
220. Boudreau, H.E., et al., *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, 2012. **53**(7): p. 1489-99.

221. Xia, C., et al., *Reactive oxygen species regulate angiogenesis and tumor growth through vascular endothelial growth factor*. *Cancer Res*, 2007. **67**(22): p. 10823-30.
222. Xing, M., *BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications*. *Endocr Rev*, 2007. **28**(7): p. 742-62.
223. Hiraga, R., et al., *Nox4-derived ROS signaling contributes to TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells*. *Anticancer Res*, 2013. **33**(10): p. 4431-8.
224. Zhang, B., Z. Liu, and X. Hu, *Inhibiting cancer metastasis via targeting NADPH oxidase 4*. *Biochem Pharmacol*, 2013. **86**(2): p. 253-66.
225. Schweppe, R.E., et al., *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*, 2008. **93**(11): p. 4331-41.
226. Saiselet, M., et al., *Thyroid cancer cell lines: an overview*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2012. **3**: p. 133.
227. Mitsutake, N., et al., *Conditional BRAFV600E expression induces DNA synthesis, apoptosis, dedifferentiation, and chromosomal instability in thyroid PCCL3 cells*. *Cancer Res*, 2005. **65**(6): p. 2465-73.
228. Leboeuf, R., et al., *BRAFV600E mutation is associated with preferential sensitivity to mitogen-activated protein kinase inhibition in thyroid cancer cell lines*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008. **93**(6): p. 2194-201.
229. Nucera, C., et al., *The BRAFV600E mutation: what is it really orchestrating in thyroid cancer?* *Oncotarget*, 2010. **1**(8): p. 751-6.
230. Ho, A.L., et al., *Selumetinib-enhanced radioiodine uptake in advanced thyroid cancer*. *N Engl J Med*, 2013. **368**(7): p. 623-32.
231. Matoba, H., et al., *Expression of transforming growth factor-beta1 and transforming growth factor-beta Type-II receptor mRNA in papillary thyroid carcinoma*. *Horm Metab Res*, 1998. **30**(10): p. 624-8.
232. Grubeck-Loebenstien, B., et al., *Transforming growth factor beta regulates thyroid growth. Role in the pathogenesis of nontoxic goiter*. *J Clin Invest*, 1989. **83**(3): p. 764-70.
233. Tsushima, T., et al., *Effects of transforming growth factor-beta on deoxyribonucleic acid synthesis and iodine metabolism in porcine thyroid cells in culture*. *Endocrinology*, 1988. **123**(2): p. 1187-94.
234. Knauf, J.A., et al., *Progression of BRAF-induced thyroid cancer is associated with epithelial-mesenchymal transition requiring concomitant MAP kinase and TGFbeta signaling*. *Oncogene*, 2011. **30**(28): p. 3153-62.
235. Yamaura, M., et al., *NADPH oxidase 4 contributes to transformation phenotype of melanoma cells by regulating G2-M cell cycle progression*. *Cancer Res*, 2009. **69**(6): p. 2647-54.
236. Hsieh, C.H., et al., *NADPH oxidase subunit 4 mediates cycling hypoxia-promoted radiation resistance in glioblastoma multiforme*. *Free Radic Biol Med*, 2012. **53**(4): p. 649-58.
237. Boudreau, H.E., et al., *Wild-type and mutant p53 differentially regulate NADPH oxidase 4 in TGF-beta-mediated migration of human lung and breast epithelial cells*. *Br J Cancer*, 2014. **110**(10): p. 2569-82.
238. Galrao, A.L., et al., *Methylation levels of sodium-iodide symporter (NIS) promoter in benign and malignant thyroid tumors with reduced NIS expression*. *Endocrine*, 2013. **43**(1): p. 225-9.

239. Smith, J.A., et al., *Methylation status of genes in papillary thyroid carcinoma*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2007. **133**(10): p. 1006-11.
240. Venkataraman, G.M., et al., *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, 1999. **84**(7): p. 2449-57.
241. Shrikanta, A., A. Kumar, and V. Govindaswamy, *Resveratrol content and antioxidant properties of underutilized fruits*. J Food Sci Technol, 2015. **52**(1): p. 383-90.
242. Yu, X.M., et al., *Resveratrol induces differentiation markers expression in anaplastic thyroid carcinoma via activation of Notch1 signaling and suppresses cell growth*. Mol Cancer Ther, 2013. **12**(7): p. 1276-87.
243. Sebai, H., et al., *Resveratrol increases iodide trapping in the rat thyroid cell line FRTL-5*. Thyroid, 2010. **20**(2): p. 195-203.
244. Nawshad, A., et al., *Transforming growth factor-beta signaling during epithelial-mesenchymal transformation: implications for embryogenesis and tumor metastasis*. Cells Tissues Organs, 2005. **179**(1-2): p. 11-23.
245. Zavadil, J. and E.P. Bottlinger, *TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions*. Oncogene, 2005. **24**(37): p. 5764-74.
246. Barnes, J.L. and Y. Gorin, *Myofibroblast differentiation during fibrosis: role of NAD(P)H oxidases*. Kidney Int, 2011. **79**(9): p. 944-56.
247. Kambe, F., et al., *Redox regulation of thyroid-transcription factors, Pax-8 and TTF-1, is involved in their increased DNA-binding activities by thyrotropin in rat thyroid FRTL-5 cells*. Mol Endocrinol, 1996. **10**(7): p. 801-12.
248. Hayes, P. and U.G. Knaus, *Balancing reactive oxygen species in the epigenome: NADPH oxidases as target and perpetrator*. Antioxid Redox Signal, 2013. **18**(15): p. 1937-45.
249. Choi, Y.W., et al., *B-RafV600E inhibits sodium iodide symporter expression via regulation of DNA methyltransferase 1*. Exp Mol Med, 2014. **46**: p. e120.
250. Stephen, J.K., et al., *DNA methylation in thyroid tumorigenesis*. Cancers (Basel), 2011. **3**(2): p. 1732-43.
251. Mishra, P.K., et al., *Mitochondrial oxidative stress-induced epigenetic modifications in pancreatic epithelial cells*. Int J Toxicol, 2014. **33**(2): p. 116-29.
252. O'Hagan, H.M., et al., *Oxidative damage targets complexes containing DNA methyltransferases, SIRT1, and polycomb members to promoter CpG Islands*. Cancer Cell, 2011. **20**(5): p. 606-19.
253. Graham, K.A., et al., *NADPH oxidase 4 is an oncoprotein localized to mitochondria*. Cancer Biol Ther, 2010. **10**(3): p. 223-31.