



HAL
open science

Développement de modèles *in vitro* et *in vivo* pour analyser la réponse aux radiations ionisantes du tissu thyroïdien normal humain

Dan Mejlachowicz

► **To cite this version:**

Dan Mejlachowicz. Développement de modèles *in vitro* et *in vivo* pour analyser la réponse aux radiations ionisantes du tissu thyroïdien normal humain. Cancer. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASL057 . tel-03362707

HAL Id: tel-03362707

<https://theses.hal.science/tel-03362707v1>

Submitted on 2 Oct 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.

DEVELOPPEMENT DE MODELES *IN VITRO* ET *IN VIVO* POUR ANALYSER
LA REPONSE AUX RADIATIONS
IONISANTES DU TISSU THYROIDIEN
NORMAL HUMAIN

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 582, Cancérologie : Biologie, Médecine, Santé (CBMS)
Spécialité de doctorat : aspects moléculaires et cellulaires de la biologie
Unité de recherche : CEA, Direction de la Recherche Fondamentale, Institut de
Biologie François Jacob, IRCM, Laboratoire de Cancérologie Expérimentale,
Université Paris-Saclay, Fontenay-aux-Roses, France.
Réfèrent : Faculté de médecine

**Thèse présentée et soutenue à Fontenay-aux-Roses,
le 10 décembre 2020, par**

Dan MEJLACHOWICZ

Composition du Jury

Roger LACAVE , Professeur Hôpital Tenon - Sorbonne Université	Président
Paul HOFMAN , Professeur Hôpital Pasteur de Nice - Université de Nice Cote d'Azur	Rapporteur
Thierry POURCHER , Directeur de Recherche Université Côte d'Azur - CEA Saclay	Rapporteur
Sandra LASSALLE , Chargée de Recherche Hôpital Pasteur de Nice - Université de Nice Cote d'Azur	Examinatrice
Maâmar SOUIDI , Directeur de Recherche IRSN - Université Paris Saclay	Examineur
Sylvie CHEVILLARD , Directrice de Recherche CEA - Université Paris Saclay	Directrice de thèse
Catherine ORY , Chargée de Recherche CEA - Université Paris Saclay	Co-encadrante de thèse

« La science est un outil puissant ; l'usage qu'on en fait, soit pour le salut de l'homme soit pour sa malédiction, dépend de l'homme, pas de l'outil »

Albert Einstein

(Publié dans le journal The New World, 1930)

Remerciements

Je remercie tout d'abord le **Pr Roger Lacave**, le **Pr Paul Hofman**, le **Dr Thierry Pourcher**, le **Dr Maâmar Souidi** et le **Dr Sandra Lassalle** d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse et de me faire l'honneur d'accorder leur attention à ce travail.

Je remercie ma directrice de thèse, le **Dr Sylvie Chevillard**, pour son enseignement, ses conseils et sa bienveillance qui m'ont beaucoup apporté tant pour le déroulement de ma thèse que pour ma future carrière dans la recherche. Merci également d'avoir été à mon écoute, pour ton soutien et d'avoir toujours été positive : des qualités qui font aussi de toi une excellente cheffe de laboratoire.

Merci au **Dr Catherine Ory**, alias **Kathy**, pour avoir encadré ma thèse tout au long de ces quatre années. Tu m'as inculqué la rigueur scientifique et m'as transmis les connaissances théoriques et pratiques des mondes passionnants de la thyroïde et de la radiobiologie. Merci de ta disponibilité et de m'avoir accompagné dans ce long périple qu'est la thèse.

Je tiens à remercier le **Dr Abir Al Ghuzlan** du centre de lutte contre le cancer Gustave Roussy et le **Dr Sandra Lassalle** de l'hôpital Pasteur de Nice, les anatomopathologistes qui ont accepté de collaborer au projet et qui nous ont permis d'obtenir les biopsies si précieuses et indispensables pour mener à bien le projet.

Un grand merci à **Sébastien Messiaen**, le roi de l'histologie, pour son aide technique et ses conseils d'expert qui m'ont été d'une grande utilité pour mes analyses histologiques.

Merci à tous les autres membres du laboratoire pour leur soutien, leur aide, leur bonne humeur ainsi que pour toutes les gourmandises déposées régulièrement sur la table de la pièce centrale. Merci beaucoup à **Cécile** pour sa gentillesse et le temps qu'elle a pris pour couper une partie de mes blocs au microtome.

Je remercie particulièrement **Isaline** et **Marie**, mes collègues thésardes, pour leur soutien, leurs encouragements, de m'avoir supporté, les bons moments que nous avons passé et les mots fléchés finis presque sans tricher. Je vous souhaite sincèrement le meilleur dans vos vies professionnelles mais aussi personnelles.

Je remercie chaleureusement tous les membres de ma famille qui ont été derrière moi tout au long de ma thèse. En particulier **mes parents** et **ma sœur** qui ont su m'épauler, me conseiller et m'encourager dans tout ce que j'ai pu entreprendre dans ma vie.

Un très grand merci à ma femme, **Mélissa**, d'avoir été à mes côtés pendant toute cette aventure et d'avoir partagé avec moi les bons comme les mauvais moments. Merci de faire partie de ma vie depuis plus de quatorze ans pendant lesquels nous avons vécu tellement de moments formidables. Parmi eux, l'arrivée de notre petite **Ilana** est sans doute le plus extraordinaire et je ne te remercierai jamais assez d'avoir mis au monde cette merveille.

Table des matières

Table des figures.....	7
Table des tableaux.....	9
Liste des abréviations	11
I) La glande thyroïde humaine.....	13
1) Anato-mo-histologie de la thyroïde	13
2) Activité fonctionnelle de la thyroïde.....	15
3) Facteurs de différenciation des thyrocytes.....	18
II) Les dysfonctionnements et les pathologies de la thyroïde	20
1) Hypothyroïdie.....	20
2) Hyperthyroïdie	21
3) Cancers de la thyroïde	23
III) Carcinogénèse et radiosensibilité thyroïdienne.....	27
1) Les radiations ionisantes.....	27
2) Les effets des radiations ionisantes sur la cellule.....	29
3) Les risques associés aux rayons ionisants	30
4) Cancers de la thyroïde et radiations ionisantes.....	32
5) Les marqueurs d'étiologie du cancer de la thyroïde.....	33
6) Réponse des thyrocytes normaux aux radiations ionisantes : spécificités et radiosensibilité.....	36
IV) Modèles du tissu thyroïdien normal dans la littérature	38
1) Culture primaire de thyrocytes normaux (culture 2D).....	38
2) Cultures 3D.....	40
1. Thyrosphères à partir d'une culture primaire.....	40
2. Organoïdes à partir de cellules souches embryonnaires ou de cellules souches pluripotentes induites.	41
3. Cultures organotypiques.....	42
4. Co-cultures	44
5. Xénogreffes chez la souris immunodéficiente.....	45
V) Projet de recherche et objectifs	47
VI) Résultats	49
1) Provenance et contrôle des biopsies de thyroïde humaine normale.....	49
2) Culture primaire 2D de thyrocytes humains normaux	50

1. Validation du modèle	50
2. Réponse à l'irradiation des thyrocytes normaux humains	54
3. Comparaison de la radiosensibilité des thyrocytes de patients non exposés ou exposés pendant l'enfance	58
3) Les thyrosphères	61
1. Obtention de structures 3D follicule-like.....	61
2. Optimisation des conditions de culture	63
4) Les cultures organotypiques	67
1. Maintien du tissu dans les conditions décrites par Toda et coll.	68
2. Culture organotypique en interface air/liquide (ALI).....	72
3. Réponse à l'irradiation	75
5) Xénogreffes chez la souris	101
1. Dégradation du tissu humain après la greffe.....	101
2. Hypothèses.....	104
VII) Discussion.....	108
1) Contexte et problématique	108
2) Empreinte d'exposition : la valeur ajoutée des modèles <i>in vitro</i>	110
Références bibliographiques	123

Table des figures

Figure 1 : Anatomie de la thyroïde.....	13
Figure 2 : Structure des follicules thyroïdiens.....	14
Figure 3 : Représentation histologique des follicules thyroïdiens.....	14
Figure 4 : Synthèse et sécrétion des hormones thyroïdiennes.....	16
Figure 5 : Synthèse des hormones thyroïdiennes régulée par l'axe thyroïdienne.	17
Figure 6 : Rôle des facteurs de transcription thyroïdiens dans la différenciation thyroïdienne.....	19
Figure 7 : Voies de signalisation dans les thyrocytes normaux.....	24
Figure 8 : Courbes dose-réponse modélisant le risque de cancer en fonction de la dose pour les faibles doses d'exposition.	32
Figure 9 : Thyrosphères mimant le follicule thyroïdien à partir de la mise en culture de thyrocytes de souris.	41
Figure 10 : Modèle de culture organotypique en matrigel selon Toda et coll.	43
Figure 11 : Théories expliquant la folliculogénèse dans un fragment en culture organotypique.....	44
Figure 12 : Modèle expérimental permettant de maintenir des fragments de thyroïde chez la souris SCID sur une longue période.	45
Figure 13 : Présentation théorique des échelles de temps sur lesquels les différents modèles de tissu thyroïdien normal pourraient être maintenus.	47
Figure 14 : Expression de PAX8, TTF1 et FOXE1 dans les cultures primaires de thyrocytes normaux en fonction du temps de culture (8 patients).	51
Figure 15 : Expression de la thyroglobuline, de DUOX1 et de la cycline D1 dans les îlots de thyrocytes normaux.	52
Figure 16 : Expression de la cycline D1 (phase G1) et des cyclines A1+A2 (phase S) dans les cultures primaires de thyrocytes normaux en fonction du temps de culture (8 patients).....	53
Figure 17 : Changement morphologique des cellules entre 2 et 3 semaines après mise en culture.....	53
Figure 18 : Courbes de prolifération et de survie moyennes, au cours du temps, de cultures primaires de thyrocytes humains normaux.....	54
Figure 19 : Analyse de la radiosensibilité des thyrocytes humains normaux à fortes doses et fort débit de dose.	55
Figure 20 : Analyse de la radiosensibilité des thyrocytes humains normaux à faible débit de dose.	55

Figure 21 : Analyse de la radiosensibilité des thyrocytes humains normaux à forts et faibles dose/débit de dose.	56
Figure 22 : Analyse du cycle cellulaire des thyrocytes humains en fonction de la dose et du débit de dose.	57
Figure 23 : Comparaison de la prolifération/survie cellulaire de cultures primaires de thyrocytes normaux non exposés pendant l'enfance (3 patients) versus exposés pendant l'enfance (2 patients).	59
Figure 24 : Comparaison de l'induction/réparation des cassures double-brin après exposition de thyrocytes exposés ou non pendant l'enfance.	60
Figure 25 : Formation de sphères en 10 jours après ensemencement dans le matrigel.	62
Figure 26 : Formation de structures 3D mimant le follicule thyroïdien à 7 semaines de culture.	62
Figure 27 : Immunomarquages des thyrosphères à 5 semaines de culture.	63
Figure 28 : Formation de sphères selon la concentration de matrigel.	64
Figure 29 : Formation de thyrosphères dans 15 % de matrigel.	64
Figure 30 : Expression de marqueurs de polarisation et de différenciation des thyrocytes dans les thyrosphères.	65
Figure 31 : Relocalisation de la thyroglobuline dans le lumen de thyrosphères.	67
Figure 32 : Conservation de la structure du tissu thyroïdien normal après 6 semaines de culture organotypique, pour les deux premiers patients.	68
Figure 33 : Conservation du tissu thyroïdien normal différencié sur les 2 premières semaines de mise en culture organotypique, pour les deux premiers patients.	69
Figure 34 : Structure du tissu thyroïdien normal en culture organotypique selon la méthode de Toda et coll.	69
Figure 35 : Hyperactivation du tissu thyroïdien normal en début de culture organotypique selon la méthode de Toda et coll.	70
Figure 36 : Expression de DUOX1 et de la caspase 3 clivée en cours de culture dans les cultures organotypiques du tissu thyroïdien normal.	71
Figure 37 : Entrée en cycle des thyrocytes dans les cultures organotypiques du tissu thyroïdien normal.	71
Figure 38 : Situation d'hypoxie des thyrocytes dans les cultures organotypiques du tissu thyroïdien normal selon la méthode de Toda et coll.	72
Figure 39 : Comparaison de l'oxygénation des biopsies de tissu normal de thyroïde entre la culture organotypique à interface air/liquide (ALI) et en matrigel.	73
Figure 40 : Maintien des biopsies de tissu normal de thyroïde en culture organotypique à interface air/liquide (ALI).	74

Figure 41 : Comparaison de l'entrée en cycle des cellules des biopsies de tissu normal de thyroïde entre la culture organotypique à interface air/liquide (ALI) et en matrigel.	75
Figure 42 : Réponse à l'irradiation des cultures organotypiques 1 semaine après irradiation.	76
Figure 43 : Entrée en apoptose des thyrocytes dans les cultures organotypiques 1 semaine après irradiation.	76
Figure 44 : Expression de DUOX1 en réponse à l'irradiation des cultures organotypiques 1 semaine après irradiation.	77
Figure 45 : Suivi de la pesée d'une souris après la greffe de tissu thyroïdien normal.	102
Figure 46 : Mise en place d'une vascularisation permettant une bonne oxygénation du tissu thyroïdien normal dès la première semaine de xénogreffe chez la souris.	102
Figure 47 : Maintien de la structure du tissu thyroïdien normal de macaque dans des xénogreffes chez la souris.	103
Figure 48 : Déstructuration et dédifférenciation des xénogreffes de tissu thyroïdien humain.	104
Figure 49 : Modifications morphologiques et fonctionnelles du tissu thyroïdien normal âgé.	104
Figure 50 : Activation d'une réaction inflammatoire dans les xénogreffes de tissu thyroïdien normal dans la souris NSG.	105
Figure 51 : Comparaison du maintien de la structure du tissu thyroïdien humain normal dans des xénogreffes dans la souris NSG versus SCID/beige.	106
Figure 52 : Dérégulation négative du cluster miR17-92 suite à une irradiation (Tchernobyl et radiothérapie) dans les tumeurs et les tissus normaux adjacents.	113
Figure 53 : Modèles 2D et 3D pour l'analyse de la réponse aux radiations ionisantes dans thyroïde humaine normale.	114
Figure 54 : Maintien du tissu thyroïdien de porc en matrigel.	117

Table des tableaux

Tableau 1 : Fréquence des principales lésions à l'ADN, pour une cellule, induites par l'irradiation aiguë d'un gray de rayonnements X ou γ	29
Tableau 2 : Composition des milieux de culture utilisés pour des thyrocytes de rats (5H) et humains (h7H et 6H).	39

Liste des abréviations

FOXE1	Forkhead box protein E1
FTC	Follicular Thyroid Carcinoma
GFR	Growth factor reduced
GH	Growth Hormone
Gy	Gray
H/E	Hémalun de Mayer/Eosine
H2AX	H2A histone family member X
H ₂ O ₂	Péroxyde d'hydrogène
h7H	Humanized 7 homeostatic additive
HHEX	Hematopoietically Expressed Homeobox
HIF1 α	Hypoxia-inducible factor 1- α
HR	Homologous Recombination
I ₂	Diode
ICRP	International Commission on Radiological Protection
IPSC	Induced Pluripotent Stem Cells
LCE	Laboratoire de Cancérologie Expérimentale
LNT	linear nonthreshold
MAPKinases	Mitogen Activated Protein Kinases
MDS	Multiple Damages Sites
MEC	Matrice extracellulaire
miARN	Micro-Acide ribonucléique
MIT	Mono-Iodo-Tyrosine
MTC	Medullary Thyroid Carcinoma
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NHEJ	Non Homologous End Joining
NIS	Symporteur Na ⁺ /I ⁻ (SLC5A5)
NSG	NOD SCID gamma
PAX8	Paired box gene 8
PE	Perturbateurs endocriniens
PTC	Papillary Thyroid Carcinoma
RI	Radiations ionisantes
ROS	Reactive Oxygen Species
RTK	Récepteur Tyrosine Kinase
SCID	Severe Combined ImmunoDeficiency
Sv	Sievert
SVF	Sérum de veau foetal
T3	Tri-iodothyronine

T4	Thyroxine
TG	Thyroglobuline
TGF β	Transforming Growth Factor- β
TGF β R2	TGF β Receptor 2
TPO	Thyropéroxydase
TRH	Thyrotropin Releasing Hormone
TSH	Thyroid Stimulating Hormone
TSHR	Récepteur de la TSH
TTF1	Thyroid Transcription Factor -1 (NKX2.1)
UNSCEAR	United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation
VEGF-A	Vascular Endothelial Growth Factor-A

I) La glande thyroïde humaine

Cette première partie décrira la glande thyroïde sur le plan anatomo-histologique et expliquera son rôle fonctionnel en insistant sur la synthèse des hormones thyroïdiennes et sa régulation moléculaire.

1) Anatomo-histologie de la thyroïde

La thyroïde est une glande endocrine localisée au niveau de la région cervicale médiane basse du cou, devant la trachée et sous le larynx (Figure 1). Elle pèse entre 20g et 30g et est composée de deux lobes qui mesurent 5 à 6 cm de hauteur et environ 2 cm d'épaisseur et qui sont reliés par un isthme lui conférant une forme de papillon (Figure 1). C'est un organe très vascularisé qui s'organise en follicules de 50 à 500 μ m (en moyenne 300 μ m) de diamètre, la taille variant selon l'âge de la personne et l'activité glandulaire [1, 2].

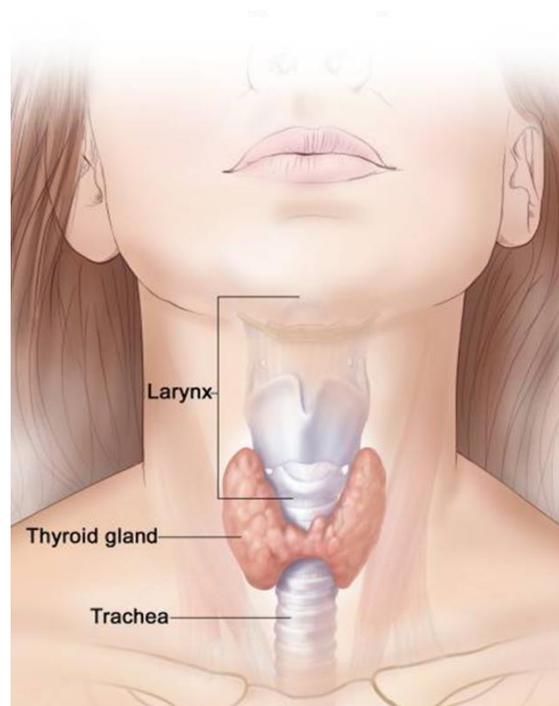


Figure 1 : Anatomie de la thyroïde.

La glande thyroïde est formée de deux lobes et est localisée au niveau du cou, devant la trachée et en-dessous du larynx (figure d'après Terese Winslow LLC, Medical And Scientific Illustration [3]).

Un follicule représente l'unité morpho-fonctionnelle de la thyroïde. De forme sphérique ou ovoïde, il est délimité par un épithélium uni-stratifié composé de cellules de forme cuboïde : les thyrocytes (ou cellules folliculaires) contenant un colloïde composé essentiellement d'une glycoprotéine : la thyroglobuline (TG), précurseur des hormones thyroïdiennes (Figure 2) [1].

La thyroïde est aussi constituée de cellules parafolliculaires ou cellules C qui sont intercalées entre les follicules. Elles ont pour rôle de sécréter la calcitonine, une

hormone hypocalcémiant, elles représentent 1% de la population cellulaire thyroïdienne chez l'adulte [1].

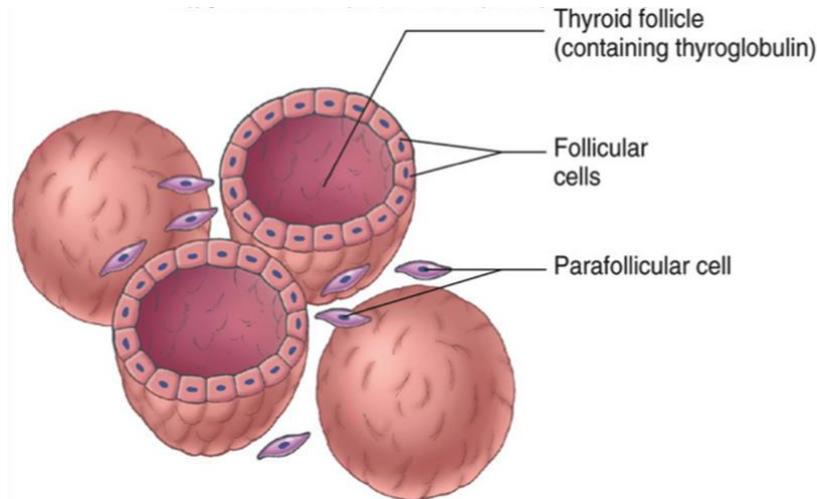


Figure 2 : Structure des follicules thyroïdiens.

Les follicules sont des sphères bordées d'un épithélium de thyrocytes (cellules folliculaires) qui englobe le colloïde (contenant la thyroglobuline). Les cellules C (cellules parafolliculaires) sont intercalées entre les follicules (figure d'après ©The McGraw-Hill Companies, Inc).

Les thyrocytes, cellules très majoritaires du tissu thyroïdien, sont le siège de la synthèse des hormones thyroïdiennes. Ce sont des cellules polarisées avec un pôle basolatéral en contact avec les vaisseaux sanguins et un pôle apical en contact avec le colloïde. En situation de repos, les thyrocytes sont aplatis et le colloïde est élargi (stockage) (Figure 3A).

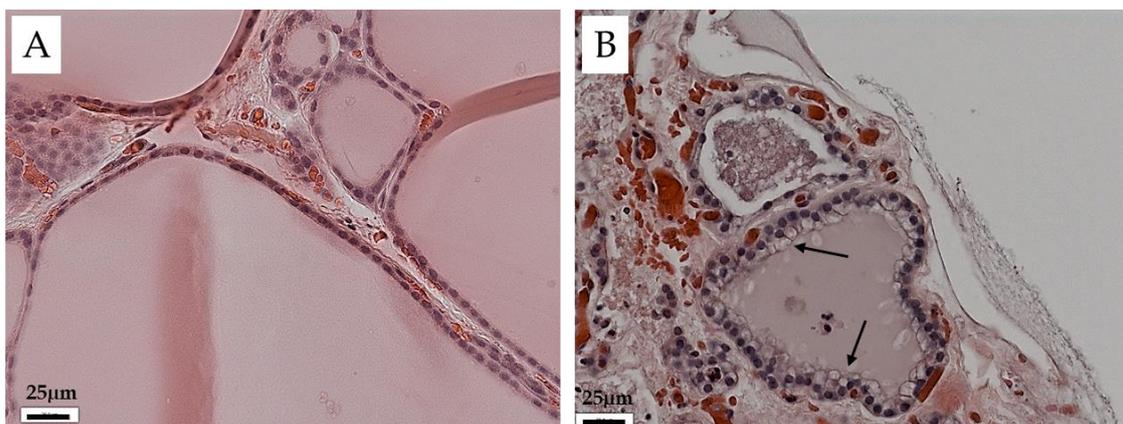


Figure 3 : Représentation histologique des follicules thyroïdiens.

Observation au microscope photonique après coloration à l'hématoxyline/éosine de follicules lorsqu'ils sont inactifs (biopsie de tissu normal thyroïdien avant la mise en culture) (A) ou activés par la TSH : les cellules deviennent de forme cuboïde et des vésicules d'absorption du colloïde se forment (B). Les flèches noires indiquent des vésicules d'absorption de la thyroglobuline, dans un tissu mis en culture en matrigel (48h) en présence de 40mIU/L de TSH. (Voir la section « Résultats »).

En revanche, après une stimulation par la TSH, les thyrocytes sont activés, présentent une forme cuboïde, et des vésicules d'absorption se forment dans les zones où la thyroglobuline iodinée est activement réabsorbée par les thyrocytes pour le relargage des hormones thyroïdiennes (Figure 3B) [1].

2) Activité fonctionnelle de la thyroïde

L'activité fonctionnelle de la glande thyroïde repose sur la production, le stockage et la sécrétion des hormones thyroïdiennes : la tri-iodothyronine (T3) et la thyroxine (T4). Ces processus ont lieu dans les thyrocytes dont la polarité est une caractéristique fondamentale pour que chacune des étapes de la biosynthèse des hormones thyroïdiennes se déroule correctement [4]. Les étapes sont les suivantes (Figure 4) :

- La captation de l'iode : l'iode est un élément retrouvé sous forme de traces dans l'alimentation et l'eau de boisson. L'iode est absorbé et réduit en ion iodure I^- dans l'intestin grêle puis libéré dans la circulation sanguine [5]. La capacité de captation de la thyroïde est telle que 70-80% de l'iode total du corps humain est concentré dans la glande thyroïde [6]. Il est capté au pôle basolatéral grâce à un transport actif assuré par le symporteur Na^+/I^- (NIS ou SLC5A5) [7], le flux de cations étant régulé par la pompe Na^+/K^+ ATPase. L'iodure I^- , utilisé pour la synthèse des hormones, est apporté en grande partie par l'alimentation/boisson, mais provient aussi du recyclage de l'iodure utilisé pour la synthèse des hormones [4].
- L'acheminement vers le pôle apical : l'iode diffuse ensuite de manière passive dans le cytoplasme et traverse la membrane apicale vers le colloïde par des mécanismes encore mal connus qui pourraient faire intervenir plusieurs transporteurs : la pendrine (SLC26A4) (échangeuse d'anions Cl^-/I^-) [8], et les canaux anioniques CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) [9], ANO1 (Anoctamin-1) [10] et CLCN5 (Chloride Channel 5) [11].
- L'organification : l'ion iodure I^- est ensuite oxydé en I_2 (Diode) grâce à la thyropéroxydase (TPO) en présence de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) produit par les NADPH (Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) oxydases, principalement par la DUOX2 (Dual Oxidase 2) et possiblement la DUOX1 (Dual Oxidase 1), maturées et activées par DUOXA2 (Dual Oxidase Maturation Factor 2) et DUOXA1 (Dual Oxidase Maturation Factor 1) respectivement. L' I_2 est alors couplé à la TG pour former les précurseurs des hormones thyroïdiennes : le MIT (Mono-Iodo-Tyrosine) et le DIT (Di-Iodo-Tyrosine). Ainsi, le couplage d'une unité DIT à un MIT ou à un DIT

permet de former respectivement les précurseurs de T3 (TG-DIT-MIT) et de T4 (TG-DIT-DIT) [4].

- Sécrétion des hormones thyroïdiennes : lorsque les thyrocytes sont stimulés par les signaux libérés par la liaison de la TSH (Thyroid Stimulating Hormone), sécrétée par l'antéhypophyse, avec son récepteur transmembranaire (TSHR) couplé à la protéine Gs induisant principalement la voie AMPc/PKA [1], le complexe TG iodiné est endocyté puis la fusion des vésicules d'endocytose avec un lysosome permet le clivage des précurseurs [4]. Les hormones T3 et T4 sont libérées dans le sang au pôle basal principalement par le transporteur MCT8 (Monocarboxylate Transporter 8) [12] et les MIT et DIT résiduels sont désiodés par la iodotyrosine dehalogénase IYD/DEHAL1 pour recycler l'iode pour la synthèse des hormones [13].

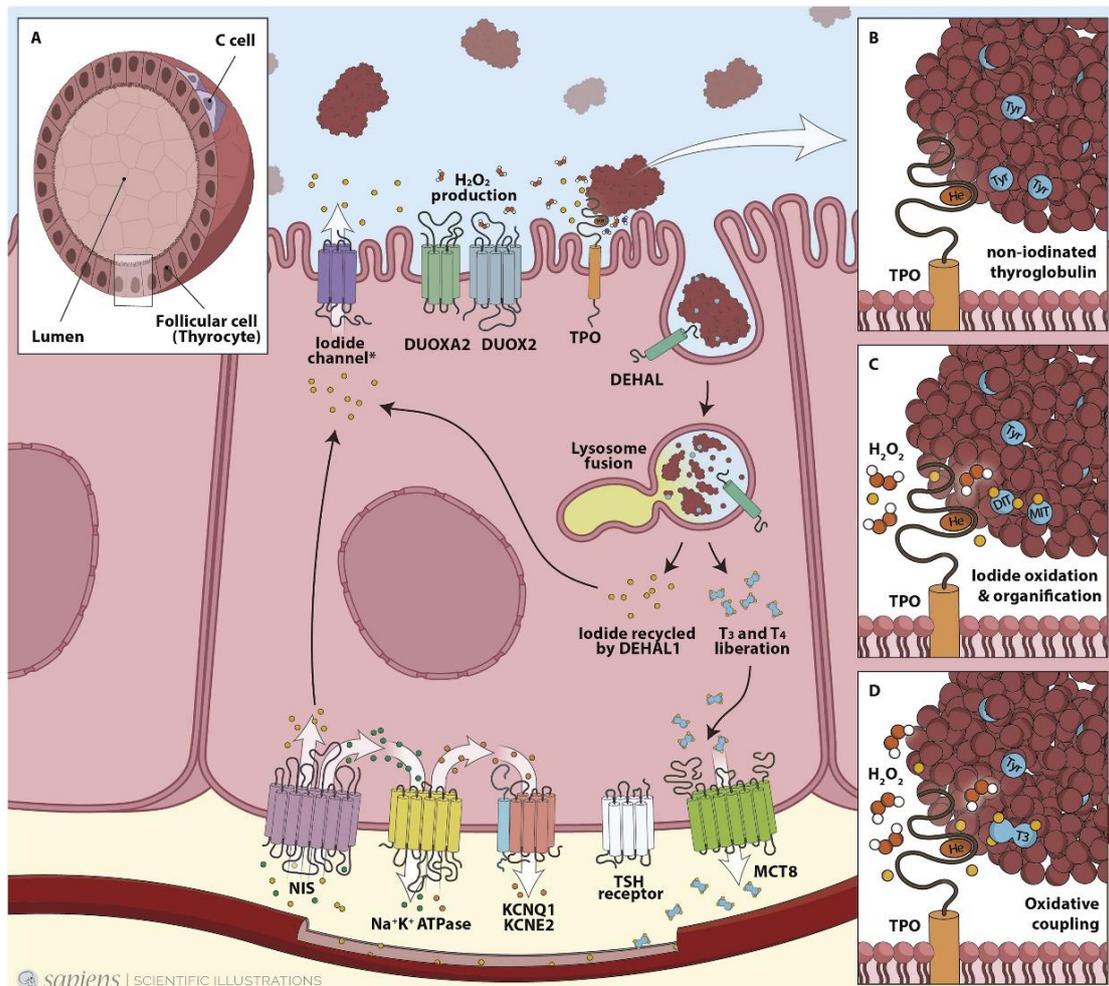


Figure 4 : Synthèse et sécrétion des hormones thyroïdiennes.

A : Structure d'un follicule thyroïdien ; B, C, D : Processus d'organification de l'iode et de formation des précurseurs des hormones thyroïdiennes (figure d'après Carvalho et coll. [4]).

Le principal mécanisme de régulation de la production des hormones thyroïdiennes est l'axe hypothalamo-hypophysaire (ou axe thyroïdote) (Figure 5). En effet, la thyroïde est activée par la TSH, sécrétée par l'antéhypophyse, qui est elle-même stimulée par la TRH (thyrotropin-releasing hormone), une hormone sécrétée par l'hypothalamus. Il existe un rétro-contrôle négatif des hormones T3 et T4 qui agissent sur la production de TSH permettant un auto-contrôle des hormones sur leur propre synthèse (Figure 5) [14].

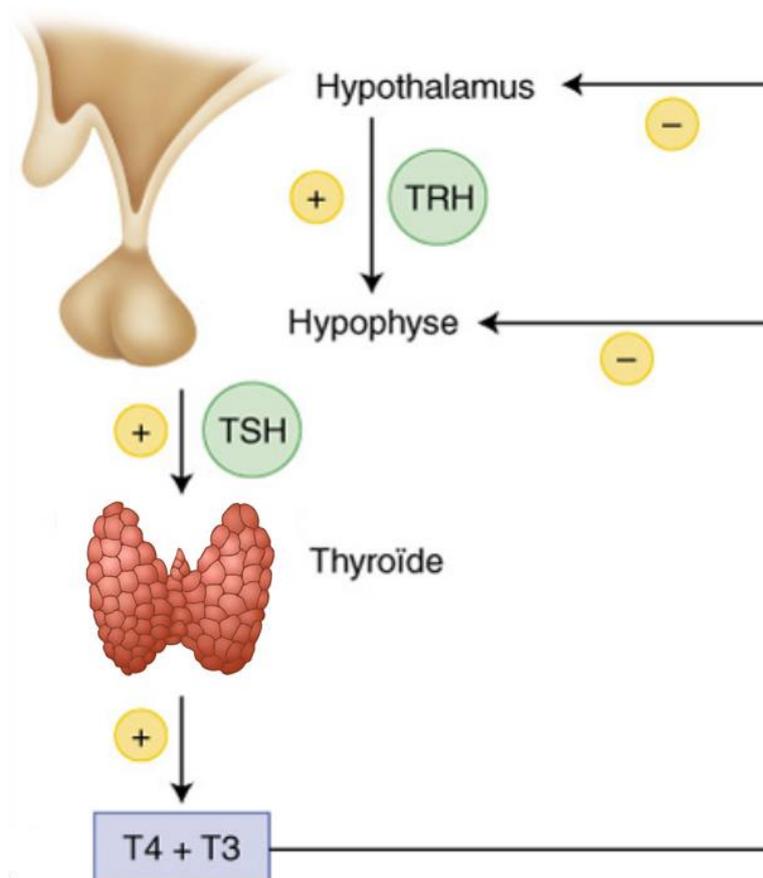


Figure 5 : Synthèse des hormones thyroïdiennes régulée par l'axe thyroïdote.
(Figure d'après Gauchez) [15]).

D'autre part, suite à une surcharge iodée, caractérisée par une concentration iodée urinaire $>300 \mu\text{g/L}$ (L) chez l'adulte et l'enfant (valeurs normales : $100-199 \mu\text{g/L}$), et $>500 \mu\text{g/L}$ chez la femme enceinte (valeurs normales : $150-249 \mu\text{g/L}$) [16], la thyroïde est capable de s'adapter en activant un mécanisme de régulation. En effet, une inhibition de l'organification de l'iode et de l'expression du NIS se met en place ce qui induit une réduction de la captation de l'iode et, par conséquent, une inhibition de la synthèse des hormones thyroïdiennes : c'est « l'effet Wolff-Chaikoff » [17, 18]. Enfin, la thyroglobuline pourrait également contrôler l'activité thyroïdienne par l'inhibition de différents facteurs de transcription responsables de l'expression des récepteurs à la TSH, du NIS et de la TPO, ainsi que de sa propre expression [19].

Une fois sécrétées dans la circulation sanguine, l'hormone thyroïdienne T3 (20% des hormones sécrétées), la plus active, et la pro-hormone T4 (80% des hormones sécrétées), qui sera convertie en T3 par déiodination dans des tissus périphériques par une famille d'iodothyronine-déiodinases (DIO1 mais également DIO2 et DIO3), agissent notamment via des récepteurs nucléaires leur permettant de contrôler l'expression de gènes, qui diffèrent selon le stade de vie de l'individu [20, 21]. En effet, pendant la vie fœtale et les premiers mois de vie, les hormones thyroïdiennes ont un rôle majeur dans le développement et la maturation du système nerveux central en particulier dans la différenciation cellulaire, la migration des cellules, la myélinisation et la mise en place des connexions neuronales [22]. Il a été récemment établi que la concentration des hormones thyroïdiennes de la mère influençait le développement du système nerveux central durant la première moitié de la gestation [23], et une carence néonatale en hormones thyroïdiennes peut également engendrer un retard mental sévère [22]. Les hormones thyroïdiennes ont également un effet important sur la croissance en période postnatale. En effet, d'une part, la T3 favorise l'expression et la sécrétion d'IGF-1 (insulin-like growth factor-1) et de l'hormone de croissance (Growth Hormone : GH) et, d'autre part, interagit avec eux ce qui permet de contrôler la différenciation et la maturation osseuse [24]. A l'âge adulte, elles sont impliquées dans le métabolisme glucidique ayant un pouvoir plutôt hyperglycémiant en stimulant la néoglucogenèse au niveau du foie et en favorisant la glycolyse, au lieu de l'utilisation du glucose (glycolyse), pour produire de l'énergie au niveau des muscles. En outre, elles régulent le métabolisme lipidique en stimulant la lipolyse dont les acides gras produits vont permettre une augmentation de la thermogénèse. Enfin, elles ont tendance à diminuer le taux de cholestérol sanguin en stimulant l'expression des récepteurs aux LDL (Low Density Lipoproteins), responsables de l'internalisation du LDL-Cholestérol dans les cellules [25].

3) Facteurs de différenciation des thyrocytes

La différenciation et le fonctionnement des thyrocytes sont contrôlés par l'expression de quatre facteurs de transcriptions (FTFs) : NKX2-1 ou TTF1 (Thyroid Transcription Factor -1), PAX8 (Paired box gene 8), FOXE1 (Forkhead box protein E1) appelé aussi TTF2, et HHEX (Hematopoietically Expressed Homeobox). Chacun de ces facteurs de transcription peut être exprimé dans d'autres types cellulaires mais c'est leur co-expression qui signe l'identité thyroïdienne. Ils ont un rôle très important dans le développement de la glande thyroïde dès les 20-22 premiers jours post-fécondation jusqu'à la différenciation complète de la thyroïde et la production des hormones (70 jours post-fécondation). Ensuite, Ils permettent le maintien de l'état différencié des thyrocytes [26].

TTF1, PAX8 et HHEX peuvent chacun réguler leur propre expression. De plus, TTF1 et PAX8 régulent aussi l'expression des deux autres facteurs de transcription FOXE1 et HHEX. Leur rôle primordial dans la différenciation thyroïdienne repose sur la régulation de l'expression de différents gènes qui codent pour des protéines impliquées dans la biosynthèse, le stockage et la sécrétion des hormones thyroïdiennes, en particulier de la TG, du NIS et de la TPO. TTF1 régule l'expression du récepteur de la TSH, de la pendrine, de DUOXA2 et de DUOX1. FOXE1 contrôle l'expression de DUOX2 et PAX8 active l'expression de DIO1 (iodothyronine deiodinase 1) (Figure 6) [26].

Ces régulations peuvent dépendre de l'association des FFTs avec des cofacteurs. C'est le cas de TTF1 et PAX8 qui peuvent se lier au co-activateur TAZ [26, 27]. PAX8 coopère également avec EP300/P300, une acétyltransférase, pour la transcription de TG et de TPO [26, 28] et avec CTCF (CCCTC-binding factor : répresseur transcriptionnel), SP1 (specificity protein 1 : facteur de transcription) et la β -caténine au niveau du promoteur de SLC5A5, le gène exprimant le NIS (Figure 6) [26, 29, 30].

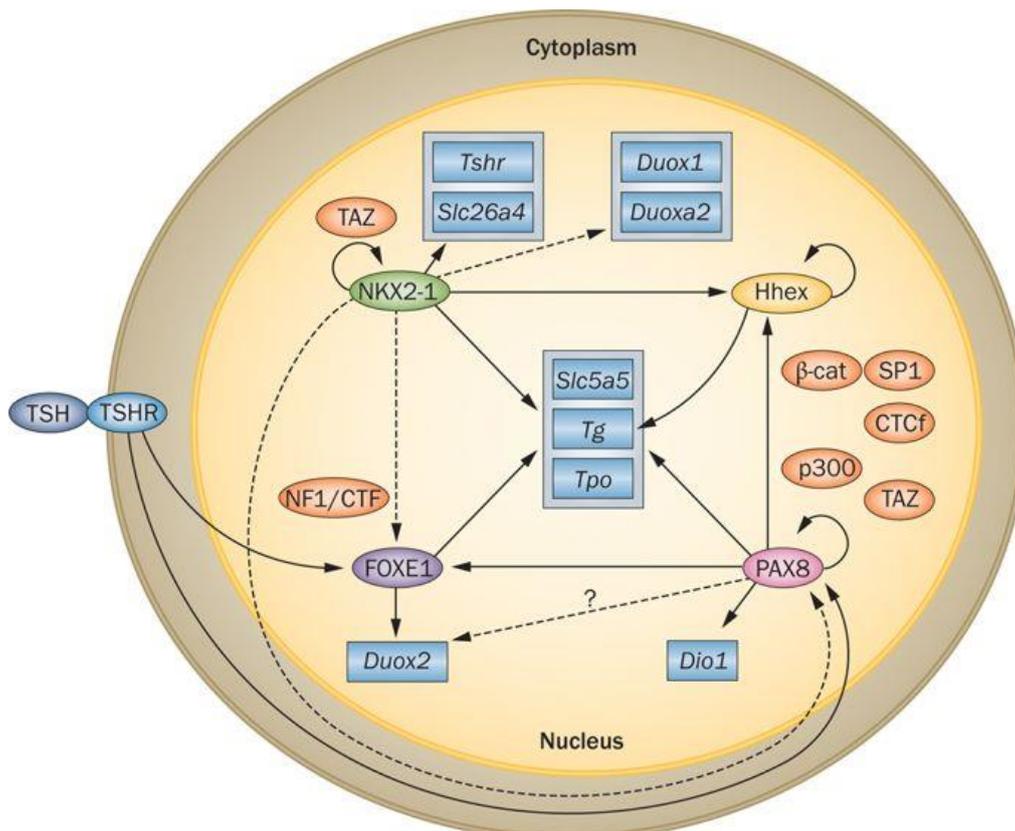


Figure 6 : Rôle des facteurs de transcription thyroïdiens dans la différenciation thyroïdienne. (Figure d'après Fernandez et coll. [26]).

II) Les dysfonctionnements et les pathologies de la thyroïde

Cette deuxième partie décrira les principaux dysfonctionnements et pathologies tels que l'hypothyroïdie, l'hyperthyroïdie et les cancers de la thyroïde.

1) Hypothyroïdie

D'une manière générale, l'hypothyroïdie se définit par un déficit de production des hormones thyroïdiennes. Sa prévalence est plus importante chez la femme (environ 7,5%) que chez l'homme (3%). Les symptômes les plus courants sont une grande fatigue associée éventuellement avec une somnolence (léthargie), de la frilosité et une prise de poids.

Cette pathologie est classifiée principalement en quatre catégories [31]:

- Primaire lorsqu'elle est due directement à un dysfonctionnement de la thyroïde
- Secondaire lorsqu'elle est due à un dysfonctionnement de l'hypophyse et donc à une déficience en TSH
- Tertiaire lorsqu'elle est due à un dysfonctionnement de l'hypothalamus et donc à une déficience en TRH
- Périphérique lorsque la cause est extérieure à la thyroïde ou à l'axe hypothalamo-hypophysaire.

Parmi les cas d'hypothyroïdie classés dans la catégorie primaire, le plus fréquent est une inflammation auto-immune chronique appelée « la thyroïdite de Hashimoto ». Elle se caractérise par une expression d'anticorps anti-TPO et anti-TG ce qui conduit à une inhibition progressive de l'activité thyroïdienne. Il est également possible qu'il y ait l'apparition d'un goitre (forte augmentation du volume de la thyroïde) [31, 32]. En effet, suite au déficit en hormones thyroïdiennes, le rétrocontrôle négatif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire n'est plus possible, entraînant une sécrétion trop importante de TSH qui a alors un effet trophique sur la thyroïde.

Les hypothyroïdies secondaires et tertiaires sont incluses dans ce que l'on appelle l'hypothyroïdie centrale. Avec les hypothyroïdies périphériques, elles sont extrêmement rares (moins de 1% des cas) [31, 33]. L'hypothyroïdie centrale est associée à des dysfonctionnements de l'axe hypothalamo-hypophysaire mais plus de la moitié des cas d'hypothyroïdie centrale sont causés par des adénomes hypophysaires. Biochimiquement, l'hypothyroïdie centrale est définie par des concentrations faibles de TSH (concentration normale pour un adulte : 0,4 à 4 mUI/L) et une concentration basse de T4 libre (concentration normale pour un adulte : 9 à 17 ng/L) [31, 33]. Les autres causes peuvent provenir de dysfonctions hypophysaires ou hypothalamiques dues à un traumatisme crânien, une apoplexie hypophysaire, de la chirurgie, de la

radiothérapie ou aux effets secondaires de médicaments anti-cancéreux affectant l'axe thyroïdien (ligands des récepteurs X des rétinoïdes) [31, 34]. L'hypothyroïdie périphérique fait suite à des cancers vasculaires comme les hémangiomes ou des tumeurs stromales gastro-intestinales qui induisent une surexpression de la iodothyronine déiodinase 3 (DIO3), responsable de l'inactivation des hormones thyroïdiennes [31, 35].

L'hypothyroïdie peut également être provoquée par une carence en iode qui s'accompagne également de développement de goitres. Comme mentionné précédemment, en plus des dérèglements métaboliques associés à l'hypothyroïdie, la carence en iode chez la mère (effet *in utero*) et/ou chez le jeune enfant est à l'origine de retard mental et physique sévère (crétinisme).

Enfin, la prise de certains médicaments peut aussi entraîner une diminution de la production des hormones thyroïdiennes. C'est le cas des médicaments à base d'iode dans les pays sans carence iodée. Le plus courant étant l'amiodarone, un antiarythmique de classe III préconisé pour traiter les troubles du rythme cardiaque, pouvant provoquer une surcharge en iode et induire l'effet Wolff-Chaikoff [36]. Le lithium, utilisé dans le traitement des troubles de l'humeur, provoquerait également un blocage de la synthèse et de la sécrétion des hormones thyroïdiennes [37].

Le diagnostic de l'hypothyroïdie est effectué :

- Systématiquement à la naissance par la mesure de la TSH afin de dépister une hypothyroïdie congénitale qui, si elle n'est pas traitée, peut-être à l'origine de retard mental sévère [31, 38].
- S'il y a suspicion d'hypothyroïdie par la présence des symptômes reportés ci-dessus. Dans ce cas, une mesure de la concentration en TSH sera réalisée : si elle est élevée, la concentration de T4 libre et la présence d'anticorps anti-TPO dans le sang seront également contrôlées [31].

Le traitement de l'hypothyroïdie consiste en la prise quotidienne de lévothyroxine (hormone T4 synthétique) ce qui permet de compenser le défaut de production des hormones thyroïdiennes [31].

2) Hyperthyroïdie

L'hyperthyroïdie se caractérise par un excès de production et de sécrétion des hormones thyroïdiennes conduisant à un syndrome de thyrotoxicose (excès d'hormones thyroïdiennes circulantes). Sa prévalence est de 0,8% en Europe et de 1,3% aux Etats-Unis. Elle est plus fréquente chez le sujet âgé et chez les femmes. Les principaux symptômes de l'hyperthyroïdie sont la perte de poids, des tremblements

des membres, une intolérance à la chaleur et des palpitations (avec une tachycardie). Les causes les plus courantes de l'hyperthyroïdie sont [39]:

- La maladie auto-immune de Graves-Basedow (la plus fréquente)
- Un goitre multinodulaire toxique ou un adénome toxique

La maladie auto-immune de Graves-Basedow est caractérisée par une production d'anticorps capables de se lier aux récepteurs de la TSH et de les activer constitutivement ce qui a pour effet de stimuler l'activité des thyrocytes en permanence et donc de synthétiser un excès d'hormones thyroïdiennes. Cette maladie peut être également associée à un goitre et à une exophtalmie (l'œil dépasse de l'orbite).

L'adénome toxique et le goitre multinodulaire toxique sont des tumeurs thyroïdiennes bénignes dont la particularité est qu'elles produisent et sécrètent des hormones thyroïdiennes indépendamment du signal de la TSH. Cette autonomie est notamment due à des mutations du récepteur de la TSH ou de la protéine Gs qui confèrent une activation constitutive du signal [39-41].

De plus, des sources médicamenteuses peuvent provoquer la thyrotoxicose, en particulier la prise excessive d'hormones thyroïdiennes et la prise de médicaments dont la molécule est iodée (amiodarone) dans les régions où il y a une carence iodée. On distingue deux types d'hyperthyroïdie qui sont liés à l'amiodarone : 1) Le type 1 qui serait dû à une augmentation de la synthèse et du relargage des hormones thyroïdiennes induite par l'apport d'iode, et se développant chez des patients ayant déjà une pathologie thyroïdienne comme un goitre multinodulaire non toxique ou une maladie de Graves-Basedow, et 2) le type 2 qui est une thyroïdite causée par un effet toxique de l'amiodarone entraînant la lyse des thyrocytes et un relargage des hormones dans la circulation sanguine [39, 42].

Le diagnostic de l'hyperthyroïdie se fait par la mesure de la TSH. Si elle est faible, une mesure de la concentration des hormones thyroïdiennes (T3 et T4) couplée à la mesure de la captation de l'iode radioactif, du taux d'anticorps anti-récepteur à la TSH, et à une échographie de la thyroïde permettront de définir les causes de l'hyperthyroïdie.

Il y a trois traitements possibles à l'hyperthyroïdie [39]:

- L'administration d'antithyroïdiens de synthèse (ATS) qui bloquent la TPO et donc la synthèse hormonale
- L'irradiation interne avec de l'iode radioactif
- Une thyroïdectomie totale ou partielle par la chirurgie

Pour la maladie de Graves-Basedow, des ATS sont administrés en premier traitement et s'il y a nécessité, il sera réalisé une ablation de la thyroïde par une chirurgie ou une irradiation avec de l'iode radioactif. L'adénome toxique et le goitre multinodulaire seront traités par une ablation après l'utilisation d'ATS pour restaurer une activité thyroïdienne normale.

Enfin, dans le cas d'une hyperthyroïdie liée à la prise d'amiodarone : le type 1 est traité avec des ATS en ajoutant, dans certains cas, du perchlorate de potassium, un compétiteur de la captation de l'iode par le NIS. Alors que le type 2 est traité par l'administration de glucocorticoïdes pour leurs effets anti-inflammatoire et inhibiteur de la conversion de la T4 en T3 [39].

3) Cancers de la thyroïde

Le cancer de la thyroïde représentait 3,1% des nouveaux cas de cancers dans le monde en 2018 [43]. Il est le plus fréquent des cancers endocriniens et plusieurs études font état d'une augmentation de son incidence depuis plusieurs dizaines d'années due en grande partie à un meilleur diagnostic et à la détection de plus petits cancers [44, 45]. Le seul facteur étiologique connu est l'exposition aux radiations ionisantes pour des doses reçues à la thyroïde d'au moins 50mGy pendant l'enfance mais des études suggèrent d'autres facteurs de risques pour le cancer de la thyroïde tels que la pollution de l'environnement (perturbateurs endocriniens ou métaux lourds) [46, 47] et le mode de vie (obésité, tabagisme, carence en iode) [48, 49].

Il existe quatre sous-types de cancer de la thyroïde établis selon des caractéristiques histologiques [50]:

- Les cancers papillaires (PTC : Papillary Thyroid Carcinoma)
- Les cancers folliculaires (FTC : Follicular Thyroid Carcinoma)
- Les cancers anaplasiques (ATC : Anaplastic Thyroid Carcinoma)
- Les cancers médullaires (MTC : Medullary Thyroid Carcinoma)

Les PTC, FTC et ATC dérivent des thyrocytes alors que les MTC dérivent des cellules C.

Les PTC et les FTC sont classés en tant que cancers thyroïdiens différenciés (CTD). Ces cancers conservent certaines caractéristiques fonctionnelles dont la sensibilité à la TSH et la captation de l'iode. Ils représentent environ 95% des cancers thyroïdiens (80% pour les PTC et 15% pour les FTC). Ils sont associés à un excellent pronostic (98% de survie à 5 ans) [45, 50].

D'un point de vue histologique, les PTC se caractérisent par des papilles, structures composées d'un axe conjonctivo-vasculaire et bordées de cellules épithéliales et de follicules, des thyrocytes différenciés avec des noyaux de grosse taille avec un aspect rainuré, des pseudo-inclusions, des chevauchements entre les noyaux, un stroma

fibreux souvent abondant et des petites calcifications feuilletées stromales (psammomes ou calcosphérites) qui sont inconstantes [50-52].

Les FTC n'ont pas les caractéristiques nucléaires des PTC. Contrairement aux PTC, l'architecture folliculaire de leur tissu est conservée. De plus, ils sont caractérisés par la présence d'une invasion vasculaire et/ou capsulaire plus ou moins étendue ce qui les rends plus agressifs que les PTC [50-52].

Des études génétiques sur les cancers de la thyroïde différenciés ont montré que des mutations ou des réarrangements dans les gènes codants pour la voie des MAP Kinases (Mitogen Activated Protein Kinases) sont requis pour la transformation cancéreuse (Figure 7) [53].

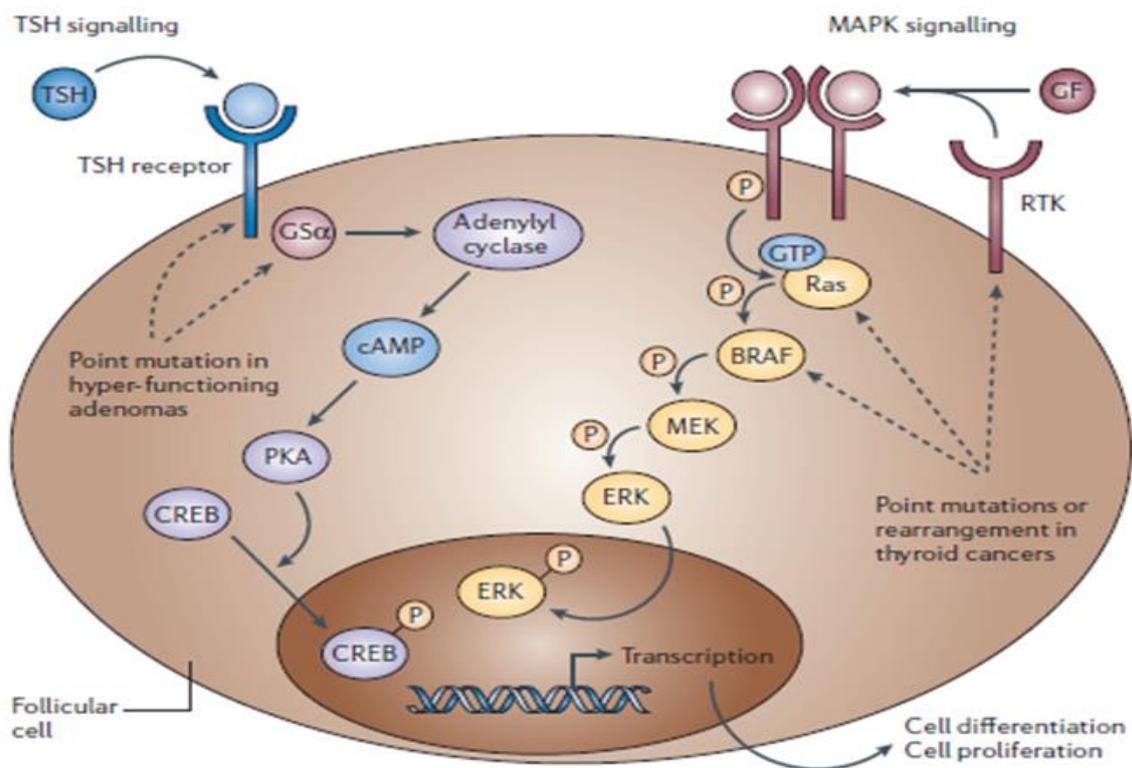


Figure 7 : Voies de signalisation dans les thyrocytes normaux.

1) La voie AMP cyclique est induite par la liaison de la TSH avec son récepteur qui active une protéine G, G α , ce qui entraîne la production d'AMP cyclique (AMPc) par l'adénylate cyclase. L'AMPc active la protéine kinase A (PKA), qui phosphoryle, entre autres, le facteur de transcription CREB (C-AMP Response Element-binding protein) qui migre dans le noyau et active la transcription de gènes régulant la synthèse des hormones thyroïdiennes.

2) La voie des MAP Kinases est initiée par la liaison de facteurs de croissances (Growth Factors : GF) sur un récepteur tyrosine kinase (RTK). La transduction du signal induit une transformation du GDP (Guanosine Diphosphate), lié à une protéine de la famille RAS, en GTP (Guanosine Triphosphate) ce qui lui permet de phosphoryler et d'activer une protéine de la famille RAF (BRAF) qui, à son tour, active en cascade les protéines de la famille MEK et ERK. Une fois phosphorylée, ERK migre dans le noyau pour aller phosphoryler des facteurs de transcriptions impliqués dans la différenciation, la prolifération et la survie cellulaire telles que les protéines MYC et ELK1.

(Figure d'après Kondo et coll. [51]).

Les réarrangements de RET nommés RET/PTC et les mutations des gènes codant pour la famille des protéines RAS (N-, K- et H-RAS) [54, 55] et la protéine BRAF [56, 57] représentent la grande majorité des altérations connues dans les CTD (environ 70%) [53]. Par ailleurs, les réarrangements RET/PTC sont rencontrés plus fréquemment chez les enfants (40 à 70% des PTC sporadiques développés chez l'enfant) alors les mutations du gène BRAF sont associés plus souvent à des cancers chez l'adulte [58]. Il est à noter que RET est un récepteur à tyrosine kinase qui n'est normalement pas exprimé dans les thyrocytes mais les réarrangements RET/PTC résultent de la fusion de la région 3' du gène de RET (codant pour le domaine tyrosine kinase de la protéine RET) avec la région 5' d'un autre gène qui est exprimé ubiquitairement ce qui conduit à l'expression constitutive de RET dans les thyrocytes [51, 59]. Plus d'une dizaine de réarrangements sont décrits mais les plus fréquents sont RET/PTC1, qui implique le gène CCDC6/H4 [51, 59] codant pour une protéine potentiellement suppresseur de tumeur impliquée dans la régulation de la réparation des dommages de l'ADN (Acide désoxyribonucléique) et l'induction de l'apoptose [60], et RET/PTC3, qui implique le gène NCOA4 [51, 59] codant pour un coactivateur de l'activité transcriptionnelle du récepteur aux androgènes impliqué dans la « ferritinophagie », un processus autophagique important pour le maintien de l'homéostasie du fer cellulaire [61]. Les CTD apparaissent sous forme de nodules non agressifs et sont traités le plus fréquemment par une chirurgie (thyroïdectomie partielle ou totale) associée à une irradiation interne avec de l'iode radioactif pour compléter l'ablation ou traiter d'éventuelles métastases (le plus souvent pulmonaires ou osseuses). Si les métastases résistent au traitement, des thérapies ciblées, telles que des inhibiteurs des récepteurs à activité tyrosine kinase, ont donné des résultats encourageants [62]. En effet, ces derniers permettent la ré-expression du NIS, inhibée par l'activation constitutive des protéines de la voie des MAP Kinases, et donc la captation de l'iode radioactif par les cellules tumorales [63].

Les ATC sont classés comme des cancers thyroïdiens indifférenciés. Ils ne fixent pas l'iode et n'expriment pas le récepteur de la TSH [64].

Ils représentent 1 à 2% des cancers de la thyroïde. Ils sont très agressifs, associés à un mauvais pronostic et entraînent un taux de mortalité élevé : les patients ont une survie médiane de moins de 12 mois à partir du diagnostic initial. Histologiquement, ces tumeurs sont composées entièrement ou partiellement de cellules qui apparaissent non différenciées et sans structures folliculaires. Il est accepté que les ATC dérivent d'un cancer différencié en passant par un état intermédiaire (faiblement différencié) dans lequel s'amorce une perte de la différenciation structurale et fonctionnelle. Des mutations dans les gènes RAS et BRAF sont d'ailleurs souvent retrouvées et considérées comme des événements précoces (signatures d'un CTD) auxquelles s'ajoutent des événements tardifs spécifiques des ATC comme une mutation du gène

suppresseur de tumeur TP53. Ce processus s'intègre dans le modèle de la carcinogénèse en plusieurs étapes dans laquelle les cellules cancéreuses dériveraient des thyrocytes matures [50, 51]. Une autre hypothèse a été proposée dans laquelle différentes composantes cellulaires fœtales de la différenciation des thyrocytes (cellules souches, thyroblastes et prothyrocytes), associées à des capacités de prolifération et d'invasion différentes, persisteraient et pourraient, en fonction de ces capacités, être associées au développement de cancers plus ou moins différenciés (PTC, FTC, ATC) [65]. Ce modèle a été appuyé par la découverte des cellules souches cancéreuses (CSC) qui représentent une petite partie de la population tumorale et possèdent des caractéristiques similaires aux cellules souches embryonnaires, l'auto-renouvellement et la multipotence. Elles auraient un rôle central dans l'initiation de la tumeur, la propagation des métastases et la résistance tumorale aux traitements [66]. Les ATC se présentent sous la forme d'une volumineuse masse thyroïdienne douloureuse ce qui provoque une compression au niveau du cou entraînant un enrouement, une dysphagie, une paralysie des cordes vocales et une dyspnée. Ils sont traités par l'association de la chirurgie et d'une radiothérapie qui s'associent à une chimiothérapie en cas de métastases [50, 67].

Les MTC sont rares (3% des cancers thyroïdiens). La majorité des MTC sont sporadiques mais environ 25% sont héréditaires et surviennent dans le cadre d'un syndrome familial, appelé Néoplasie Endocrinienne Multiple de type 2 (NEM2), qui est causé par une mutation du gène RET [50, 68]. On distingue 3 formes de NEM2 : 1) la néoplasie endocrinienne de type 2A (NEM2A) ou syndrome de Sipple (le plus fréquent des NEM2), un MTC qui est souvent associé à une tumeur des glandes surrénales (phéochromocytome) et/ou à une tumeur des glandes parathyroïdes qui sécrètent la parathormone, une hormone hypercalcémiant, 2) la néoplasie endocrinienne de type 2B (NEM2B) ou syndrome de Gorlin (5% des NEM2), un MTC qui est souvent associé à un phéochromocytome et/ou à des malformations musculaires et squelettiques, et 3) le cancer médullaire familial (15% des NEM2) qui n'est pas associé à d'autres cancers ou autres pathologies/déficiences [50].

La confirmation du diagnostic d'un MTC se fait par la mesure de la concentration de calcitonine dans le sang (≥ 100 pg/mL) [69]. Le traitement repose essentiellement sur la chirurgie avec l'ablation totale de la thyroïde complétée par une radiothérapie. En cas de métastases, des traitements avec des inhibiteurs de tyrosine kinases semblent être prometteurs [50, 70].

III) Carcinogénèse et radiosensibilité thyroïdienne

Cette troisième partie portera, dans un premier temps, sur la description et les effets des radiations ionisantes (RI), puis dans un deuxième temps, sur les cancers de la thyroïde radio-induits ainsi que leurs marqueurs d'étiologie, et enfin, sur l'état actuel de la littérature à propos de la radiosensibilité des thyrocytes normaux.

1) Les radiations ionisantes

Les rayonnements sont dits « ionisants » lorsqu'ils sont capables de déposer assez d'énergie pour arracher un ou plusieurs électrons à des atomes qu'ils traversent et les transformer en ions. On distingue deux grands types de rayonnements ionisants : les rayonnements particuliers tels que les particules alpha (α), bêta (β) ou les neutrons, et les rayonnements électromagnétiques tels que les rayons gamma (γ) et les rayons X [71]. Lorsque l'on parle des rayonnements ionisants, il faut distinguer deux grands types d'unités : les unités de doses et les unités de risques :

- Le becquerel (Bq) qui mesure l'activité radioactive d'une source radioactive (exprimé en nombre de désintégrations par seconde) est essentiellement utilisé en physique [72].
- Le Gray (Gy) qui mesure la quantité de rayonnement (énergie) absorbée par quantité de matière exposée à une source radioactive ($1\text{Gy} = 1$ joule par kilogramme de matière). C'est une unité utilisée par les radiobiologistes et les radiothérapeutes. Le débit de dose étant la dose absorbée par unité de temps [71].
- Le Sievert (Sv), qui est une unité utilisée en radioprotection, permet de tenir compte des effets biologiques d'une exposition en fonction du type de rayonnement sur un tissu, un organe ou sur un organisme entier :
 - La dose équivalente (H_T) permet d'estimer le dommage subi par un organe ou un tissu (T) en tenant compte du type de rayonnement (R) appelé également EBR (efficacité biologique relative). Elle est calculée en multipliant la dose absorbée en Gy $D_{T,R}$ par un facteur empirique de pondération radiologique W_R (sans dimension) dépendant de l'énergie liée au type de rayonnement : $H_T = \sum_R D_{T,R} \cdot W_R$ [73].
 - La dose efficace (E) pour une exposition externe permet d'estimer les conséquences biologiques d'une exposition sur un organisme en tenant compte du type de rayonnement et de la radiosensibilité intrinsèque de chaque organe. Elle est calculée en additionnant la dose équivalente (H_T) de chaque tissu (T) multipliée par un facteur

empirique de pondération tissulaire W_T (sans dimension) estimant sa radiosensibilité : $E = \sum_T H_T \cdot W_T$ [73].

Il existe deux types d'exposition aux radiations ionisantes [74] :

- Par irradiation externe (radiothérapie externe, bombardements sur Hiroshima/Nagasaki)
- Par contamination quand les radionucléides pénètrent dans l'organisme par inhalation, ingestion ou passage transcutané. Dans ce cas, la dose et la durée de l'exposition dépendra de la demi-vie physique du radionucléide et/ou de ses différentes formes, représentant le temps nécessaire pour que son activité radioactive diminue de moitié. Le niveau d'exposition des organes dépendra également du comportement du radionucléide dans l'organisme, à savoir : sa solubilité influençant son transport dans l'organisme, sa vitesse d'élimination dans les urines/fèces, et/ou sa captation, et son métabolisme dans un organe spécifique, la biocinétique du radionucléide pouvant dépendre de l'âge et du sexe de l'individu contaminé [75, 76]. Par exemple, la toxicité des radioisotopes de l'iode est due à leur particularité d'être captés dans la thyroïde, dans les glandes salivaires ou dans le sein pendant la grossesse/lactation en raison de l'expression du symporteur NIS [77]. Parmi ces isotopes, l'iode-131 est une des principales sources de contamination lors des accidents nucléaires [78, 79] mais il est également utilisé en médecine nucléaire pour le traitement de l'hyperthyroïdie [39] et pour l'approche théranostique, qui combine le diagnostic (par imagerie) et le traitement des cancers de la thyroïde différenciés [50, 80].

Tous les êtres humains sont exposés quotidiennement aux rayonnements ionisants naturels. Les sources naturelles peuvent être d'origine cosmique (rayonnements provenant principalement du soleil et de l'explosion d'étoiles), ou terrestre (désintégrations de minéraux tels que l'uranium et le thorium, présents dans le sol), et entraînent une exposition externe et/ou interne par ingestion de radionucléides dans l'alimentation ou l'eau, ou par inhalation de radon. L'exposition est variable en fonction de l'altitude et de la composition des sols. Les populations peuvent également être exposées dans un contexte professionnel ou médical (imagerie, radiothérapie), ou en raison de la contamination environnementale par les activités industrielles ou militaires utilisant la radioactivité [71, 74]. En France, l'exposition totale moyenne pour une personne est estimée à 4.5mSv/an dont 2,4 mSv/an en moyenne associés à l'exposition naturelle, 1.6mSv/an principalement en raison d'expositions médicales [81] et 0,01 mSv/an par les rejets autorisés provenant de l'industrie nucléaire [81]. L'exposition de populations entières à une contamination par des radionucléides s'est produite lors d'accident nucléaire de Tchernobyl en 1986 (gamme de doses sur tout le

corps accumulée de 1986 à 2005 pour les populations de Biélorussie, Russie et Ukraine : quelques mSv à une centaine de mSv) [82], ou à une irradiation externe lors des bombardements sur Hiroshima et Nagasaki en 1945 (de quelques mGy à 2500 m de l'hypocentre jusqu'à une dizaine de Gy à 1000 m de l'hypocentre) [83, 84].

2) Les effets des radiations ionisantes sur la cellule

Les radiations ionisantes peuvent causer des lésions à tous les constituants de la cellule, en particulier l'ADN, mais également les lipides et les protéines. Ces effets peuvent être directs (ionisations provoquées par l'énergie du rayonnement) ou indirects, par la radiolyse de l'eau qui engendre un stress oxydatif dû à la production d'espèces radicalaires de l'oxygène (ROS : Reactive Oxygen Species), extrêmement délétères pour les biomolécules et en particulier pour l'ADN [75, 85].

Les dommages à l'ADN causés par les radiations ionisantes peuvent induire, s'ils n'ont pas été réparés, des cancers (cellules somatiques) ou des altérations génétiques transmissibles (cellules germinales). Les différents types de lésions et leur fréquence par cellule pour une dose d'irradiation aiguë d'un gray de rayonnements X ou γ sont décrits dans le tableau 1 [86]:

Types de lésions	Nombre de lésions
Lésions des bases	10000
Cassures simple-brin CSB	1000
Cassures double-brin CDB	40
Lésions des sucres (désoxyribose)	1000
Pontages ADN-ADN	30
Pontages ADN-protéine	150

Tableau 1 : Fréquence des principales lésions à l'ADN, pour une cellule, induites par l'irradiation aiguë d'un gray de rayonnements X ou γ .

La plupart des lésions sont réparées rapidement par des systèmes de réparation de la cellule. Les altérations de bases et les cassures simple-brin sont réparés par le BER (Base Excision Repair) et les modifications de la structure de la double hélice de l'ADN (pontages) par le NER (Nucleotide Excision Repair). Ces systèmes de réparations sont dits « fidèles » car ils restaurent la séquence d'ADN initiale [87].

Les CDB activent la protéine ATM, une protéine sérine/thréonine kinase, qui est recrutée à la chromatine et phosphoryle un grand nombre de substrats ce qui permet d'initier une cascade de signalisation qui active les points de contrôle du cycle cellulaire, et de favoriser le recrutement de facteurs de réparation sur le site des dommages [88]. Parmi les substrats d'ATM, p53 est un facteur de transcription jouant un rôle majeur dans la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose [89]. H2AX (H2A histone family member X) est un membre de la famille des histones H2A qui est

phosphorylé par ATM immédiatement après l'induction de cassures double-brin à l'ADN. H2AX phosphorylée (γ H2AX) est un marqueur très utilisé pour détecter les CDB [90]. Deux mécanismes peuvent, ensuite, réparer les CDB : la recombinaison homologue (HR : Homologous Recombination) et la recombinaison par jonction d'extrémités non homologues (NHEJ : Non Homologous End Joining). La HR est un système de réparation fidèle qui utilise préférentiellement la séquence homologue et non endommagée située sur la chromatide sœur (accessible en phase S ou G2 du cycle cellulaire). Le NHEJ permet de liguer les extrémités d'une cassure double-brin sans homologie de séquence entre les deux brins et agit principalement en phase G1 du cycle cellulaire. C'est donc un système moins fidèle, qui peut être la source d'insertions ou de délétions de courtes séquences d'ADN, pouvant causer une perte de l'information génétique [88, 91].

Les dommages liés aux radiations ionisantes sont complexes et présentent plusieurs types de lésions regroupées dans 1 à 2 tour d'hélice (Multiple Damages Sites : MDS). La complexité de ces sites, due principalement à la diversité et au nombre de lésions, fait que la réparation des lésions est plus lente et plus difficile que pour des lésions isolées, et peut comporter des erreurs, conduisant à des mutations [92, 93]. De plus, lorsque dans ces MDS, des CSB sont induites sur les deux brins de l'ADN l'une en face de l'autre et qu'elles sont mal réparées, elles pourront aboutir également à des CDB ou à des réarrangements chromosomiques [92].

Découlant de cette instabilité génétique, la cellule peut suivre deux voies : 1) la mort cellulaire par déclenchement de l'apoptose ou par nécrose, ou 2) la survie en conservant une instabilité génétique et des mutations conférant un avantage sélectif pour la cellule (prolifération, survie, contrôle de la réponse immunitaire anti-tumorale, angiogenèse...). Cette sélection clonale peut potentiellement conduire à un cancer après plusieurs années [88, 94].

3) Les risques associés aux rayons ionisants

En radioprotection, les risques pour la santé sont classés en deux types d'effets :

- Les effets déterministes sont dépendants de la dose absorbée et leur gravité augmente en fonction de la dose. Ils surviennent assez rapidement (quelques jours à quelques années) chez tous les individus à partir d'une dose seuil sans grande variabilité interindividuelle. Les mécanismes associés à ces effets sont principalement dus à l'induction de l'apoptose mais impliquent également des processus inflammatoires entraînant des lésions tissulaires [95].

Exemples : diminution temporaire du nombre de spermatozoïdes (150mGy), cataracte (0,5 Gy), lésions cutanées (1Gy) et décès (à partir de 15 Gy) [96].

- Les effets stochastiques ou aléatoires surviennent sans effet de seuil. La gravité de la pathologie n'est pas liée à la dose absorbée. Ils surviennent à plus long terme (quelques années à quelques dizaines d'années après l'exposition). Ces effets sont principalement représentés par l'induction de cancers chez l'Homme ou l'animal dont la fréquence d'apparition augmente avec la dose. Concernant les altérations ciblant les cellules germinales, si celles-ci survivent et que les mutations n'empêchent pas la fécondation et le développement embryonnaire, les anomalies génétiques pourraient être transmises à la descendance et causer éventuellement des pathologies/dysfonctionnements héréditaires [97]. Cependant, de tels risques n'ont été montrés que dans quelques modèles animaux, ils n'ont jamais été mis en évidence dans les populations humaines exposées telles que les études réalisées sur les enfants des survivants des bombardements d'Hiroshima et Nagasaki [98] ou de l'accident de Tchernobyl [99].

Concernant le risque de cancer, les études épidémiologiques, comparant des cohortes de sujets exposés et non exposés, mesurent un excès de risque significatif à partir de 100 mGy. En dessous de ce seuil, les études épidémiologiques ne montrent plus d'excès de risque mais pour des raisons de radioprotection/principe de précaution, il est postulé que quelle que soit la dose, le risque existe. Ainsi, aux faibles doses, ce risque est extrapolé à partir du risque observé aux plus fortes doses par différents modèles mathématiques [100]. Les organismes de radioprotection (UNSCEAR : United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation, et ICRP : International Commission on Radiological Protection) retiennent, par prudence, le modèle linéaire sans seuil (LNT : linear nonthreshold) exposant l'hypothèse que les risques sont proportionnels aux doses reçues dès les plus faibles doses, indépendamment du fractionnement de la dose au cours du temps [95, 100]. Ce modèle suscite un débat notamment autour de l'extrapolation faite pour les faibles doses/débit de doses. En effet, la réponse aux radiations ionisantes peut être différente selon la nature du rayonnement, du type d'exposition (fractionnée ou non), de l'âge à l'exposition, du type de tissu irradié et du sexe. Une étude rassemblant les données sur l'incidence de la leucémie chez les survivants de la bombe atomique d'Hiroshima suggère plutôt un modèle linéaire avec un seuil (500 mSv) en dessous duquel il n'y aurait pas de risque de leucémie [101], et que le modèle LNT pourrait dans certains cas surestimer le risque, confortant dans un sens sa pertinence en radioprotection mais montrant sa limitation à appréhender correctement le risque aux faibles doses

d'exposition. Plusieurs modèles ont donc été proposés dans la littérature pour répondre à ces différents paramètres (Figure 8) [102]. Nous devons aussi mentionner que quelques études montrent que de faibles doses auraient des effets bénéfiques sur l'organisme (modèle hormesis) tels que le renforcement du système immunitaire ou l'augmentation de l'activité des antioxydants [103].

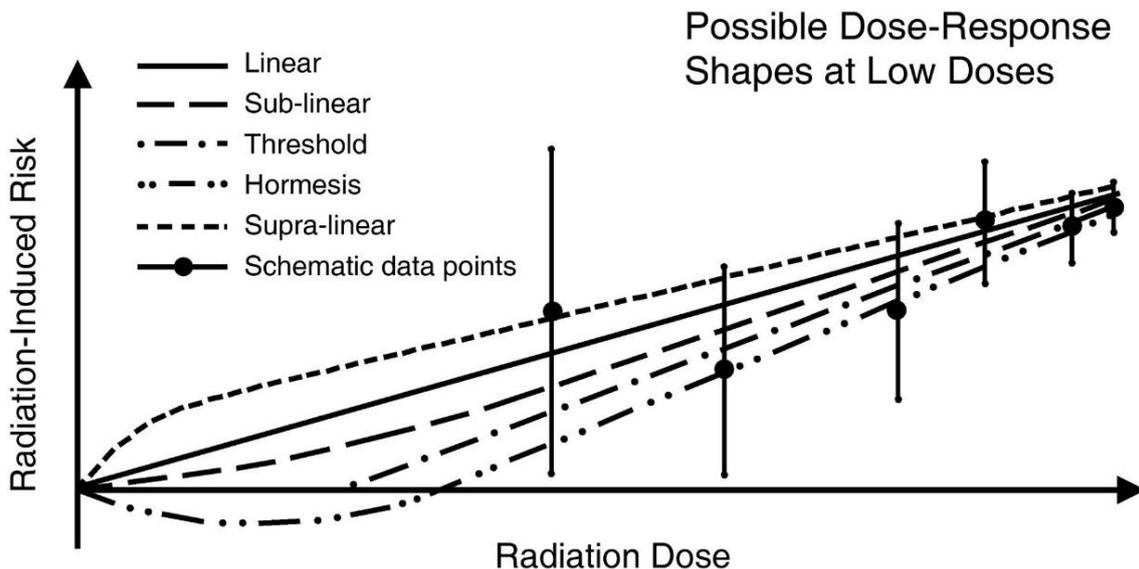


Figure 8 : Courbes dose-réponse modélisant le risque de cancer en fonction de la dose pour les faibles doses d'exposition.

Ces courbes représentent les différentes modélisations pouvant estimer le risque de cancer radio-induit suite à une exposition aux faibles doses, dont le modèle linéaire sans seuil ou LNT (linear), le modèle avec seuil (threshold), et le modèle hormesis dans lequel il y aurait des effets bénéfiques sur l'organisme en dessous d'un certain seuil. (Figure d'après Boice Jr [102]).

4) Cancers de la thyroïde et radiations ionisantes

Le seul facteur étiologique connu pour le cancer de la thyroïde est une exposition aux radiations ionisantes durant l'enfance à une dose reçue à la thyroïde d'au moins 100mGy [104, 105]. La première étude établissant la relation de cause à effet entre une exposition aux RI et un risque de cancer de la thyroïde a été publiée en 1950. Cette dernière porte sur une cohorte d'enfants et d'adolescents de moins de 18 ans ayant développé un cancer de la thyroïde secondairement à une radiothérapie au thymus entre 4 et 18 mois après la naissance [106]. Par la suite, de nombreuses études épidémiologiques ont confirmé la relation entre une exposition pendant l'enfance (exposition externe ou contamination par les iodes radioactifs) et l'excès de cancers de la thyroïde observé dans la population : suivi des cohortes d'Hiroshima/Nagasaki [107-109], de patients traités par radiothérapie pendant l'enfance pour une maladie bénigne ou un premier cancer [109-113], ou de cohortes post-Tchernobyl [114-117].

Un excès de risque significatif est observé à partir de 100 mGy dans les études épidémiologiques, notamment dans une analyse groupée sur 7 cohortes publiées

d'individus exposés par irradiation externe (4 cohortes de patients traités par radiothérapie pendant l'enfance, 1 cohorte d'enfants exposés lors des bombardements atomiques en 1945 au Japon et 2 cohortes contrôles) [109]. Cette même équipe, en augmentant le recrutement des patients à 9 puis 12 cohortes représentant les plus importantes méta-analyses à ce jour, a mesuré un risque significatif dès 50mGy [118, 119]. L'excès de risque augmente proportionnellement à la dose d'irradiation reçue à la thyroïde jusqu'à 4 Gy et se stabilise jusqu'à 30 Gy, puis diminue en restant significatif jusqu'à environ 50 Gy [119].

L'excès de risque de développer un cancer de la thyroïde est observé au plus tôt environ 5-10 ans après exposition [109, 120]. En particulier après l'accident de Tchernobyl, les premiers cas de cancers de la thyroïde ont été observés chez des enfants à Minsk (Biélorussie) et Kiev (Ukraine) en 1990, 4 ans après l'accident [78]. L'excès de risque est maximal 20-35 ans après exposition pour décroître ensuite mais, parmi les survivants des bombardements sur Hiroshima et Nagasaki, un excès de risque est toujours présent 60 ans après exposition [121].

Actuellement, pour les plus faibles doses (<50-100mGy), l'épidémiologie conventionnelle ne peut pas répondre aux interrogations sociétales sur les risques liés aux faibles doses de RI délivrées suite à l'utilisation croissante de l'imagerie médicale en particulier pour les enfants, aux essais nucléaires, à l'accident de Tchernobyl et ses effets en Europe de l'ouest ou à l'accident de Fukushima. En effet, comme mentionné précédemment, une augmentation des cancers de la thyroïde est observée partout dans le monde, et en particulier en France où il a été décrit que le taux moyen d'augmentation annuel était de 7,8 % chez les hommes et de 7,2 % chez les femmes sur la période 1985-2010 [44]. Alors que cette augmentation a commencé avant l'accident de Tchernobyl et qu'elle est principalement due au dépistage des pathologies thyroïdiennes, les retombées de Tchernobyl en Europe occidentale sont encore associées à l'augmentation des cancers de la thyroïde dans la population. Cependant, les enfants de France (âge = 1 an) ont reçu une dose thyroïdienne moyenne de 2,1 mGy (pour 750 mGy en Biélorussie) [122]. Or, à de si faibles doses, si des cancers se développent en étant associés à l'exposition, ils surviendront à une très faible fréquence, ce qui n'est pas compatible avec l'excès de cancers observé dans la population.

5) Les marqueurs d'étiologie du cancer de la thyroïde

Les cancers de la thyroïde radio-induits, comme les cancers sporadiques, sont majoritairement des PTC, mais des FTC ou des formes bénignes (adénomes

folliculaires thyroïdiens ou FTA) sont également diagnostiqués. Les tumeurs radio-induites ont les mêmes caractéristiques cliniques et les mêmes caractéristiques histologiques que des cancers sporadiques [123, 124]. Après l'accident de Tchernobyl, une forte fréquence de variants folliculaires des PTC (FvPTC) a été détectée qui a d'abord été attribuée à l'exposition. Mais il a été montré que cette augmentation est due à la carence en iode des populations autour de Tchernobyl et est également observée dans des populations carencées non exposées [125]. La carence en iode et la consommation par les enfants de produits laitiers contaminés par l'iode 131 a également entraîné le développement de tumeurs radio-induites avec une plus courte latence (4-5 ans) que ce qui avait été observé dans les cohortes post-radiothérapie (10-15 ans), et ces cancers pédiatriques avaient, comme les cancers pédiatriques sporadiques, un comportement plus agressif que les PTC se développant chez l'adulte [125].

Des analyses de cohortes post-Tchernobyl ont décrit que la nature et la fréquence des altérations telles que des mutations ponctuelles des gènes BRAF, des réarrangements chromosomiques RET/PTC1 et RET/PTC3, diffèrent entre les tumeurs radio-induites. Néanmoins, la fréquence à laquelle elles sont observées varie en fonction de l'âge au moment de l'exposition [126], du temps de latence pour le développement de la tumeur [127, 128], et de la dose reçue [129]. En outre, des analyses génomiques ont montré des variations du nombre de copies (gains ou pertes) de régions de l'ADN de manière fréquente mais non spécifique [130, 131].

Donc, ni l'apparition de FvPTC, ni l'agressivité des tumeurs, ni les variations de fréquence des différentes formes de RET/PTC ou des altérations génomiques détectées dans les tumeurs radio-induites ne peuvent être associées à la seule exposition aux RI.

Pour mieux comprendre les spécificités des tumeurs radio-induites en comparaison des tumeurs sporadiques, plusieurs équipes ont analysé les altérations géniques [130-133], le protéome [134, 135] et le transcriptome [133, 136-141] des tumeurs de la thyroïde radio-induites et les ont comparés avec ceux des tumeurs sporadiques.

Concernant les analyses sur les protéines, aucune n'a réussi à identifier des marqueurs spécifiques de l'exposition dont une étude qui a testé si l'on pouvait différencier, par immunohistochimie, des PTC radio-induits post-radiothérapie et des PTC sporadiques à partir de l'expression de protéines régulatrices du cycle cellulaire (cycline A, B1, D1, E, et Ki67) et de la longueur des télomères mais leurs résultats n'ont pas été concluants [135]. Toutefois, une autre analyse, par immunohistochimie, a permis d'identifier 6 protéines (des métalloprotéinases des cathepsines et NTKR1 (neurotrophic tyrosine kinase receptor 1)) capables de classer des PTC post-Tchernobyl et des PTC sporadiques mais ces marqueurs n'ont pas été testés de manière robuste, en aveugle, et sur d'autres contextes d'exposition aux RI [134].

Des analyses transcriptomiques ont été réalisées sur des séries de tumeurs développées chez des enfants Ukrainiens et Biélorusses vivant à proximité de la centrale de Tchernobyl en 1986 en comparaison de tumeurs sporadiques. En fonction des études, les données ne trouvaient pas de signature [136], alors que d'autres en suggéraient une [133, 137, 138, 141].

Le fait d'identifier ou pas des signatures relève en partie, d'une part, de la taille des cohortes et, d'autre part, d'un problème méthodologique pour explorer les données omiques : les séries analysées étaient petites, et les méthodes d'analyses bio-informatiques habituelles utilisées sont plutôt adaptées à de grandes séries de données. De plus, les séries incluaient des tumeurs radio-induites et sporadiques qui n'étaient pas forcément équilibrées au niveau de l'âge. Certaines séries incluaient des patients exposés ukrainiens et des tumeurs sporadiques de patients français [136, 137, 141]. De plus jusqu'en 2012, l'estimation de la dose reçue à la thyroïde n'était pas disponible pour les patients de Tchernobyl.

De fait, après avoir développé une méthode adaptée à l'analyse de petites séries de tumeurs [141], notre équipe a comparé le transcriptome de tumeurs sporadiques, avec d'une part, le transcriptome de tumeurs de la thyroïde développées chez des patients ayant eu une radiothérapie pendant l'enfance (irradiation externe à 12-43Gy/ fort débit de dose) [140] et, d'autre part, de tumeurs post-Tchernobyl (contamination aux iodes radioactifs à des doses allant de 14mGy à 2,5Gy/plus faible débit de dose), avec une ré-analyse des données de puces publiées par l'équipe de C. Maenhaut [141]. Deux signatures transcriptomiques de 322 et 106 gènes ont été identifiées : elles discriminent les tumeurs sporadiques des tumeurs post-radiothérapie et post-Tchernobyl, respectivement [140, 141]. Ces deux signatures ont permis de prédire avec plus de 90% de fiabilité, par une validation en aveugle, l'étiologie de séries indépendantes de tumeurs sporadiques et post-radiothérapie ou post-Tchernobyl, respectivement [140, 141]. L'équipe de C. Maenhaut, qui avait analysé des séries de tumeurs post-Tchernobyl (dont celle ré-analysée par le laboratoire) avec des méthodes d'analyses bio-informatiques non adaptées aux petites séries, n'avait pas trouvé de signatures en comparant une première série de tumeurs post-radiothérapie et post-Tchernobyl avec des tumeurs sporadiques mais les avait séparé en fonction de l'étiologie en utilisant une signature de stress oxydant (lymphocytes exposés au peroxyde d'hydrogène/lymphocytes témoins) [136], ou avait trouvé des signatures peu robustes [137]. De fait, les deux signatures de 322 et 106 gènes incluent bien une composante de stress oxydant [142].

Comme les deux signatures de 322 et de 106 gènes ont été identifiées avec des cohortes analysées sur des puces différentes et avec des méthodes de normalisation différentes, l'effet de la dose/débit de dose sur la robustesse de la signature post-radiothérapie à prédire l'étiologie des tumeurs post-Tchernobyl en comparaison de tumeurs sporadiques, et réciproquement, n'a pas pu être rigoureusement évalué. Néanmoins,

5 gènes communs entre les deux signatures et des sous-groupes de chaque signature permettent de classer avec réciprocity les PTC de l'autre série. Ces résultats suggèrent que les tumeurs développées, après une irradiation externe ou après une contamination aux iodes radioactifs, partagent des caractéristiques moléculaires indépendantes de la dose et du débit de dose ce qui les qualifie comme radio-induites en comparaison des sporadiques [143]. Une nouvelle étude intégrant plus de tumeurs analysées dans les mêmes conditions est en cours pour évaluer l'impact de la dose et du débit de dose sur les spécificités des tumeurs radio-induites.

6) Réponse des thyrocytes normaux aux radiations ionisantes : spécificités et radiosensibilité

La réponse des thyrocytes humains normaux à une exposition aux radiations ionisantes est mal documentée [144-147]. Quelques données publiées ont étudié la réponse à l'irradiation sur la lignée humaine Nthy-ori 3-1 considérée comme pseudo-normale (thyrocytes transformés par l'antigène T de SV40) [144, 148]. Néanmoins, cette lignée ne présente pas une activité fonctionnelle similaire à celle des thyrocytes normaux (contrairement à la lignée pseudo normale de rat FRTL-5) [149], du fait d'une très faible expression du NIS, et ne présente pas un caryotype normal [150]. De plus, cette lignée a été obtenue par l'immortalisation de thyrocytes humains par l'antigène T du virus SV40 [151] et, de ce fait, la voie de la réponse majeure à l'irradiation dépendant de p53 est inactivée. [150]. Elle n'est donc pas un modèle pertinent pour analyser la réponse des thyrocytes à un stress génotoxique.

Dans des cultures primaires de thyrocytes et dans des cellules de la lignée Nthyori 3-1, l'équipe de C. Dupuy a montré une augmentation de l'expression de la NADPH oxydase DUOX1 après exposition à une forte dose d'irradiation (10 Gy), associée à une augmentation de la production de H₂O₂ et à des cassures double-brin 7 jours après irradiation [144]. L'hypothèse émise par cette équipe serait que l'irradiation, en dérégulant cette protéine qui est impliquée dans la synthèse des hormones thyroïdiennes dans les thyrocytes exposés, induirait un stress oxydant chronique qui serait à l'origine d'une instabilité génétique et de la carcinogénèse radio-induite. Cette hypothèse doit être néanmoins validée à des doses d'irradiation plus faibles, sans effet majeur sur la survie des cellules et dans des conditions physiologiques proches de la thyroïde humaine normale.

Des études de la réponse du tissu thyroïdien normal ou prélevé chez des patients atteints de la maladie de Graves-Basedow et greffé dans des souris C.B17-scid/scid [145] ou dans des souris C57BL/6J-scid/scid [146] ont montré, après irradiation, 1) l'induction de mutations génétiques dans les gènes codant pour les protéines P53 et c-

kit, qui sont aussi retrouvées dans des cancers de la thyroïde développés après exposition aux RI à des doses supérieures à 24 Gy (rayons X) et 11 Gy (rayons γ) [145], et 2) l'augmentation de l'expression de gènes, connus comme étant impliqués dans la réponse cellulaire, 2 semaines après exposition aux neutrons à 0,4 et 0,6 Gy [146]. Cependant, ces études comportent des biais : tissus pathologiques, irradiations séquentielles avant la greffe et après la greffe pendant le stress hypoxique, dû au délai de la revascularisation du greffon.

La glande thyroïde est le tissu le plus sensible à l'induction de cancers après exposition aux RI pendant l'enfance. Pourquoi cette spécificité ? Pendant l'enfance, les thyrocytes différenciées prolifèrent (contrairement à une division tous les 8 ans chez l'adulte), les rendant plus sensibles aux effets mutagènes des rayonnements ionisants [152]. Alternativement, les lésions se produiraient dans les cellules souches thyroïdiennes, et pourraient être liés au développement de cancers [65].

L'analyse de la réponse de la thyroïde normale aux RI dans les modèles murins n'est pas informative pour comprendre la radiosensibilité et la carcinogénèse thyroïdienne radio-induite chez l'Homme. En effet, alors que la fréquence de cancers augmente avec l'âge chez l'homme et après exposition, les souris ne développent quasiment pas de cancers de la thyroïde spontanés ou induits après irradiation. De plus, les quelques tumeurs qui se développent après une exposition aux RI sont principalement des cancers folliculaires alors qu'ils sont majoritairement papillaires chez l'Homme [153]. Les mécanismes de carcinogénèse sporadique et radio-induite chez la souris ne sont donc pas transposables à l'humain.

Ainsi, pour comprendre les mécanismes de la réponse à l'irradiation du tissu thyroïdien normal, et en particulier pour analyser les effets de la dose et du débit de dose sur les mécanismes de la transformation maligne, il est absolument nécessaire de mettre en place des modèles permettant de travailler sur du tissu thyroïdien normal humain.

IV) Modèles du tissu thyroïdien normal dans la littérature

Afin de pouvoir analyser la réponse à l'irradiation et comprendre les premières étapes de la carcinogénèse radio-induite, le modèle idéal, pour représenter le mieux possible le tissu normal *in vivo*, repose sur le maintien durant plusieurs mois/années de :

- L'organisation et la complexité tissulaire
- La différenciation et la polarité des thyrocytes
- L'activité fonctionnelle incluant la captation de l'iode et la synthèse des hormones thyroïdiennes

Dans cette quatrième partie, je vais présenter les principaux modèles de tissu thyroïdien normal décrits dans la littérature : les cultures primaires de thyrocytes, les modèles de culture tridimensionnelle (3D) *in vitro* et les xénogreffes chez la souris, en décrivant le principe de chacun avec leurs avantages et leurs inconvénients.

1) Culture primaire de thyrocytes normaux (culture 2D)

Les cultures primaires de thyrocytes ont été développées à partir de biopsies de souris, de rat, de porc, de mouton et d'Homme [149, 154, 155]. Elles ont permis de commencer à comprendre les mécanismes de la physiologie de la thyroïde normale. Néanmoins, en monocouche, les thyrocytes ne présentent pas de polarisation véritable et la thyroglobuline est sécrétée dans le milieu.

La culture primaire de thyrocytes nécessite, comme toutes les cultures primaires, la présence de facteurs spécifiques dans le milieu (Tableau 2). Pour optimiser la culture primaire de thyrocytes humains et mieux stabiliser la différenciation au cours du temps, l'équipe de Bravo et coll. a modifié les conditions de cultures initialement utilisées pour la lignée de thyrocytes immortalisée de rat FRTL-5 (milieu 5H) [149], notamment en ajustant la composition des éléments du milieu de culture et/ou leurs concentrations pour certains, pour les adapter aux constantes humaines (milieu h7H : humanized 7 homeostatic additive) (Tableau 2) [156]. Ainsi, cette étude montre que le phénotype et l'expression des ARNm (RT-PCR) des marqueurs de différenciation (TTF1 et PAX8) sont conservés sur une quinzaine de passages. Une autre étude réalisée par Wang et coll. [157] a permis de montrer l'efficacité du milieu h7H, en comparaison d'un autre milieu (milieu 6H), pour maintenir une culture primaire de thyrocytes humains *in vitro*. Ils ont contrôlé la morphologie des cellules par microscopie ainsi que l'expression des marqueurs de la différenciation thyroïdienne (PAX8, TTF1, FOXE1, NIS, TG, TPO et TSHR) par RT-PCR au cours du temps. Jusqu'aux deux premières semaines de culture, les thyrocytes sont arrondies et étalées. Par la suite, les cellules s'allongent et se rapprochent plus de la forme de fibroblastes, et leur vitesse de prolifération augmente. A trois semaines de culture, l'expression des marqueurs de

différenciation est encore maintenue mais est diminuée voire nulle pour certains (TSHR et TPO) à six semaines de culture [157].

	Dosage sanguin humain normal	Milieu 5H	Milieu h7H (Bravo)	Milieu h7H modifié (Bravo)	Milieu h7H (Wang)	Milieu 6H (Wang)
Milieu de base	/	Ham's F-12, Coon's Modification				
Na bicarbonate	1.65g/L	/	2.68g/L	1.68g/L	2.68g/L	2.68g/L
TSH	0.4 to 2.5 mIU/L	10IU/L	40mIU/L	40mIU/L	40mIU/L	10IU/L
Na iodide	0,4 à 5 µg/L	/	10µg/L	10µg/L	10µg/L	/
Na selenite	92 - 125 µg/L	/	75µg/L	75µg/L	75µg/L	/
L-Glutathione red	0,3g /L	/	0.2mg/L	0.2mg/L	0.2mg/L	/
Somatostatin	25 ng/L	10ng/ml	50ng/L	50ng/L	/	10ng/mL
GH	3 - 5 µg/L (20µg/L chez l'enfant)	/	0.2µg/L	0.2µg/L	0.2µg/L	/
(+)-Na L-ascorbate (15mg/l dans le Ham's F-12, Coon's Modification)	6-20mg/L	/	1mg/L	1mg/L	/	/
Hydrocortisone	5-50nM (forme libre à 8h du matin)	10nM	23nM	23nM	23nM	1nM
Apo-transferrin	2 à 4 g/L	/	5mg/L	1mg/L	1mg/L	/
Insulin	25 mU/L à jeun	12U/L	25mU/L	12,5mU/L	25mU/L	10 U/L
Transferrin	2 à 4 g/L	5µg/mL	5mg/L	/	/	5µg/mL
(±)-α-Tocopherol	4,3 à 13,3 mg/L (toutes les formes d'α-tocophérol)	/	0.2mg/L	0.5mg/L	0.2mg/L	/
DL-α-Tocopherol acetate	1mg/L	/	0.2mg/L	0.5mg/L	0.2mg/L	/
Serum de veau fœtal (SVF) et/ou Sérum de veau nouveau-né (SVN)	/	0.1-0.5% SVF	5% SVF + 5% SVN	5% SVF + 5% SVN	5% SVF	5% SVN

Tableau 2 : Composition des milieux de culture utilisés pour des thyrocytes de rats (5H) et humains (h7H et 6H).

Parmi ces constituants, on retrouve des hormones (TSH, somatostatine, insuline, hydrocortisone ou cortisol), des antioxydants (Na L-ascorbate ou vitamine C, +/- α-Tocopherol, DL- α-Tocopherol acetate, L-Glutathione), des oligo-éléments essentiels pour la fonction thyroïdienne (iode et sélénium), la transferrine qui est le transporteur du fer et l'hormone de croissance GH. (Données d'après Ambesi-Impiombato et coll. [149], Bravo et coll. [156, 158] et Wang et coll. [157]).

Bien que ce modèle ne conserve pas la polarité des thyrocytes et la complexité du tissu thyroïdien, il permet néanmoins d'obtenir une culture homogène de thyrocytes normaux, principaux constituants de la thyroïde [1] et à l'origine de la majorité des cancers thyroïdiens [50], avec un protocole et des conditions de mise en culture bien décrits dans la littérature [156] qui permettent d'analyser la réponse aux stress des thyrocytes normaux sur une période de 2-3 semaines. La réalisation de cultures sur des filtres microporeux recouverts de collagène permettrait de restaurer une polarité aux cellules qui resteraient, cependant, cultivées en monocouche [159-161].

2) Cultures 3D

Les modèles 3D ont été développés afin d'obtenir des conditions proches de celles observées *in vivo* telles que l'organisation structurale et les interactions cellulaires. Ces modèles reposent, soit sur la culture de thyrosphères par l'isolement de follicules à partir de biopsies, mais cette méthode ne permet de récupérer que très peu de follicules fermés et fonctionnels [162-164], ou par l'organisation de cellules isolées (cellules souches embryonnaires (ESC : Embryonic Stem Cells), cellules souches pluripotentes induites (IPSC : Induced Pluripotent Stem Cells), cellules différenciées normales, cellules tumorales) en sphéroïdes/organoïdes mimant l'organisation du tissu d'intérêt ou de tumeurs *in vivo*, soit à partir de la mise en culture de biopsies. Ils sont utilisés notamment dans l'étude de la physiologie d'un organe et de ses dysfonctionnements (réponse à un stress), dans la découverte de médicaments ou dans la recherche sur les cellules souches (médecine régénérative) [165, 166].

1. Thyrosphères à partir d'une culture primaire

Ce modèle a pour but de permettre l'organisation des thyrocytes, qui proviennent d'une culture primaire, en structure 3D mimant l'unité fonctionnelle de la thyroïde : le follicule [1, 2]. Deux approches ont été proposées : développement des sphères en milieu liquide ou en matrigel. Pour les thyrocytes normaux, l'organisation de sphères conservant une polarité physiologique nécessite que les cellules soient cultivées dans une matrice extracellulaire (MEC) de collagène ou de matrigel [167-170] car la thyroïde est structurée, entre autres, grâce à une MEC inter-folliculaire [171].

Des thyrosphères ont été obtenues après la dissociation cellulaire de tissu de thyroïde de souris et l'ensemencement des thyrocytes dans du matrigel [172]. Elles ont été maintenues jusqu'à 6 mois en culture avec une structure de follicule thyroïdien comportant des cellules polarisées (Figure 9). De plus, elles ont été injectées dans la capsule sub-rénale de souris NOD/SCID à 7 semaines de culture, et elles maintiennent la capacité de captation de l'iode 4 semaines après la transplantation [172].

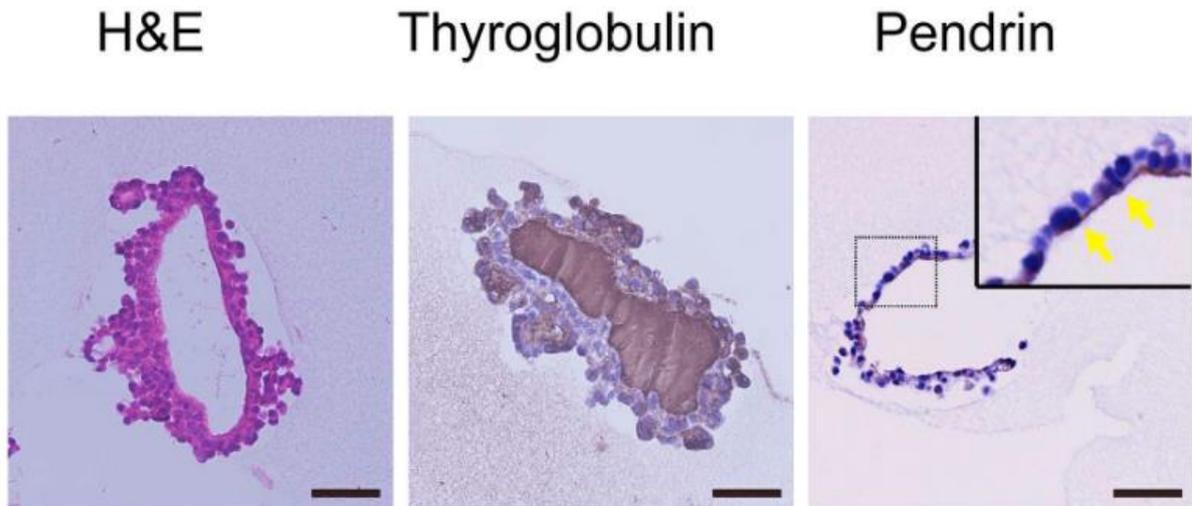


Figure 9 : Thyrosphères mimant le follicule thyroïdien à partir de la mise en culture de thyrocytes de souris.

Ces marquages immuno-histochimiques à la peroxydase montrent que la pendrine est bien localisée sur la membrane apicale en contact du colloïde et que ces sphères englobent la thyroglobuline.

(Figure d'après Saito et coll. [172])

Ces thyrosphères sont constituées exclusivement de thyrocytes. Leur formation repose sur l'agrégation, la prolifération et/ou une plasticité cellulaire des thyrocytes. Il est également possible que des cellules souches, présentes dans les cultures primaires, puissent contribuer au développement de ces thyrosphères. Ces caractéristiques pourraient ainsi mimer le comportement de la thyroïde chez l'enfant.

2. Organoïdes à partir de cellules souches embryonnaires ou de cellules souches pluripotentes induites.

Une autre façon de réaliser des sphères mimant un follicule thyroïdien repose sur l'utilisation de cellules souches embryonnaires ou de cellules souches pluripotentes induites [173].

Ces deux types de cellules sont pluripotentes, c'est-à-dire qu'elles peuvent se différencier en n'importe quel type de cellules de l'organisme [174].

Les ESC sont mises en culture à partir d'un embryon [175]. Chez l'humain, elles sont obtenues avec un embryon surnuméraire provenant d'une procréation médicalement assistée, d'où une utilisation de ces cellules en recherche qui est soumise à la loi de bioéthique [176].

Les iPSC ont les mêmes caractéristiques que les ESC, mais elles sont obtenues par une reprogrammation génétique de cellules adultes différenciées (cellules sanguines, fibroblastes de la peau, cellules épithéliales ou cellules mésenchymateuses adultes) [177]. Yamanaka et coll. ont réussi à induire des cellules souches pluripotentes à partir

de fibroblastes murins [178] et humains [179] adultes par transfection, avec des vecteurs rétroviraux exprimant les quatre facteurs de transcription (Oct4, Sox2, Klf4 et c-Myc) connus pour maintenir la pluripotence des cellules souches embryonnaires [180-183]. L'inconvénient est que les rétrovirus s'intègrent dans le génome de la cellule, entraînant un risque de mutation et d'expression prolongée de ces gènes pouvant provoquer une transformation maligne notamment avec l'oncogène c-Myc [184]. D'autres moyens de transférer et d'exprimer les facteurs de transcription, comme les plasmides [185], les vecteurs adénoviraux [186] ou la modification de ces facteurs de transcription pour qu'ils soient capables de traverser la membrane plasmique (protéines recombinantes) [187], ont été mis au point mais sont généralement associés à une faible efficacité de reprogrammation [177].

Des ESC ou des iPSC peuvent être amenées à se (re-)différencier par des protocoles complexes de cultures séquentielles avec différents cocktails spécifiques de facteurs de croissance, ou par la surexpression de facteurs de différenciation, à l'aide de lentivirus, pour passer de cellules pluripotentes vers des progéniteurs intermédiaires multipotents, puis développer des organoïdes représentatifs d'un organe d'intérêt (exemples : cerveau, poumon, estomac, intestins, foie, rein) [188].

De telles approches ont été réalisées pour obtenir des organoïdes thyroïdiens à partir d'ESC ou d'iPSC d'humains ou de souris. Un cocktail de facteurs de croissance, incluant BMP4 et FGF2 sur des ESC et des iPSC murins, induit des cellules exprimant TTF1 et PAX8, et qui sont capables de former des thyrosphères dans du matrigel en présence de TSH [189, 190]. La surexpression des facteurs de différenciation PAX8 et TTF1 est suffisante pour induire le programme de différenciation d'iPSC humaines en thyrocytes capables de générer des organoïdes pouvant capter de l'iode [191].

Ces approches ont permis de commencer à comprendre les mécanismes de différenciation des cellules souches en thyrocytes. En comparaison des protocoles utilisés pour obtenir des thyrosphères à partir des cultures primaires en matrigel, les protocoles utilisant des cellules souches sont complexes et nécessitent une grande expertise ainsi qu'un coût et une durée, pour l'obtention des cultures, plus élevés.

3. Cultures organotypiques

La culture organotypique est un modèle 3D consistant à mettre en culture des fragments d'organes, ce qui permet de conserver la structure thyroïdienne et, dans une certaine mesure, une complexité tissulaire. Toda et coll. ont mis au point un modèle de culture organotypique de thyroïde de porc dans un environnement combinant une

MEC et une exposition à l'air, ce qui favorise l'oxygénation et le maintien du tissu en comparaison d'une culture en collagène recouvert de milieu de culture [192] (Figure 10).

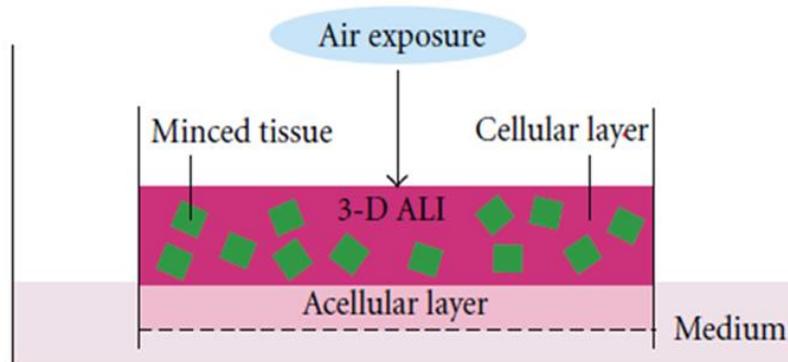


Figure 10 : Modèle de culture organotypique en matrigel selon Toda et coll.

Les fragments de tissu thyroïdien de porc sont intégrés dans un gel de collagène placé dans un insert de culture qui est disposé dans un puit de plaque de culture contenant du milieu de manière à ne pas submerger les fragments.

Cette approche a permis le maintien de la complexité tissulaire, au moins au cours des 7 premiers jours de culture, le réseau capillaire disparaissant progressivement au sein des fragments de tissu en raison de la nécrose des cellules endothéliales [193]. Les cellules C sont conservées sur une période d'au moins 40 jours [192] mais ne montrent aucune capacité de prolifération, même avec la stimulation de plusieurs concentrations de calcium libre [193]. Les analyses immunohistochimiques montrent la présence de thyroglobuline dans les follicules, et l'expression de TTF1, de la pendrine et du récepteur de la TSH dans les thyrocytes. Les cellules C présentent un marquage positif pour la calcitonine [192].

Ce protocole de culture a permis d'observer une folliculogenèse thyroïdienne, en périphérie des fragments, due à la prolifération des thyrocytes dans cette zone. Aucune régénération n'est observée dans la zone centrale [193]. Ils proposent deux théories possibles expliquant ce phénomène (Figure 11) [194] : 1) la densité plus élevée au centre empêcherait la régénération folliculaire dû à l'inhibition de contact et la densité moins élevée en périphérie supprimerait cette contrainte, et 2) la formation d'un microenvironnement au sein d'une « niche » de follicules matures en zone centrale inhiberait la folliculogenèse que l'on ne retrouverait pas en périphérie.

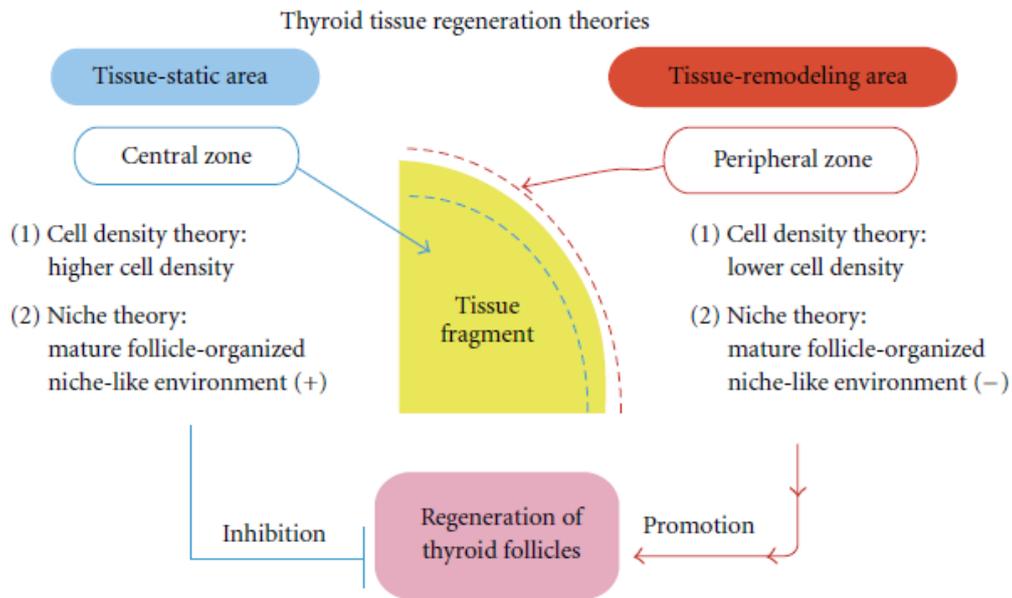


Figure 11 : Théories expliquant la folliculogénèse dans un fragment en culture organotypique. (Figure d'après Toda et coll. [194]).

Alternativement, les biopsies, dont la culture et le maintien ne dépendent pas comme pour les sphères d'une MEC, peuvent être cultivées directement sur une membrane microporeuse flottant dans le milieu, comme montré dans l'étude de Hick et coll [195]. Ce protocole pourrait améliorer d'avantage l'oxygénation du tissu que dans le modèle de Toda et coll., qui permet d'ores et déjà la maintenance de tissu thyroïdien normal de porc sur une période de 1-2 mois.

4. Co-cultures

La thyroïde est très vascularisée et l'étude réalisée par Hick et coll., mentionnée ci-dessus, montre que des cellules endothéliales contrôleraient la folliculogénèse et la différenciation des cellules C au cours de la morphogénèse thyroïdienne chez la souris. En effet, le recrutement des cellules endothéliales s'opère par une sécrétion paracrine de VEGF-A (Vascular Endothelial Growth Factor-A) par les thyrocytes, ce qui permet la formation des vaisseaux sanguins autour et à l'intérieur de la thyroïde [195].

Une autre étude montre que la leptine sécrétée par des adipocytes régule la morphologie des thyrocytes, inhibe leur apoptose, favorise la polarisation ainsi que l'expression de la thyroglobuline et de PAX8 [196].

Éventuellement, la co-culture avec des cellules endothéliales et/ou des adipocytes pourraient permettre de mieux stabiliser aussi bien les thyrosphères que les cultures organotypiques.

5. Xénogreffes chez la souris immunodéficiente

Ce modèle consiste à utiliser des souris immunodéprimées (par exemple, SCID : Severe Combined ImmunoDeficiency ou NSG : NOD SCID gamma) afin de pouvoir greffer et maintenir sur une longue période des biopsies de thyroïde humaine normale. L'équipe de Fukuda a greffé et maintenu du tissu humain normal pendant 3 ans dans des souris C.B17-scid/scid. Lorsque la souris mourrait (vie d'une souris environ 2 ans), les fragments étaient transplantés dans une autre souris. Ils ont observé une conservation de la morphologie, par des études histologiques, sur 3 ans, une captation de l'iode par le tissu greffé 3 mois après la greffe, ainsi qu'une sécrétion de l'hormone thyroïdienne T3 suite à une stimulation par injection de TSH humaine deux mois après la transplantation [197].

Une autre équipe a maintenu morphologiquement, environ 10 mois, du tissu de goitres adénomateux humains dans des souris NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Sug/Jic (NOG) [198]. D'un point de vue fonctionnel, les follicules étaient composés de colloïde contenant de la thyroglobuline et les thyrocytes exprimaient la TPO.

Ce modèle a été utilisé pour analyser la réponse du tissu thyroïdien humain, normal ou provenant de patients atteints de maladie de Graves, dans des souris C.B17-scid/scid à des expositions fractionnées de rayons X ou de rayons gamma pendant 2 ans (Figure 12). A fortes doses et fort débit de dose (24 Gy et 11 Gy à 1,19 Gy/min), ils ont observé les mutations génétiques retrouvées habituellement dans le cancer de la thyroïde (P53 et c-kit), une dégénération du tissu et une réduction de la sécrétion d'hormones [145].

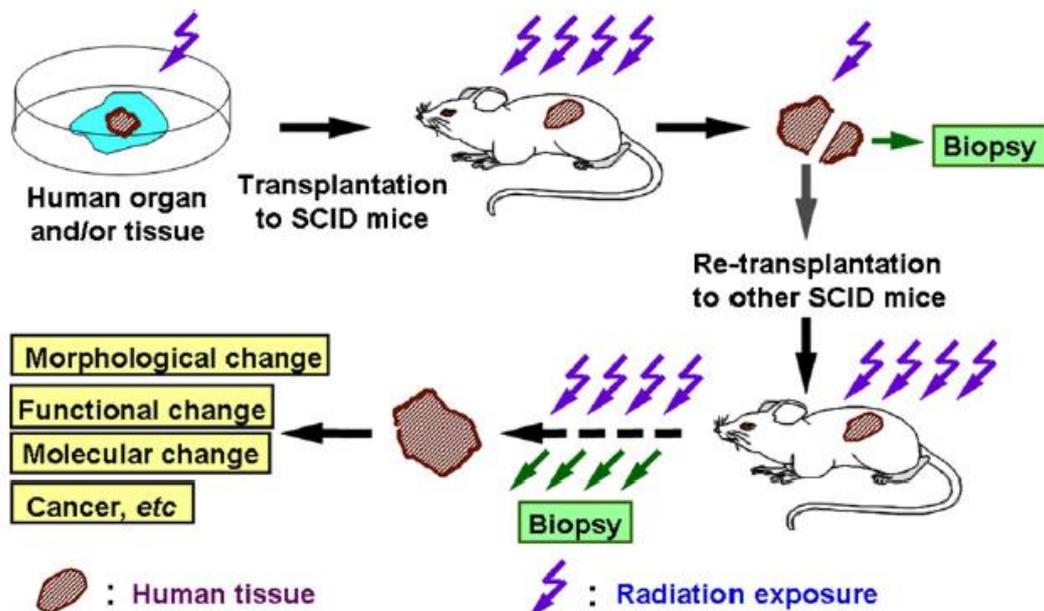


Figure 12 : Modèle expérimental permettant de maintenir des fragments de thyroïde chez la souris SCID sur une longue période.

(Figure d'après Nomura et coll. [145]).

Dans une autre étude, Adachi et coll. ont maintenu du tissu thyroïdien provenant de patients atteints de la maladie de Graves pendant 3 ans avec des souris C57BL/6J-scid/scid. Ils ont observé une transformation des fragments greffés 7 mois après irradiation aux neutrons (0.2-0.6Gy) ou aux gammas (1-3 Gy). De plus, ils ont observé des variations de l'expression de gènes reliés à la réponse cellulaire au stress, l'apoptose et à la transcription spécifiquement en réponse à l'irradiation [146].

Néanmoins, dans ces deux études [145, 146], le tissu a été irradié, soit, juste avant la greffe, soit, juste après la greffe. Ce sont donc des tissus en stress hypoxique (avant la revascularisation du greffon) qui ont été irradiés et donc de nouvelles études sont nécessaires pour analyser réellement la réponse à l'irradiation du tissu normal humain dans ce modèle de xénogreffe.

Ce modèle permettrait d'analyser la réponse à un stress à long-terme, ce qui devrait permettre de vérifier l'hypothèse émise par C. Dupuy concernant la mise en place d'un stress oxydatif chronique [144] à l'origine de la transformation.

V) Projet de recherche et objectifs

L'objectif de ma thèse est d'analyser la réponse à l'irradiation du tissu thyroïdien humain normal, à forts et faibles doses et débits de dose, pour mieux comprendre les mécanismes de la carcinogenèse radio-induite dans la thyroïde chez l'homme et éventuellement identifier des marqueurs précoces de la transformation maligne. En effet, suite à une irradiation reçue par la thyroïde, des cancers peuvent survenir après quelques dizaines d'années. La question est de savoir quelles sont les réponses à court, moyen et long termes suite à une irradiation ?

Pour y parvenir, nous avons développé différents modèles 2D et 3D de thyrocytes/thyroïde à partir de tissu humain normal, qui permettront d'étudier au cours du temps la réponse à l'irradiation. Chacun des modèles présente différents niveaux de complexité se rapprochant de plus en plus du tissu thyroïdien *in vivo* en termes de maintien de la différenciation, de la polarité cellulaire, et de la complexité tissulaire :

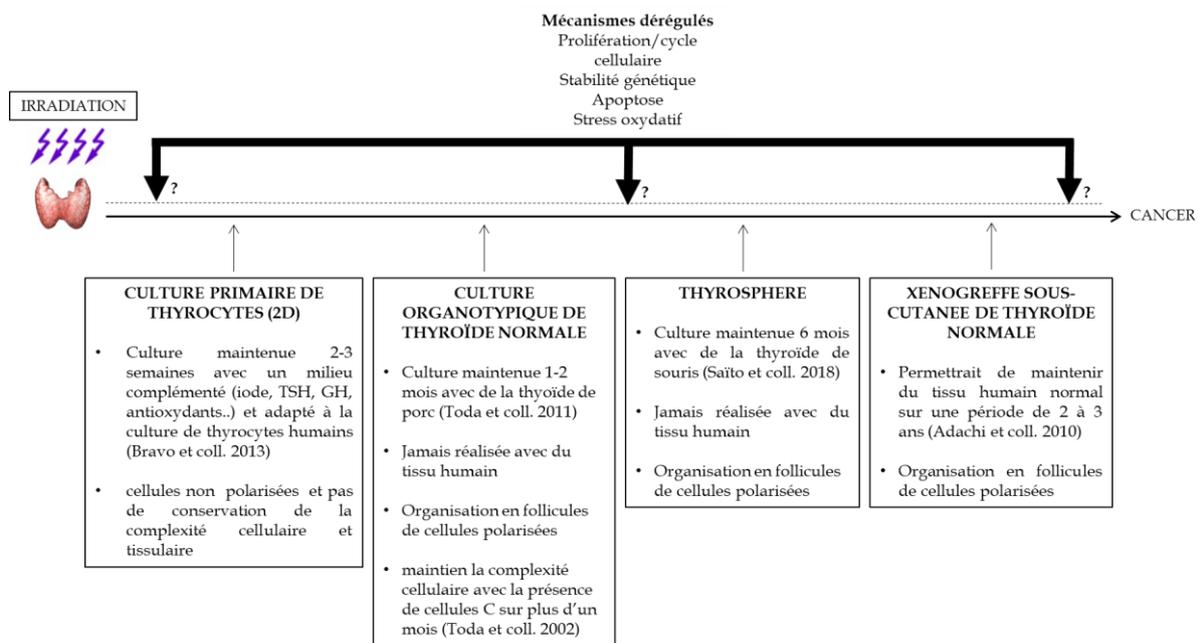


Figure 13 : Présentation théorique des échelles de temps sur lesquels les différents modèles de tissu thyroïdien normal pourraient être maintenus.

La culture 2D (2-3 semaines) et la culture organotypique (1-2 mois) permettraient une analyse de la réponse à l'irradiation à court terme, les thyrosphères (6 mois) à moyen terme et les xéno greffes (2-3 ans) à long terme.

Les modèles développés devraient permettre de combler le manque d'informations sur les mécanismes de la réponse à l'irradiation du tissu thyroïdien normal chez l'Homme, notamment la réponse précoce. De plus, comme expliqué auparavant, la physiologie et la carcinogenèse thyroïdienne sont différentes chez l'homme et les rongeurs donc ces modèles sont essentiels pour analyser l'impact des radiations

ionisantes sur l'Homme, et particulièrement l'effet des faibles doses d'irradiation qui suscitent d'importantes interrogations sociétales.

A l'avenir, nos modèles permettront également d'étudier les effets d'autres facteurs étiologiques suspectés d'induire potentiellement des pathologies thyroïdiennes, tels que les perturbateurs endocriniens (PE) seuls ou en cocktails. L'effet de ces PE sur la radiosensibilité du tissu thyroïdien et sur le risque de développer un cancer après irradiation pourra en particulier être analysé.

VI) Résultats

1) Provenance et contrôle des biopsies de thyroïde humaine normale

Les biopsies de tissu de thyroïde normale sont prélevées sur le lobe non pathologique de la thyroïde de patients ayant subi une thyroïdectomie pour un cancer. Les patients atteints d'une co-pathologie thyroïdienne diagnostiquée (ex : maladie de Graves) sont exclus des prélèvements.

Comme les biopsies de tissu thyroïdien normal prélevées sont adjacentes à du tissu pathologique, nous nous sommes assurés que le tissu utilisé pour les cultures est effectivement histologiquement normal. Une analyse macroscopique du prélèvement est réalisée par les anatomopathologistes pour éliminer immédiatement les biopsies présentant des nodules. De plus, un contrôle histologique après fixation dans du formol, inclusion en paraffine (FFPE) et coloration à l'Hémalum de Mayer/Eosine (H/E), a été réalisé initialement par les anatomopathologistes sur un fragment de la biopsie afin d'exclure les biopsies hyperplasiques et les micronodules, et secondairement au laboratoire sur 2-3 fragments fixés après le transport et juste avant la mise en culture (T0) pour s'assurer du bon maintien du prélèvement. Si le tissu présente une histologie normale validée par les cliniciens, les cultures sont maintenues et des blocs FFPE sont réalisés au laboratoire pour les analyses immunohistochimiques ultérieures.

Idéalement, comme la radiosensibilité est maximum pendant l'enfance, l'analyse de la réponse du tissu normal devrait inclure en priorité des biopsies provenant de patients jeunes (< à 15ans). Néanmoins, la fréquence des cancers de la thyroïde augmente après 40 ans donc la probabilité de récupérer du tissu de patients ayant développé un cancer pédiatrique est très faible. Dans un premier temps, pour la mise au point des modèles, nous avons utilisé des biopsies de patients le plus jeune possible en limitant l'âge maximum de recrutement à 50 ans, la thyroïde humaine montrant des signes de dégénérescence après 60 ans environ [199].

Nous avons mis en place des collaborations avec, d'une part, le centre de lutte contre le cancer Gustave Roussy (Villejuif) (collaboration avec Abir Al Ghuzlan) et d'autre part avec l'hôpital Pasteur de Nice (collaboration avec Sandra Lassalle), ce qui nous a permis d'analyser des biopsies provenant de patients âgés de 17 à 50 ans (35 ans en moyenne).

Tous les patients ont signé un consentement éclairé et les prélèvements sont anonymes. Nous sommes informés uniquement sur l'âge, le sexe et la pathologie liée aux chirurgies.

Les biopsies sont récupérées après avoir été conservées, soit 2-3h dans du milieu de culture h7H (Gustave Roussy), soit 24h dans de l'AQIX RS-I (Life science production) (hôpital de Nice), une solution permettant de maintenir du tissu humain jusqu'à 72h à température ambiante. Ces conditions de transport permettent d'obtenir un excellent maintien du tissu thyroïdien et une très bonne reproductibilité en termes de densité cellulaire par volume de tissu mis en culture (environ 6500 cellules/mm³, en moyenne, à 3-4 jours de culture), de faibles mortalité et prolifération, et de pourcentage de prise de greffe chez la souris (88% en moyenne).

Les prélèvements et les cultures dérivées sont testés pour la présence de mycoplasmes (MycoAlert Mycoplasma Detection Kit, Lonza) et éliminés si une contamination est détectée car elle risquerait de modifier la réponse des thyrocytes en culture 2D ou dans les modèles 3D ce qui constituerait un biais pour l'analyse de la réponse à l'irradiation.

Les biopsies sont découpées en morceaux de 3-4 mm de côté qui sont dissociés par digestion enzymatique (collagénase I et dispase (Gibco - Thermo fisher Scientific) puis par dissociation mécanique (gentleMACS Dissociator, Miltenyi Biotec) pour obtenir une culture primaire de thyrocytes puis éventuellement des thyrosphères après ensemencement dans du matrigel GFR (Growth factor reduced - Corning) au premier passage (2-3 jours après dissociation). Alternativement, les fragments sont directement cultivés en culture organotypique ou greffés chez la souris.

2) Culture primaire 2D de thyrocytes humains normaux

Plusieurs milieux de cultures sont décrits dans la littérature comme permettant de maintenir le niveau de différenciation des thyrocytes humains normaux en culture sur plusieurs semaines (voir paragraphe IV, tableau 2).

Nous avons fait le choix de suivre le protocole de Bravo et coll. [156], en utilisant le milieu h7H, décrit pour maintenir une culture de thyrocytes normaux sur 2-3 semaines par l'analyse de marqueurs de différenciation thyroïdien (RT-PCR, marquages immunohistochimiques, Western blot) et de la morphologie des cellules. Après avoir vérifié le maintien de la différenciation des thyrocytes dans nos cultures : expression de marqueurs de la différenciation thyroïdienne au cours du temps et morphologie des thyrocytes, nous avons analysé la réponse à l'irradiation de nos cultures primaires en fonction de la dose et du débit de dose.

1. Validation du modèle

Nous avons testé l'expression de marqueurs de différenciation de la thyroïde : la co-expression des facteurs de transcription TTF1, PAX8, et FOXE1, ainsi que TG et DUOX1, par un marquage immunocytochimique à la peroxydase. L'expression

nucléaire de PAX8 (ab97477, ABCAM), TTF1 (ab76013, ABCAM) et FOXE1 (ab134129, ABCAM), exprimés en même temps uniquement dans les thyrocytes, est détectée dans plus de 90% de cellules après dissociation, ce qui montre l'homogénéité des cultures. Ce marquage est maintenu pendant deux à trois semaines après mise en culture pour PAX8 et TTF1, ce qui est conforme aux résultats de Bravo et coll. et plus longtemps pour FOXE1 (au moins 38 jours) (Figure 14). Après 2-3 semaines, le niveau d'expression et la proportion de cellules positives dans la culture pour TTF1 et PAX8 diminuent au cours du temps, indiquant une dédifférenciation des cellules.

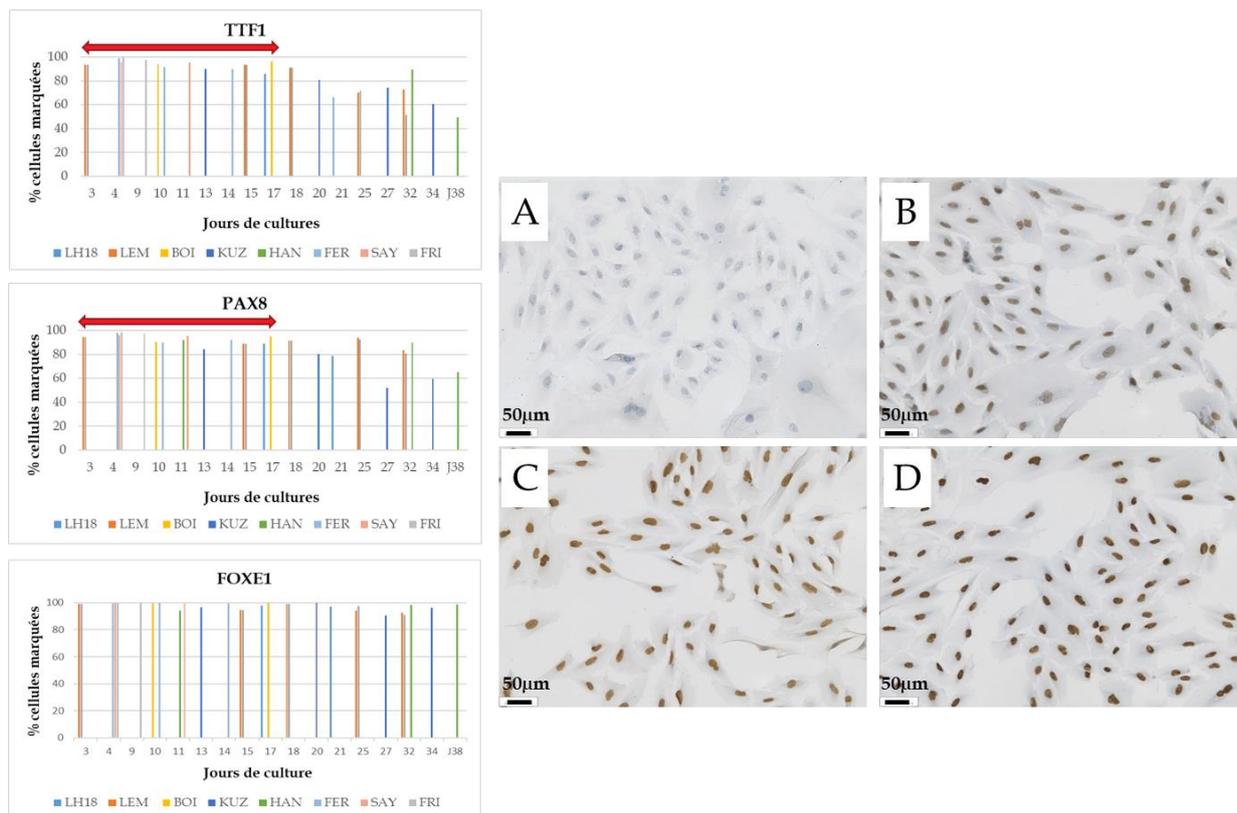


Figure 14 : Expression de PAX8, TTF1 et FOXE1 dans les cultures primaires de thyrocytes normaux en fonction du temps de culture (8 patients).

Les double-flèches rouges indiquent le temps pendant lequel au moins 90% des cellules expriment ces deux facteurs de transcription.

LH18, LEM, BOI, KUZ, HAN, FER, SAY et FRI correspondent aux codes attribués aux patients.

Les marquages immunohistochimiques A, B, C et D ont été réalisés à 17 jours après mise en culture. A : contrôle négatif (anticorps secondaire), B : anticorps anti-TTF1, C : anticorps anti PAX8 et la contre-coloration et D : anticorps anti-FOXE1.

L'expression de la TG (ab156008, ABCAM) et de DUOX1 (HPA023544, SIGMA) est observée dans les premiers jours de culture après dissociation au centre des îlots de thyrocytes. En effet, pour préserver la survie des thyrocytes, la dissociation enzymatique et mécanique n'est pas totale et après dissociation, des thyrocytes isolés ainsi que des fragments d'épithélium folliculaire sont mis en culture. L'expression de la TG dans les îlots présente un effet « miroir » avec l'expression de la cycline D1 (CCND1) (ab134175, ABCAM) en périphérie des îlots : les cellules positives pour la TG

n'expriment pas CCND1 (Figure 15). L'expression de DUOX1 et de la TG diminue significativement au premier passage lorsque les cellules sont complètement dissociées et disparaît totalement après le 2^e passage avec l'augmentation de la prolifération des cellules. De la même manière, l'équipe de Bravo observait des regroupements de cellules formant des structures pseudo 3D dans lesquelles étaient exprimés la TG, le NIS et la TPO, suggérant qu'une forte confluence cellulaire et/ou une organisation pseudo 3D est nécessaire au maintien de ce niveau de différenciation (persistance de la machinerie de synthèse des hormones).

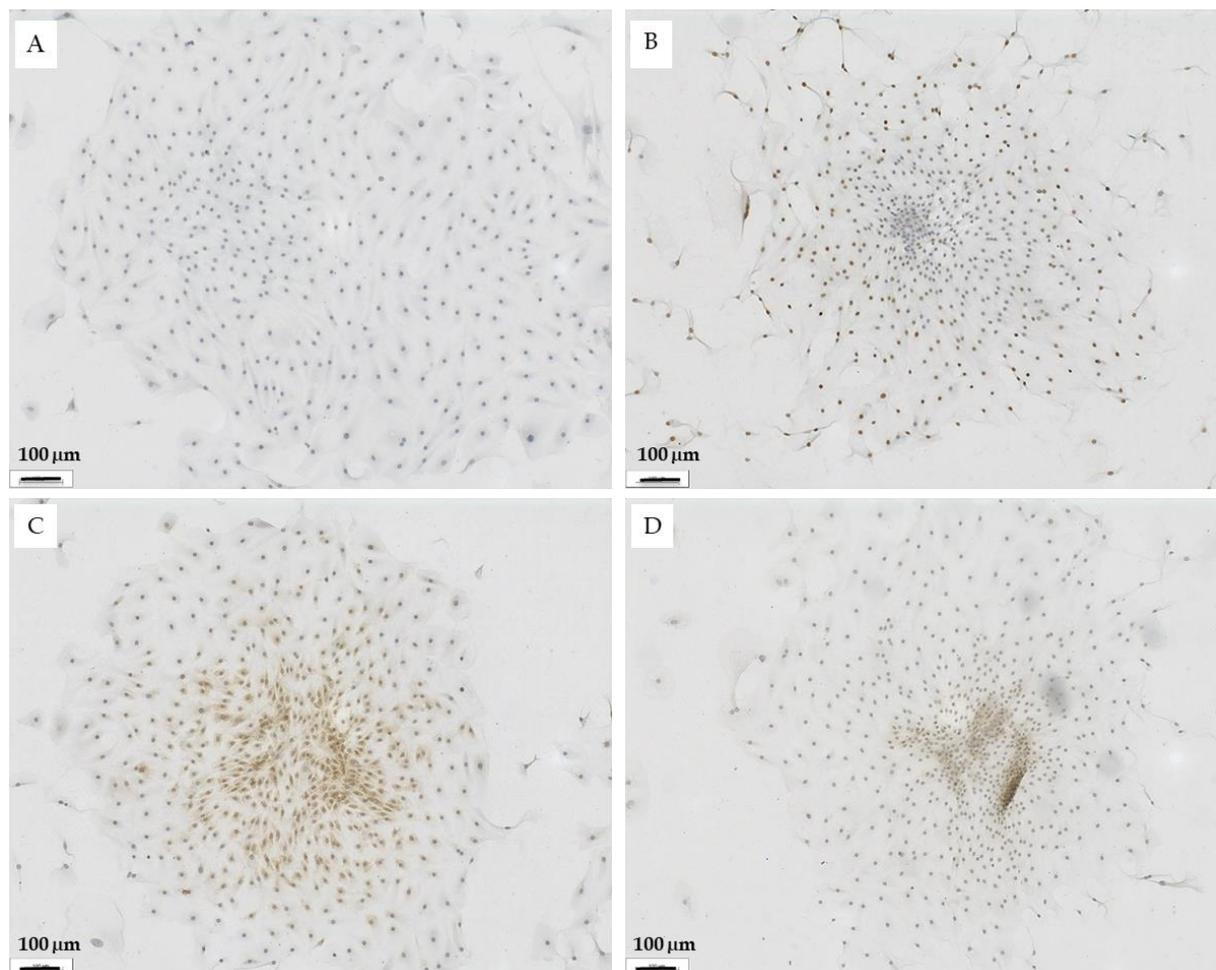


Figure 15 : Expression de la thyroglobuline, de DUOX1 et de la cycline D1 dans les îlots de thyrocytes normaux.

Marquages immunohistochimiques à la peroxydase réalisés à 3 jours de culture.

A : Contrôle négatif (anticorps secondaire) ; B anticorps anti-Cycline D1 ; C : anticorps anti-TG ; anticorps anti-DUOX1.

Comme attendu, le milieu h7H contenant des facteurs de croissance (TSH, insuline et GH) connus pour avoir un effet prolifératif, la mise en culture des thyrocytes induit une reprise du cycle : trois jours après la mise en culture, plus de 80% des cellules expriment la cycline D1 suivie d'un pic de cellules positives pour les cyclines A1 et A2 (ab185619, ABCAM)) (Figure 16). Ces protéines sont synthétisées, respectivement, au

cours de la phase G1 et S du cycle cellulaire. Au cours des passages, les cellules se désynchronisent et continuent à proliférer (46% des cellules positives pour CCND1 en moyenne après deux semaines de cultures), une augmentation de la vitesse de prolifération (le temps de doublement des cultures étant en moyenne de 14 jours en début de culture et d'environ 3 jours au bout de 3 semaines de cultures), en parallèle avec la perte de différenciation décrite ci-dessus.

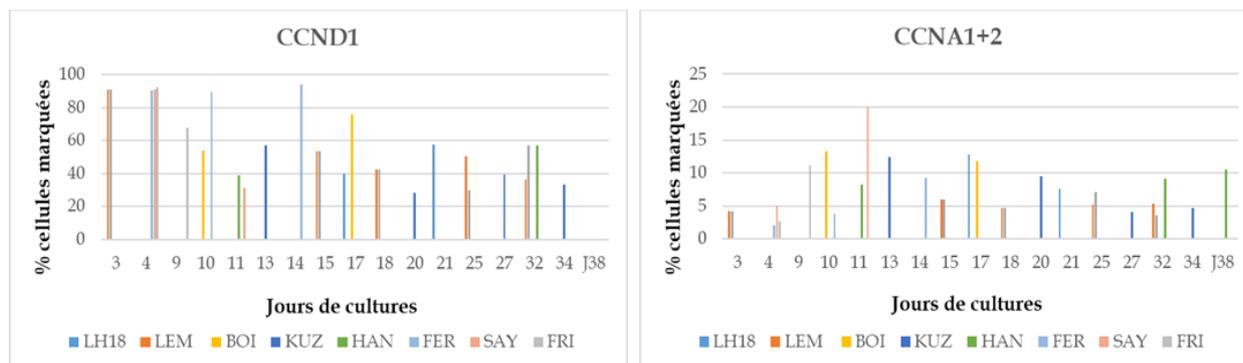


Figure 16 : Expression de la cycline D1 (phase G1) et des cyclines A1+A2 (phase S) dans les cultures primaires de thyrocytes normaux en fonction du temps de culture (8 patients).

LH18, LEM, BOI, KUZ, HAN, FER, SAY et FRI correspondent aux codes attribués aux patients.

La prolifération et la dédifférenciation des cellules s'accompagne d'un changement de la morphologie des thyrocytes qui passent d'une forme étalée à une forme plus allongées (Figure 17).

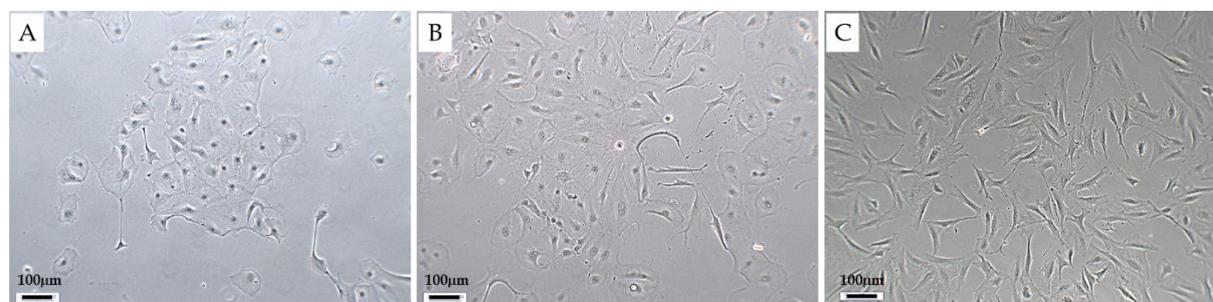


Figure 17 : Changement morphologique des cellules entre 2 et 3 semaines après mise en culture.

Observation des thyrocytes humains normaux au microscope photonique à 7 (A), 10 (B) et 21 jours de culture (C).

En conclusion, le modèle 2D permet le maintien de certains des marqueurs de la différenciation thyroïdienne et de la morphologie des cellules pendant 2- 3 semaines après dissociation tissulaire et est adapté à une analyse de la réponse précoce aux RI : prolifération/survie, cycle cellulaire, cassures double-brin (γ -H2AX) ou transcriptome.

Pour les analyses de la prolifération/survie et du cycle, les cellules sont passées 3 à 4 jours après dissociation, à une densité de 12000 cellules par cm^2 , et sont ensemencées à 8000 cellules par cm^2 au bout de 8 à 14 jours pour être analysées.

Dans ces conditions, les cultures primaires de thyrocytes humains normaux prolifèrent de façon reproductible avec une faible mortalité (4-5%) et aucune variabilité interindividuelle significative n'a été observée sur 5 patients (Figure 18).

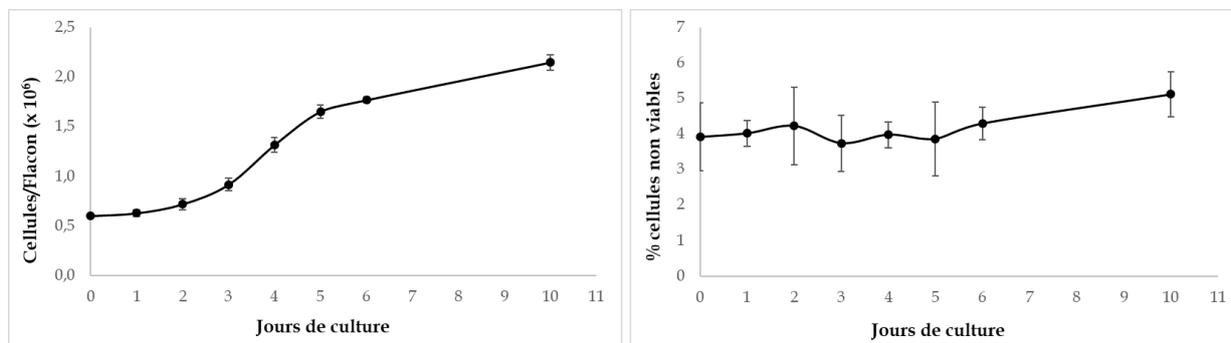


Figure 18 : Courbes de prolifération et de survie moyennes, au cours du temps, de cultures primaires de thyrocytes humains normaux.

Les cellules sont ensemencées à une densité de 8000 cellules /cm² au passage 2 (J0) et la prolifération/survie est suivie par un comptage au bleu trypan.

La courbe de gauche représente la prolifération cellulaire moyenne et la courbe de droite représente la mortalité cellulaire moyenne.

Les patients sont âgés de 26 à 37 ans (5 patients avec 1 biopsie conservée dans de l'AQIX).

2. Réponse à l'irradiation des thyrocytes normaux humains

La sensibilité à une irradiation des thyrocytes en culture 2D a été analysée (irradiateur GSR-D1, rayonnements γ du césium 137), en réalisant une première gamme de doses de 0,5 ; 1 ; 2 ; 3 et 5 Gy à 1,15 Gy/mn (fort débit de dose). L'effet de l'exposition a été suivi en termes de prolifération et de survie cellulaire, grâce à un comptage au bleu trypan, à 1, 2 et 3 jours.

Nous avons observé un effet dose sur la prolifération, avec une inhibition de la prolifération dès 0,5 Gy jusqu'à un arrêt de prolifération à 3 et 5 Gy. De plus, nous remarquons un effet sur la mortalité à partir de 1Gy qui augmente pour 3 et 5 Gy (Figure 19).

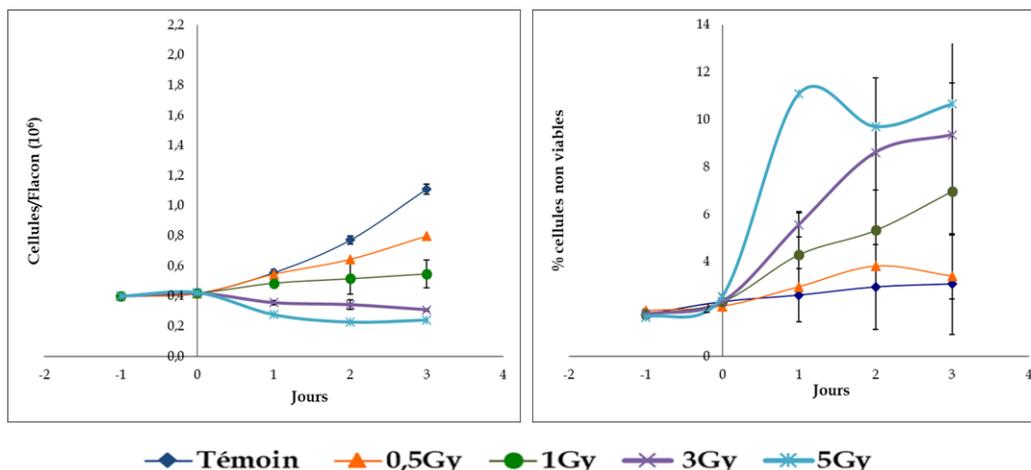


Figure 19 : Analyse de la radiosensibilité des thyrocytes humains normaux à fortes doses et fort débit de dose.

Gamme de dose : 0,5 ; 1 ; 2 ; 3 et 5 Gy à 1,15 Gy/mn sur 1,2 et 3 jours après irradiation (2 patients). La courbe de gauche représente la prolifération cellulaire moyenne et la courbe de droite représente la mortalité cellulaire moyenne. L'ensemencement a été réalisé 1 jour avant l'irradiation (J0).

Nous avons réalisé une deuxième gamme de dose (0,1 ; 0,2 ; 0,5 et 1 Gy) à 0,1 Gy/min (faible débit de dose). Nous observons un effet dose reproductible sur la prolifération. En comparaison des résultats à fort débit de dose pour la dose de 1Gy (figure 19), nous observons un nombre de cellules qui augmentent jusqu'à 4 jours après irradiation. La mortalité moyenne est similaire mais les deux patients ne se comportaient pas de la même façon à fort débit de dose (écarts-types plus importants) ce qui ne permet pas de conclure sur la survie (Figure 20).

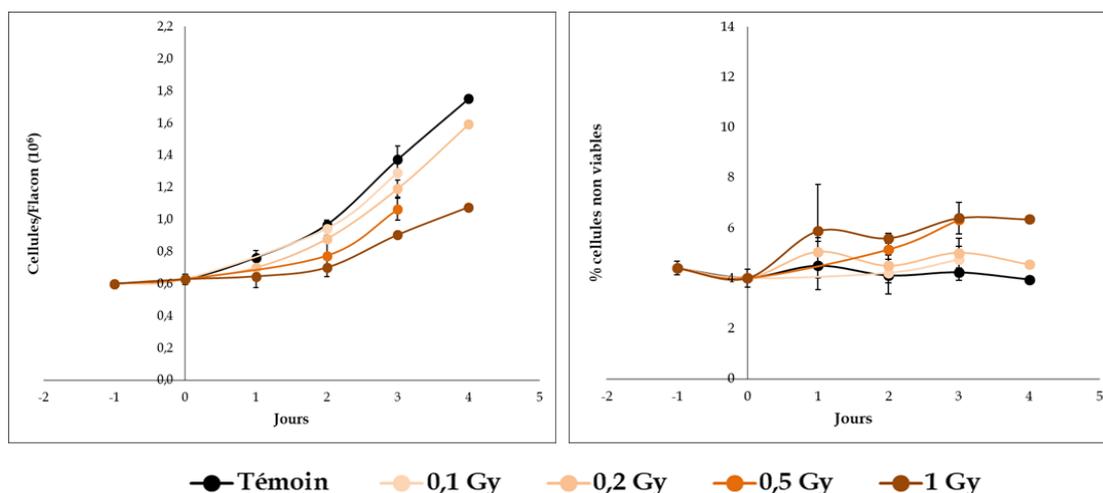


Figure 20 : Analyse de la radiosensibilité des thyrocytes humains normaux à faible débit de dose. Gamme de dose : 0,1 ; 0,2 ; 0,5 et 1Gy à 0,1 Gy/mn sur 1, 2, 3 et 4 jours après irradiation (2 patients). La courbe de gauche représente la prolifération cellulaire moyenne et la courbe de droite représente la mortalité cellulaire moyenne. L'ensemencement a été réalisé 1 jour avant l'irradiation (J0).

Pour évaluer à la fois les effets de la dose et du débit de dose sur la réponse des thyrocytes, nous avons choisi les doses de 0,1 Gy et 1Gy à un débit de dose de 0,1

Gy/mn (faible débit de dose), et à 1 Gy et 3 Gy à un débit de dose de 0,76 Gy/mn (fort débit de dose). Nous avons confirmé que pour la dose de 1Gy, l'augmentation du débit de dose entraîne une augmentation de la mortalité cellulaire associée à une diminution faible de la prolifération des cellules au cours du temps (Figure 21).

Ces conditions définissent 3 situations phénotypiques associées à une exposition des thyrocytes aux RI: 1) peu/pas d'effet sur la prolifération et pas d'effet sur la survie (0,1Gy à faible débit de dose), 2) un effet sur la prolifération et pas sur la survie (1Gy à faible débit de dose) et 3) un effet sur la prolifération et sur la survie (fort débit de dose).

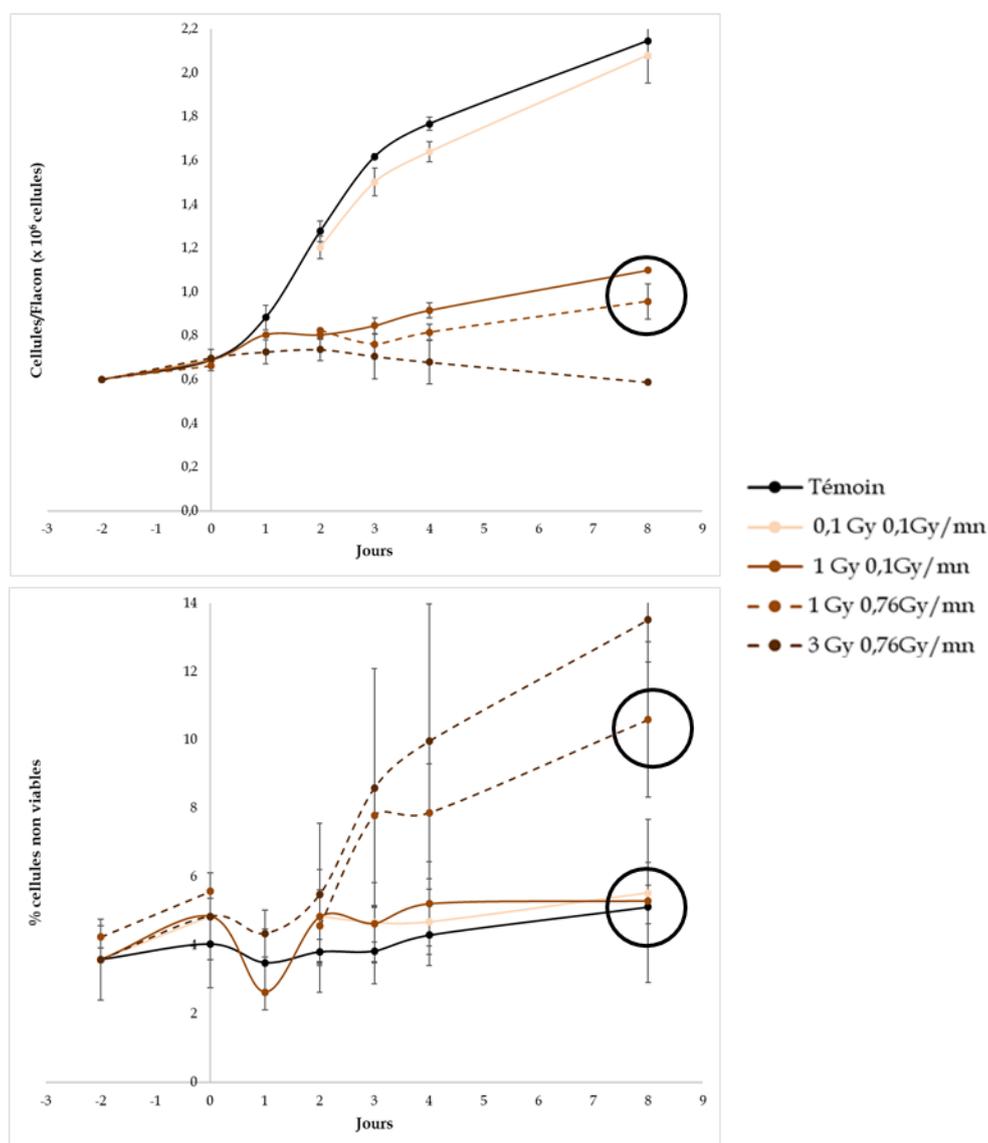


Figure 21 : Analyse de la radiosensibilité des thyrocytes humains normaux à forts et faibles dose/débit de dose.

Irradiation à 0,1 Gy et 1 Gy à 0,1 Gy/mn, et 3 Gy à 0,76 Gy/mn (3 patients), et 1 Gy à 0,76 Gy/mn (sur 2 des 3 patients).

Le graphe du haut représente la prolifération cellulaire moyenne et le graphe du bas représente la mortalité cellulaire moyenne.

L'ensemencement a été réalisé 2 jours avant l'irradiation (J0).

Les cercles noirs indiquent l'effet débit de dose sur la prolifération et la survie cellulaire.

En parallèle, le cycle cellulaire a été analysé sur les 3 patients utilisés pour la dernière gamme de dose choisie (0,1 Gy et 1Gy à 0,1 Gy/mn, et à 1 Gy et 3 Gy de 0,76 Gy/ mn) en mettant au point un protocole incluant un marquage immunocytochimique PAX8 permettant de distinguer et d'analyser uniquement les thyrocytes bien différenciés.

Nous avons observé pour un patient un blocage en G1 à 3 Gy entre 1-4 jours et un blocage plus transitoire à 1 Gy (au maximum à J2) (Figure 22A), et pour les deux autres patients un blocage transitoire en G2 à J1-J2 après une exposition de 3 Gy (Figure 22B et 22C).

Cette différence pourrait être associée à un délai différent entre la dissociation cellulaire et l'ensemencement pour l'irradiation des cellules, qui n'est pas le même selon les patients (9 jours pour le patient dont le blocage est en G1, 10 jours et 12 jours pour les deux autres patients), induisant des différences dans la synchronisation des cellules.

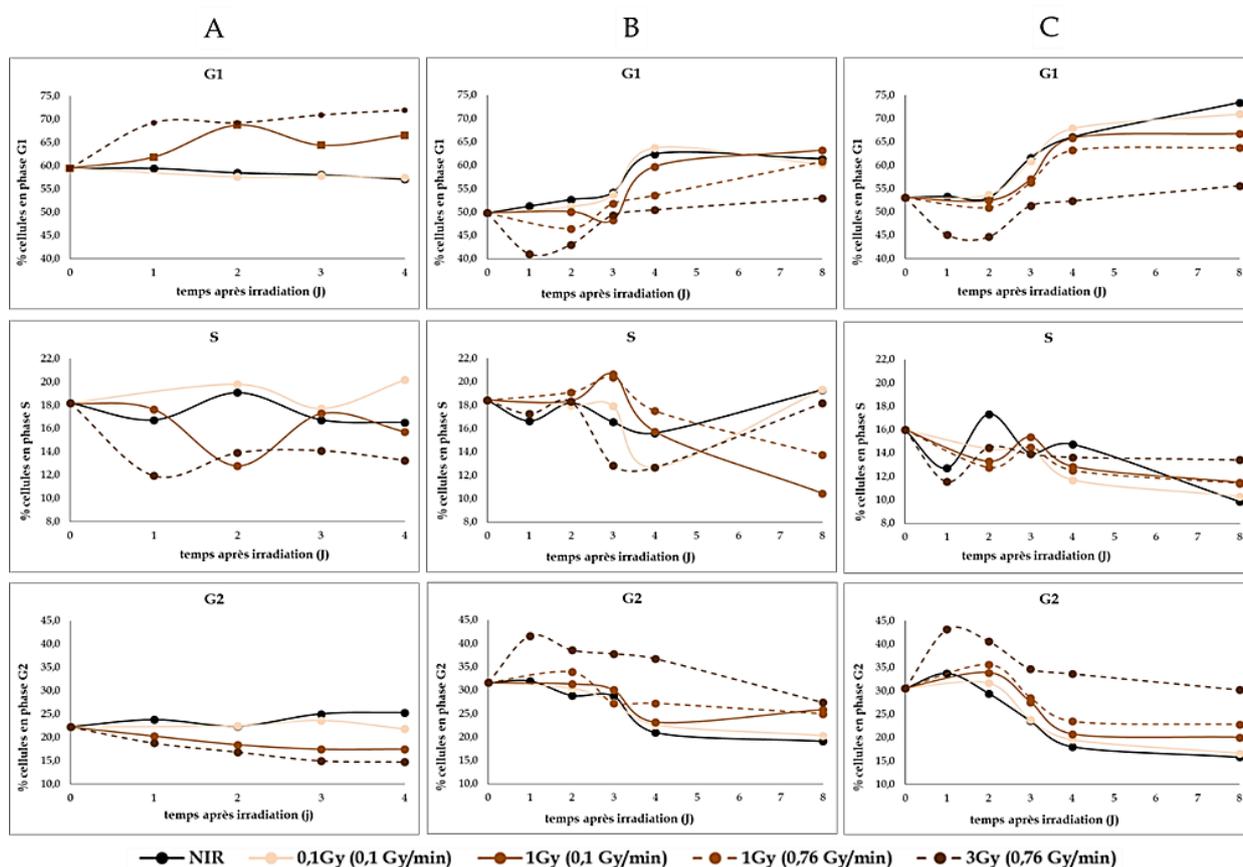


Figure 22 : Analyse du cycle cellulaire des thyrocytes humains en fonction de la dose et du débit de dose.

Colonne A : 0.1Gy et 1Gy à 0.1Gy/mn, et 3Gy à 0.76Gy/mn (1 patient) ; Colonne B et C : 0.1Gy et 1Gy à 0.1Gy/mn, et à 1Gy et 3Gy à 0.76Gy/mn (2 patients).

L'ensemencement a été réalisé 2 jours avant l'irradiation (J0).

3. Comparaison de la radiosensibilité des thyrocytes de patients non exposés ou exposés pendant l'enfance

La grande majorité des biopsies analysées proviennent de patients ayant développé une tumeur sans historique d'irradiation pendant l'enfance. Néanmoins, nous avons analysé le tissu normal provenant de deux patients opérés pour une tumeur thyroïdienne mais développée dans un contexte de radiothérapie pour un premier cancer pendant l'enfance. Les deux patients ont été initialement irradiés pour un médulloblastome (région cérébrale), avec la thyroïde dans le champ d'irradiation. L'un a reçu, au total, une dose de 35 Gy à l'âge de 2 ans (23 ans au diagnostic de la tumeur thyroïdienne) et l'autre une dose de 36 Gy à l'âge de 12 ans (17 ans au diagnostic de la tumeur thyroïdienne). L'estimation de la dose reçue à la thyroïde n'a pas encore été calculée au moment de la rédaction de ma thèse.

Les thyrocytes en culture primaire de patients non exposés et de patients exposés pendant l'enfance ont un comportement similaire en termes de prolifération et de survie. En revanche, après irradiation des thyrocytes, les thyrocytes des 2 patients exposés pendant l'enfance sont plus radiorésistants que les thyrocytes de patients non exposés en termes de prolifération et de survie cellulaire. En effet, la mortalité, suite à l'exposition des thyrocytes primaires aux doses de 1Gy et de 3Gy à fort débit de dose, est moins importante dans les thyrocytes exposés en comparaison des thyrocytes non exposés, associé à une augmentation du nombre de cellules pour la dose de 1 Gy aux deux débits de doses et pour la dose de 3 Gy dès J2 après irradiation (Figure 23).

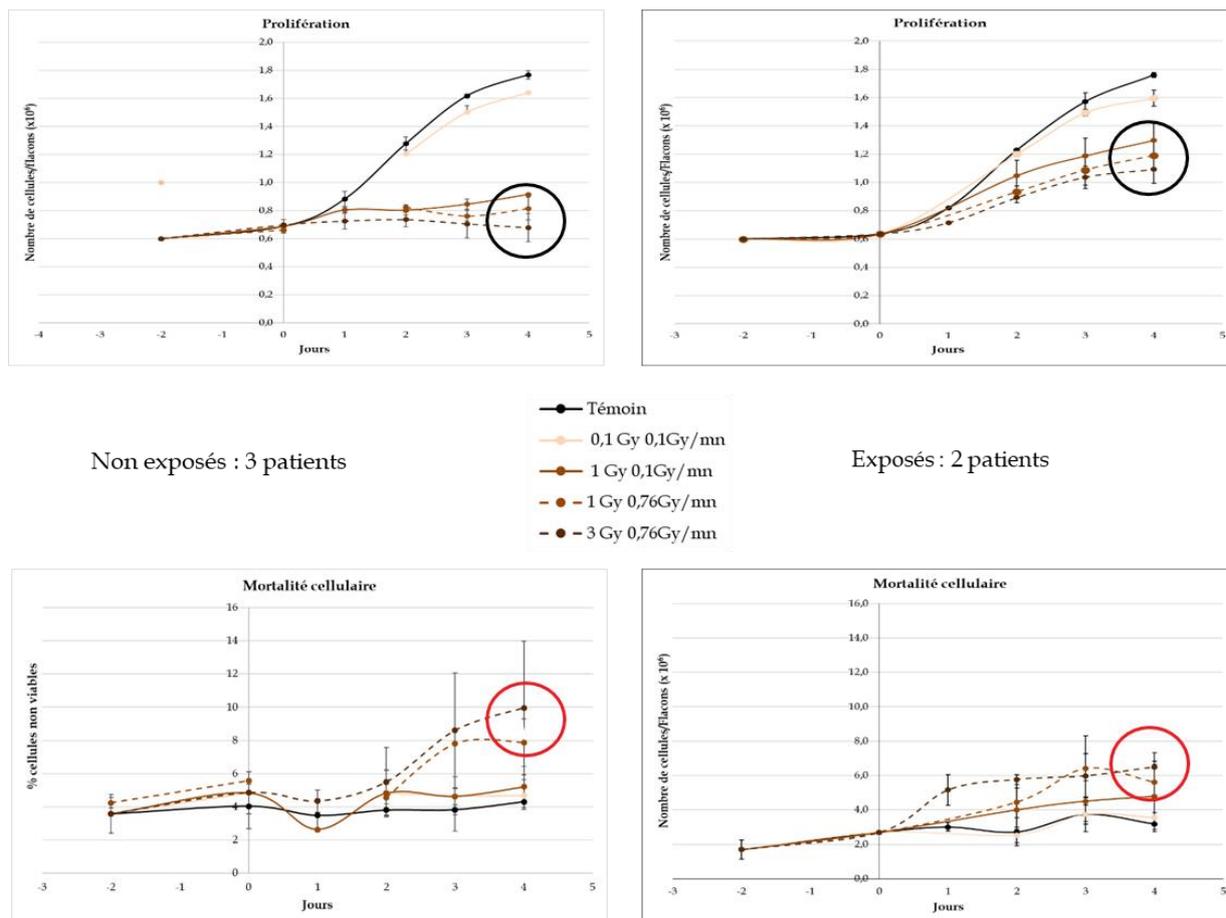


Figure 23 : Comparaison de la prolifération/survie cellulaire de cultures primaires de thyrocytes normaux non exposés pendant l'enfance (3 patients) versus exposés pendant l'enfance (2 patients). L'ensemencement a été réalisé 2 jours avant l'irradiation (J0). Les cercles noirs indiquent les différences obtenues sur la prolifération, et les cercles rouges sur la survie cellulaire.

La cinétique d'induction/réparation des cassures double-brin de ces 2 patients a été analysée par un marquage de γ -H2AX (05-636-I, Merck Millipore) (100 noyaux comptés/condition ; 9 à 14 champs pour chaque dose) après une irradiation à 1Gy (0.1Gy/mn et 0.76Gy/mn) et 3 Gy (0.76Gy/mn), et comparée à celle de thyrocytes non exposés (2 patients pour toutes les conditions, 1 patient à une dose de 1Gy aux deux débits de doses).

Le niveau basal des cassures double-brin est très faible, voire quasi nul, ce qui nous a permis de détecter nettement une différence après irradiation. Les thyrocytes des patients non exposés pendant l'enfance présentent des pics de cassures double-brin à 30 mn pour 1 Gy, similaires à fort débit de dose (10,4 cassures en moyenne) et à faible débit de dose (10,1 cassures en moyenne), et pour 3 Gy (17,2 cassures en moyenne).

Les thyrocytes des 2 patients exposés pendant l'enfance présentent une diminution du nombre de foci qui est significative pour les 2 patients exposés. Notamment, pour 1Gy à faible débit de dose, quasiment aucun foci n'est observé au cours du temps pour les thyrocytes exposés alors qu'une augmentation du nombre de foci γ -H2AX est observée à 10 et 30 min pour les thyrocytes de patients non exposés. Au plus fort débit de dose,

une exposition de 1Gy entraîne un pic de foci à 30 min dans les thyrocytes exposés et non exposés mais moins de foci sont induits dans les thyrocytes des patients exposés pendant l'enfance (10,4 cassures en moyenne pour les thyrocytes non exposés contre 2,3 cassures en moyenne pour les thyrocytes exposés) (Figure 24).

De plus, le pic de cassure est même décalé à 10 mn pour un des patients à 3Gy suggérant une réparation plus rapide pour ce patient à cette dose.

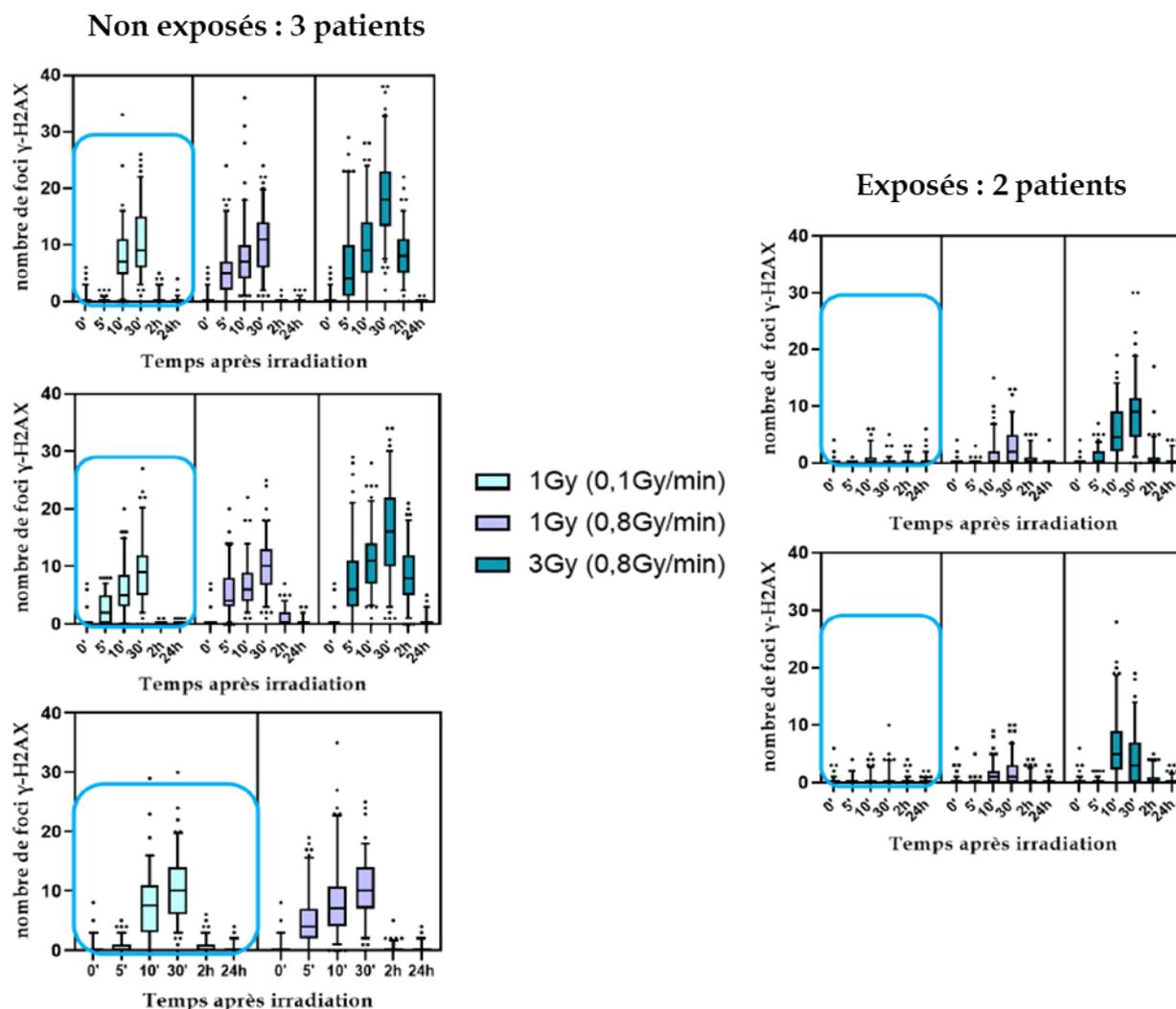


Figure 24 : Comparaison de l'induction/réparation des cassures double-brin après exposition de thyrocytes exposés ou non pendant l'enfance.

(Marquage γ -H2AX-100 noyaux comptés/condition).

Les encadrés bleus indiquent la diminution du nombre de cassures dans les thyrocytes exposés pendant l'enfance pour la dose de 1Gy à 0.1Gy/mn.

En conclusion, nous avons caractérisé la réponse à l'irradiation de thyrocytes humains normaux en termes de prolifération, de survie cellulaire et de cycle cellulaire. D'autres patients sont nécessaires pour confirmer nos résultats, en particulier pour le cycle cellulaire.

Pour la dose de 1 Gy (thyrocytes non exposés pendant l'enfance), les débits de dose de 0,1 Gy/mn et de 0,76 Gy/mn induisent une cinétique d'induction/réparation des cassures qui est similaire, mais le plus faible débit de dose permet une meilleure survie des cellules après exposition.

En outre, un historique d'exposition pendant l'enfance ne modifie pas le comportement des thyrocytes en culture en comparaison de thyrocytes non exposés, mais induit une résistance des thyrocytes en réponse à une seconde irradiation en termes de prolifération, de survie, d'induction de cassures double-brin et possiblement de cinétique de réparation à 3 Gy (à confirmer sur plus de patients). Ces résultats suggèrent fortement la persistance d'une empreinte de l'exposition sur le tissu non pathologique à long terme (jusqu'à 21 ans après irradiation).

3) Les thyrosphères

Contrairement à la culture 2D, les thyrocytes organisés en thyrosphères présentent une polarisation cellulaire et une organisation mimant le follicule thyroïdien.

Ce modèle n'a jamais été réalisé avec des thyrocytes humains mais il a été décrit avec des thyrocytes de souris (Saito et coll.) [172] formant des structures 3D composées de thyrocytes polarisés et maintenues pendant 6 mois.

L'objectif est donc développer ce modèle à partir de thyrocytes humains en le validant en termes de polarité, de différenciation cellulaire et de fonctionnement physiologique.

1. Obtention de structures 3D follicule-like

Lors du premier passage après la mise en culture primaire faisant suite à la dissociation d'une biopsie, les thyrocytes sont mélangés à 110µl de matrigel etensemencés dans des inserts de culture (millicells), en plaques 12 puits, selon la méthode décrite par Toda et coll. [194], le milieu de culture (h7H) diffusant au travers de la membrane basale poreuse de l'insert et dans le matrigel.

Les thyrosphères ont été obtenues sur six patients âgés de 26 à 45 ans. Nous avons testé différentes densités cellulaires (5000, 10000, 15000, 20000 cellules/millicell) et plusieurs pourcentages de matrigel GFR (10%, 50% et 100%). La culture en matrigel GFR à 10%, avec un ensemencement à 10000 cellules/millicell, a permis d'obtenir le développement de sphères en 7-10 jours après ensemencement dans le matrigel (comme décrit par Saito et coll.) (Figure 25). L'organisation des thyrocytes en structures 3D est obtenue principalement par le regroupement et/ou la prolifération des thyrocytes (Figure 25A).

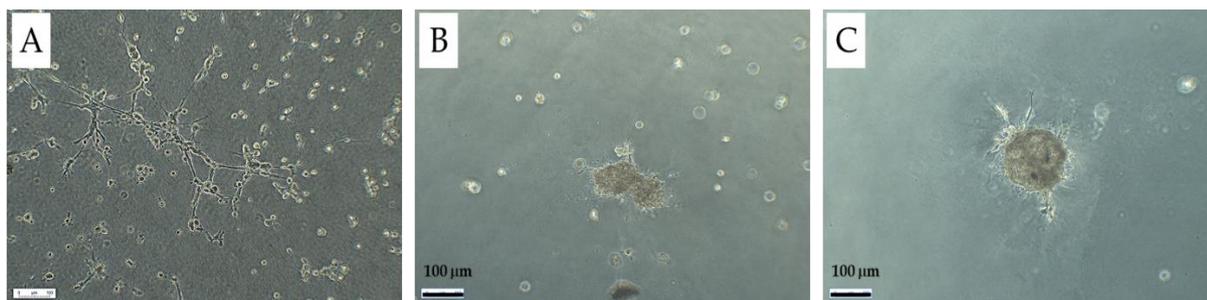


Figure 25 : Formation de sphères en 10 jours après ensemencement dans le matrigel.

Observation au microscope photonique 4h (A), 3 jours (B) et 10 jours (C) après ensemencement (10000 cellules/ millicell) dans le matrigel GFR 10%.

Les thyrosphères (de taille maximum d'environ 100 à 200 μm) ont été maintenues dans le matrigel jusqu'à 7 semaines (Figure 26A).

Afin de vérifier que les sphères s'organisaient bien en follicules (sphères creuses délimitées par un épithélium de thyrocytes), le dôme de matrigel contenant les sphères a été fixé au formaldéhyde/glutaraldéhyde et les thyrocytes ont été marqués à la phalloïdine-FITC (marquage de l'actine F - ActinGreen™ 488 ReadyProbes™ Reagent invitrogen) et au Hoechst 33342 (marquage de l'ADN). Les observations faites au microscope confocal montrent une organisation mimant effectivement celle d'un follicule thyroïdien, avec un épithélium bordant un lumen observé à 7 semaines en culture (Figure 26B).

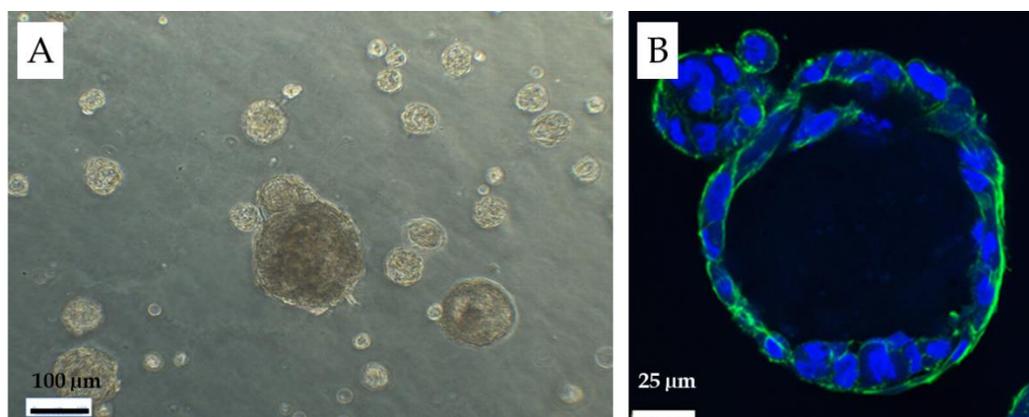


Figure 26 : Formation de structures 3D mimant le follicule thyroïdien à 7 semaines de culture.

A : Observation des thyrosphères au microscope photonique

B : Observation au microscope confocal des thyrosphères marquées à la phalloïdine-FITC (vert) et au hoechst 33342 (bleu).

Nous avons ensuite vérifié que l'organisation 3D en follicule était bien associée à une différenciation des cellules, et également une polarisation cellulaire qui pourrait suggérer que les sphères seraient physiologiquement fonctionnelles. Dans un premier temps, les dômes de matrigel contenant les sphères ont été fixés (2% formaldéhyde, 0.1% glutaraldéhyde) et inclus en paraffine, pour réaliser des immunomarquages des sphères par un anticorps anti-PAX8 et un anticorps anti-TG.

Les thyrocytes de l'épithélium expriment bien le facteur de transcription PAX8 dans les noyaux mais la TG est localisée dans le cytoplasme des cellules (Figure 27) : elle n'est pas exocytée dans le lumen des sphères.

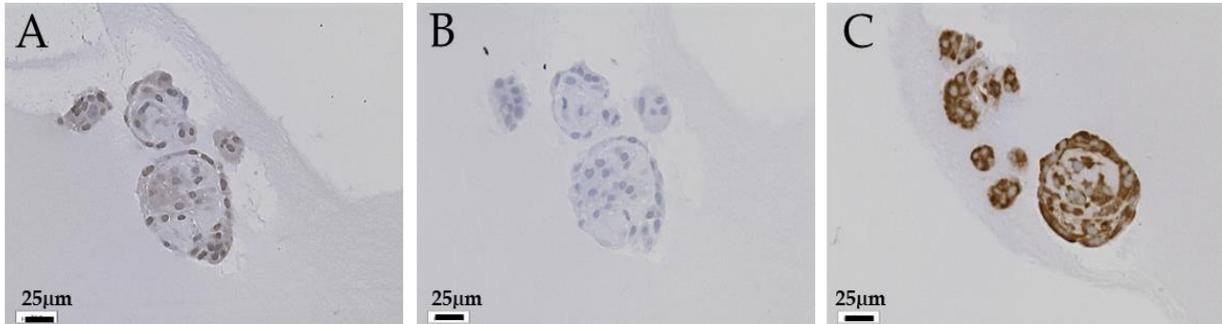


Figure 27 : Immunomarquages des thyrosphères à 5 semaines de culture.

A : anticorps anti-PAX8 ; B : Contrôle négatif (anticorps secondaire) ; C : anticorps anti-TG.

2. Optimisation des conditions de culture

Il est possible que le regroupement des thyrocytes (Figure 25A) pour former les sphères piège du matrigel dans les structures 3D ce qui pourrait, en conséquence, perturber la polarisation des cellules (matrice extracellulaire à l'intérieur et hors des sphères).

Nous avons donc testé différentes concentrations de matrigel pour favoriser le développement des sphères à partir de cellules isolées, tout en permettant l'expansion des sphères : 10, 15, 20 et 25% de matrigel GFR pour ensemercer les thyrocytes. La concentration de 15% permet de limiter le regroupement des cellules au début de la culture et contrairement à une concentration de 20 ou 25% de matrigel, permet une augmentation de la taille des sphères au cours du temps similaire à celle observée à 10% (Figure 28).

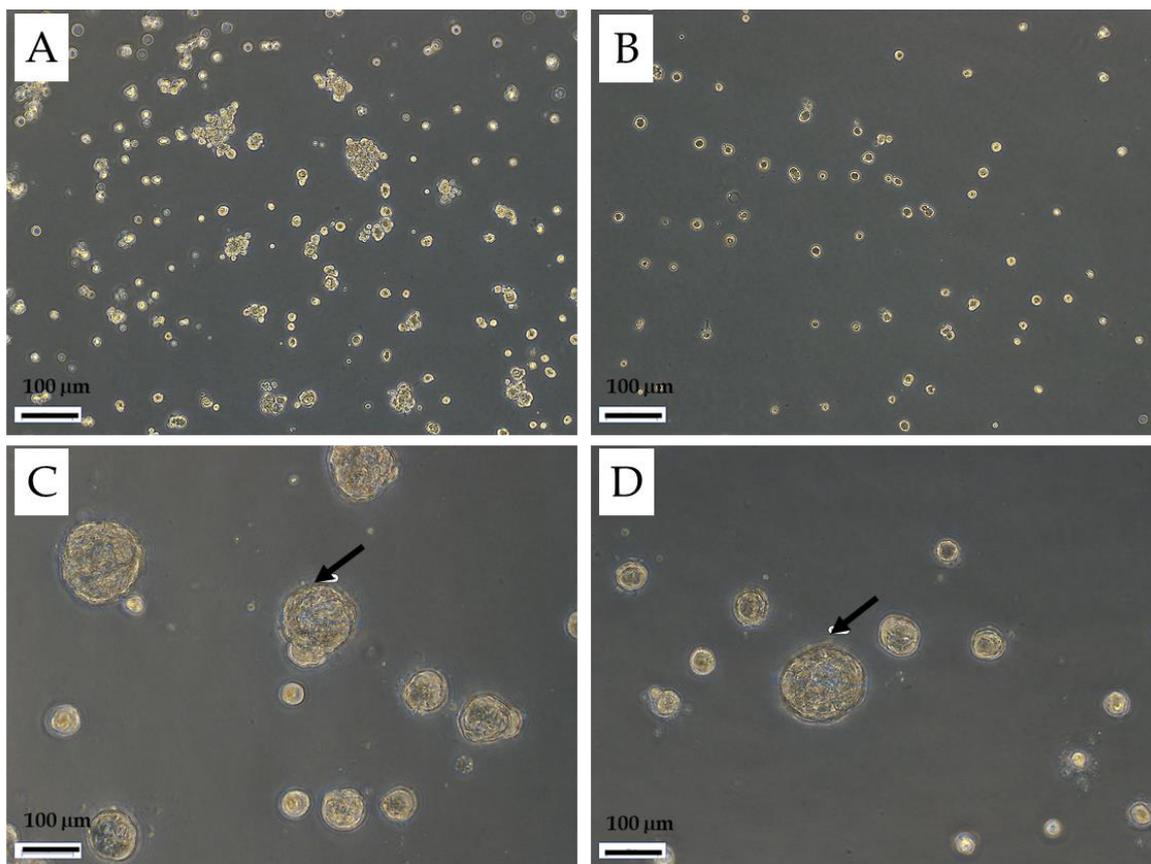


Figure 28 : Formation de sphères selon la concentration de matrigel.

Observation au microscope photonique 4 jours (A et B) ou 15 jours (C et D) après ensemencement dans 10% (A et C) ou 15% (B et D) de matrigel.

Les flèches noires indiquent les sphères mesurées : 78 µm pour l'image C (10% matrigel) et 91 µm pour l'image D (15% matrigel).

Dans ces conditions nous favorisons la mise en place des structures, avec la formation d'un lumen dans la cellule puis entre les cellules après division, similairement à ce qui est obtenu dans d'autres modèles d'organoïdes épithéliaux de tissus glandulaires (Figure 29).

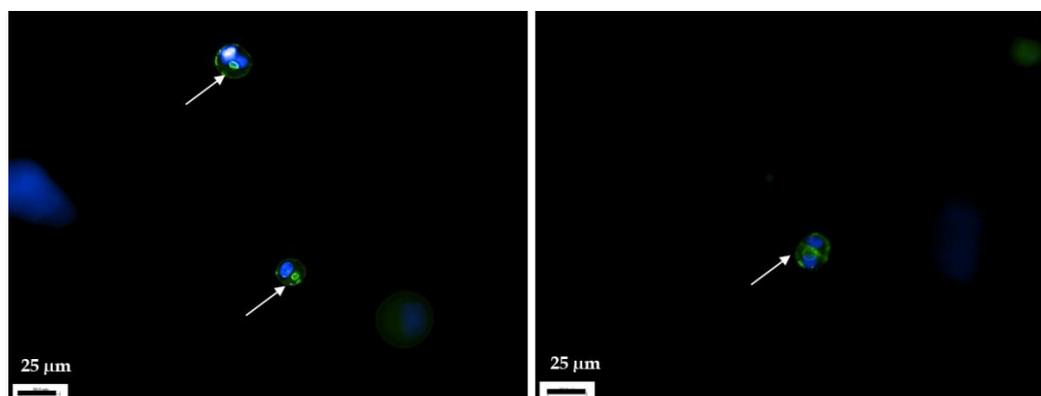


Figure 29 : Formation de thyrosphères dans 15 % de matrigel.

Observation au microscope photonique 8 jours après ensemencement : marquage à la phalloïdine-FITC (vert) et au hoechst 33342 (bleu).

Les flèches blanches indiquent la formation des lumens.

Une optimisation des protocoles de fixation/perméabilisation des dômes de matrigel contenant les sphères et d'immunomarquage a permis de réaliser des immunomarquages des thyrosphères directement dans le matrigel. Un marquage anti-GM130 (ab52649, ABCAM) (protéine liée à la membrane du Golgi) en position apicale à 3 jours de culture en matrigel ainsi que l'expression des laminines (ab11575, ABCAM) en partie basale à deux semaines de culture en matrigel suggèrent un début de polarisation des cellules (Figure 30B et 30D). Le marqueur de différenciation PAX8 est bien exprimé dans le noyau des thyrocytes (Figure 30F). Néanmoins, la TG est toujours retenue dans le cytoplasme et n'est pas exocytée dans le lumen (Figure 30G).

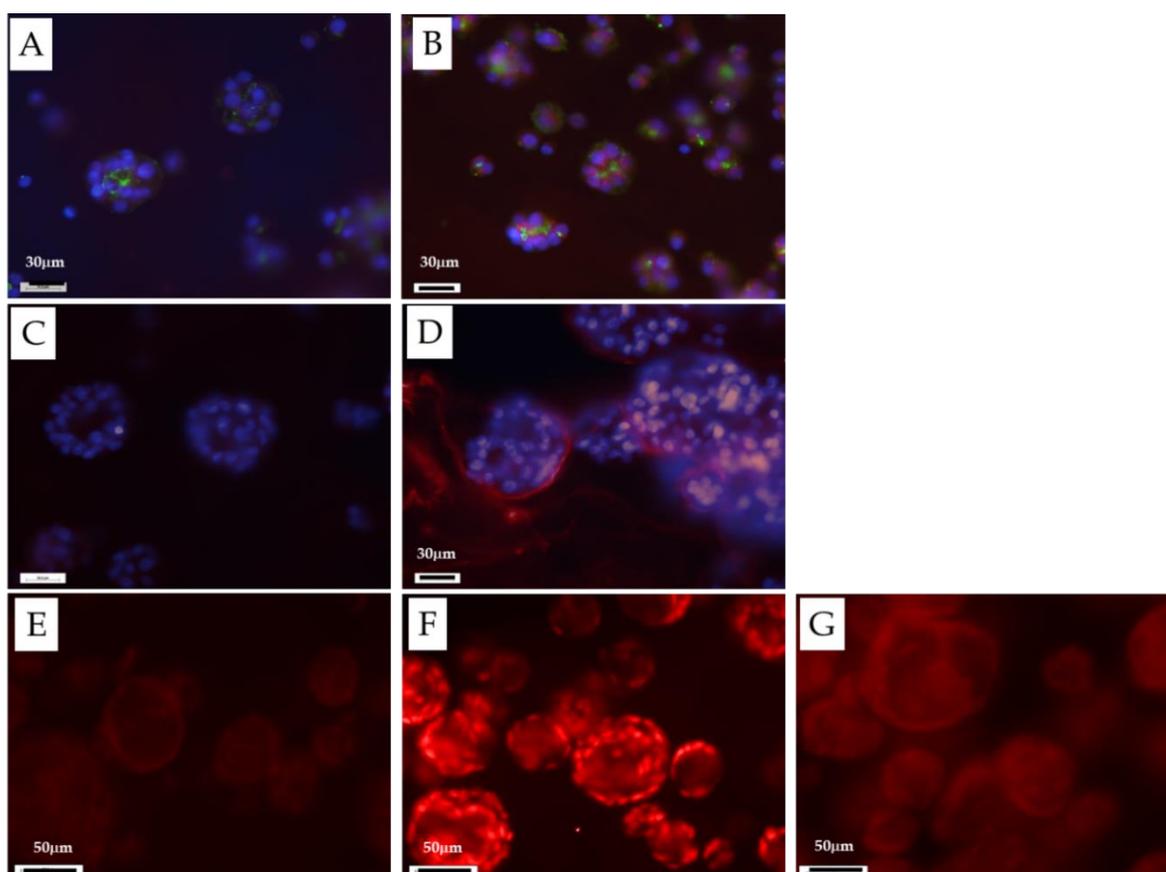


Figure 30 : Expression de marqueurs de polarisation et de différenciation des thyrocytes dans les thyrosphères.

Observation au microscope 3 jours (A et B) ou 15 jours (C, D, E, F et G) jours après ensemencement dans le matrigel.

A, C et E, Contrôle négatif (F(ab')₂ anti-lapin couplé à l'Alexa Fluor 594) ; B, anticorps anti-GM130 + F(ab')₂-594 ; D, anticorps anti-laminine + F(ab')₂-594 ; F, anticorps anti-PAX8 + F(ab')₂-594 ; G, anticorps anti-TG + + F(ab')₂-594. A, B, C et D, hoechst 33342. A et B : phalloïdine-FITC.

Il se peut également que la composition du milieu h7H soit adaptée pour la culture 2D mais mal équilibrée pour le développement des sphères.

Cette hypothèse est basée sur une publication de Kim et coll. [200] qui montrait que dans une culture de thyrocytes de porc, l'ajout, dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 10% sérum bovin néonatal, de TSH (1000mIU/L) seule ou

de TSH avec de l'insuline (1mg/ml), de l'hydrocortisone (1nM) et de la transferrine (5mg/ml), augmentait la synthèse de la thyroglobuline de 5 fois et 25 fois, respectivement. Cette augmentation est surtout associée à une rétention de la TG dans le réticulum endoplasmique en association avec la protéine BIP, un marqueur de l'UPR (Unfolded Protein Response). Morishita et coll. montrent qu'un tel stress peut être induit par un défaut de maturation post-traductionnelle de la TG en raison de l'augmentation de la quantité de TG synthétisée ce qui engendrerait une accumulation intracellulaire de TG non glycosylée [201]. Le milieu h7H contient des concentrations bien inférieures de la plupart de ces facteurs : 40mIU/L de TSH, 1mg/L d'insuline, 5mg/L de transferrine et 5mg/L d'apo-transferrine, excepté pour l'hydrocortisone (23nM). Néanmoins, le phénomène décrit par Kim et coll. ressemblait beaucoup à ce que nous observions dans nos thyrosphères. Comme l'accumulation cytoplasmique de la TG était décrite comme un phénomène réversible, nous avons séparé les cultures restantes des sphères exprimant la TG dans le cytoplasme à 15 jours de culture (Figure 30 G) en 3 groupes : un groupe a été maintenu en h7H classique (40mIU/L de TSH, 10µg/L d'iode), un groupe a été transféré dans du h7H dont les concentrations en TSH et en iode ont été réduites (10mIU/L de TSH, 5µg/L d'iode) et un groupe a été transféré dans du h7H (10mIU/L de TSH, 5µg/L d'iode) sans insuline, hydrocortisone et transferrine. Les sphères ont été cultivées 1 semaine dans ces milieux et la diminution de la concentration de TSH et d'iode permet d'observer la relocalisation dans le lumen de la TG de certaines des thyrosphères (Figure 31).

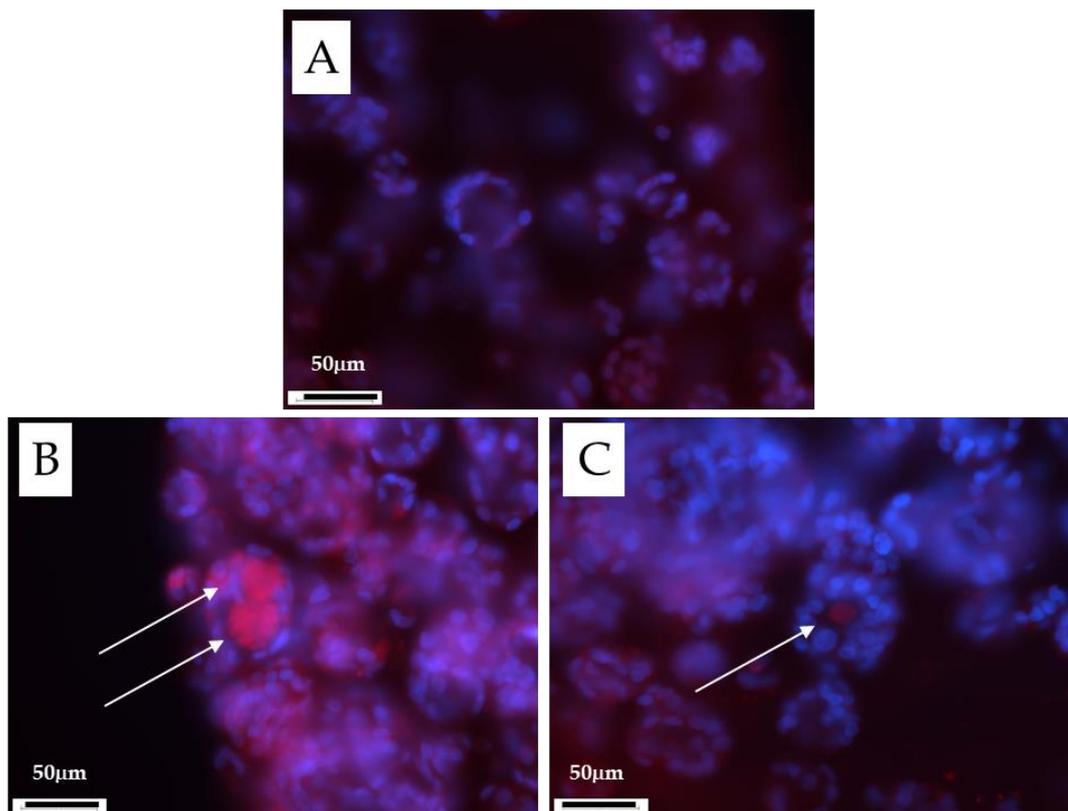


Figure 31 : Relocalisation de la thyroglobuline dans le lumen de thyrosphères.

Rouge : A, Contrôle négatif (F(ab')₂ anti-lapin couplé à l'Alexa Fluor 594) ; B et C, anticorps anti-TG + F(ab')₂ anti-lapin couplé à l'Alexa Fluor 594. Bleu : A, B et C, hoechst 33342.

Les flèches blanches indiquent les sphères contenant la TG dans le lumen.

L'effet d'une gamme de TSH et/ou d'iode dans le milieu de culture doit être testé dès le début de la culture pour optimiser le niveau d'expression de la TG avec sa localisation au niveau du lumen dans une majorité des sphères.

4) Les cultures organotypiques

Les cultures organotypiques permettent le maintien du tissu thyroïdien dans sa complexité cellulaire. En effet, Toda et coll. ont mis au point un modèle pouvant maintenir du tissu thyroïdien normal de porc, avec la présence de cellules C, sur une période de 40 jours [192, 193].

Nous avons utilisé le protocole de Toda [177] (voir paragraphe IV, Figure 10) pour mettre en culture des biopsies de tissu humain, ce qui n'a jamais été réalisé jusque-là. La validation du modèle a été effectuée en termes de maintien de la structure des follicules thyroïdiens, de la différenciation et de la polarité cellulaire, et de la fonctionnalité des thyrocytes.

1. Maintien du tissu dans les conditions décrites par Toda et coll.

Les biopsies sont découpées en fragments et mises en culture dans du matrigel GFR 10%, et du milieu h7H (Figure 10).

Nous avons contrôlé le maintien en culture du tissu au cours du temps sur 7 patients (24 à 63 ans). Les biopsies ont été fixées dans du formol, incluses en paraffine toutes les semaines, jusqu'à 7 semaines pour deux patients. Les blocs ont été coupés et les coupes ont été colorées à l'hémalum de Mayer/éosine ou marquées en immunohistochimie.

Les cultures organotypiques ont donné des résultats encourageants avec les deux premiers patients (50 et 63 ans). Une bonne conservation de la structure thyroïdienne avait été observée (Figure 32). Une activation des thyrocytes était également observée (changement de morphologie, vésicules de résorption de la TG liées à l'endocytose de la TG pour le relargage des hormones thyroïdiennes) suggérant une activité fonctionnelle en réponse à la TSH du milieu jusqu'à 6 semaines après mise en culture (Figure 32C et 32D).

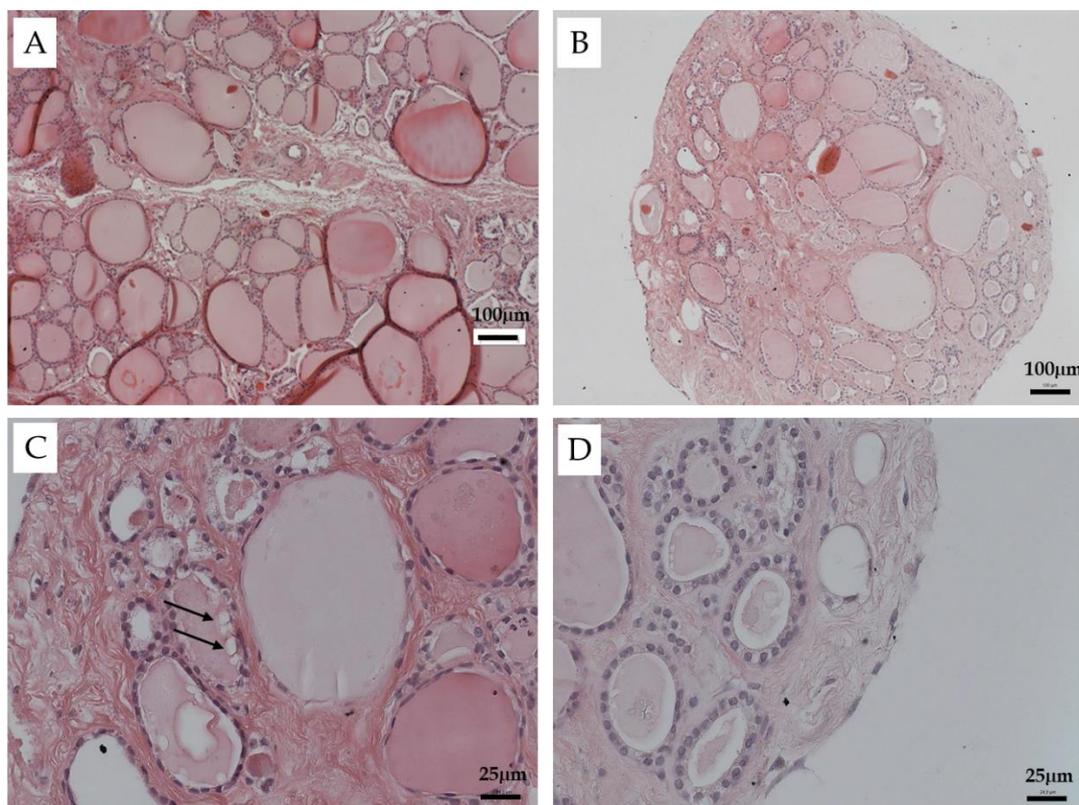


Figure 32 : Conservation de la structure du tissu thyroïdien normal après 6 semaines de culture organotypique, pour les deux premiers patients.

Observation au microscope photonique après coloration H/E à TO (A) et à 6 semaines de culture (B, C et D). Les flèches noires indiquent des vésicules de résorption de la TG.

De plus, nous avons analysé l'expression des marqueurs de la différenciation thyroïdienne TTF1 et TG (Figure 33).

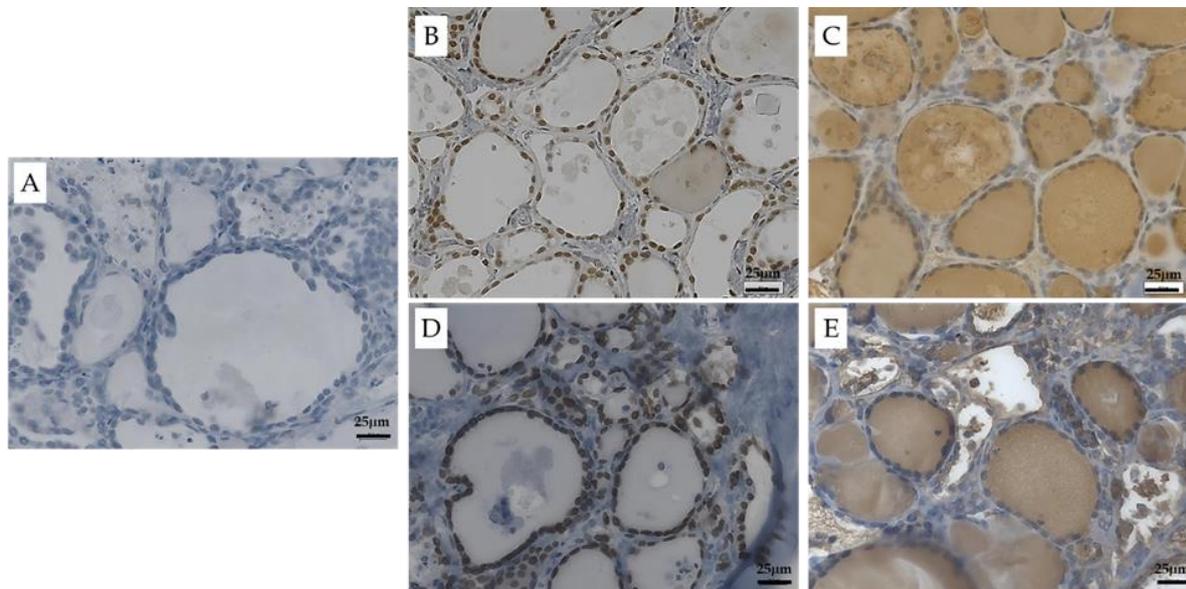


Figure 33 : Conservation du tissu thyroïdien normal différencié sur les 2 premières semaines de mise en culture organotypique, pour les deux premiers patients.

Observation au microscope photonique à T0 (B et C) et 2 semaines de culture (A, D et E). A : Contrôle négatif (anticorps secondaire) ; (B et D) : anticorps anti-TTF1 ; (C et E) : anticorps anti-TG.

Néanmoins, l'analyse des biopsies des 7 patients suivants (23 à 50 ans) a montré une grande variation dans le maintien du tissu en fonction des patients : nous avons observé, 1 à 3 semaines après mise en culture selon les patients, une perte de l'organisation de l'épithélium folliculaire et tissulaire, et l'apparition d'une fibrose (Figure 34), suggérant que nos conditions de culture n'étaient pas encore totalement optimisées.

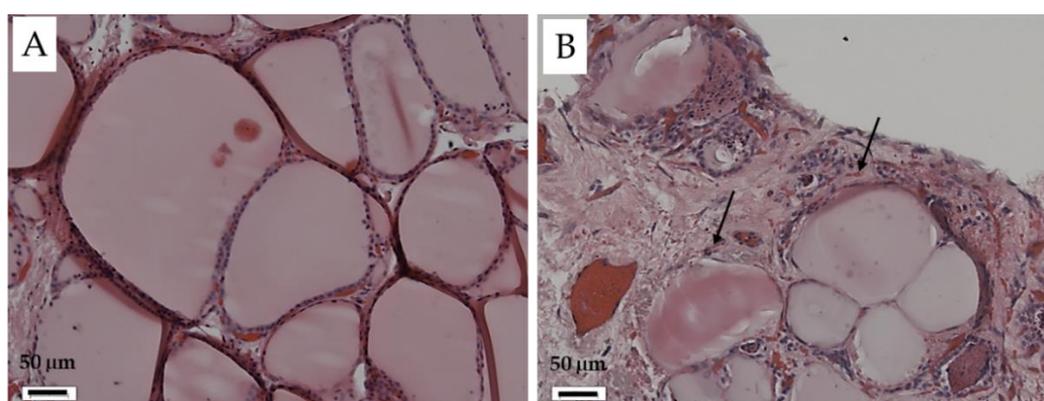


Figure 34 : Structure du tissu thyroïdien normal en culture organotypique selon la méthode de Toda et coll.

Observation au microscope photonique après coloration H/E à T0 (A) et à 1 semaine de culture (B). Les flèches noires indiquent les follicules ayant perdu leur épithélium.

Afin de comprendre pourquoi le tissu se dégradait, nous avons réalisé une analyse des biopsies à des temps plus précoces (1-3 jours).

Une activation des thyrocytes est observée dès 24h après la mise en culture. En effet, alors que les thyrocytes sont plutôt aplatis et inactifs dans une thyroïde adulte *in vivo*, les colorations H/E révèlent des cellules à l'aspect cuboïde avec l'apparition de vésicules d'absorption de la TG dans le colloïde (Figure 35).

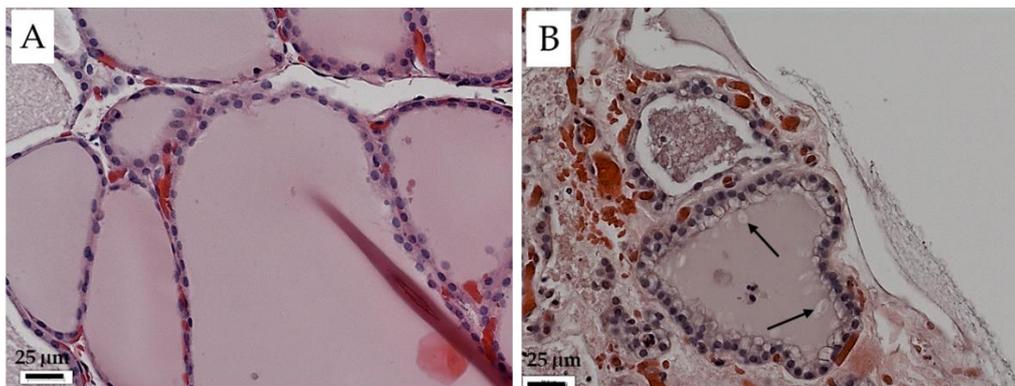


Figure 35 : Hyperactivation du tissu thyroïdien normal en début de culture organotypique selon la méthode de Toda et coll.

Observation au microscope photonique après coloration H/E à T0 (A) et à 2 jours de culture (B). Les flèches noires indiquent des vésicules d'absorption de la TG.

L'hyperactivation à 2 jours de culture est associée à une augmentation de l'expression de DUOX1 (Figure 36C) impliquant potentiellement une augmentation de la production d' H_2O_2 et donc un stress oxydatif qui pourrait contribuer à la mort des thyrocytes à long terme. L'augmentation du marquage de la caspase 3 clivée (9661S, OZYME) a également été observée à des temps plus tardifs (3 semaines de culture) mais de façon très localisée suggérant que l'apoptose n'est pas le mécanisme majeur associé à la dégénérescence de l'épithélium (Figure 36F).

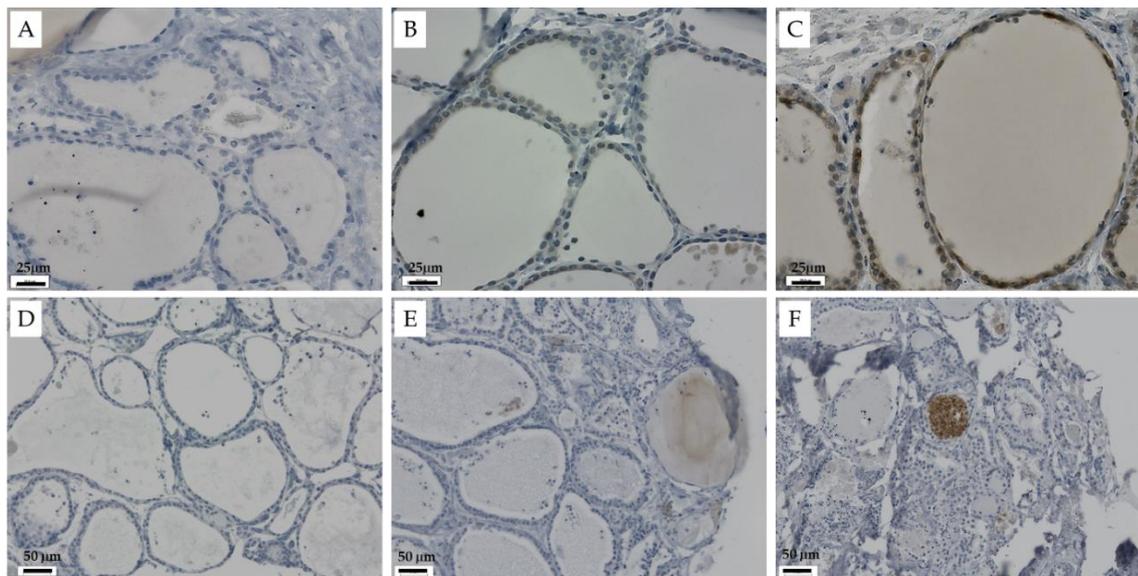


Figure 36 : Expression de DUOX1 et de la caspase 3 clivée en cours de culture dans les cultures organotypiques du tissu thyroïdien normal.

Observation au microscope photonique après marquage à la peroxydase à T0 (A, B, D et E), 2 jours (C) et 3 semaines de culture (F). A et D : Contrôle négatif (anticorps secondaire) ; B et C : anticorps anti-DUOX1 ; E et F : anticorps anti-CASP3.

D'autre part, alors que comme attendu, les thyrocytes des patients n'expriment pas la cycline D1 avant la mise en culture (T0) (les thyrocytes se divisent tous les 8 ans environ dans le tissu normal chez l'adulte [1]), une augmentation de l'expression de la cycline D1 est observée dès 24h après la mise en culture par des marquages immunohistochimiques à la peroxydase, suggérant une entrée en cycle des thyrocytes (Figure 37C).

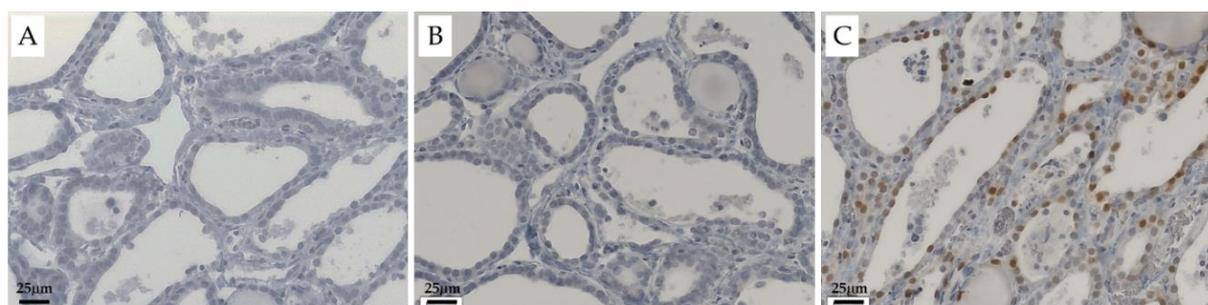


Figure 37 : Entrée en cycle des thyrocytes dans les cultures organotypiques du tissu thyroïdien normal.

Observation au microscope photonique après marquage à la peroxydase à T0 (A et B) et 24h de culture dans h7H (C).

A : Contrôle négatif (anticorps secondaire) ; B et C : anticorps anti-CCND1.

Enfin, le marquage nucléaire positif de HIF1 α (Hypoxia-inducible factor 1- α) (ab16066, ABCAM) à 24h de culture (Figure 38C) indique que même si le protocole décrit par Toda permet une meilleure oxygénation du tissu en comparaison d'une culture immergée dans le milieu, le tissu subit un stress hypoxique lors de la mise en culture en matrigel.

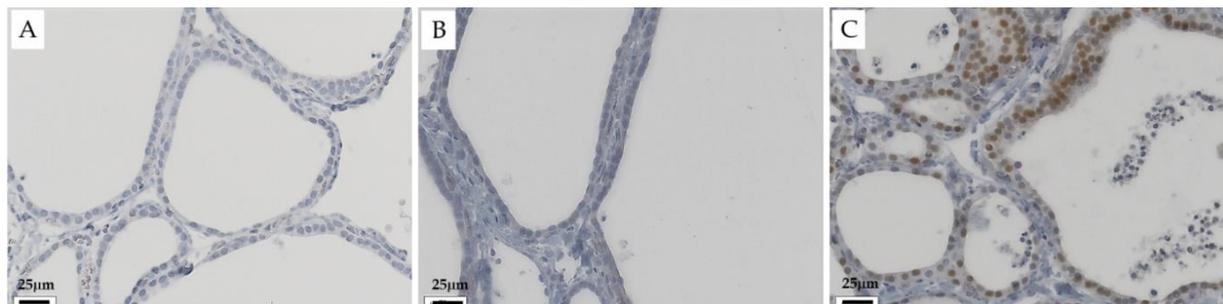


Figure 38 : Situation d'hypoxie des thyrocytes dans les cultures organotypiques du tissu thyroïdien normal selon la méthode de Toda et coll.

Observation au microscope photonique après marquage par un anti-HIF1 α couplé à la peroxydase à T0 (A) et 24h de culture (B et C).

A : Contrôle négatif (anticorps secondaire) ; B et C : anticorps anti-HIF1 α .

Ainsi, nous devons optimiser les conditions de culture pour améliorer l'oxygénation du tissu et Hick et coll. ont obtenu le maintien d'explants de thyroïde embryonnaire murine cultivés en interface air/liquide (ALI) : dans ce protocole, les biopsies sont maintenues sur une membrane microporeuse flottant sur du milieu de culture [195]. Nous avons testé la possibilité de conserver nos biopsies en culture sur une membrane pour limiter le stress hypoxique dans le tissu. En effet, contrairement aux thyrosphères qui ont besoin d'être incluses dans une matrice extracellulaire pour la polarisation des thyrocytes, la culture de blocs de tissu ne présente pas cette contrainte.

2. Culture organotypique en interface air/liquide (ALI)

Nous avons vérifié sur 3 patients que la culture ALI permettait de limiter le stress hypoxique observé en matrigel.

Contrairement à la culture en matrigel, les fragments cultivés en ALI n'expriment pas HIF1 α dans les noyaux des thyrocytes. Un faible marquage cytoplasmique est néanmoins observé (Figure 39).

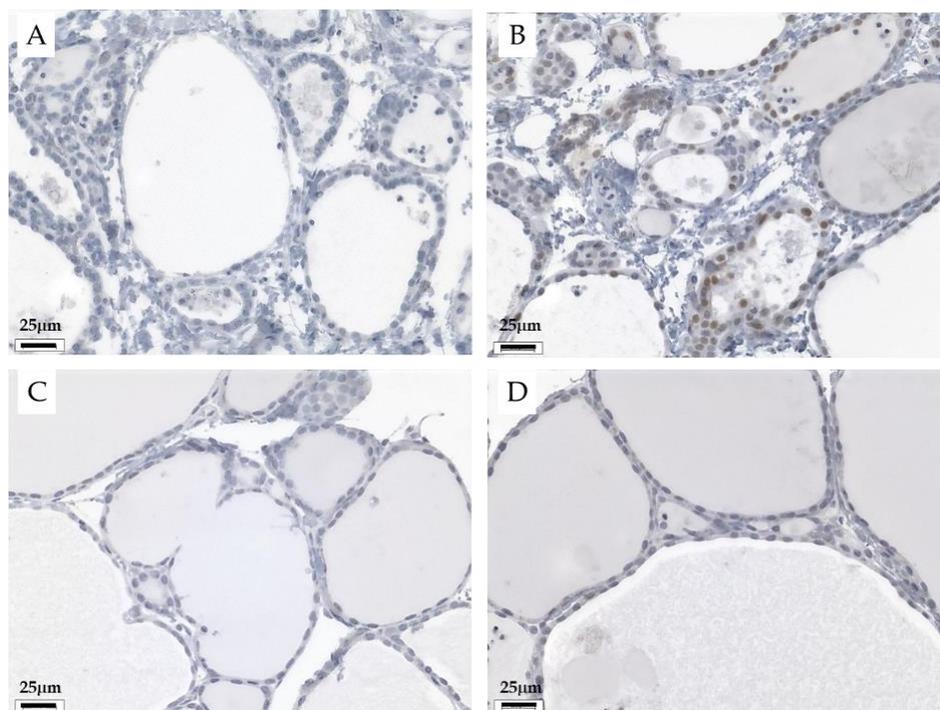


Figure 39 : Comparaison de l'oxygénation des biopsies de tissu normal de thyroïde entre la culture organotypique à interface air/liquide (ALI) et en matrigel.

Observation au microscope photonique après marquage anti-HIF α 1 couplé à la peroxydase à T0 (C) et à 24h de culture en matrigel (A et B) ou à interface air/liquide (D)

A : Contrôle négatif (anticorps secondaire) ; (B, C et D) : anticorps anti-HIF1 α .

La culture en ALI semble donc mieux adaptée à la culture des biopsies. Néanmoins, nous avons observé que le maintien du tissu est plutôt meilleur si les blocs de tissu mis en culture sont fins. Dans ces conditions, nous avons un bon maintien du tissu en culture sur 4 semaines pour un des patients (Figure 40). Mais une variabilité dans le maintien des biopsies est toujours observée entre les patients.

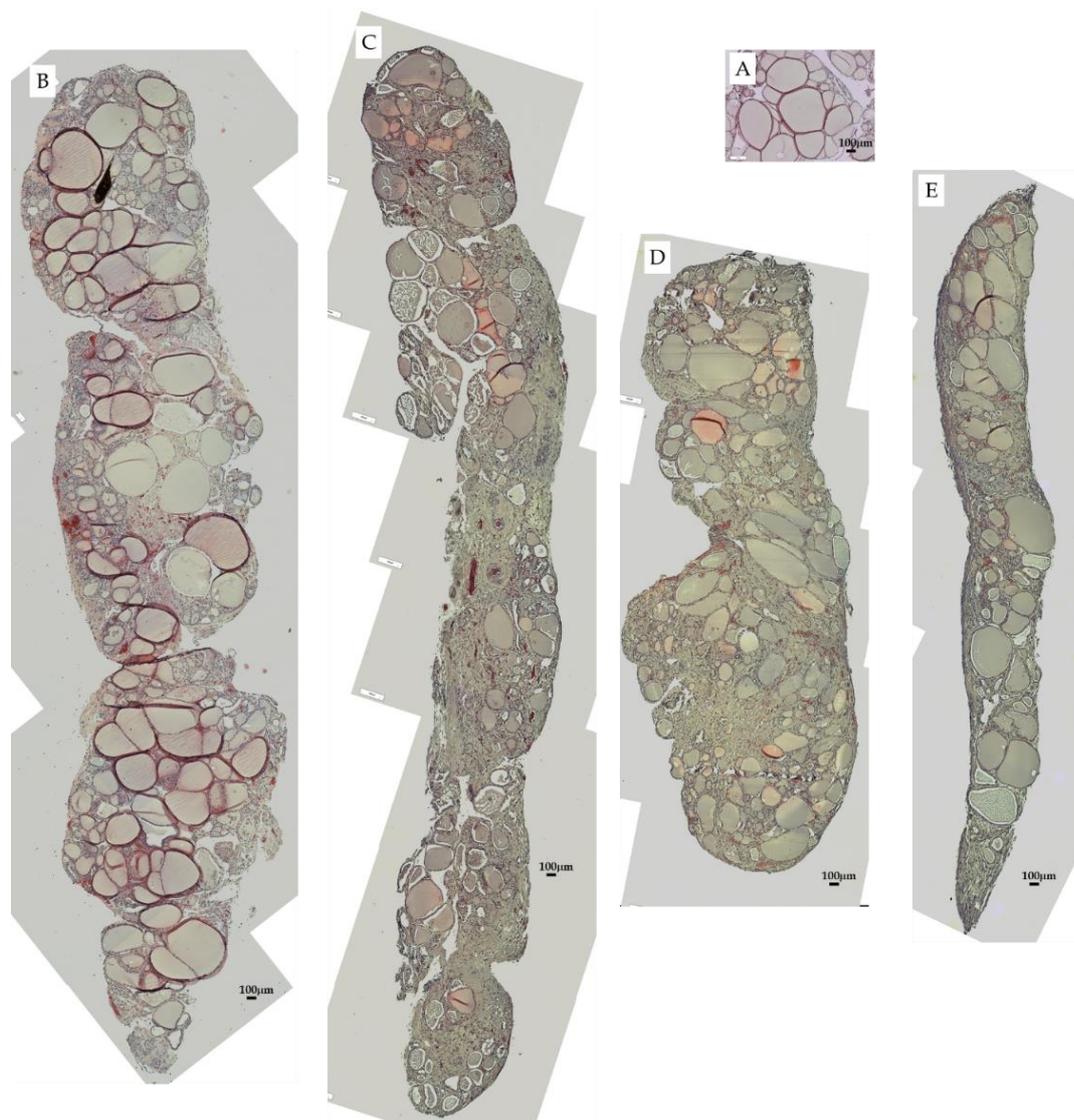


Figure 40 : Maintien des biopsies de tissu normal de thyroïde en culture organotypique à interface air/liquide (ALI).

Observation au microscope photonique coloration H/E à TO (A), 1 semaine (B), 2 semaines (C), 3 semaines (D) et 4 semaines (E) de culture.

En effet, nous observons également une activation du tissu en culture ALI. L'expression de CCND1 est également observée dans certains thyrocytes mais à un plus faible pourcentage qu'en matrigel (Figure 41). En effet, le milieu de culture h7H, similairement à ce qui avait été observé pour les thyrosphères, doit être optimisé pour les cultures organotypiques, à plus forte raison si nous voulons le maintien du tissu normal ce qui implique l'inhibition totale de l'entrée en cycle des thyrocytes.

Nous avons comparé le maintien du tissu dans le milieu h7H (40mIU/L de TSH, 10µg/L d'iode) et dans le milieu h7H modifié (10mIU/L de TSH, 5µg/L d'iode). Mais pour les cultures organotypiques, cette modification ne diminue pas l'activation et permet toujours la reprise du cycle de certains thyrocytes (Figure 41).

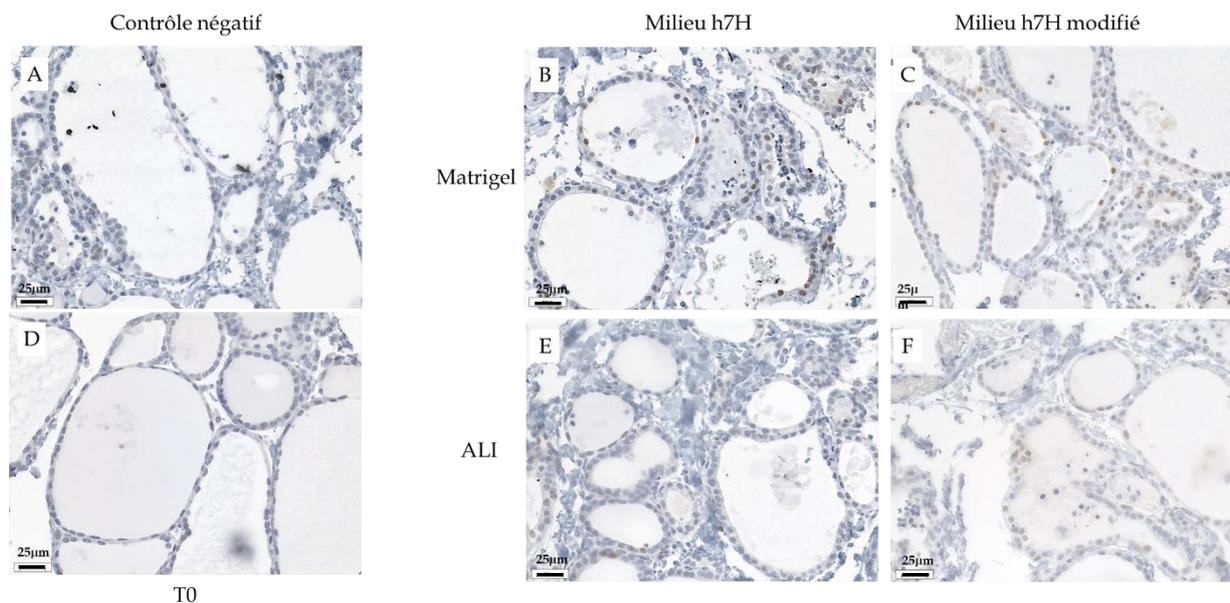


Figure 41 : Comparaison de l'entrée en cycle des cellules des biopsies de tissu normal de thyroïde entre la culture organotypique à interface air/liquide (ALI) et en matrigel.

Observation au microscope photonique après marquage anti-CCND1 couplé à la peroxydase à T0 (D) et à 24h de culture en matrigel (A, B et C) ou à interface air/liquide (E et F) dans du milieu h7H (A, B et E) ou du milieu h7H modifié (C et F).

A : Contrôle négatif (anticorps secondaire) ; (B, C, D, E et F) : anticorps anti-CCND1.

3. Réponse à l'irradiation

Nous savions que la stabilité des cultures organotypiques en matrigel était non satisfaisant à long terme. Néanmoins, en parallèle des mises au point décrites ci-dessus, et pour valider la pertinence de ces modèles pour l'analyse de la réponse à l'irradiation du tissu normal, au moins, à court terme, des biopsies ont été mises en culture en matrigel et exposées aux rayonnements γ (irradiateur GSR-D1) à une semaine de culture avec une gamme de dose de 1, 3 et 5 Gy (1,15 Gy/mn). Nous avons vérifié par une coloration H/E que le maintien du tissu non irradié était satisfaisant à l'exposition (1 semaine de culture) et à deux semaines de culture, et nous avons analysé la réponse à l'irradiation du tissu thyroïdien normal.

Une semaine après irradiation, nous observons une dégradation de l'organisation du tissu (pertes de l'épithélium folliculaire, augmentation de la fibrose) avec un effet dose (Figure 42).

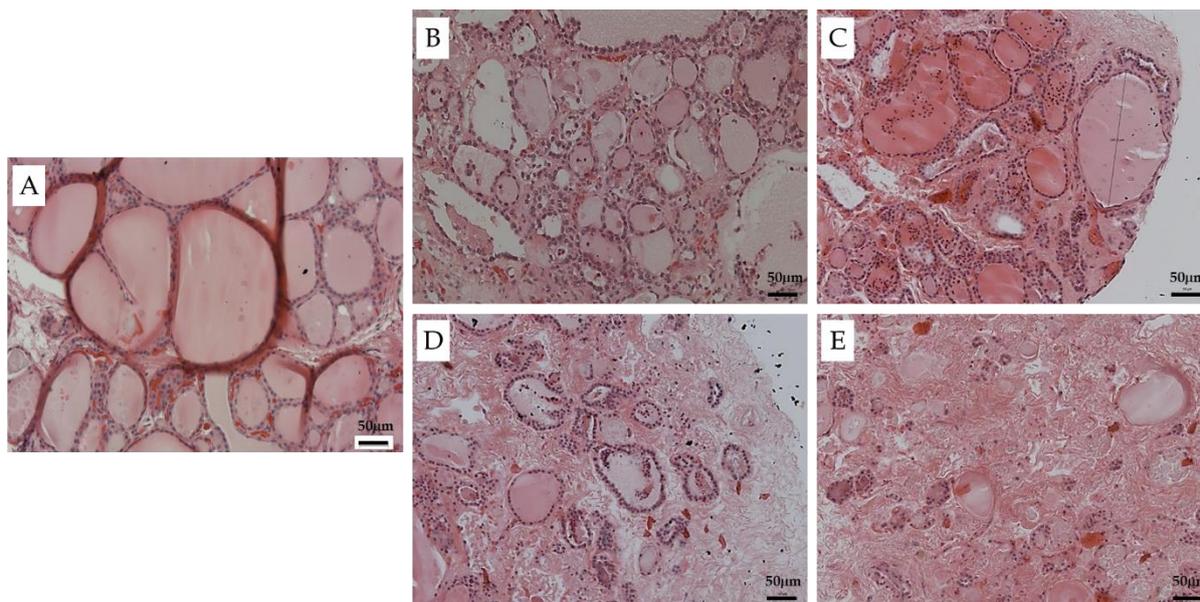


Figure 42 : Réponse à l'irradiation des cultures organotypiques 1 semaine après irradiation.

Observation au microscope photonique après coloration H/E.

Les cultures ont été irradiées à 1 semaine de culture et analysées à 2 semaines de culture.

A : T0, B : non irradié, et irradiation à 1 Gy (C), 3 Gy (D) et 5 Gy (E) à 1,15 Gy/mn.

La déstructuration du tissu est associée à une entrée en apoptose des cellules à la plus forte dose : nous obtenons un marquage positif pour la caspase 3 clivée des thyrocytes à la dose de 5 Gy (Figure 43).

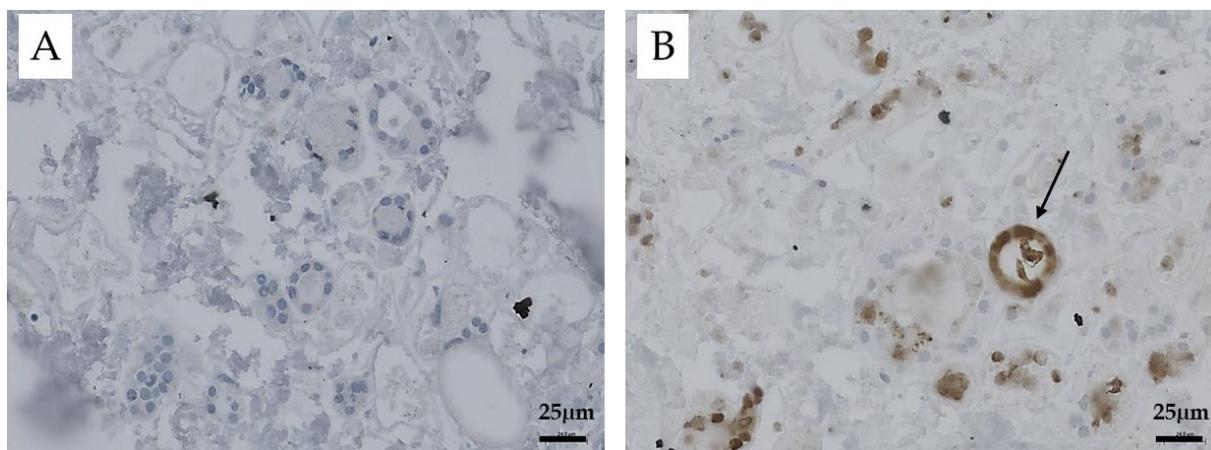


Figure 43 : Entrée en apoptose des thyrocytes dans les cultures organotypiques 1 semaine après irradiation.

Les cultures ont été irradiés à 1 semaine de culture à 5 Gy (A et B) à 1,15 Gy/mn.

Observation au microscope photonique après marquage à la peroxydase à 2 semaines de culture (A et B). A : Contrôle négatif (anticorps secondaire); B : anticorps anti-Caspase 3 clivée.

L'équipe de C. Dupuy avait observé une augmentation de l'expression DUOX1 sur des modèles 2D (Nthy-ori 3.1 et thyrocytes) après une irradiation à 10 Gy et a formulé une hypothèse intéressante [144] : l'irradiation induirait, via la dérégulation de DUOX1, la mise en place d'un stress oxydatif chronique qui participerait à la carcinogenèse radio-induite dans la thyroïde humaine.

Nous avons également observé que l'expression de la protéine DUOX1 est induite par l'irradiation en culture organotypique, et l'intensité du marquage semble proportionnelle à la dose, 1 semaine après irradiation (Figure 44).

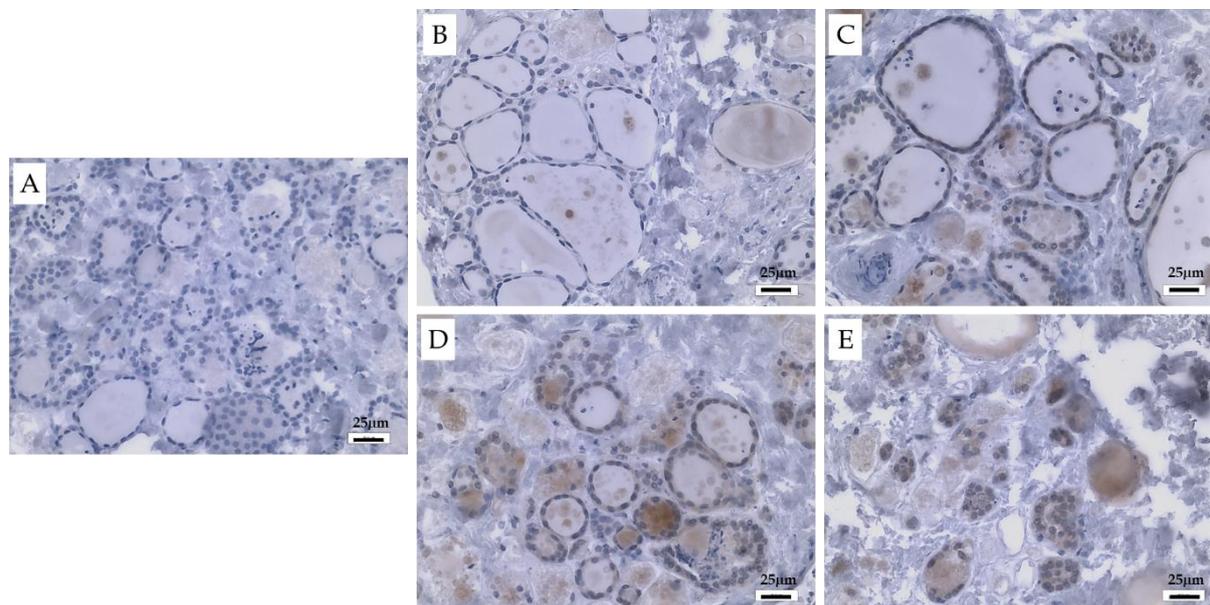


Figure 44 : Expression de DUOX1 en réponse à l'irradiation des cultures organotypiques 1 semaine après irradiation.

Observation au microscope photonique après marquage avec un anticorps anti-DUOX1 couplé à la peroxydase.

Les cultures ont été irradiées à 1 semaine de culture et analysés à 2 semaines de culture.

A : contrôle négatif (anticorps secondaire), B : non irradié, et irradiation à 1 Gy (C), 3 Gy (D), 5 Gy (E) à 1,15 Gy/mn.

Les modèles apparaissent donc prometteurs pour l'analyse de la mise en place de ce stress chronique dans des conditions plus proches de la situation *in vivo*.

De plus, les résultats obtenus sur la culture organotypique feront l'objet d'une publication qui est en cours de rédaction (voir ci-dessous) et sera finalisée après confirmation de nos analyses sur 2 autres patients :

ORGANOTYPIC CULTURE OF HUMAN NORMAL THYROID TISSUE TO ANALYSE THE TISSUE RESPONSE TO CARCINOGENIC STRESS

Dan Mejlachowicz¹, Elodie Perlat¹, Cecile Mathé¹, Abir Al Ghuzlan², Sandra Lassalle³, Martin Schlumberger⁴, Sylvie Chevillard¹, Catherine Ory¹

Author Affiliations:

¹CEA DRF, iBFJ, iRCM, LCE and University Paris-Saclay, route du Panorama, 92265 Fontenay-aux-Roses cedex, France

² Department of Pathology, Gustave Roussy, Paris Sud University, Villejuif, France

³Laboratory of Clinical and Experimental Pathology and CHU-CRLCC-UNSA tumour tissue bank of Nice area, Louis Pasteur Hospital, Nice, F-06002, France

⁴Gustave Roussy and University Paris-Saclay, rue Edouard Vaillant, 94800 Villejuif, France

⁵INSERM ERI-21/EA 4319, Nice, F-06002, France

⁶University of Nice-Sophia Antipolis, IFR 50, Nice, F-06002, France

Dan Mejlachowicz, PhD student, dan.mejlachowicz@cea.fr

Elodie Perlat, Supbiotech student

Cécile Mathé, technician, cecile.mathe@cea.fr

Abir Al Ghuzlan, PU-PH, Abir.ALGHUZLAN@gustaveroussy.fr

Sandra Lassalle, PU-PH, LASSALLE.S@chu-nice.fr

Martin Schlumberger, PU-PH, Martin.SCHLUMBERGER@igr.fr

Sylvie Chevillard, PhD, sylvie.chevillard@cea.fr

Catherine Ory, PhD, catherine.ory@cea.fr

Abstract

The trend of thyroid cancers is increasing worldwide for more than 30 years, mostly due to the over-diagnosis of small size cancers. However, epidemiology studies suggested that systematic scrutiny may not be the only explanation opening the hypothesis of an impact of environmental factors on thyroid carcinogenesis: low doses of exposure to ionizing radiation

(IR) during medical diagnosis by imagery technics in the head and neck area, endocrine disrupting chemicals (EDC), and/or lifestyle and diet. Such exposures are complex and require relevant models to analyze the thyroid tissue response to carcinogenic stress in function of dose and mode of exposure (acute, chronic and cocktail). However, thyroid carcinogenesis in rodent (and eventually other species) is not comparable to thyroid carcinogenesis in human, thus human normal thyroid tissue models are necessary.

Among the models already described, organotypic cultures allow a conservation of the cellular and tissue complexity which is found in the thyroid gland. This model was described for animal biopsies cultured either in collagen matrix (matrigel) with air exposure or on microporous membranes at the air-liquid interface (ALI). In this work, we have compared these two methods using h7H medium to develop a protocol for normal human thyroid tissue in the aim to maintain normal thyroid tissue over several weeks or even months.

We showed a hypoxic stress in the human tissue in matrigel at the beginning of the culture whereas an optimal oxygenation of the tissue was obtained by air-liquid interface culture. Due to h7H medium, an overactivation of thyrocytes and an abnormal entry into the cell cycle were observed in matrigel but were less marked and more peripheral in ALI culture. Furthermore, a secretion of free thyroid hormone T4 was observed in ALI organotypic cultures. Moreover, we validated this model by showing that the expression of DUOX1 increased with the dose one week after ionizing radiation exposure (1, 3 and 5Gy) that was observed in thyrocyte primary culture after a 10Gy exposure by Ameziane-El-Hassani who hypothesized that IR induces a chronic oxidative stress leading to genetic instability and radiation-induced carcinogenesis.

Therefore, we optimized a protocol for organotypic culture of human normal thyroid tissue, allowing to analyze the thyroid tissue response to carcinogenic stress especially IR and EDC effects and risks on the human thyroid.

Introduction

The incidence of thyroid cancers is increasing worldwide for more than 30 years, mostly due to a better detection and diagnosis of small size cancers by the use of ultrasound and fine-needle aspiration biopsies [1-3]. However, several epidemiology studies reported an increase of papillary thyroid cancers of all sizes [1, 4, 5], and suggested that systematic scrutiny could not be the only explanation for the observed excess of thyroid cancers. In parallel, an increase of thyroid non cancer-pathologies is also observed [6]. These observations open the hypothesis of an impact of etiology factors leading to thyroid dysfunctions and/or carcinogenesis. These factors may target the thyroid itself, the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis and/or the transport/effect of thyroid hormones (TH) in periphery tissues, impacting all physiological pathways regulated by the TH in peripheral tissues, leading to the alteration of lipid metabolism, bone metabolism, development/function of the central nervous system... [7, 8].

To date exposure to ionising radiation (IR) at dose >100mGy during childhood, the period of the highest radiosensitivity of the thyroid, is the only demonstrated etiology factors for thyroid cancers [9]. For lower doses, conventional epidemiology loose its statistical discriminating power, mainly due to cohort size, for discriminating a potential increased risk when comparing exposed and non exposed populations. However, a meta-anaysis regrouping post-radiotherapy and Hiroshima/Nagasaki cohorts showed a significant excess of cancers after exposure at dose as low as 50mGy and suggested a non-threshold linear model to

extrapolate the risk observed at high doses to doses under 100mGy [10]. Accordingly, our laboratory showed that post-Chernobyl thyroid tumors developed after exposure at doses from 14 to 40mGy at the thyroid present a common molecular profile with tumors developed after exposure doses of the range of the Gray, and this profile qualify post-Chernobyl tumors (high and low doses) as radiation-induced as compared with sporadic tumors [11]. Thus, radiation-induced tumors may developed after exposure to doses below 50mGy, however at a lower frequency than at higher doses, since the risk of developing a tumour is proportional to the dose. Ionizing radiation exposure may also lead to physiological thyroid dysfunctions [12, 13], known to be risks factors for thyroid carcinogenesis, with questionning concerning the effect of very low doses (range of mGy) of radiation exposure applied for medical imagery (increase use of dental X-rays and head/neck CT scans for diagnostic).

Others factors such as environmental pollution (endocrine disrupting chemicals (EDC), heavy metals), and/or lifestyle and diet (obesity, tobacco smoking, iodine deficiency/supplies...) are suspectd to impact thyroid physiology and/or pathologies [14-19]. Environmental/occupational exposures (IR at low doses/low dose rates, chronic EDC exposure) are complex and we need relevant *in vitro* and/or *in vivo* models to analyze rigorously the thyrocyte/thyroid tissue response to such stress in function of dose and mode of exposure (acute, chronic, cocktail exposure).

Such models should be relevant to the normal thyroid physiology in human and should allow analyzing the response to stress for few/several month/years. Ideally, full analysis of EDC cocktail effects will also require that these models could mirror the balanced regulation of the human HTP axis. Yet, rodent models are not appropriate to understand human thyroid response to stress as either spontaneous carcinogenesis or radiation- and chemical-induced carcinogenesis are very different as compared to human carcinogenesis [20, 21]. They develop

very few sporadic (non-exposed/control) thyroid tumors, are not sensitive to radiation-induced thyroid cancers which moreover never displayed papillary patterns that are the more frequent histopathological cancer subtype developed in human exposed or not to radiation [21]. Thus, the understanding of the relationship between exposure to IR and/or chemicals in terms of the thyrocyte response to these stress and and for evaluating the risk of carcinogenesis will be informative only using a human model of normal thyroid tissue.

Few models to obtain thyrocyte 3D structure mimicking the thyroid follicle or conditions to maintain biopsies of thyroid tissue in culture (organotypic culture) were already described [22-26]. Organoids were derived either from primary culture of mice thyrocytes seeded in an extracellular matrix (ECM) [22], or from human or mouse embryonic or induced pluripotent stem cells, however this late approach necessitates complex protocols, including over-expression of TTF1 and PAX8 and/or specific cocktails of growth factors [23-25]. Organotypic cultures have the advantage to display a cellular complexity close to that of thyroid tissue and permit to observe folliculogenesis. For example, using a collagen matrix together with air exposure, that optimizes oxygen availability for the cells, biopsies of porcine thyroid tissue have been maintained for at least 40 days, although endothelial cells underwent necrosis after 7 days [26, 27]. Alternatively, mouse embryo thyroid explants were successfully maintained on microporous membranes at the air-liquid interface (ALI) [28].

Up to now organotypic cultures were described for animal biopsies, thus the aim of the work was to compare ECM-based and ALI culture to develop a protocol of organotypic culture optimized for normal human thyroid tissue, allowing the maintenance of thyroid differentiation over a period of weeks and possibly months.

Materials and Methods

Biopsies of normal human thyroid tissue

Resected thyroid tissue samples are provided by the Department of Biology and Medical Pathology (Gustave Roussy, France), and by the Department of Head and Neck Surgery (Antoine Lacassagne Cancer Center, Institut Universitaire de la Face et du Cou, Nice Hospital Biobank (BB-0033-00025), France).

Patients have a lobectomy because of a cancer in the contralateral lobe; patients with Grave's disease or hyperplasia are excluded. Before surgery, patients received the necessary informations and signed an informed consent for using their specimen for research project. After surgery, senior thyroid pathologists take care of the macroscopy, selecting the area normal tissue and samples are immediately immerge in the AQIX RS-I Cell Transportation Medium with antibiotic (Life science production) and sent to our laboratory at room temperature. Time before sample is cultured varies from 2-3 hours to about 24 hours, delay that does not alter the quality of the biopsies. Only free-mycoplasma biopsy (MycoAlert Mycoplasma Detection Kit, Lonza) are cultivated. As controls, 2 or 3 sections of paraffin embedded tissue of each biopsy are fixed overnight in Formaldehyde 4% w/v buffered at pH 6.9 (Calo Erba), eventually stored at 4° in 70% Ethanol and paraffin-embedded (Tissue-Tek VIP 6, Sakura). Within days after sample reception, hematoxylin/eosin staining (H/E) of the tissue is done to verify that the biopsy is morphologically normal tissue, all biopsy presenting hyperplasic or any pathologic patterns are eliminated. Ideally, for studying normal thyroid tissue response to radiation or chemical stress, it would be necessary to work on samples taken from young patients, since the higher sensitivity of thyrocytes to radiation exposure is before the age of 15 year old. However, the frequency of thyroid cancers in human increases after 40 years old, and pediatric thyroid cancers are rare. In the present work to set up the

conditions for human normal tissue organotypic culture, we cultivated biopsies from patients aged from XX to XX years old.

Oganotypic culture

Either for matrigel based protocol described by Toda and al. [26] or the air-liquide interface culture [28], thyroid tissue is sliced in 2x2x4mm blocks in cold PBS, ph 7.4 (Gibco). For matrigel based protocol, biopsie blocks are included in Corning Matrigel Matrix , growth factor reduced (GFR) (Fisher, France) in millicell culture Insert, Polyethylene Terephthalate (PET) 1 μ m (Millipore, France) in 12 well plate (Figure A1). To avoid the biopsied to stick to the PET membrane, a 100 μ l layer of 50% matrigel in h7H medium was poured and solidified in the insert culture. Then, the tissue blocks were deposit on the 50% matrigel layer and embedded in 150 μ l of 5% matrigel in h7H medium. For air-liquide interface (ALI) culture, the blocks were put on a MF-Millipore (Mixed cellulose esters) membrane, 0.8 μ m pore size, (Merck, France) maintained at the interface using a polylactic acid device design and print by Bip3D (France) in 6 well plates (Figure B1). For the two protocols, the humanized medium (h7H) decribed by Bravo et al was used [29] eventually with modifications as described in supplementary data. Medium was changed three times a week. At chosen time, the tissue blocks were either gently removed from the matrigel with forceps or picked up from the inserts, washed quickly in PBS (Gibco) and then were fixed and paraffin-embedded as described above.

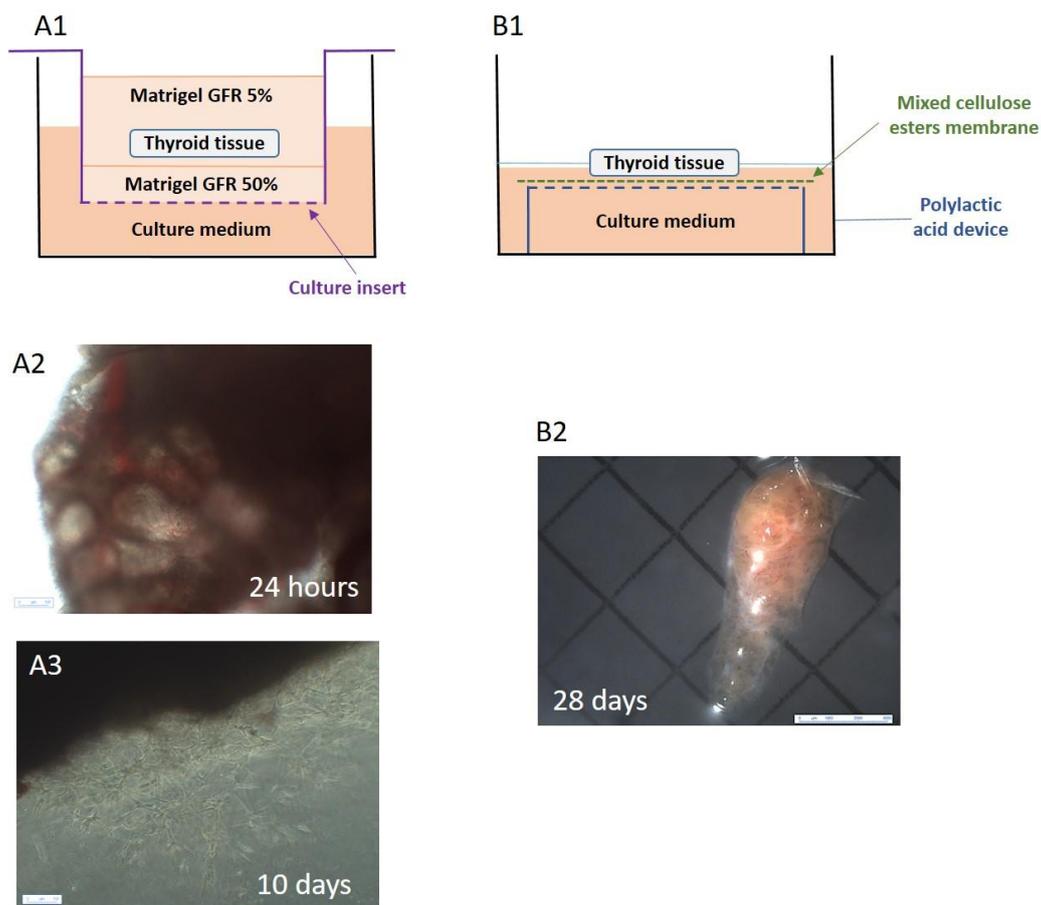


Figure 1: Matrigel-based and ALI-based protocols

A1: Scheme of matrigel based protocol as described by Toda and al. [26]; A2: 1 μ m PET culture inserts are optically transparent and permit to check the aspect of the tissue at least in the beginning of the culture (since the blocks opaqueness increases with time) and A2, to observe the formation of the cellular network around the tissue. B1: Scheme of ALI protocol. B2: ALI biopsy à 4 weeks of culture (B2).

Follow-up of the structural maintenance of thyroid tissue in culture

Five μ m-thick sections FFPE blocks were cut using microtome and fixed by overnight incubation at 37°C on adhesion slides, Menzel Gläser, Polysine (VWR). The maintenance of the tissue organization is verified after Mayer Hematoxylin /Eosin staining of the sections. Expression of thyroid differentiation markers (Transcription factor PAX8 and NKX2.1/TTF1, thropoxydase, thyroid hormone transporter MCT8, or thyroglobulin) or markers associated with induction of proliferation (CCND1), hypoxia (HIF1A), or apoptosis (clived Caspase-3) was

performed by immuno-histochemistry labelling. Antibodies and dilutions are described in table 1.

Markers	Symbol	Dilution	Reference	Providers
NK2 homeobox 1 / Thyroid transcription factor 1	NKX2-1 / TTF1	1/100e	ab76013	ABCAM
Paired box 8	PAX8	1/100e	ab97477	ABCAM
Thyroglobulin	TG	1/50e	ab156008	ABCAM
Thyroperoxydase	TPO	1/200e	HPA007987	Ozyme
Solute carrier family 16 member 2	SLC16A2 / MCT8	1/500e	HPA003353	Ozyme
Cyclin D1	CCND1	1/250e	ab134175	ABCAM
Cyclin dependent kinase inhibitor 2A/p16INK4a	CDKN2A	1/100e	ab108349	ABCAM
Galactosidase beta 1	GLB1	1/100e	ab203749	ABCAM
Cleaved Caspase-3	Cleaved Caspase-3	1/100e	9661S	OZYME SAS
Hypoxia inducible factor 1 subunit alpha	HIF1A	1/100e	ab16066	ABCAM
Marker of proliferation Ki-67	MKI67	1/100e	550609	BD pharmingen

Table 1: Antibodies

Peroxidase was used as chromogenic reporter (ImmPRESS™ HRP Anti-Rabbit IgG (Peroxidase), Polymer Detection Kit, made in Horse and DAB Peroxidase (HRP) Substrate Kit (with Nickel), 3,3'-diaminobenzidine (vector, cliniscence). After immunostaining, sections were counterstained with Mayer Hematoxylin, dehydrated and mounted in Eukitt® Quick-hardening mounting medium (Sigma) before microscope observation.

T4 dosage of free T4 in culture supernatants

To follow the physiologic maintenance of the biopsies in ALI culture, we check the abilities of the tissues to respond both to a TSH stimulus for thyroid hormone synthesis and to an excess of iodine to inhibit TH synthesis (Wolf-Chaikkof effect) by measuring the variation of free T4 concentration in the culture supernatant. At choosen times, six series of 4 biopsies (separated MF-Millipore membrane) were washed twice in PBS, pH 7.4 (Gibco). Then the series of biopsies were cultured for two days in the h7H medium (40mIU/L of TSH, 10µg/L of sodium

iodine), in h7H medium without TSH, in h7H with high TSH concentration (160mIU/L), or in h7H with high iodine concentrations (100µg/L and 300µg/L). Supernatant were collected and stored at -20°C. Free T4 dosage was realized in the Medical Analysis Laboratory of CEA, Saclay, using electrochemiluminescence on a cobas 6000 analyzer (Roche diagnostics). Dosage were normalized using the weight of thyroid tissues of each 4 biopsies groups.

Organotypic culture exposure to ionizing radiation

Biopsies were stabilized 1 week in culture, and exposed to a gamma ¹³⁷Cs source using a GSR-D1 irradiation unit (Gamma-Service Medical, Leipzig, Germany), at indicated doses and dose rate. Acceptance tests of the gamma irradiator were established and performed with a small-volume ion chamber and high-sensitivity radiochromic films, EBT3, before samples exposure. At indicated time, samples were briefly washed in PBS, processed for FFPE-embedding.

Results

Hypoxic stress in human thyroid organotypic culture in matrigel

The biopsies of human thyroid tissue were maintained in the medium described by Bravo et al. [29], which has been specially adapted to the maintenance of primary cultures of human thyrocytes as compared to media previously developed for mouse thyrocytes. We first follow the protocol described by Toda et al. [26]: porcine biopsies were collagen-embedded in culture inserts allowing the culture medium diffusion to the biopsies by the porous membrane of the insert bottom, and an optimized oxygenation as no medium was poured in the insert, on the top of the collagen plug (Figure 1). In this study, human biopsies were embedded in matrigel, as already described for obtaining mice and human thyroid organoids [22, 30]. We rather used growth factor reduced (GFR) matrigel to avoid an additive effect on thyrocytes, of growth

factors present at higher concentrations in the standard formulation (eg. EGF, IGF1), however no significant difference was seen for the maintenance of the biopsies using complete or GFR formulation (data not shown). Human biopsies were maintained up to 3-5 weeks in the matrigel. Degradation, more or less severe of thyroid tissue organization were observed in fonction of the donors, going in some cases up to a destructuration/loss of the follicule epithelium and induction of fibrosis as soon as after one week of culture (Figure 2).

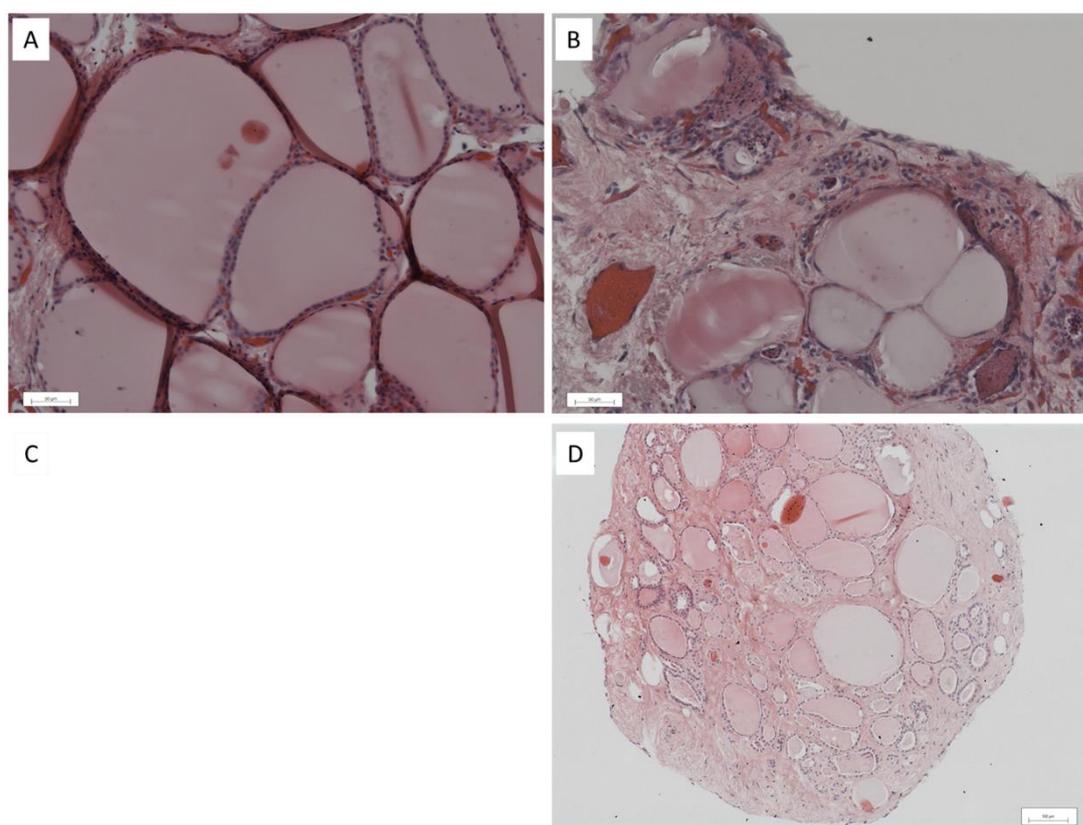


Figure 2: Follow-up of human thyroid tissue organization in matrigel according to the donor
A, B: For this donor, the normal tissue (A: before being embedded in GFR matrigel) lost its histological organisation after one week in matrigel (B) showed by HE staining. C, D: Another donor before being embedded (C) and after 5 weeks of culture. In this latter case, follicule epithelium and tissue morphologie was still globally maintained.

To determine which stress could be associated with the poor maintenance of the tissue, biopsies were analysed at 24h, 48, and 72h of culture and we checked the normoxic/hypoxic status by analysing the stabilisation and localisation of the hypoxic transcription factor HIF1A. Nuclear HIF1A positive staining was observed in the follicule epithelium, suggesting that a hypoxic stress is induced in the tissue from the start of the culture (Figure 3B). To check if this stress is due to culture matrigel embedding conditions, HIF1A expression was in biopsies cultured on membrane inserts at the air-liquid interface (ALI) according to the protocol described by Hick and al. to maintain explants of thyroid mice embryos [28]. Nuclear HIF1A localization was not observed, only a weak diffuse staining in the thyrocyte cytoplasm was observed for some donors (Figure 3D).

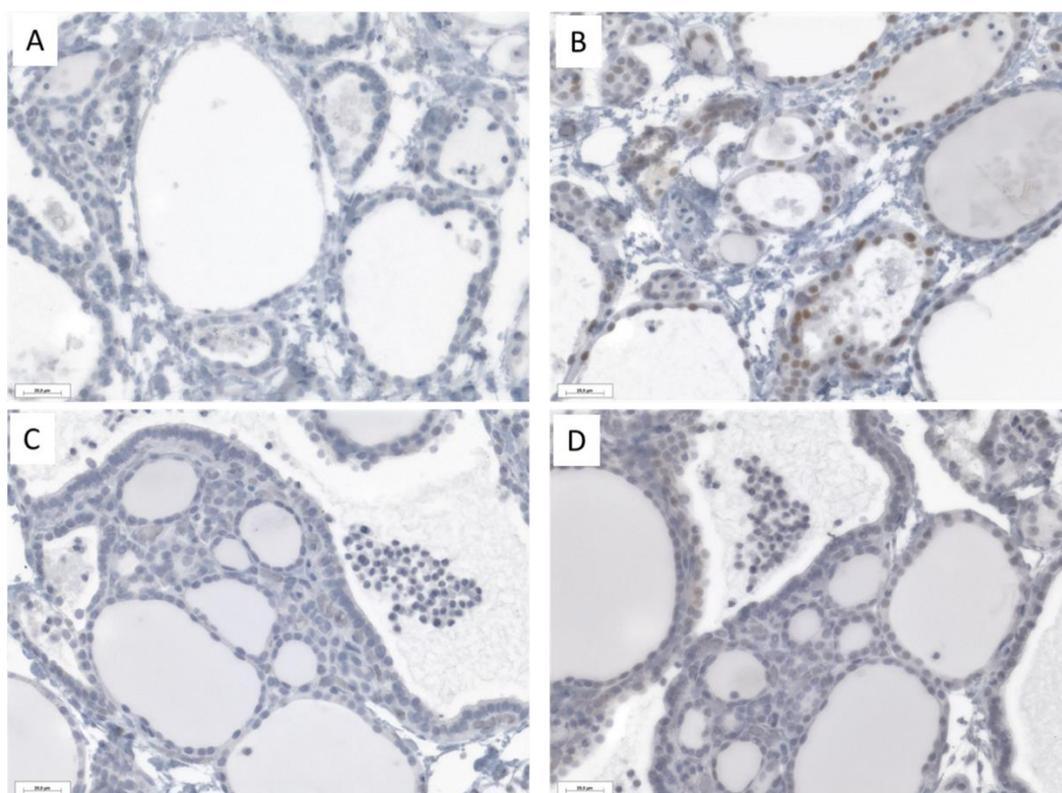


Figure 3: HIF1A immunostaining of human thyroid tissue cultivated in matrigel or at the air liquid interface

A, B: Tissue embedded in matrigel for 24 hours and C, D: Tissue of the same donor in ALI culture for 24 hours; A and C: negative control without HIF1A antibody; B and D: HIF1A staining.

Effects of the h7H medium for organotypic culture of normal thyroid tissue

The h7H medium is very well adapted to the 2D primary culture of human thyrocytes, allowing in our hands a very reproducible survival and growth of human thyrocytes in culture among donors. Accordingly to Bravo et al, we observed by immunocytochemistry staining (data not shown) a high percentage (>90%) of thyrocytes expressing PAX8 (4-5 weeks of 2D culture) and NRKX2.1/TTF1 (up to 3 weeks after cell culture). However, from 24h of culture in h7H medium we observed a strong activation of the thyrocytes in the tissue (turned from flat to cuboïde morphology, observation of thyroglobulin readsorption lacunae) in matrigel (both in standard and GFR formulation), as compared to the thyrocyte status in the biopsies before the culture (Figure 4 A1,2). Similar activation was observed in ALI cultures, but less pronounced and more peripheric as compared to matrigel cultures. Moreover, an increase of thyrocytes expressing Cycline D1 was observed in the follicules epithelia (Figure 4, C1), but very few thyrocytes were positive for Ki67 (Figure 4, C2).

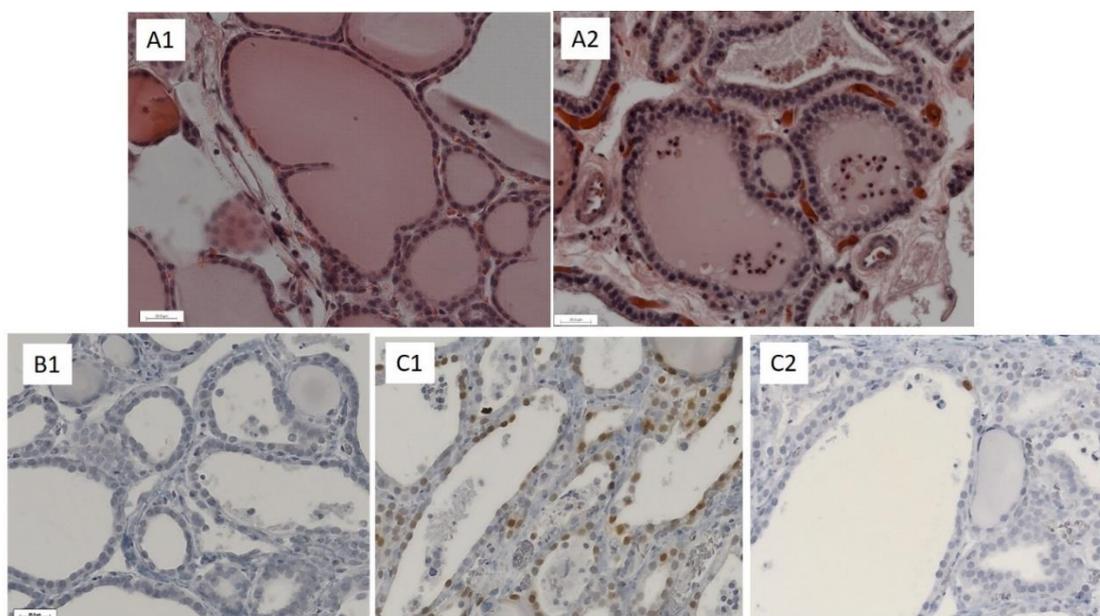


Figure 4: Thyrocytes activation and G0-early G1 phase transition in follicule epithelia

A: H/E staining of a biopsy before (1) and after 48h (2) of culture in matrigel. B, C: biopsy before (B1) and after 48h (C) of culture in matrigel; B1, C1: CCND1 staining; C2, Ki67 staining.

Physiological response to TSH activation or iodine excess of the organotypic cultures

To verify the tissue activation/thyrocyte differentiation in ALI culture, we measured the concentration of free T4 released by the biopsies in the h7H medium containing 40mIU/L of TSH as compared with TSH-free medium and h7H medium with 4 times the TSH concentration (160mIU/L). The lack of TSH led to a decrease in free T4 release, but we do not observe a dose effect in T4 release when compared 40mIU/L and 160mIU/L of TSH. This result also indicates that the TSH concentration in the h7H medium is high for our organotypic culture condition and this point could explained the activation/proliferation in the tissue. The negative feedback of thyroid hormone synthesis, known as Wolff-Chaikov effect, was fonctionnal as release of free T4 in the culture medium was decreased by increasing the concentration of sodium iodine (10µg/L to 100µg/L) in the culture medium.

Organotypic culture to study the effect of ionizing radiation exposure on human normal thyroid tissue

To validate the organotypic culture as relevant models to study the effect of ionizing radiation on human normal tissue, biopsies were exposed to 1, 3 or 5Gy (1Gy/mn) after one week in culture and FFPE-embedded one week after irradiation. According to Ameziane-El-Hassani [31], an increase of DUOX1 expression was observed. This increase was dose dependent in level and persistence over the time (Figure 5).

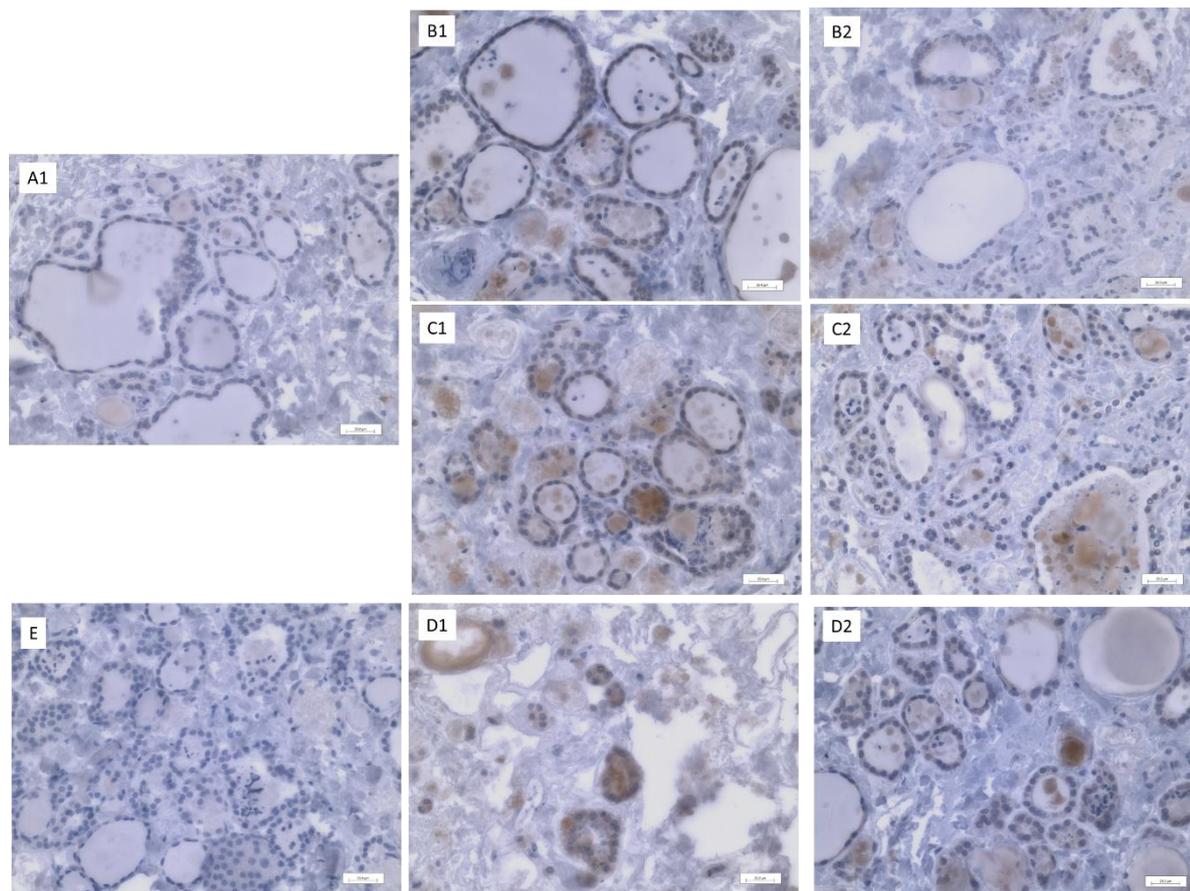


Figure 5: NADPH DUOX1 expression in response to ionizing radiation exposure in organotypic culture

After one week of culture, biopsies were non-exposed (A), or exposed to 1Gy (B), 3Gy (C) or 5Gy (D) at a dose rate of 1Gy/mn. Expression of DUOX1 was analysed one week after exposure (1) or 2 weeks of exposure (2). E: negative control without DUOX1 antibody on a 1Gy-exposed biopsy (one week of exposure).

Discussion

The objective of this work was to challenge protocols already described for porcine [29] or murine [28] organotypic cultures to maintain biopsies of human normal thyroid tissues *in vitro*. As the physiology and carcinogenesis differ among the species, such *in vitro* model will empty the lack of human models to analyze the short/mid term response of thyroid tissue to suspected carcinogenic stress, such as low doses/dose rates of ionizing radiation exposure and/or EDC alone or in cocktail. When developing normal thyroid tissue models for such purpose, both 1) the maintenance of the polarization of the thyrocytes and of the tissue organization, and 2) the physiologic ability for thyroid hormones (TH) synthesis in response to the pituitary thyroid stimulating hormone (TSH) stimulation, are required.

Following the protocol described by Toda *et al.* for thyroid organotypic culture in matrigel, we have to face two major problems: a hypoxic stress that provokes the degradation of follicule organisation and an excessive thyrocytes proliferation/activation.

As an endocrine organ, thyroid is highly vascularized and needs adapted oxygenation for proper function. Response to hypoxia is regulated by the stabilisation and the nuclear localization of hypoxic transcription factors including HIF1A, which in turns dimerized with HIF1B/ARNT, to launch a transcriptomic program optimizing the cell machinery/metabolism for cell survival to stress [32-34]. It was shown that transplantation of human thyroid tissue in SCID mice led to transcriptomic variation of genes during the first week of transplantation, but expression of these gene recovered at longer times when the tissue become vascularized in the mouse [35]. In our model, strong nuclear localization of HIF1A was observed in the thyrocytes at the beginning (up to 2-3 Days) of the culture in matrigel, but this point has been greatly improved by culturing the fragments at the air liquid interface (ALI) that favorises the tissue oxygenation. *In vitro*, a better oxygenation of the tissue may be obtained using a

combination of oxygen carrier (extracellular hemoglobin embedded in alginate beads) and oxygen generating biomaterial (CaO₂ silicone disks) as it was described to maintain porcine pancreatic islets embedded in alginate beads [36]. However, it should be validated since it could generate reactive oxygen species (ROS) known to be toxic for the cells.

Importantly, after an hypoxic stress, it was recently showed that HIF1 α regulates TERT in thyroid cells that increases proliferation and autophagy in thyroid cancers cells [37]. Thus hypoxia could favor the thyrocytes reenter the cell cycle. Moreover, within the biopsy endothelial cells, adipocytes and infiltrating macrophages may also respond to hypoxia by the releasing of growth factors, angiogenic factors, inflammatory cytokines, which may contribute to an unwanted activation of the thyrocytes. [38]. Hypoxia may induced the secretion of leptin by stromal adipocytes [39] and leptin was shown to increase the activating effect of the TSH on human thyrocytes [40]. Few CD68⁺ (monocytes, macrophage) cells infiltrate the thyroid normal tissue [41, 42], they are sensitive to hypoxia by inducing an inflammatory program that eventually locally increases oxygen consumption and thus increases hypoxia [38, 43]. Overall, considering the complex effects of hypoxia in the thyroid tissue, such stress should be limited at best, either for use of the models to study short term response of thyroid tissue to stress, or for long term physiologic behavior of the tissue. Therefore, we privilege ALI culture for the maintenance of the thyroid tissue.

Folliculogenesis was both observed at the periphery of porcine biopsies [27] and in the mouse explants co-cultured with endothelial cells [28]. Indeed, folliculogenesis and a moderate activation of the thyrocytes could be advantageous for the 3D culture in the perspective to analyze the response of thyroid tissue to ionizing radiation, as it may enable to mimick the behavior of young thyroid using adult patients since childhood thyroid is highly radiation sensitive because it still proliferates. Hopefully, thyroid cancer is very rare in children, but it

decreases the opportunities to challenge normal tissues from young people. However, h7H medium had to be adapted to organotypic cultures to limit its activating and proliferative effects on the tissue. Few variations of the h7H medium were previously described, but these studies focused on 2D primary cultures of human thyroid normal or pathologic tissues [44, 45]. Wang *et al.* compared a 6H and h7H media, and mentioned no significative difference for the maintenance of 2D cultures, while the concentrations of pro-proliferating factors for thyrocytes were very different (10mIU/ml vs 40mIU/L of TSH and 10mIU/ml vs 25mIU/L of insulin, for 6H and h7H respectively) [44]. Antioxydants, growth hormone and iodine are included in h7H but not in 6H and the media are complemented by 5% of fetal bovine serum (FBS) for the 6H and by 5% fetal calf serum plus 5% FBS for h7H. In our hands, h7H was indeed very well adapted to 2D cultures, allowing the maintenance of differentiation over 3-4 weeks and very reproductive proliferation rates and cell survival among donors, while a change of thyrocytes morphology occurred from 2-3 weeks (data not shown). In 2D culture and for organotypic cultures in matrigel, 10% and 5% of FBS did not significantly change the thyrocytes morphology, proliferation rate and survival. It did not change the maintenance of organotypic culture as well (data not shown). Both activation of the thyrocytes and passage for G0 to G1 stage are linked with TSH effects.

In conclusion, we optimized a protocol for organotypic culture of human normal thyroid tissue, and validate its use analysing of the response of human thyroid tissue to ionizing radiation exposure. Indeed, Ameziane-El-Hassani *et al.* proposed an interesting hypothesis associated with the radiation-induced increased expression of DUOX1, which may led to the induction of a chronic oxidative stress, DNA damage and radiation-induced carcinogenesis in the thyroid. However, this hypothesis relied on the response of primary culture of human

thyrocytes to high exposure dose (10Gy) and organotypic culture of normal human thyroid tissue may be a useful tool to challenge this hypothesis in a context mimicking human tissue *in vivo*.

Acknowledgments

This work was supported by the ANSES, by Electricité de France and by the Segment Radiobiology Segment (Christophe Carles, CEA).

Author disclosure statement

No competing financial interests exist.

References

1. Deng, Y., et al., *Global Burden of Thyroid Cancer From 1990 to 2017*. JAMA Netw Open, 2020. **3**(6): p. e208759.
2. Hafdi-Nejjari, Z., et al., *Impact of thyroid surgery volume and pathologic detection on risk of thyroid cancer: A geographical analysis in the Rhone-Alpes region of France*. Clin Endocrinol (Oxf), 2018.
3. Leboulleux, S., et al., *Papillary thyroid microcarcinoma: time to shift from surgery to active surveillance?* Lancet Diabetes Endocrinol, 2016. **4**(11): p. 933-942.
4. Morris, L.G. and D. Myssiorek, *Improved detection does not fully explain the rising incidence of well-differentiated thyroid cancer: a population-based analysis*. Am J Surg, 2010. **200**(4): p. 454-61.
5. Chen, A.Y., A. Jemal, and E.M. Ward, *Increasing incidence of differentiated thyroid cancer in the United States, 1988-2005*. Cancer, 2009. **115**(16): p. 3801-7.
6. Taylor, P.N., et al., *Global epidemiology of hyperthyroidism and hypothyroidism*. Nat Rev Endocrinol, 2018. **14**(5): p. 301-316.
7. Mullur, R., Y.Y. Liu, and G.A. Brent, *Thyroid hormone regulation of metabolism*. Physiol Rev, 2014. **94**(2): p. 355-82.
8. Mughal, B.B., J.B. Fini, and B.A. Demeneix, *Thyroid-disrupting chemicals and brain development: an update*. Endocr Connect, 2018. **7**(4): p. R160-R186.
9. Veiga, L.H., et al., *Thyroid Cancer after Childhood Exposure to External Radiation: An Updated Pooled Analysis of 12 Studies*. Radiat Res, 2016. **185**(5): p. 473-84.
10. Lubin, J.H., et al., *Thyroid Cancer Following Childhood Low-Dose Radiation Exposure: A Pooled Analysis of Nine Cohorts*. J Clin Endocrinol Metab, 2017. **102**(7): p. 2575-2583.
11. Ory, C., et al., *Comparison of transcriptomic signature of post-Chernobyl and post-radiotherapy thyroid tumors*. Thyroid, 2013.
12. Inskip, P.D., et al., *Hypothyroidism after Radiation Therapy for Childhood Cancer: A Report from the Childhood Cancer Survivor Study*. Radiat Res, 2018. **190**(2): p. 117-132.
13. Ron, E. and A. Brenner, *Non-malignant thyroid diseases after a wide range of radiation exposures*. Radiat Res, 2010. **174**(6): p. 877-88.
14. Calsolaro, V., et al., *Thyroid Disrupting Chemicals*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(12).

15. Pearce, E.N. and L.E. Braverman, *Environmental pollutants and the thyroid*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2009. **23**(6): p. 801-13.
16. Boas, M., U. Feldt-Rasmussen, and K.M. Main, *Thyroid effects of endocrine disrupting chemicals*. Mol Cell Endocrinol, 2012. **355**(2): p. 240-8.
17. Hoffman, K., et al., *Exposure to flame retardant chemicals and occurrence and severity of papillary thyroid cancer: A case-control study*. Environ Int, 2017. **107**: p. 235-242.
18. Aschebrook-Kilfoy, B., et al., *Thyroid cancer risk and dietary nitrate and nitrite intake in the Shanghai women's health study*. Int J Cancer, 2013. **132**(4): p. 897-904.
19. Ward, M.H., et al., *Nitrate intake and the risk of thyroid cancer and thyroid disease*. Epidemiology, 2010. **21**(3): p. 389-95.
20. Bartsch, R., et al., *Human relevance of follicular thyroid tumors in rodents caused by non-genotoxic substances*. Regul Toxicol Pharmacol, 2018. **98**: p. 199-208.
21. Dalke, C., et al., *Differences in the susceptibility to iodine(1)(3)(1)-induced thyroid tumours amongst inbred mouse strains*. J Radiat Res, 2012. **53**(3): p. 343-52.
22. Saito, Y., et al., *Development of a functional thyroid model based on an organoid culture system*. Biochem Biophys Res Commun, 2018. **497**(2): p. 783-789.
23. Ma, R., R. Latif, and T.F. Davies, *Human embryonic stem cells form functional thyroid follicles*. Thyroid, 2015. **25**(4): p. 455-61.
24. Antonica, F., et al., *Generation of Functional Thyroid Tissue Using 3D-Based Culture of Embryonic Stem Cells*. Methods Mol Biol, 2017. **1597**: p. 85-95.
25. Antonica, F., et al., *Generation of functional thyroid from embryonic stem cells*. Nature, 2012. **491**(7422): p. 66-71.
26. Toda, S., et al., *A new organotypic culture of thyroid tissue maintains three-dimensional follicles with C cells for a long term*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **294**(4): p. 906-11.
27. Toda, S., et al., *Thyocytes, but not C cells, actively undergo growth and folliculogenesis at the periphery of thyroid tissue fragments in three-dimensional collagen gel culture*. Cell Tissue Res, 2003. **312**(3): p. 281-9.
28. Hick, A.C., et al., *Reciprocal epithelial:endothelial paracrine interactions during thyroid development govern follicular organization and C-cells differentiation*. Dev Biol, 2013. **381**(1): p. 227-40.
29. Bravo, S.B., et al., *Humanized medium (h7H) allows long-term primary follicular thyroid cultures from human normal thyroid, benign neoplasm, and cancer*. J Clin Endocrinol Metab, 2013. **98**(6): p. 2431-41.

30. Kurmann, A.A., et al., *Regeneration of Thyroid Function by Transplantation of Differentiated Pluripotent Stem Cells*. Cell Stem Cell, 2015. **17**(5): p. 527-42.
31. 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.
32. Thomas, L.W. and M. Ashcroft, *Exploring the molecular interface between hypoxia-inducible factor signalling and mitochondria*. Cell Mol Life Sci, 2019. **76**(9): p. 1759-1777.
33. Bischof, C. and J. Krishnan, *Exploiting the hypoxia sensitive non-coding genome for organ-specific physiologic reprogramming*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1863**(7 Pt B): p. 1782-90.
34. Tirpe, A.A., et al., *Hypoxia: Overview on Hypoxia-Mediated Mechanisms with a Focus on the Role of HIF Genes*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(24).
35. Nomura, T., et al., *Differential radiation sensitivity to morphological, functional and molecular changes of human thyroid tissues and bone marrow cells maintained in SCID mice*. Mutat Res, 2008.
36. Moure, A., et al., *Extracellular hemoglobin combined with an O₂-generating material overcomes O₂ limitation in the bioartificial pancreas*. Biotechnol Bioeng, 2019. **116**(5): p. 1176-1189.
37. Song, H.J., et al., *HIF-1 α -mediated TERT Activation Inducing Autophagy through mTOR Promotes Papillary Thyroid Carcinoma Progression During Hypoxia Stress*. Thyroid, 2020.
38. Corcoran, S.E. and L.A. O'Neill, *HIF1 α and metabolic reprogramming in inflammation*. J Clin Invest, 2016. **126**(10): p. 3699-3707.
39. Wang, B., I.S. Wood, and P. Trayhurn, *Hypoxia induces leptin gene expression and secretion in human preadipocytes: differential effects of hypoxia on adipokine expression by preadipocytes*. J Endocrinol, 2008. **198**(1): p. 127-34.
40. Yamamoto, M., et al., *Interaction between thyrocytes and adipose tissue in vitro*. Pathol Int, 2016. **66**(3): p. 148-157.
41. Kim, S., et al., *The expression of tumor-associated macrophages in papillary thyroid carcinoma*. Endocrinol Metab (Seoul), 2013. **28**(3): p. 192-8.
42. Guarino, V., et al., *Thyroid cancer and inflammation*. Mol Cell Endocrinol, 2009.
43. Palazon, A., et al., *HIF transcription factors, inflammation, and immunity*. Immunity, 2014. **41**(4): p. 518-28.

44. Wang, Y., et al., *Primary Cell Culture Systems for Human Thyroid Studies*. *Thyroid*, 2016. **26**(8): p. 1131-40.
45. Garcia-Rendueles, A.R., et al., *Rewiring of the apoptotic TGF-beta-SMAD/NFkappaB pathway through an oncogenic function of p27 in human papillary thyroid cancer*. *Oncogene*, 2016.

5) Xénogreffes chez la souris

D'après les publications de Fukuda et coll., des greffes de fragments de thyroïde normale humaine chez la souris immunodéprimée SCID permettraient de maintenir le tissu thyroïdien normal jusqu'à au moins 3 ans, ce qui permettrait d'analyser les conséquences d'une exposition à plus long terme qu'avec les précédents modèles et éventuellement d'appréhender les premières étapes de la carcinogenèse thyroïdienne. Comme rapporté ci-dessus, ce modèle a déjà été utilisé pour analyser les effets d'une exposition aux neutrons ou aux rayons X en comparaison d'une irradiation gamma [145, 146].

Nous avons greffé du tissu thyroïdien normal en sous-cutanée sur des souris NOD.Cg-*Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ* ou NSG, et contrôlé le maintien de la structure et de la différenciation du tissu au cours du temps. Les souris NSG ont la particularité de n'avoir aucune activité des lymphocytes T et des lymphocytes B, une activité faible des cellules NK (Natural killer), un dysfonctionnement des macrophages et des cellules dendritiques et n'ont pas de réaction immunitaire développée spontanément (non « leaky »).

1. Dégradation du tissu humain après la greffe

Nous avons réalisé 4 séries de greffes (4 greffons par souris), deux avec du tissu de macaques (2 patients) et deux séries avec du tissu humain (2 patients).

Sur la souris xénogreffée, le point critique est de trouver le bon équilibre entre le fonctionnement normal de la thyroïde de la souris et le tissu greffé qui, s'il reste fonctionnel, peut complètement bouleverser l'équilibre hormonal T3/T4/TSH de la souris. Les hormones thyroïdiennes libérées par les 4 greffons pourraient induire la boucle de rétrocontrôle sur l'axe hypothalamo-hypophysaire de la souris, une baisse de la sécrétion de TSH et en conséquence un arrêt de synthèse des hormones dans la thyroïde de la souris et dans les greffons. Ainsi, nous avons injecté, en intrapéritonéal, de la TSH humaine aux souris (20µIU/g de souris, 2 fois par semaine) pour éviter ce rétro-contrôle négatif.

Nous avons eu de bons taux de prise de greffes avec 12/16 et 13/16 pour le macaque (à 6 semaines), et 23/24 et 29/36 pour l'humain (à 10 et 8 semaines, respectivement). De plus, la greffe et les injections de TSH n'ont pas modifié le comportement des souris (Figure 45).

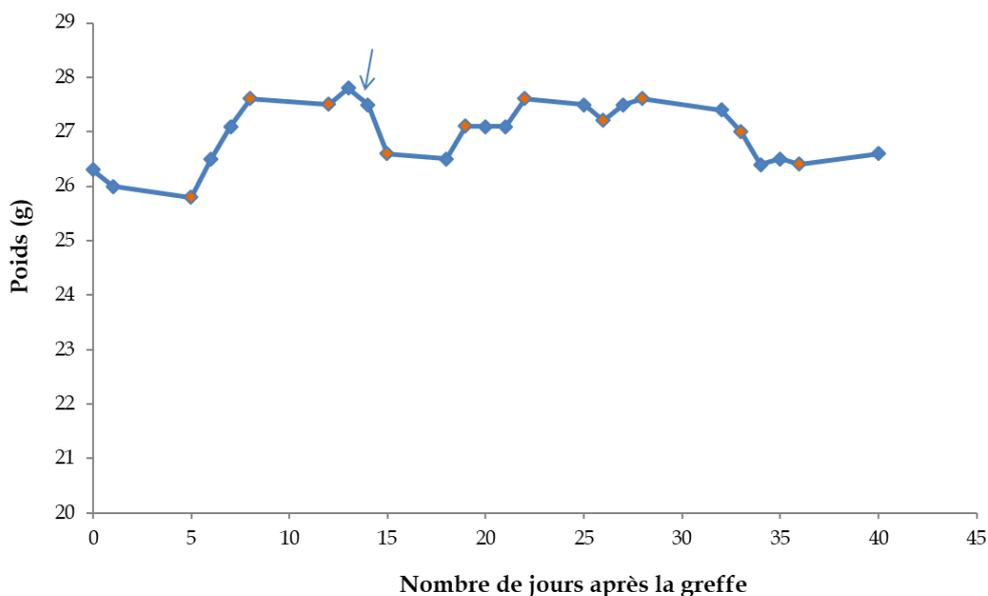


Figure 45 : Suivi de la pesée d'une souris après la greffe de tissu thyroïdien normal.

Les losanges oranges indiquent les jours où la souris a été injectée avec la TSH.

Les biopsies ont été greffées à T0. Pour respecter la règle des 3R, 4 greffons ont été greffés chez la souris. Deux des greffons sont récupérés par chirurgie (incision de la peau sous anesthésie) à des temps choisis, et les deux derniers greffons sont récupérés puis la souris est euthanasiée.

La flèche bleue indique la récupération de greffons par chirurgie en cours de suivi.

Pour les deux premières séries de greffes, réalisées avec du tissu de primate, nous avons prélevé des greffons toutes les semaines après la greffe. Dès la première semaine après la greffe, nous avons observé l'apparition d'un réseau de capillaires sanguins dans la peau de la souris colonisant la greffe. De fait, l'analyse de ces greffons, après fixation et inclusion dans la paraffine, par un marquage immunohistochimique anti-HIF1 α , a montré que les greffons n'étaient pas en choc hypoxique suggérant une bonne oxygénation du greffon (Figure 46).

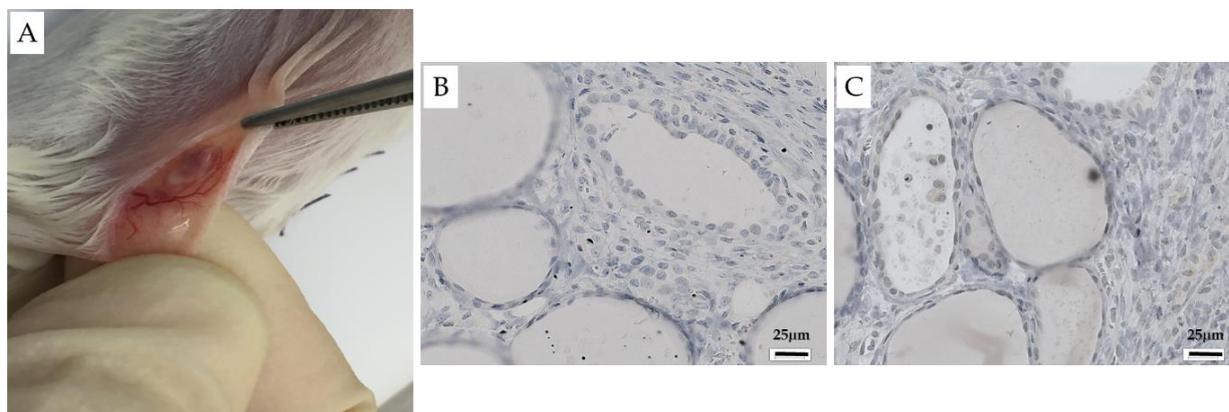


Figure 46 : Mise en place d'une vascularisation permettant une bonne oxygénation du tissu thyroïdien normal dès la première semaine de xéno greffe chez la souris.

Observation à l'œil nu des greffes (A) et au microscope photonique après marquage par un anticorps anti-HIF1 α couplé à la peroxydase à 1 semaine après la greffe.

B : Contrôle négatif (anticorps secondaire) ; C : anticorps anti-HIF1 α .

Les colorations H/E des greffons au cours du temps montrent une bonne conservation de l'organisation du tissu (Figure 47B) dans les greffons pendant les 4 premières semaines de suivi. De plus, nous pouvons remarquer la formation de nouveaux follicules en périphérie des greffons (Figure 47C et 47D), avec plusieurs types de folliculogénèse, comme décrit par Toda et coll. en matrigel [193].

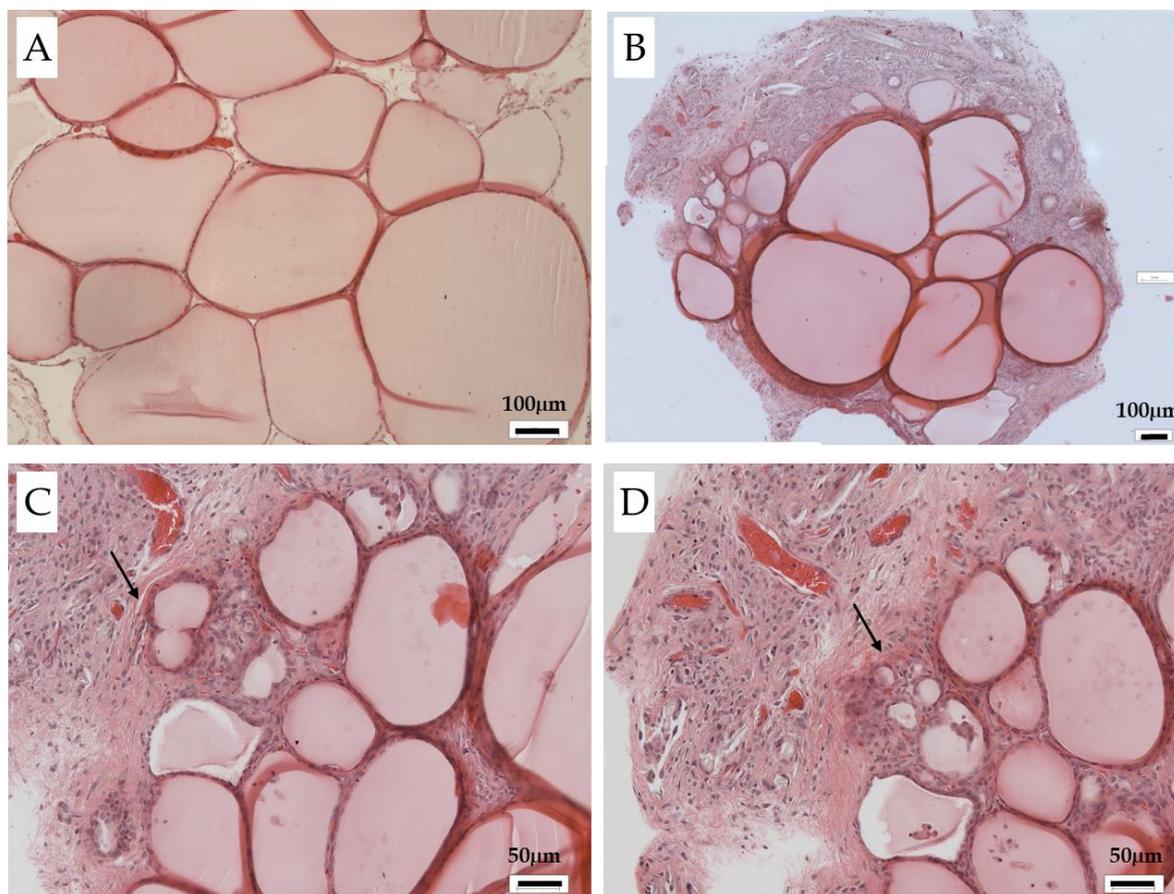


Figure 47 : Maintien de la structure du tissu thyroïdien normal de macaque dans des xéno greffes chez la souris.

Observation au microscope photonique après coloration H/E à T0 (A) et à 4 semaines après la greffe (B, C et D).

Les flèches indiquent la formation de nouveaux follicules.

En revanche, les greffes de patients humains ne se sont pas correctement maintenues. Les colorations H/E et les marquages immunohistochimiques montrent une déstructuration du tissu (perte des follicules) 4 semaines après la greffe (Figure 48A et 48B) et possiblement une dédifférenciation caractérisée par la perte de marqueurs de la thyroïde tels que PAX8 (Figure 48C, 48B et 48 D).

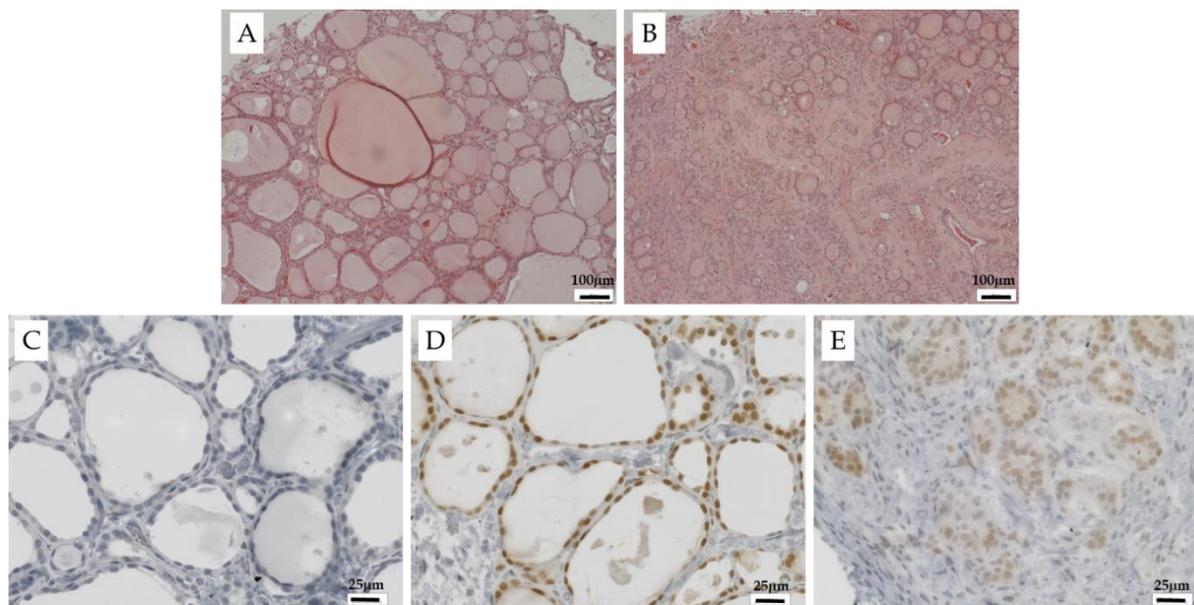


Figure 48 : Déstructuration et dédifférenciation des xéngreffes de tissu thyroïdien humain.

Observation au microscope photonique après coloration H/E à T0 (A) et 4 semaines après la greffe (B), ou après marquage à la peroxydase à T0 (C et D) et à 4 semaines après la greffe (E).

C : Contrôle négatif (anticorps secondaire) ; D et E : anticorps anti-PAX8.

2. Hypothèses

Une des hypothèses pouvant expliquer la différence de comportement des greffons de macaques et humains est l'âge des patients. Les singes étaient âgés de 11 ans ce qui équivaut à un âge de 30-40 ans chez l'Homme, alors que pour les prélèvements humains, les premières greffes ont été réalisées avec du tissu provenant de patients âgés de 63 ans et 82 ans. En effet, chez l'Homme, l'activité fonctionnelle de la thyroïde décroît à partir de 60 ans. De fait, plusieurs observations décrites dans l'étude de Lee et coll. (2016) [199] sur les modifications morphologiques et fonctionnelles du tissu thyroïdien âgé, telles que la présence de globules de TG dans les follicules (Figure 49A et 49C) ou une forte concentration de TG intra-folliculaire (follicule hypoactif) (Figure 49C), sont retrouvées dans nos fragments.

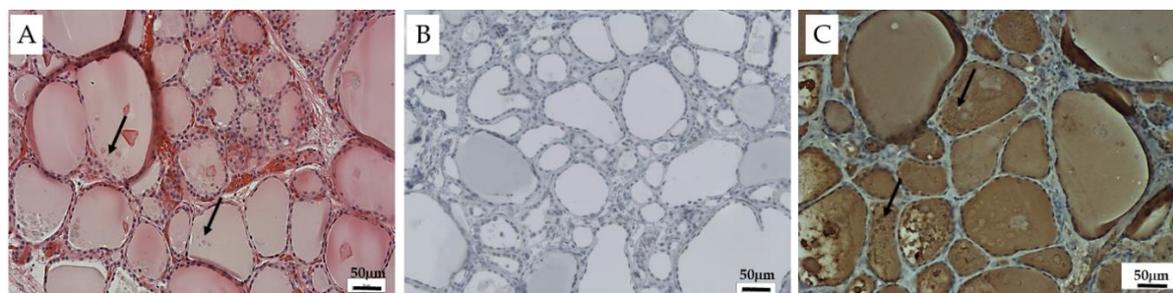


Figure 49 : Modifications morphologiques et fonctionnelles du tissu thyroïdien normal âgé.

A : Observation au microscope photonique après coloration H/E à T0 (A) ou marquage par un anticorps anti-TG couplé à la peroxydase à T0 (B et C). B : Contrôle négatif (anticorps secondaire) ; C : anticorps anti-TG. Les flèches noires indiquent les globules de TG.

De plus, l'analyse des greffons a montré une augmentation du nombre monocytes/macrophages (marquage anti-CD68 ; ab74704, ABCAM) en comparaison du fragment à T0 (Figure 50A et 50B, 50C et 50D), ce qui suggère une réaction inflammatoire dans les greffes pouvant entraîner la fibrose du tissu. Ces cellules produisent du TGF β (Transforming Growth Factor- β), et les thyrocytes expriment au moins la forme TGF β R2 (TGF β Receptor 2) du récepteur au TGF β , ce qui pourrait, de plus, inhiber la prolifération et la différenciation des thyrocytes [202] (Figure 50E).

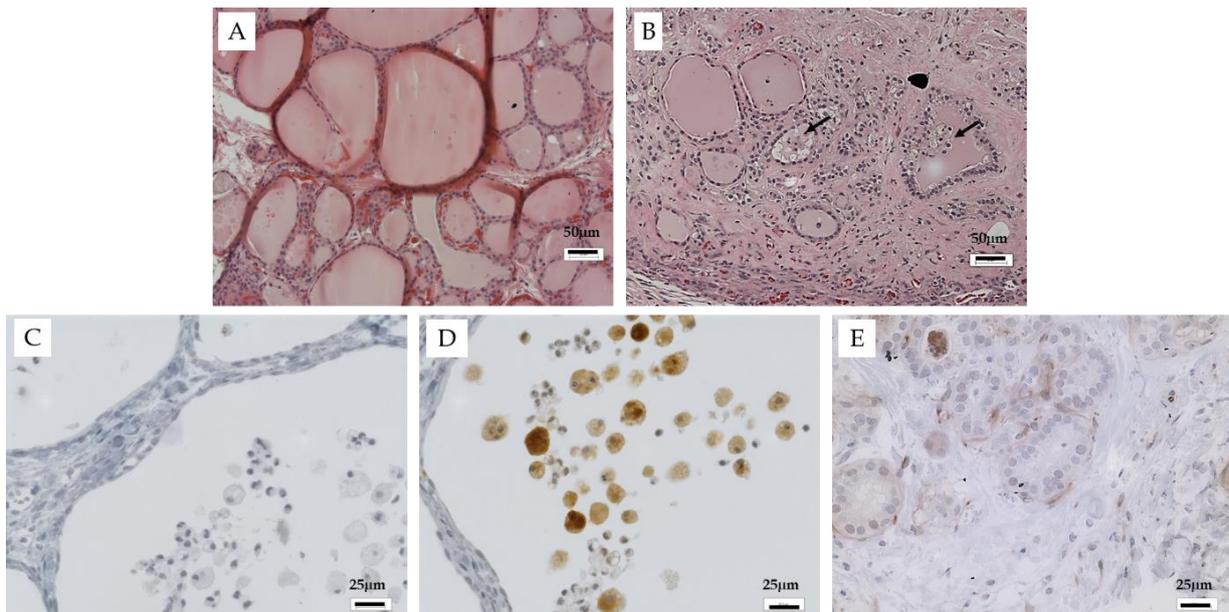


Figure 50 : Activation d'une réaction inflammatoire dans les xénogreffes de tissu thyroïdien normal dans la souris NSG.

Observation au microscope photonique après coloration H/E à T0 (A) et 4 semaines après la greffe (B), ou après marquage à la peroxydase à 4 semaines après la greffe (C, D et E).

C : Contrôle négatif (anticorps secondaire) ; D : anticorps anti-CD68 ; E : anticorps anti-TGF β R2.

Une deuxième hypothèse serait que le fond génétique des souris n'est pas adapté aux xénogreffes de thyroïde. En effet, une publication a montré que si les souris NSG sont parfaitement adaptées aux greffes de moelle, elles ne permettent pas forcément un maintien optimal de greffes d'autres tissus. En particulier, des greffes de peau, réalisées par Kirkiles-Smith et coll., sur des souris NSG ont présenté une inflammation, associée à des infiltrations de leucocytes murins, qui n'est pas observée dans les souris SCID/beige [203].

Nous avons comparé le comportement du tissu thyroïdien de 3 jeunes patients différents (29, 38 et 45 ans) en xénogreffant en parallèle dans des souris NSG et dans des souris SCID/beige, avec un suivi de 5 semaines. Les analyses sur 2 des 3 patients, par coloration H/E des greffons, montrent pour 1 patient que la structure du tissu normal ainsi que l'épithélium des follicules sont mieux maintenus dans les souris SCID/beige que dans les NSG à 5 semaines après la greffe (figure 51).

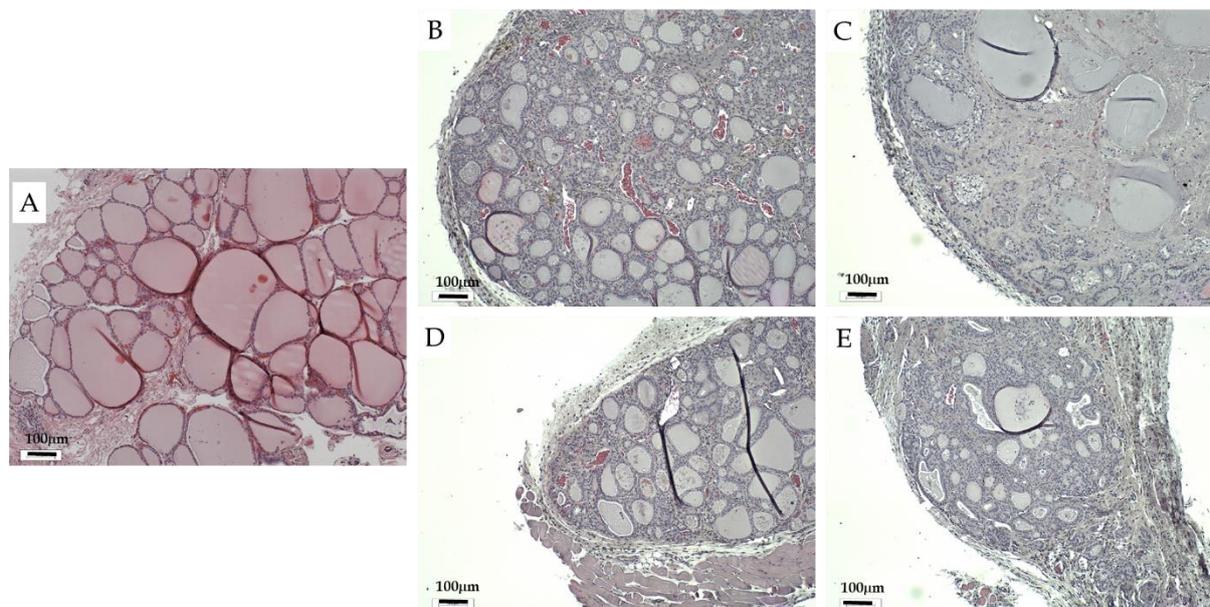


Figure 51 : Comparaison du maintien de la structure du tissu thyroïdien humain normal dans des xéngreffes dans la souris NSG versus SCID/beige.

Observation au microscope photonique après coloration H/E à T0 (A) et à 5 semaines après les greffes pour 1 patient (B, C, D et E). B et D : greffes dans la souris SCID/Beige ; C et E : greffes dans la souris NSG.

En conclusion, nous avons obtenu des résultats prometteurs sur le développement de modèles 3D du tissu thyroïdien normal plus proches de la physiologie *in vivo* de la thyroïde, en comparaison de la culture 2D, en utilisant du tissu humain ce qui n'avait jamais été réalisé auparavant pour les thyrosphères et les cultures organotypiques. Toutefois, nous devons encore optimiser les conditions de culture pour optimiser les modèles qui devraient permettre d'analyser la réponse du tissu thyroïdien normal à différents stress (irradiation, perturbateurs endocriniens) à moyen et long termes.

Nous devons également vérifier le bon fonctionnement de l'activité physiologique des modèles par un dosage de l'hormone T4 libre dans les conditions normales de culture, en absence de TSH et en réponse à une stimulation de TSH. Nous testerons aussi la capacité des cellules à répondre à un excès d'iode qui doit entraîner la rétroaction de la synthèse des hormones thyroïdiennes (effet Wolff-Chaikov).

De plus, une collaboration avec l'IRSN (Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire) et la plateforme CriBiom (Marseille) permettra d'analyser les variations du métabolome en cours de culture en comparaison du tissu à T0, et en réponse à une stimulation de TSH ou un excès d'iode.

Nous avons également montré que la culture organotypique est un modèle très prometteur pour l'analyse de la réponse du tissu normal humain à l'irradiation : une dégénérescence du tissu dépendant de la dose associée à une induction de l'apoptose à la plus forte dose (5Gy), et une augmentation de DUOX1 dès 1Gy soutenant l'hypothèse de C. Dupuy sur l'induction d'un stress oxydatif chronique dans le tissu thyroïdien suite à une exposition aux radiations ionisantes qui détournerait la machinerie de synthèse des hormones. Nos modèles sont particulièrement appropriés pour confirmer cette hypothèse et analyser les conséquences moléculaires d'un stress oxydatif chronique radio-induit.

VII) Discussion

1) Contexte et problématique

La fréquence des cancers de la thyroïde augmente dans le monde depuis plus de 30 ans. Il est admis que cette augmentation est principalement due à une meilleure détection et à un meilleur diagnostic des cancers de petites tailles subcliniques grâce à l'utilisation de l'échographie et de la cytoponction [204, 205].

L'association entre le cancer de la thyroïde et l'irradiation est connue depuis 1950 [106] et s'est confirmée avec le suivi des survivants des bombes d'Hiroshima et Nagasaki et plus récemment des enfants vivant en Ukraine et en Biélorussie en 1986 au moment de l'accident de Tchernobyl [109, 114].

Même si elle observée partout dans le monde, l'augmentation des cancers de la thyroïde a relancé le débat sociétal concernant l'exposition des populations à une irradiation, en particulier aux faibles doses. En effet, les populations sont de plus en plus souvent exposées à de faibles doses d'irradiation, en particulier à cause de l'augmentation de l'usage de l'imagerie médicale, en particulier chez les enfants, aux activités nucléaires et aux retombées des accidents de Tchernobyl et de Fukushima. En particulier, la relation entre l'augmentation des cancers détectés en Europe de l'ouest et les retombées de Tchernobyl suscite toujours des interrogations sociétales alors que les doses reçues sont très faibles et que l'exposition s'est produite à l'âge adulte pour certains patients diagnostiqués avec une tumeur de la thyroïde. Une polémique similaire s'est produite après l'accident de Fukushima : alors que les doses à la thyroïde sont plus faibles que pour la catastrophe de Tchernobyl et bien que la population ne soit pas carencée en iode, une augmentation des cancers, qui a été observée en raison du screening systématique après l'accident, est attribuée à l'irradiation [206, 207]. L'incidence des cancers de la thyroïde a également augmenté en Polynésie française et de nombreux habitants relient cette augmentation aux essais nucléaires. Cependant, plusieurs études suggèrent l'implication de facteurs confondants comme la grossesse multiple ou l'obésité [208-210]. Enfin, les expositions de plus en plus fréquentes des populations (en particulier des enfants) à de faibles doses d'irradiation, qui est due à l'augmentation de l'utilisation des techniques d'imagerie médicale pour le diagnostic qui peuvent exposer la thyroïde telles que la radiologie dentaire ou le scanner des zones de la tête et du cou [211], posent une interrogation sur les effets à long terme de ces expositions. Des études suggèrent une augmentation du risque de cancer de la thyroïde après une exposition aux rayons X d'un scanner pendant l'enfance [212, 213].

Des études épidémiologiques utilisant des données d'expositions externes (survivants des bombes d'Hiroshima/Nagasaki et personnes ayant été traitées par une

radiothérapie pour un premier cancer ou une maladie bénigne) ont permis de montrer qu'il existe un excès de risque de développer un cancer de la thyroïde suite à une exposition à des doses >50 mGy [118, 119]. Pour des doses plus faibles, le risque n'est actuellement pas objectivé et c'est donc par précaution que le modèle linéaire sans seuil est aujourd'hui appliqué pour cette gamme de doses. En effet, la fréquence des cancers radio-induits diminue avec la dose et, le bruit de fond élevé des cancers sporadiques augmentant avec l'âge, les méthodes statistiques de l'épidémiologie conventionnelle ne sont plus applicables. Ne pouvant pas distinguer des tumeurs radio-induites et des tumeurs sporadiques ni par des caractéristiques cliniques et histopathologiques, ni par des altérations génétiques, une solution est de détecter des signatures moléculaires. L'équipe du LCE a identifié deux signatures : une signature de 322 gènes permettant de prédire l'étiologie de tumeurs de la thyroïde induites par une radiothérapie pendant l'enfance (irradiation externe, fortes doses/débits de dose) et une signature de 106 gènes discriminant des tumeurs développées chez des enfants vivant à proximité de la centrale de Tchernobyl en 1986 (contamination par les radioisotopes de l'iode, plus faibles doses/débits de dose) en comparaison des tumeurs sporadiques [140, 141]. Une comparaison des deux signatures a permis d'obtenir 5 gènes en communs (*CLU* : Clusterin, *SERPINE1* : Serpin family E member 1, *PABPC1* : Polyadenylate-binding protein 1, *GTF2H2* : General Transcription Factor IIIH Subunit 2 et *DHCR24* : 24-Dehydrocholesterol Reductase) qui permettent de classer les tumeurs post-radiothérapie et les tumeurs post-Tchernobyl. De plus, la signature post-radiothérapie permet de classer les tumeurs post-Tchernobyl et, réciproquement la signature post-Tchernobyl classe les tumeurs post-radiothérapie, et les mécanismes moléculaires dérégulés dans les deux analyses sont associés à la réponse à l'irradiation et au stress oxydatif. Ces résultats suggèrent que des tumeurs développées suite à une exposition à des faibles doses/débits de dose (contamination interne) ou à de fortes doses/débits de dose (irradiation externe) partagent des spécificités moléculaires communes indépendantes de la dose et du débit de dose [143]. Néanmoins, les séries étaient petites pour rechercher une signature en fonction du niveau de dose.

Une nouvelle analyse portant sur de plus grandes séries de tumeurs de la thyroïde vient de se terminer au laboratoire. Des échantillons de tumeurs de cancers sporadiques et des tumeurs post-radiothérapie ou post-Tchernobyl ainsi que les tissus normaux adjacents ont été analysés en miRNome, transcriptome et exome. Des empreintes moléculaires ont été identifiées aussi bien dans les tumeurs de patients exposés que dans les tissus sains des patients exposés par rapport aux patients jamais exposés. Il semble aussi que bien qu'il existe une empreinte commune quels que soient la dose et le débit de dose, une signature distincte forte dose/faible dose existe aussi.

Ce résultat est compatible avec les études montrant que selon le niveau de stress initial, les mécanismes cellulaires de la réponse à l'irradiation ne seraient pas les mêmes. En effet, plusieurs études montrent chez la souris, sur des modèles 3D de peau ou des

cultures 2D de cellules humaines (par exemple des fibroblastes et des kératinocytes), une différence de profil d'expression des gènes impliqués dans les mécanismes de la réponse à l'irradiation dont la réparation des dommages à l'ADN et le système immunitaire, en fonction de la dose et du débit de dose [214-218].

De plus, si les signatures identifiées dans les tumeurs ont un lien avec l'exposition initiale, il est possible que la tumeur et le tissu sain « portent » tous les deux une empreinte de l'exposition qui, de plus, pourrait être pour partie spécifique de la dose. Seuls des modèles 2D et 3D permettront de définir précisément le « poids » de la dose et du débit de dose dans la carcinogenèse, de définir l'origine de l'empreinte de l'irradiation observée dans les tumeurs radioinduites et enfin d'objectiver le risque de cancer après exposition aux faibles doses d'irradiation.

2) Empreinte d'exposition : la valeur ajoutée des modèles *in vitro*

Plusieurs études ont déjà montré un mécanisme « d'imprinting » dans le cas d'exposition à une irradiation [219, 220] à des facteurs environnementaux (pesticides ou perturbateurs endocriniens) [221, 222], ou suite à un stress nutritionnel maternel pendant la vie fœtale [223].

Ces empreintes sont dues à des modifications épigénétiques qui modifient les niveaux d'expression des ARNm (ARN messager) ou des protéines sans altérer la séquence de l'ADN : des méthylations/acétylations des histones qui changent la conformation de la chromatine, et/ou des méthylations de certaines cytosines (îlots CpG) qui induisent la liaison de protéines régulatrices et empêchent les facteurs de transcription d'accéder à la chromatine, et/ou aux petits ARN non codants comme les miARNs qui se lient à l'ARNm et empêchent la synthèse de protéines soit par clivage de l'ARNm, soit par l'inhibition de la traduction [224-226].

Ces modifications surviennent en réponse à un stress et peuvent être rapides, différées, réversibles ou non. Lorsqu'elles ne sont pas réversibles, ces empreintes somatiques sont transmissibles à la descendance de la cellule initialement stressée. Effectivement, des études montrent qu'une instabilité génétique (non liée à des mutations dans l'ADN et sans sélection clonale) caractérisée le plus souvent par un taux de cassures de l'ADN élevé et accompagné d'une augmentation du stress oxydant, est transmise aux cellules descendantes des cellules irradiées par des mécanismes épigénétiques [227, 228].

Par ailleurs, cette empreinte somatique causée par un stress pourrait se transmettre de manière héréditaire par les cellules germinales. En effet, il a été montré que les cellules somatiques stressées peuvent libérer dans la circulation sanguine des vésicules contenant ces marqueurs épigénétiques (miARNs) qui viennent secondairement « marquer » le stress dans les cellules germinales [229]. Par exemple, une étude montre que la descendance (F1 jusqu'à F4) de rats exposés à un perturbateur endocrinien

pendant la gestation présentait un nombre diminué de spermatozoïdes et une moindre fertilité [230]. La transmission de ces caractères de génération en génération serait liée à la transmission d'un miARN responsable d'une modification de la méthylation de l'ADN [231].

J'ai pu comparer la radiosensibilité des thyrocytes en culture primaire provenant de patients non exposés avec ceux provenant de patients traités par radiothérapie (2 patients), à fortes doses (35 et 36 Gy) et forts débits de dose, pendant l'enfance/jeune adulte (irradiation à 2 ans et 12 ans). J'ai observé une diminution de la radiosensibilité des thyrocytes déjà exposés avec une meilleure prolifération/survie, et moins de cassures double-brin à dose, débit de dose et temps équivalents. Donc l'empreinte d'exposition, identifiée en comparant le miRNome de tissus normaux exposés (adjacents aux tumeurs radio-induites) avec des tissus normaux non exposés (adjacents aux tumeurs sporadiques), est associée à un phénotype de radiorésistance. De façon intéressante, une étude sur des campagnols vivant dans les zones contaminées par l'accident de Tchernobyl et qui sont soumis à une exposition chronique (externe/interne) montre que les fibroblastes provenant des individus exposés sont également plus radiorésistants que des fibroblastes des campagnols contrôles (venant de zones non contaminées d'Ukraine). Après une exposition de 10 Gy, les fibroblastes des campagnols exposés prolifèrent plus vite que les fibroblastes des campagnols non exposés, ce qui est associé à une capacité de détoxification des ROS plus importante dans les fibroblastes exposés [232].

Ces données confortent l'hypothèse de l'équipe de Corinne Dupuy selon laquelle les radiations ionisantes induiraient la mise en place d'un stress oxydatif chronique qui serait à l'origine d'une instabilité génétique et potentiellement, à long terme, d'un cancer de la thyroïde. Ce stress oxydatif serait initié par une surexpression de DUOX1 jusqu'à 10 jours après irradiation, une NADPH oxydase qui génère de l' H_2O_2 et est impliquée dans la synthèse des hormones thyroïdiennes, qu'ils observent sur des thyrocytes en 2D [144]. J'ai également observé dans les cultures organotypiques que l'expression de la protéine DUOX1 est induite par l'irradiation et l'intensité du marquage apparaît proportionnelle à la dose 1 semaine après irradiation. En réponse à ce stress oxydatif chronique, il est également possible que les thyrocytes se soient adaptés en augmentant leur capacité de détoxification des ROS comme les fibroblastes des campagnols exposés à Tchernobyl qui présentent une augmentation du taux basal d'antioxydants, comme le glutathion qui a déjà été retrouvé augmenté chez des oiseaux vivants dans des zones contaminées par l'accident de Tchernobyl [233]. Aussi, d'autres facteurs ont été décrits pour être impliqués dans la réponse adaptative au stress oxydatif : les superoxyde dismutases qui éliminent l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ par une réaction de dismutation, les glutathion peroxydases qui réduit les peroxydes en

oxydant le glutathion, et la thiorédoxine, un antioxydant qui intervient dans la dégradation des peroxydes lipidiques et du peroxyde d'hydrogène [234].

De manière intéressante, l'équipe de Corinne Dupuy a également analysé l'expression de DUOX1 dans des tumeurs thyroïdiennes de patients ayant des antécédents d'exposition aux rayonnements ionisants pendant l'enfance et le niveau d'expression de DUOX1 était significativement plus élevé dans les tumeurs thyroïdiennes radio-induites que dans des tumeurs sporadiques ou des tissus thyroïdiens normaux [144]. En outre, l'équipe du LCE a retrouvé DUOX1 comme étant surexprimé dans les tumeurs post-Tchernobyl en comparaison des tumeurs sporadiques [143].

Comme les biopsies de patients irradiés pendant l'enfance sont rares, nous n'avons pas encore pu explorer les mécanismes moléculaires associés à cette résistance (régulation du stress oxydatif ou modification des patterns de méthylation entre tissu exposé vs non exposé) dans les échantillons exposés et sporadiques. Les marqueurs sélectionnés dans les signatures miRNome ou transcriptome identifiées récemment au laboratoire en comparant le tissu normal de patients non exposés et exposés (post-radiothérapie et post-Tchernobyl) seront utiles pour indiquer les hypothèses à tester. Par exemple, une publication montre que dans des lignées cellulaires cancéreuses humaines rendues radiorésistantes par une exposition fractionnée aux rayons X, le cluster miR17-92 est dérégulé négativement alors que HIF1 α est dérégulé positivement. Lorsque le cluster miR17-92 est surexprimé dans ces cellules, l'expression de HIF1 α est réprimée et, surtout, les cellules retrouvent une sensibilisation aux RI [235]. Quasiment tous les miARNs du cluster miR17-92 et les miARNs de la même famille codés par d'autres clusters sont moins exprimés dans les échantillons exposés (tumeur et tissu normal) que dans les échantillons non exposés (Figure 52). Ces données concordent avec mes résultats sur l'observation d'une radiorésistance des thyrocytes suite à une première irradiation.

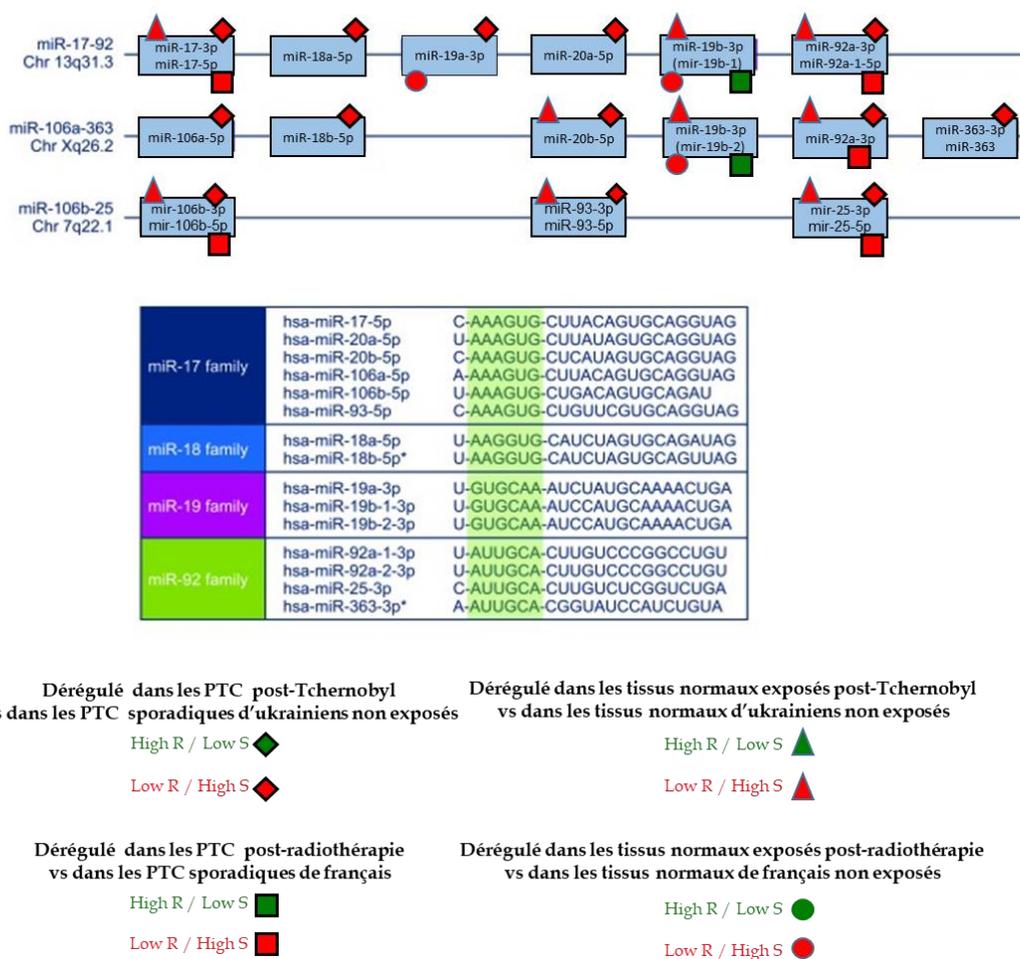


Figure 52 : Dérégulation négative du cluster miR17-92 suite à une irradiation (Tchernobyl et radiothérapie) dans les tumeurs et les tissus normaux adjacents.

La figure présente schématiquement les clusters 17-92, 106a-363 et 106b-25 codant pour les miARNs de la famille 17, 18, 19 et 92. Lors de la synthèse d'un miARN (Micro-Acide ribonucléique), une séquence précurseur appelée « pré-miARN » peut donner un miARN-5' (5p) et/ou un miARN-3' (3p). Dans les boîtes bleues sont indiqués les miARNs effectivement retrouvés dérégulés dans les séries post-Tchernobyl et post-radiothérapie.

Les signatures ont été identifiées en comparant des tumeurs post-Tchernobyl ou post-radiothérapie en comparaison, respectivement, de tumeurs sporadiques d'ukrainiens non exposés et de tumeurs sporadiques de patients français. En parallèle, les tissus normaux adjacents aux tumeurs (post Tchernobyl et post-radiothérapie) ont été comparés, respectivement, aux tissus normaux adjacents aux tumeurs sporadiques d'ukrainiens non exposés et aux tumeurs sporadiques de français.

Le cluster miR17-92 est majoritairement sous-exprimé à long terme dans les échantillons exposés en comparaison des échantillons non exposés.

3) Les modèles

Pour analyser les effets de l'irradiation sur les tissus thyroïdiens humains, les modèles murins ne sont pas adaptés car ils ne présentent pas les mêmes mécanismes de carcinogénèse thyroïdienne (radio-induite et sporadique). Il était donc absolument nécessaire d'adapter des protocoles existant pour le maintien de tissus ou d'organoïdes de thyroïde murine ou porcine au tissu humain.

Au cours de la thèse, j'ai développé plusieurs approches permettant de disposer, pour l'analyse des effets des radiations ionisantes, de cultures primaires et de modèles 3D mimant le tissu thyroïdien humain (Figure 53).

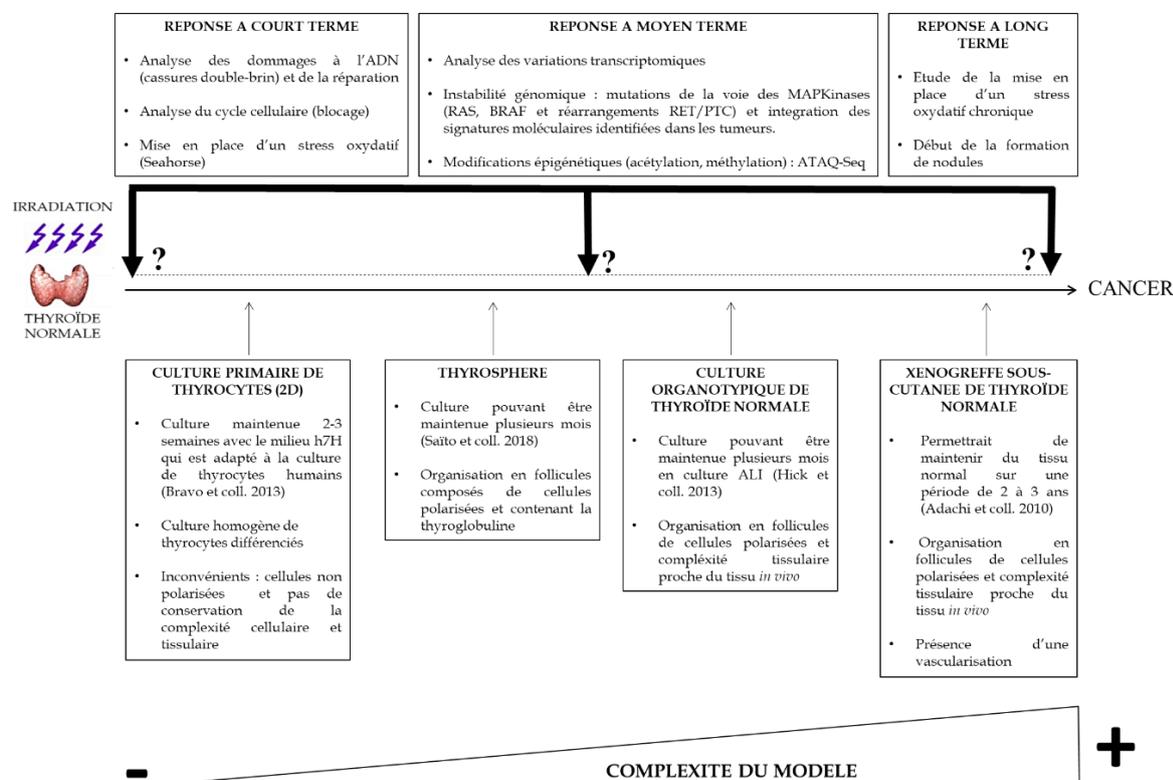


Figure 53 : Modèles 2D et 3D pour l'analyse de la réponse aux radiations ionisantes dans thyroïde humaine normale.

Les modèles permettent un suivi, sur différentes périodes (de quelques semaines à 1-2 ans), des conséquences d'une irradiation du tissu aux radiations ionisantes à court, moyen et long termes. Nous pourrions vérifier la mise en place d'un stress oxydatif chronique après exposition, en fonction de la dose/débit de dose et analyser les modifications épigénétiques associés (méthylations, variations du miRNome). Ces empreintes d'exposition identifiées dans les modèles seront complémentaires aux signatures d'exposition identifiées après comparaison des tissus thyroïdiens normaux non exposés (adjacents à un PTC sporadique) avec des tissus thyroïdiens normaux exposés pendant l'enfance suite à une radiothérapie ou à une exposition aux iodes radioactifs (adjacents aux PTC radio-induits).

Nous avons utilisé le milieu décrit par Bravo et coll. qui optimise le maintien des thyrocytes humains en culture primaire sur une vingtaine de passages. Le maintien de la différenciation a été confirmé par Wang et coll. [157] par une analyse de l'expression des ARNm de marqueurs thyroïdiens jusqu'à 43 jours de culture. J'ai contrôlé l'expression des marqueurs de la différenciation thyroïdienne (TTF1, PAX8 et FOXE1) par des immunomarquages au cours du temps et j'ai observé une diminution de l'expression des marqueurs TTF1 et PAX8 accompagnée d'un changement phénotypique des cellules dès 2-3 semaines de culture (2-3 passages). Dans cet intervalle de temps, les cultures primaires sont très robustes et aucune variabilité

interindividuelle n'a été observée entre les patients (5 patients), permettant d'obtenir une bonne reproductibilité en termes de prolifération et de survie, ce qui m'a permis de mettre en évidence l'empreinte d'exposition à long terme des tissus exposés pendant l'enfance, même sur un petit nombre de patients (n=2), en comparaison des tissus non exposés.

Ce modèle est donc robuste et facile à mettre en place, mais ne permet qu'une analyse de la réponse à l'irradiation à court terme et sur des cellules non polarisées.

Ces inconvénients sont levés par le développement de modèles 3D : l'organisation des cellules en thyrosphères permet de retrouver la polarisation cellulaire et la structure de l'unité fonctionnelle de la thyroïde, et les cultures organotypiques présentent une complexité cellulaire proche de celle du tissu *in vivo*.

Néanmoins, alors que le milieu h7H était parfaitement adapté au modèle 2D (permet une bonne adéquation entre une prolifération et un maintien de la différenciation), une optimisation en fonction des caractéristiques de chacun des modèles est nécessaire pour les modèles 3D.

En effet, concernant les cultures organotypiques, le maintien du tissu implique qu'aucun effet sur le comportement des thyrocytes ne doit être observé : le tissu doit être maintenu tel qu'il est *in vivo*, et en particulier chez l'adulte dont les thyrocytes se divisent rarement (tous les 8 ans). Mais le milieu h7H entraîne une entrée en cycle des cellules (augmentation du nombre de cellules exprimant la cycline D1) et une activation des thyrocytes (lacunes de résorptions de la thyroglobuline et forme cuboïde des cellules) dès 24h de culture.

Dans les thyrosphères, en revanche, la prolifération cellulaire est nécessaire à la formation des sphères.

Le milieu h7H, comme tous les milieux de culture, est un milieu complexe. Parmi les facteurs de croissance du milieu h7H, le plus susceptible d'être impliqué dans la prolifération/activation des thyrocytes est la TSH. Une diminution de 40mIU/L à 10mIU/L de TSH bovine a effectivement permis la relocalisation de la TG dans le lumen des thyrosphères. Contrairement à l'effet décrit par Kim et coll. [200], seule la concentration de TSH est impliquée car la suppression d'insuline, d'hydrocortisone et de transferrine du milieu ne favorise pas la relocalisation de la TG dans le lumen comparé à la diminution de la TSH seule. Par contre, la concentration de 10mIU/L n'a pas significativement amélioré la maintenance des biopsies en culture organotypique et entraîne également une activation/entrée en cycle des thyrocytes dans les cultures. Donc la concentration de la TSH doit être optimisée différemment pour les thyrosphères et les cultures organotypiques.

Nous avons testé également l'impact d'une diminution de la concentration de SVF en culture 2D sur la prolifération et la survie des thyrocytes : une diminution de 10% à 5% n'a présenté aucun effet alors qu'à 3% et 1%, la prolifération des cellules est

effectivement inhibée mais elle s'accompagne de la modification de la morphologie des thyrocytes et d'une mortalité cellulaire augmentée. Mais la diminution du SVF de 10% à 5% ne modifiant pas le comportement des thyrocytes en culture organotypique, nous avons finalement conservé le milieu à 10% de SVF comme indiqué dans le protocole de Bravo et coll.

Le matrigel est lui aussi susceptible d'apporter des facteurs de croissance et la qualité du matrigel (standard ou GFR) implique des différences de concentration. En particulier l'EGF (Epidermal Growth Factor) (standard : 0,5-1,3 ng/mL et GFR : <0,5 ng/mL), l'IGF (standard : 15,6 ng/mL et GFR : 5 ng/mL), et le TGF β (standard : 2,3 ng/mL et GFR : 1,7 ng/mL) sont décrits comme induisant une perte de la polarisation des thyrocytes ce qui inhibe la folliculogénèse [202, 236, 237].

Cependant, une comparaison de ces deux matrigels n'a pas montré d'effet significatif et nous avons choisi, par précaution, le matrigel GFR car c'est le plus neutre pour les cellules.

En particulier pour les cultures organotypiques, une autre observation peut en partie expliquer la variabilité de maintien du tissu au cours du temps : l'optimisation de l'oxygénation du tissu. En effet, pour ce modèle, nous avons suivi dans un premier temps le protocole décrit par l'équipe de Toda, consistant à mettre les fragments dans du matrigel sans immersion ce qui optimisait l'oxygénation des cellules et le maintien de biopsies de thyroïde de porc en comparaison de la culture immergée. Néanmoins, nous avons quand même observé un choc hypoxique dans le tissu humain qui pourrait contribuer, en plus de l'activation par la TSH, à la déstructuration du tissu en induisant un effet pro-prolifératif. En effet, une étude a récemment montré que HIF1 α régule positivement TERT (Telomerase Reverse Transcriptase) dans les cellules cancéreuses thyroïdiennes entraînant une augmentation de la prolifération et le processus d'autophagie [238]. Le tissu thyroïdien de porc est possiblement moins sensible à l'hypoxie que le tissu humain, pourtant, certaines de leurs images histologiques montrent également une déstructuration globale du tissu et des follicules avec un épithélium déstructuré [193] (Figure 54).

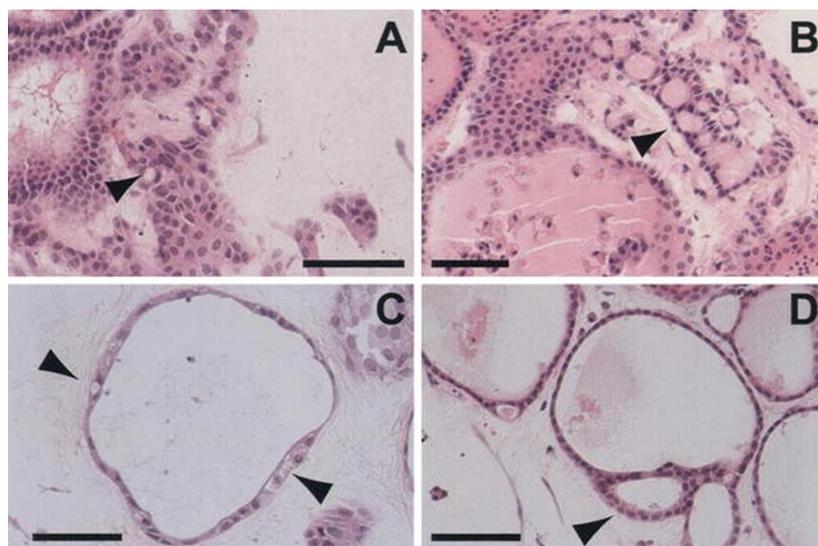


Figure 54 : Maintien du tissu thyroïdien de porc en matrigel.

Images histologiques à 5 jours de culture en matrigel stimulé à la TSH à 10 mU/mL. Ces observations montrent un tissu dégradé, des follicules qui sont plutôt isolés et des epitheliums folliculaires déstructurés. Barre d'échelle : 100 μ M. (Figures d'après Toda et coll. [193]).

De plus, d'autres cellules que les thyrocytes comme les cellules endothéliales, les adipocytes et les macrophages peuvent également répondre à un choc hypoxique par la libération de facteurs de croissance, de facteurs angiogéniques et de cytokines inflammatoires qui peuvent contribuer à une sur-activation des thyrocytes, à une inflammation [239, 240] et également à la perte de la structure du tissu et à l'apparition d'une fibrose.

La méthode de culture ALI, décrite par Hick et coll., qui consiste à déposer directement les morceaux de biopsies sur une surface air/liquide sans l'intégrer dans du matrigel [195], évite ce choc hypoxique. Néanmoins, nous avons observé que le tissu se maintient mieux lorsque les bouts sont coupés le plus fin possible (de forme rectangulaire plutôt qu'en bloc) suggérant que même si la culture ALI permet d'éviter le choc hypoxique, une trop grande épaisseur du bloc (environ 4 mm et au-delà) inhiberait l'apport des éléments du milieu (TSH, iode, facteurs de croissance ou antioxydants) aux thyrocytes.

Les thyrosphères sont majoritairement formées grâce au réarrangement des cellules différenciées. Cependant, il n'est pas exclu que la culture primaire présente une composante de « cellules souches » qui participerait à la formation des sphères. En fin de compte, ce modèle présente une composante différenciée proliférative et potentiellement une composante « souche » qui se rapprocherait du comportement de la thyroïde chez l'enfant. Les cellules souches de la thyroïde humaine sont identifiables grâce au marqueur « souche » OCT4, au transporteur ABCG2 (ATP-binding cassette super-family G member 2) [241].

L'organisation en organoïdes, à partir des cellules souches normales, repose sur le processus de différenciation cellulaire. En effet, une étude montre que des cellules souches peuvent être isolées, grâce à un tri cellulaire à l'aide des marqueurs ABCG2 et OCT4, de sphères réalisées à partir d'une co-culture de cellules souches et de thyrocytes issus de goitres nodulaires avec des facteurs de croissances (EGF et bFGF). Une stimulation avec de la TSH permet une différenciation de ces cellules souches isolées en thyrocytes exprimant les marqueurs de différenciation thyroïdienne (PAX8, TG, NIS, TSHr et TPO) et s'organisant en thyrosphères capables de capter de l'iode [242].

En utilisant les marqueurs « souches », il sera possible d'isoler ces cellules souches ou, tout du moins, d'enrichir la culture 2D en cellules souches et, ainsi, d'estimer le rôle des cellules souches dans la réponse à l'irradiation. De plus, leur implication dans le processus de folliculogenèse pourra être étudié. En effet, plusieurs études montrent que les cellules souches/progénitrices présentes dans le tissu thyroïdien adulte participent à la régénération des follicules et pourraient être utilisées en médecine régénérative lors de pathologies de la thyroïde telle que la thyroïdite de Hashimoto, une maladie inflammatoire auto-immune causant une hypothyroïdie [241, 243].

En début de thèse, une autre approche avait été envisagée pour développer des organoïdes à l'aide d'un modèle tirant parti de la plasticité des cellules tumorales et/ou de la composante « souche » dans des lignées tumorales. Cette composante de cellules souches cancéreuses est distinguable par une activité élevée de l'ALDH (Aldehyde Dehydrogenase), les marqueurs OCT4, SOX-2 et CD133, et un phénotype CD44⁺/CD24 [244]. Ce modèle, consistant à déposer un culot de cellules de lignées tumorales sur une membrane poreuse flottant sur du milieu, permet, grâce à une redifférenciation/reprogrammation des cellules cancéreuses et/ou à la différenciation des CSC, d'obtenir des organoïdes mimant le tissu normal. Et ce modèle avait été utilisé avec succès pour développer des organoïdes de poumon humain au laboratoire. J'ai réalisé des essais en utilisant des lignées thyroïdiennes cancéreuses : la lignée pseudo normale Nthy-ori, une lignée dérivée de PTC (TPC-1), et une lignée dérivée d'ATC (ARO). Toutefois, cette approche n'a pas été concluante. En effet, la lignée TPC-1 présente trop peu de cellules souches [245]. Par contre, une composante « souche » significative avait été reportée pour la lignée ARO dans la même publication mais il a été montré qu'une lignée de cancer anaplasique ARO81-1 ne serait pas thyroïdienne mais une lignée de cancer du côlon par cross-contamination, suggérant que la lignée récupérée et libellée ARO pouvait être dérivée de cette lignée de colon [246]. Ne pouvant pas obtenir une infirmation ou une confirmation sur l'origine de la lignée ARO, nous n'avons pas continué dans cette voie.

Concernant le modèle des xénogreffes, nous avons commencé sur des souris NSG parce qu'elles présentent un niveau d'immunosuppression maximal, particulièrement

adapté pour les greffes hématopoïétiques, et qu'elles étaient disponibles au sein de l'institut. Hélas, nous avons observé une dégradation rapide du tissu alors qu'un maintien pendant au moins 1-2 ans a été observé par Fukuda et coll. [197]. De fait, le fond génétique de ces souris n'est pas adapté pour tous les tissus. En effet, il a été montré une meilleure prise de greffe de peau humaine dans des souris SCID/beige que dans des souris NSG, la dégénérescence du tissu dans les NSG étant associée à une infiltration du greffon par des macrophages murins GR1+ entraînant une réaction inflammatoire dans le tissu qui serait due au fond génétique des souris [203].

La comparaison du comportement du tissu de 3 patients xéno greffés sur des souris NSG et SCID/beige suggère un meilleur maintien du tissu à 5 semaines chez les SCID/beige. Cependant, une confirmation de ces résultats avec une étude à plus long terme et sur plus de patients doit être effectuée.

L'avantage de ce modèle est qu'il permettrait de faire des analyses à long terme afin d'appréhender les premières étapes de la carcinogenèse radio-induite. En effet, ce modèle a déjà été testé pour analyser la réponse à l'irradiation [145, 146]. Même si les protocoles d'exposition qu'ils utilisent sont perfectibles, certains des gènes dérégulés dans le tissu xéno greffé après irradiation avaient aussi été trouvés dérégulés dans les signatures d'étiologie des tumeurs de la thyroïde par le laboratoire [140]. Cette constatation soutient également la relation entre le stress initial et une empreinte à long terme de l'exposition ce qui permettrait, éventuellement, de faire le lien entre la mise en place d'une empreinte et les premières étapes de la carcinogenèse dans le tissu.

4) Réponse à l'irradiation

En fonction du contexte d'irradiation (examens médicaux, essais nucléaires et catastrophes nucléaires), les gammes de doses d'exposition sont différentes. En effet, les doses médianes reçues à la thyroïde pour un enfant de 1 an sont de l'ordre de quelques dizaines de mGy lors d'un scanner cérébrale (médiane : 22,8 mGy ; 25^{ème} percentile : 13,5 mGy ; 75^{ème} percentile : 43,8 mGy) [247] ; lors des essais nucléaires atmosphériques en Polynésie française, la dose moyenne reçue à la thyroïde était de 2,6 mGy avec des doses comprises entre 0 et 39 mGy [210]. La catastrophe de Tchernobyl a entraîné des irradiations à la thyroïde avec une dose moyenne de 400 mGy en allant d'environ 1 mGy à 13 Gy selon la proximité avec la centrale [74, 248] ; enfin une étude récente sur les doses reçues par les habitants de plusieurs villes autour de la centrale de Fukushima après l'accident indique une dose médiane à la thyroïde pour un enfant de 1 an entre 0,6 et 16 mGy et un 95^{ème} percentile entre 7,5 et 30 mGy [249].

Pour commencer à analyser l'effet de la dose et du débit de dose, j'ai utilisé dans un premier temps le modèle 2D et j'ai réalisé des gammes de dose qui m'ont permis de définir la dose de 100mGy comme une faible dose (pas ou peu d'effet sur la prolifération des thyrocytes (Figures 20 et 21), et qui correspond à la limite en dessous de laquelle l'épidémiologie conventionnelle ne peut pas estimer un excès de risque de développer un cancer de la thyroïde, sauf dans le contexte de méta-analyses. Deux fortes doses (1 et 3 Gy) associées à des phénotypes différents en termes de prolifération et de survie ont également été définies.

Pour analyser l'effet du débit de dose sur les thyrocytes, la dose de 1Gy a été délivrée aux cultures avec deux débits de doses. En effet, l'influence du débit de dose n'est actuellement pas clairement établie sur le risque de développer des cancers de la thyroïde. Par défaut, en radioprotection, les risques des faibles débits de dose, de la même manière que ceux liés aux faibles doses, sont extrapolés de ceux des forts débits de doses par un modèle linéaire sans seuil [95]. J'ai donc étudié l'impact du débit de dose, en comparant un fort débit de dose (0,76 Gy/min) et un plus faible débit de dose (0,1 Gy/min), et j'ai effectivement observé un effet du débit de dose sur les thyrocytes normaux pour la dose de 1 Gy marqué par une meilleure survie des cellules au plus faible débit de dose (Figure 21). Cependant, l'induction de cassures double-brin n'est pas modifiée (Figure 24) : ces données soulèvent une interrogation sur les conséquences à long terme d'une exposition de 1 Gy sur les thyrocytes au plus faible débit de dose, si des cassures double-brin ne seraient pas ou mal réparées dans des cellules qui survivent mieux, en terme de carcinogenèse. Une comparaison d'un fort et d'un faible débit de dose, à plus long terme, par exemple dans les modèles 3D, permettrait de mieux analyser l'impact du débit de dose sur le risque d'une persistance de cellules endommagées dans les tissus.

Par ailleurs, les résultats sur l'augmentation de DUOX1 suite à une irradiation ont été obtenus avec des cultures organotypiques qui ont été réalisées dans des cultures en matrigel. Comme vu précédemment, ce ne sont pas les meilleures conditions de culture, néanmoins, j'ai pu réaliser un premier test du comportement du tissu thyroïdien normal, peu décrit dans la littérature, et alors que l'irradiation a été effectuée à 1 semaine de culture et les analyses 1 semaine après, les analyses histologiques ont montré un maintien acceptable du tissu jusqu'à 2 semaines de culture pour ce patient. De plus, les doses sont plus faibles (1, 3 et 5 Gy) que celle utilisé par C. Dupuy (10 Gy) sachant que dans les gammes de doses réalisées au laboratoire, la dose de 5 Gy entraîne déjà une augmentation significative de la mortalité des thyrocytes (Figure 19). Ces résultats valident l'intérêt des modèles 3D pour analyser la réponse du tissu thyroïdien normal humain à une exposition aux RI.

5) Perspectives

Les résultats obtenus sur le développement des modèles 3D de thyroïde normale humaine sont très prometteurs mais il reste à optimiser les conditions de culture qui doivent permettre de valider le maintien du tissu normal pour analyser la réponse à l'irradiation à moyen et long termes.

La thyroïde est un organe très vascularisé. Nous avons obtenu des conditions évitant le choc hypoxique, néanmoins, une meilleure oxygénation du tissu pourrait être obtenue en utilisant un système, décrit par Mouré et coll. avec des îlots de Langerhans pancréatiques porcins, combinant des disques de silicone qui encapsulent du CaO_2 pour générer de l' O_2 avec des billes d'alginate incorporant le tissu et une hémoglobine extracellulaire pour transporter l'oxygène [250]. Cependant, ce système doit être testé car il pourrait générer des ROS qui sont toxiques pour les cellules.

De plus, l'équipe de HICK a montré que la co-culture avec des cellules endothéliales pourraient permettre de mimer la vascularisation et la libération de facteurs de croissance qui favorise la folliculogénèse ce qui aiderait à la stabilisation des modèles [195]. Cette co-culture pourrait permettre d'améliorer la stabilité du tissu thyroïdien normal et de le conserver sur une période plus longue dans les cultures 3D *in vitro*.

Nous devons également nous assurer du maintien de l'activité physiologique des thyrocytes dans les cultures. Nous avons commencé à doser la T4 libre dans nos modèles 3D, en collaboration avec le Service Médical de Saclay (CEA). Une analyse préliminaire avec des cultures organotypiques en culture ALI (1 patient) a permis de montrer que les fragments de thyroïde sécrétaient de la T4 en réponse à la TSH. Cependant, aucun effet dose n'a été observé entre la concentration de base en TSH du milieu h7H (40mIU/L) et une concentration 4 fois plus élevée (160mIU/L). Une gamme de dose de la TSH sur un prochain test permettrait d'identifier une dose pour laquelle un effet dose est détectable ce qui permettrait d'ajuster la concentration en TSH dans le milieu.

Après confirmation de leur fonctionnalité, ces modèles permettront d'analyser en détail l'hypothèse de Corinne Dupuy sur l'établissement d'un stress oxydant chronique suite à une irradiation. En effet, les modèles sont complémentaires car ils ont chacun un niveau de complexité différent, et ils permettent d'analyser la réponse à différents temps après une irradiation (Figure 53).

Le modèle 2D permet d'analyser la réponse à l'irradiation à court terme avec l'analyse des cassures double-brin, de la réparation, du cycle cellulaire (blocage dans le cycle) ainsi que la mise en place d'un stress oxydatif qui peut être observé à l'aide du Seahorse (AGILENT). Cette technologie permet d'étudier le métabolisme des cellules

(respiration mitochondriale) en mesurant la consommation en O₂ grâce à différentes drogues intervenant sur la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM) comme l'oligomycine qui inhibe l'ATP synthase, le carbonylcyanide-p-trifluorométhoxyphénylhydrazone (FCCP) qui est un découplant de la CRM, la rotenone qui inhibe le complexe I et l'antimycine A qui inhibe le complexe III. Un test pour comparer la réponse à une irradiation du métabolisme de thyrocytes en 2D a déjà été mis en place mais une mise au point de la densité cellulaire est nécessaire pour une analyse optimale.

Une analyse des mécanismes épigénétiques (méthylation et acétylation) est également possible par l'utilisation, notamment, de l'ATAQ-Seq qui est une technique permettant, grâce à la transposase Tn5, de cartographier et de révéler les sites de chromatine ouverts, les nucléosomes individuels et le compactage de la chromatine à résolution nucléotidique. L'accessibilité de la chromatine est un paramètre majeur de la régulation épigénétique donc un accès à la chromatine ouverte et à son séquençage permettra d'établir un profil épigénétique [251].

Les modèles 3D *in vitro* (thyrosphères et cultures organotypiques) permettront une analyse à moyen terme et les xénogreffes chez la souris permettront d'analyser la réponse plus tardive avec les effets d'un stress oxydatif chronique et l'apparition de nodules.

Les modèles nous permettront d'analyser les effets de facteurs étiologiques, notamment des PE, qui sont suspectés d'être impliqués dans le développement de pathologies thyroïdiennes. En effet, les PE interfèrent à tous les niveaux de l'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien (synthèse et sécrétion des hormones) et sur l'action des hormones thyroïdiennes sur leurs tissus cibles [252]. Plusieurs études épidémiologiques montrent une association entre une exposition aux PE (pesticides, nitrate, dioxyde de soufre ou microparticules de la fumée de cigarette) et le risque de développer un cancer de la thyroïde mais ce n'est pas toujours le cas [253-256]. Cette variabilité est due au fait que les effets des PE sont différents selon l'individu (âge et sexe), la nature du produit chimique et la dose d'exposition. De plus, l'organisme est exposé à un mélange de PE tout au long de sa vie [257]. Les modèles que j'ai développés pourraient permettre d'étudier les effets des PE (seuls ou mélangés) et d'estimer s'ils pourraient modifier la radiosensibilité du tissu thyroïdien et éventuellement le risque de développer des cancers de la thyroïde après une exposition aux radiations ionisantes.

Références bibliographiques

1. Maenhaut, C., et al., *Ontogeny, Anatomy, Metabolism and Physiology of the Thyroid*, in *Endotext*, K.R. Feingold, et al., Editors. 2000: South Dartmouth (MA).
2. Hillary, S. and S.P. Balasubramanian, *Anatomy of the thyroid, parathyroid, pituitary and adrenal glands*. SURGERY, 2017. **35:10**: p. 537-541.
3. <https://www.teresewinslow.com/head/kpq8szid8jl52tr94bp69g8oa9vdhu>.
4. Carvalho, D.P. and C. Dupuy, *Thyroid hormone biosynthesis and release*. Mol Cell Endocrinol, 2017. **458**: p. 6-15.
5. Farebrother, J., M.B. Zimmermann, and M. Andersson, *Excess iodine intake: sources, assessment, and effects on thyroid function*. Ann N Y Acad Sci, 2019. **1446(1)**: p. 44-65.
6. Ahad, F. and S.A. Ganie, *Iodine, Iodine metabolism and Iodine deficiency disorders revisited*. Indian J Endocrinol Metab, 2010. **14(1)**: p. 13-7.
7. Darrouzet, E., et al., *The sodium/iodide symporter: state of the art of its molecular characterization*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1838(1 Pt B)**: p. 244-53.
8. Scott, D.A., et al., *The Pendred syndrome gene encodes a chloride-iodide transport protein*. Nat Genet, 1999. **21(4)**: p. 440-3.
9. Devuyst, O., et al., *Expression of CFTR in human and bovine thyroid epithelium*. Am J Physiol, 1997. **272(4 Pt 1)**: p. C1299-308.
10. 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.
11. van den Hove, M.F., et al., *The loss of the chloride channel, ClC-5, delays apical iodide efflux and induces a euthyroid goiter in the mouse thyroid gland*. Endocrinology, 2006. **147(3)**: p. 1287-96.
12. Friesema, E.C., et al., *Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter*. J Biol Chem, 2003. **278(41)**: p. 40128-35.
13. Gnidehou, S., et al., *Iodotyrosine dehalogenase 1 (DEHAL1) is a transmembrane protein involved in the recycling of iodide close to the thyroglobulin iodination site*. FASEB J, 2004. **18(13)**: p. 1574-6.
14. Hoermann, R., et al., *Homeostatic Control of the Thyroid-Pituitary Axis: Perspectives for Diagnosis and Treatment*. Front Endocrinol (Lausanne), 2015. **6**: p. 177.
15. Gauchez, A., *Thyroxine (totale et libre) et tri-iodothyronine (totale et libre)*. EMC - Biologie médicale, 2014. **0(0)**: p. 1-6.
16. World Health Organization. *Assessment of iodine deficiency disorders and monitoring their elimination: a guide for programme managers*. 2007.

17. Wolff, J. and I.L. Chaikoff, *Plasma inorganic iodide as a homeostatic regulator of thyroid function*. J Biol Chem, 1948. **174**(2): p. 555-64.
18. Leung, A.M. and L.E. Braverman, *Consequences of excess iodine*. Nat Rev Endocrinol, 2014. **10**(3): p. 136-42.
19. Suzuki, K., et al., *Autoregulation of thyroid-specific gene transcription by thyroglobulin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(14): p. 8251-6.
20. Cheng, S.Y., J.L. Leonard, and P.J. Davis, *Molecular aspects of thyroid hormone actions*. Endocr Rev, 2010. **31**(2): p. 139-70.
21. Pirahanchi, Y. and I. Jialal, *Physiology, Thyroid Stimulating Hormone (TSH)*, in *StatPearls*. 2020: Treasure Island (FL).
22. Bernal, J., *Thyroid Hormones in Brain Development and Function*, in *Endotext*, K.R. Feingold, et al., Editors. 2000: South Dartmouth (MA).
23. Moog, N.K., et al., *Influence of maternal thyroid hormones during gestation on fetal brain development*. Neuroscience, 2017. **342**: p. 68-100.
24. Gouveia, C.H.A., et al., *Thyroid Hormone and Skeletal Development*. Vitam Horm, 2018. **106**: p. 383-472.
25. Mullur, R., Y.Y. Liu, and G.A. Brent, *Thyroid hormone regulation of metabolism*. Physiol Rev, 2014. **94**(2): p. 355-82.
26. 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.
27. Di Palma, T., et al., *TAZ is a coactivator for Pax8 and TTF-1, two transcription factors involved in thyroid differentiation*. Exp Cell Res, 2009. **315**(2): p. 162-75.
28. De Leo, R., et al., *Role for p300 in Pax 8 induction of thyroperoxidase gene expression*. J Biol Chem, 2000. **275**(44): p. 34100-5.
29. Ruiz-Llorente, S., et al., *Genome-wide analysis of Pax8 binding provides new insights into thyroid functions*. BMC Genomics, 2012. **13**: p. 147.
30. Sastre-Perona, A. and P. Santisteban, *Wnt-independent role of beta-catenin in thyroid cell proliferation and differentiation*. Mol Endocrinol, 2014. **28**(5): p. 681-95.
31. Chaker, L., et al., *Hypothyroidism*. Lancet, 2017. **390**(10101): p. 1550-1562.
32. Michels, A.W. and G.S. Eisenbarth, *Immunologic endocrine disorders*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S226-37.
33. Persani, L., *Clinical review: Central hypothyroidism: pathogenic, diagnostic, and therapeutic challenges*. J Clin Endocrinol Metab, 2012. **97**(9): p. 3068-78.
34. Graeppi-Dulac, J., et al., *Endocrine side-effects of anti-cancer drugs: the impact of retinoids on the thyroid axis*. Eur J Endocrinol, 2014. **170**(6): p. R253-62.
35. Huang, S.A., et al., *Severe hypothyroidism caused by type 3 iodothyronine deiodinase in infantile hemangiomas*. N Engl J Med, 2000. **343**(3): p. 185-9.

36. Zhong, B., et al., *Environmental Iodine Content, Female Sex and Age Are Associated with New-Onset Amiodarone-Induced Hypothyroidism: A Systematic Review and Meta-Analysis of Adverse Reactions of Amiodarone on the Thyroid*. *Cardiology*, 2016. **134**(3): p. 366-71.
37. Shine, B., et al., *Long-term effects of lithium on renal, thyroid, and parathyroid function: a retrospective analysis of laboratory data*. *Lancet*, 2015. **386**(9992): p. 461-8.
38. Wassner, A.J., *Congenital Hypothyroidism*. *Clin Perinatol*, 2018. **45**(1): p. 1-18.
39. De Leo, S., S.Y. Lee, and L.E. Braverman, *Hyperthyroidism*. *Lancet*, 2016. **388**(10047): p. 906-918.
40. Krohn, K. and R. Paschke, *Clinical review 133: Progress in understanding the etiology of thyroid autonomy*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001. **86**(7): p. 3336-45.
41. Fuhrer, D., *Constitutive TSH receptor activation as a hallmark of thyroid autonomy*. *Endocrine*, 2020.
42. Batcher, E.L., et al., *Thyroid function abnormalities during amiodarone therapy for persistent atrial fibrillation*. *Am J Med*, 2007. **120**(10): p. 880-5.
43. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. *CA Cancer J Clin*, 2018. **68**(6): p. 394-424.
44. Colonna, M., et al., *Recent trends in incidence, geographical distribution, and survival of papillary thyroid cancer in France*. *Cancer Epidemiol*, 2015. **39**(4): p. 511-8.
45. Davies, L. and H.G. Welch, *Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002*. *Jama*, 2006. **295**(18): p. 2164-7.
46. Calsolaro, V., et al., *Thyroid Disrupting Chemicals*. *Int J Mol Sci*, 2017. **18**(12).
47. Vigneri, R., et al., *Heavy metals in the volcanic environment and thyroid cancer*. *Mol Cell Endocrinol*, 2017. **457**: p. 73-80.
48. Cho, A., et al., *Cigarette smoking and thyroid cancer risk: a cohort study*. *Br J Cancer*, 2018. **119**(5): p. 638-645.
49. Zhao, Z.G., et al., *Overweight, obesity and thyroid cancer risk: a meta-analysis of cohort studies*. *J Int Med Res*, 2012. **40**(6): p. 2041-50.
50. Lebastchi, A.H. and G.G. Callender, *Thyroid cancer*. *Curr Probl Cancer*, 2014. **38**(2): p. 48-74.
51. Kondo, T., S. Ezzat, and S.L. Asa, *Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia*. *Nat Rev Cancer*, 2006. **6**(4): p. 292-306.
52. Schlumberger, M., *[Papillary and follicular thyroid carcinoma]*. *Ann Endocrinol (Paris)*, 2007. **68**(2-3): p. 120-8.

53. Cancer Genome Atlas Research, N., *Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma*. Cell, 2014. **159**(3): p. 676-90.
54. Suarez, H.G., et al., *Detection of activated ras oncogenes in human thyroid carcinomas*. Oncogene, 1988. **2**(4): p. 403-6.
55. Lemoine, N.R., et al., *Activated ras oncogenes in human thyroid cancers*. Cancer Res, 1988. **48**(16): p. 4459-63.
56. Cohen, Y., et al., *BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma*. J Natl Cancer Inst, 2003. **95**(8): p. 625-7.
57. Kimura, E.T., et al., *High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma*. Cancer Res, 2003. **63**(7): p. 1454-7.
58. Ciampi, R. and Y.E. Nikiforov, *RET/PTC rearrangements and BRAF mutations in thyroid tumorigenesis*. Endocrinology, 2007. **148**(3): p. 936-41.
59. Nikiforov, Y.E., *Thyroid carcinoma: molecular pathways and therapeutic targets*. Mod Pathol, 2008. **21 Suppl 2**: p. S37-43.
60. Cerrato, A., et al., *CCDC6: the identity of a protein known to be partner in fusion*. Int J Cancer, 2018. **142**(7): p. 1300-1308.
61. Santana-Codina, N. and J.D. Mancias, *The Role of NCOA4-Mediated Ferritinophagy in Health and Disease*. Pharmaceuticals (Basel), 2018. **11**(4).
62. Brose, M.S., et al., *Rationale and design of decision: a double-blind, randomized, placebo-controlled phase III trial evaluating the efficacy and safety of sorafenib in patients with locally advanced or metastatic radioactive iodine (RAI)-refractory, differentiated thyroid cancer*. BMC Cancer, 2011. **11**: p. 349.
63. Ho, A.L., et al., *Selumetinib-enhanced radioiodine uptake in advanced thyroid cancer*. N Engl J Med, 2013. **368**(7): p. 623-32.
64. Schlumberger, M.J., *Anaplastic Thyroid Carcinoma*, in *Orphanet Encyclopedia*, P.S. Filetti, Editor. 2004.
65. Takano, T., *Fetal cell carcinogenesis of the thyroid: theory and practice*. Semin Cancer Biol, 2007. **17**(3): p. 233-40.
66. Davies, T.F., et al., *Clinical review: The emerging cell biology of thyroid stem cells*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(9): p. 2692-702.
67. Pasiaka, J.L., *Anaplastic thyroid cancer*. Curr Opin Oncol, 2003. **15**(1): p. 78-83.
68. Marsh, D.J., et al., *Somatic mutations in the RET proto-oncogene in sporadic medullary thyroid carcinoma*. Clin Endocrinol (Oxf), 1996. **44**(3): p. 249-57.
69. Costante, G., et al., *Predictive value of serum calcitonin levels for preoperative diagnosis of medullary thyroid carcinoma in a cohort of 5817 consecutive patients with thyroid nodules*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(2): p. 450-5.

70. Hadoux, J. and M. Schlumberger, *Chemotherapy and tyrosine-kinase inhibitors for medullary thyroid cancer*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2017. **31**(3): p. 335-347.
71. Claisse, P.A., *IONISING RADIATION*, in *Civil Engineering Materials*. 2016, BUTTERWORTH-HEINEMANN, LINACRE HOUSE, JORDAN HILL, OXFORD OX2 8DP, OXON, ENGLAND. p. 101-106.
72. E.Holbert, R.L.M., *Radioactivity*, in *NUCLEAR ENERGY: AN INTRODUCTION TO THE CONCEPTS, SYSTEMS, AND APPLICATIONS OF NUCLEAR PROCESSES*. 2020 ELSEVIER BUTTERWORTH-HEINEMANN, 30 CORPORATE DRIVE, STE 400, BURLINGTON, MA 01803 USA. p. 29-40.
73. Harrison, J.D., et al., *Use of effective dose*. Ann ICRP, 2016. **45**(1 Suppl): p. 215-24.
74. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation, U., *2008 UNSCEAR REPORT : SOURCES AND EFFECTS OF IONIZING RADIATION*. 2008.
75. E.Holbert, R.L.M., *Information From Isotopes*, in *NUCLEAR ENERGY: AN INTRODUCTION TO THE CONCEPTS, SYSTEMS, AND APPLICATIONS OF NUCLEAR PROCESSES*. 2020, ELSEVIER BUTTERWORTH-HEINEMANN, 30 CORPORATE DRIVE, STE 400, BURLINGTON, MA 01803 USA. p. 225-248.
76. Amdur R.J., M.E.L., *Half-Life and Emission Products of I-131*, in *Essentials of Thyroid Cancer Management*. 2005, Springer, Boston, MA. p. 165-168.
77. Dohan, O., et al., *The sodium/iodide Symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance*. Endocr Rev, 2003. **24**(1): p. 48-77.
78. Williams, D., *Radiation carcinogenesis: lessons from Chernobyl*. Oncogene, 2008. **27 Suppl 2**: p. S9-18.
79. Fujiwara, H., *Observation of radioactive iodine ((131)I, (129)I) in cropland soil after the Fukushima nuclear accident*. Sci Total Environ, 2016. **566-567**: p. 1432-1439.
80. Choudhury, P.S. and M. Gupta, *Differentiated thyroid cancer theranostics: radioiodine and beyond*. Br J Radiol, 2018. **91**(1091): p. 20180136.
81. *Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire , Exposition de la population française aux rayonnements ionisants*. 2015.
82. Bouville, A., et al., *Radiation dosimetry for highly contaminated Belarusian, Russian and Ukrainian populations, and for less contaminated populations in Europe*. Health Phys, 2007. **93**(5): p. 487-501.
83. Socolow, E.L., et al., *Thyroid carcinoma in man after exposure to ionizing radiation. A summary of the findings in Hiroshima and Nagasaki*. N Engl J Med, 1963. **268**: p. 406-10.

84. Young RW, K.G., eds, *Reassessment of the atomic bomb radiation dosimetry for Hiroshima and Nagasaki – Dosimetry system 2002*. 2005, Radiation Effects Research Foundation: Hiroshima, Japan.
85. ThierryDouki, J.-L., *UV and ionizing radiations induced DNA damage, differences and similarities*, in *Radiation Physics and Chemistry*, M. Spothem-Maurizot, Editor. 2016. p. 92-102.
86. Waxman, M.B.J., *The principles of cancer treatment*, in *Oncology*, Wiley-Blackwell, Editor. 2010, Wiley-Blackwell.
87. Chatterjee, N. and G.C. Walker, *Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis*. *Environ Mol Mutagen*, 2017. **58**(5): p. 235-263.
88. Maier, P., et al., *Cellular Pathways in Response to Ionizing Radiation and Their Targetability for Tumor Radiosensitization*. *Int J Mol Sci*, 2016. **17**(1).
89. Mirzayans, R., et al., *New insights into p53 signaling and cancer cell response to DNA damage: implications for cancer therapy*. *J Biomed Biotechnol*, 2012. **2012**: p. 170325.
90. Mah, L.J., A. El-Osta, and T.C. Karagiannis, *gammaH2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair*. *Leukemia*, 2010. **24**(4): p. 679-86.
91. Vitor, A.C., et al., *Studying DNA Double-Strand Break Repair: An Ever-Growing Toolbox*. *Front Mol Biosci*, 2020. **7**: p. 24.
92. Sage, E. and N. Shikazono, *Radiation-induced clustered DNA lesions: Repair and mutagenesis*. *Free Radic Biol Med*, 2017. **107**: p. 125-135.
93. Nickoloff, J.A., N. Sharma, and L. Taylor, *Clustered DNA Double-Strand Breaks: Biological Effects and Relevance to Cancer Radiotherapy*. *Genes (Basel)*, 2020. **11**(1).
94. Yu, H., *Typical cell signaling response to ionizing radiation: DNA damage and extranuclear damage*. *Chin J Cancer Res*, 2012. **24**(2): p. 83-9.
95. Protection, T.R.o.t.I.C.o.R., *ICRP 2007 REPORT*. 2007.
96. <http://www.inrs.fr/risques/rayonnements-ionisants/effets-sur-la-sante.html>.
97. White, S.C. and S.M. Mallya, *Update on the biological effects of ionizing radiation, relative dose factors and radiation hygiene*. *Aust Dent J*, 2012. **57 Suppl 1**: p. 2-8.
98. Neel, J.V., et al., *The children of parents exposed to atomic bombs: estimates of the genetic doubling dose of radiation for humans*. *Am J Hum Genet*, 1990. **46**(6): p. 1053-72.
99. Kiuru, A., et al., *Hereditary minisatellite mutations among the offspring of Estonian Chernobyl cleanup workers*. *Radiat Res*, 2003. **159**(5): p. 651-5.
100. UNSCEAR, *Sources, Effects and Risks of Ionizing Radiation. Report to the General Assembly and Scientific Annexes A and B*. UNSCEAR 2012, United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation.

101. Cuttler, J.M., *Evidence of a Dose Threshold for Radiation-Induced Leukemia*. Dose Response, 2018. **16**(4): p. 1559325818811537.
102. Boice, J.D., Jr., *The linear nonthreshold (LNT) model as used in radiation protection: an NCRP update*. Int J Radiat Biol, 2017. **93**(10): p. 1079-1092.
103. Shibamoto, Y. and H. Nakamura, *Overview of Biological, Epidemiological, and Clinical Evidence of Radiation Hormesis*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(8).
104. Ron, E., *Thyroid cancer incidence among people living in areas contaminated by radiation from the Chernobyl accident*. Health Phys, 2007. **93**(5): p. 502-11.
105. Berrington de Gonzalez, A., et al., *Proportion of second cancers attributable to radiotherapy treatment in adults: a cohort study in the US SEER cancer registries*. Lancet Oncol, 2011. **12**(4): p. 353-60.
106. Duffy, B.J., Jr. and P.J. Fitzgerald, *Thyroid cancer in childhood and adolescence; a report on 28 cases*. Cancer, 1950. **3**(6): p. 1018-32.
107. Thompson, D.E., et al., *Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part II: Solid tumors, 1958-1987*. Radiat Res, 1994. **137**(2 Suppl): p. S17-67.
108. Mabuchi, K., et al., *Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part I: Use of the tumor registries in Hiroshima and Nagasaki for incidence studies*. Radiat Res, 1994. **137**(2 Suppl): p. S1-16.
109. Ron, E., et al., *Thyroid cancer after exposure to external radiation: a pooled analysis of seven studies*. Radiat Res, 1995. **141**(3): p. 259-77.
110. Shore, R.E., et al., *Thyroid cancer among persons given X-ray treatment in infancy for an enlarged thymus gland*. Am J Epidemiol, 1993. **137**(10): p. 1068-80.
111. Ron, E., et al., *Thyroid neoplasia following low-dose radiation in childhood*. Radiat Res, 1989. **120**(3): p. 516-31.
112. Pottern, L.M., et al., *Thyroid nodularity after childhood irradiation for lymphoid hyperplasia: a comparison of questionnaire and clinical findings*. J Clin Epidemiol, 1990. **43**(5): p. 449-60.
113. Schneider, A.B., et al., *Dose-response relationships for radiation-induced thyroid cancer and thyroid nodules: evidence for the prolonged effects of radiation on the thyroid*. J Clin Endocrinol Metab, 1993. **77**(2): p. 362-9.
114. Cardis, E., et al., *Risk of thyroid cancer after exposure to ¹³¹I in childhood*. J Natl Cancer Inst, 2005. **97**(10): p. 724-32.
115. Bogdanova, T.I., et al., *A cohort study of thyroid cancer and other thyroid diseases after the Chornobyl accident: pathology analysis of thyroid cancer cases in Ukraine detected during the first screening (1998-2000)*. Cancer, 2006. **107**(11): p. 2559-66.
116. Tronko, M.D., et al., *A cohort study of thyroid cancer and other thyroid diseases after the chornobyl accident: thyroid cancer in Ukraine detected during first screening*. J Natl Cancer Inst, 2006. **98**(13): p. 897-903.

117. Brenner, A.V., et al., *I-131 dose response for incident thyroid cancers in Ukraine related to the Chernobyl accident*. *Environ Health Perspect*, 2011. **119**(7): p. 933-9.
118. Lubin, J.H., et al., *Thyroid Cancer Following Childhood Low-Dose Radiation Exposure: A Pooled Analysis of Nine Cohorts*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2017. **102**(7): p. 2575-2583.
119. Veiga, L.H., et al., *Thyroid Cancer after Childhood Exposure to External Radiation: An Updated Pooled Analysis of 12 Studies*. *Radiat Res*, 2016. **185**(5): p. 473-84.
120. de Vathaire, F., et al., *Thyroid carcinomas after irradiation for a first cancer during childhood*. *Arch Intern Med*, 1999. **159**(22): p. 2713-9.
121. Furukawa, K., et al., *Long-term trend of thyroid cancer risk among Japanese atomic-bomb survivors: 60 years after exposure*. *Int J Cancer*, 2013. **132**(5): p. 1222-6.
122. Drozdovitch, V., et al., *Radiation exposure to the population of Europe following the Chernobyl accident*. *Radiat Prot Dosimetry*, 2007. **123**(4): p. 515-28.
123. Rubino, C., et al., *Characteristics of follicular cell-derived thyroid carcinomas occurring after external radiation exposure: results of a case control study nested in a cohort*. *Thyroid*, 2002. **12**(4): p. 299-304.
124. Naing, S., B.J. Collins, and A.B. Schneider, *Clinical behavior of radiation-induced thyroid cancer: factors related to recurrence*. *Thyroid*, 2009. **19**(5): p. 479-85.
125. Williams, E.D., et al., *Morphologic characteristics of Chernobyl-related childhood papillary thyroid carcinomas are independent of radiation exposure but vary with iodine intake*. *Thyroid*, 2008. **18**(8): p. 847-52.
126. Powell, N., et al., *Frequency of BRAF T1796A mutation in papillary thyroid carcinoma relates to age of patient at diagnosis and not to radiation exposure*. *J Pathol*, 2005. **205**(5): p. 558-64.
127. Smida, J., et al., *Distinct frequency of ret rearrangements in papillary thyroid carcinomas of children and adults from Belarus*. *Int J Cancer*, 1999. **80**(1): p. 32-8.
128. Unger, K., et al., *RET rearrangements in post-Chernobyl papillary thyroid carcinomas with a short latency analysed by interphase FISH*. *Br J Cancer*, 2006. **94**(10): p. 1472-7.
129. Hamatani, K., et al., *RET/PTC rearrangements preferentially occurred in papillary thyroid cancer among atomic bomb survivors exposed to high radiation dose*. *Cancer Res*, 2008. **68**(17): p. 7176-82.
130. Kimmel, R.R., et al., *Microarray comparative genomic hybridization reveals genome-wide patterns of DNA gains and losses in post-Chernobyl thyroid cancer*. *Radiat Res*, 2006. **166**(3): p. 519-31.
131. Hess, J., et al., *Gain of chromosome band 7q11 in papillary thyroid carcinomas of young patients is associated with exposure to low-dose irradiation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(23): p. 9595-600.

132. Zitzelsberger, H. and K. Unger, *DNA copy number alterations in radiation-induced thyroid cancer*. Clin Oncol (R Coll Radiol), 2011. **23**(4): p. 289-96.
133. Stein, L., et al., *Copy number and gene expression alterations in radiation-induced papillary thyroid carcinoma from chernobyl pediatric patients*. Thyroid, 2010. **20**(5): p. 475-87.
134. Boltze, C., et al., *Sporadic and radiation-associated papillary thyroid cancers can be distinguished using routine immunohistochemistry*. Oncol Rep, 2009. **22**(3): p. 459-67.
135. Achille, M., et al., *Expression of cell cycle biomarkers and telomere length in papillary thyroid carcinoma: a comparative study between radiation-associated and spontaneous cancers*. Am J Clin Oncol, 2009. **32**(1): p. 1-8.
136. Detours, V., et al., *Absence of a specific radiation signature in post-Chernobyl thyroid cancers*. Br J Cancer, 2005. **92**(8): p. 1545-52.
137. Detours, V., et al., *Genome-wide gene expression profiling suggests distinct radiation susceptibilities in sporadic and post-Chernobyl papillary thyroid cancers*. Br J Cancer, 2007. **97**(6): p. 818-25.
138. Port, M., et al., *A radiation-induced gene signature distinguishes post-Chernobyl from sporadic papillary thyroid cancers*. Radiat Res, 2007. **168**(6): p. 639-49.
139. Maenhaut, C., et al., *Gene expression profiles for radiation-induced thyroid cancer*. Clin Oncol (R Coll Radiol), 2011. **23**(4): p. 282-8.
140. Ory, C., et al., *Gene expression signature discriminates sporadic from post-radiotherapy-induced thyroid tumors*. Endocr Relat Cancer, 2011. **18**(1): p. 193-206.
141. Ugolin, N., et al., *Strategy to find molecular signatures in a small series of rare cancers: validation for radiation-induced breast and thyroid tumors*. PLoS One, 2011. **6**(8): p. e23581.
142. Ory, C., et al., *Discriminating gene expression signature of radiation-induced thyroid tumors after either external exposure or internal contamination*. Genes (Basel), 2011. **3**(1): p. 19-34.
143. Ory, C., et al., *Comparison of transcriptomic signature of post-Chernobyl and postradiotherapy thyroid tumors*. Thyroid, 2013. **23**(11): p. 1390-400.
144. 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.
145. Nomura, T., et al., *Differential radiation sensitivity to morphological, functional and molecular changes of human thyroid tissues and bone marrow cells maintained in SCID mice*. Mutat Res, 2008. **657**(1): p. 68-76.
146. Adachi, S., et al., *Effects of fission neutrons on human thyroid tissues maintained in SCID mice*. Mutat Res, 2010. **696**(2): p. 107-13.

147. Nikiforova, M.N., et al., *MicroRNA dysregulation in human thyroid cells following exposure to ionizing radiation*. *Thyroid*, 2011. **21**(3): p. 261-6.
148. Sanzari, J.K., M. Nuth, and A.R. Kennedy, *Induction of cytokine gene expression in human thyroid epithelial cells irradiated with HZE particles (iron ions)*. *Radiat Res*, 2009. **172**(4): p. 437-43.
149. Ambesi-Impiombato, F.S., L.A. Parks, and H.G. Coon, *Culture of hormone-dependent functional epithelial cells from rat thyroids*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1980. **77**(6): p. 3455-9.
150. Zitzelsberger, H., et al., *Clonal chromosomal aberrations in simian virus 40-transfected human thyroid cells and in derived tumors developed after in vitro irradiation*. *Int J Cancer*, 2001. **96**(3): p. 166-77.
151. Lemoine, N.R., et al., *Characterisation of human thyroid epithelial cells immortalised in vitro by simian virus 40 DNA transfection*. *Br J Cancer*, 1989. **60**(6): p. 897-903.
152. Sinnott, B., E. Ron, and A.B. Schneider, *Exposing the thyroid to radiation: a review of its current extent, risks, and implications*. *Endocr Rev*, 2010. **31**(5): p. 756-73.
153. Dalke, C., et al., *Differences in the susceptibility to iodine(1)(3)(1)-induced thyroid tumours amongst inbred mouse strains*. *J Radiat Res*, 2012. **53**(3): p. 343-52.
154. Pocar, P., et al., *AhR-agonist-induced transcriptional changes of genes involved in thyroid function in primary porcine thyrocytes*. *Toxicol Sci*, 2006. **89**(2): p. 408-14.
155. Kimura, T., et al., *Regulation of thyroid cell proliferation by TSH and other factors: a critical evaluation of in vitro models*. *Endocr Rev*, 2001. **22**(5): p. 631-56.
156. Bravo, S.B., et al., *Humanized medium (h7H) allows long-term primary follicular thyroid cultures from human normal thyroid, benign neoplasm, and cancer*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013. **98**(6): p. 2431-41.
157. Wang, Y., et al., *Primary Cell Culture Systems for Human Thyroid Studies*. *Thyroid*, 2016. **26**(8): p. 1131-40.
158. Garcia-Rendueles, A.R., et al., *Rewiring of the apoptotic TGF-beta-SMAD/NFkappaB pathway through an oncogenic function of p27 in human papillary thyroid cancer*. *Oncogene*, 2017. **36**(5): p. 652-666.
159. Chambard, M., et al., *Polarization of thyroid cells in culture: evidence for the basolateral localization of the iodide "pump" and of the thyroid-stimulating hormone receptor-adenyl cyclase complex*. *J Cell Biol*, 1983. **96**(4): p. 1172-7.
160. Chambard, M., J. Mauchamp, and O. Chabaud, *Synthesis and apical and basolateral secretion of thyroglobulin by thyroid cell monolayers on permeable substrate: modulation by thyrotropin*. *J Cell Physiol*, 1987. **133**(1): p. 37-45.
161. Nilsson, M., et al., *Primary culture of human thyrocytes in Transwell bicameral chamber: thyrotropin promotes polarization and epithelial barrier function*. *Eur J Endocrinol*, 1996. **135**(4): p. 469-80.

162. Many, M.C., et al., *In vitro study of acute toxic effects of high iodide doses in human thyroid follicles*. *Endocrinology*, 1992. **131**(2): p. 621-30.
163. Deneff, J.F., U. Bjorkman, and R. Ekholm, *Structural and functional characteristics of isolated thyroid follicles*. *J Ultrastruct Res*, 1980. **71**(2): p. 185-202.
164. Spinel-Gomez, C., et al., *Correlated morphological and functional study of isolated rat thyroid follicles in suspension culture*. *Mol Cell Endocrinol*, 1990. **71**(2): p. 141-53.
165. Alhaque, S., M. Themis, and H. Rashidi, *Three-dimensional cell culture: from evolution to revolution*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2018. **373**(1750).
166. Jensen, C. and Y. Teng, *Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture?* *Front Mol Biosci*, 2020. **7**: p. 33.
167. Toda, S., N. Koike, and H. Sugihara, *Thyrocyte integration, and thyroid folliculogenesis and tissue regeneration: perspective for thyroid tissue engineering*. *Pathol Int*, 2001. **51**(6): p. 403-17.
168. Chambard, M., J. Gabrion, and J. Mauchamp, *Influence of collagen gel on the orientation of epithelial cell polarity: follicle formation from isolated thyroid cells and from preformed monolayers*. *J Cell Biol*, 1981. **91**(1): p. 157-66.
169. Garbi, C., L. Nitsch, and S.H. Wollman, *Embedding in a collagen gel stabilizes the polarity of epithelial cells in thyroid follicles in suspension culture*. *Exp Cell Res*, 1984. **151**(2): p. 458-65.
170. Toda, S., et al., *Plural cells organize thyroid follicles through aggregation and linkage in collagen gel culture of porcine follicle cells*. *Endocrinology*, 1993. **133**(2): p. 914-20.
171. Mauchamp, J., et al., *Follicle-like structure and polarized monolayer: role of the extracellular matrix on thyroid cell organization in primary culture*. *Biol Cell*, 1998. **90**(5): p. 369-80.
172. Saito, Y., et al., *Development of a functional thyroid model based on an organoid culture system*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018. **497**(2): p. 783-789.
173. Sewell, W. and R.Y. Lin, *Generation of thyroid follicular cells from pluripotent stem cells: potential for regenerative medicine*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2014. **5**: p. 96.
174. Zakrzewski, W., et al., *Stem cells: past, present, and future*. *Stem Cell Res Ther*, 2019. **10**(1): p. 68.
175. Sukoyan, M.A., et al., *Embryonic stem cells derived from morulae, inner cell mass, and blastocysts of mink: comparisons of their pluripotencies*. *Mol Reprod Dev*, 1993. **36**(2): p. 148-58.
176. *Rapport sur l'application de la loi de bioéthique*. 2018, Agence de la Biomédecine.

177. A.Thomson, J.J., *Induced Pluripotent Stem Cells*, in *Principles of Tissue Engineering (Fourth Edition)*, R.L.a.J.V. Robert Lanza, Editor. 2014. p. 581-594.
178. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. *Cell*, 2006. **126**(4): p. 663-76.
179. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. *Cell*, 2007. **131**(5): p. 861-72.
180. Nichols, J., et al., *Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4*. *Cell*, 1998. **95**(3): p. 379-91.
181. Avilion, A.A., et al., *Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function*. *Genes Dev*, 2003. **17**(1): p. 126-40.
182. Li, Y., et al., *Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4*. *Blood*, 2005. **105**(2): p. 635-7.
183. Cartwright, P., et al., *LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism*. *Development*, 2005. **132**(5): p. 885-96.
184. Pelengaris, S., M. Khan, and G. Evan, *c-MYC: more than just a matter of life and death*. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(10): p. 764-76.
185. Si-Tayeb, K., et al., *Generation of human induced pluripotent stem cells by simple transient transfection of plasmid DNA encoding reprogramming factors*. *BMC Dev Biol*, 2010. **10**: p. 81.
186. Stadtfeld, M., et al., *Induced pluripotent stem cells generated without viral integration*. *Science*, 2008. **322**(5903): p. 945-9.
187. Zhou, H., et al., *Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins*. *Cell Stem Cell*, 2009. **4**(5): p. 381-4.
188. Fatehullah, A., S.H. Tan, and N. Barker, *Organoids as an in vitro model of human development and disease*. *Nat Cell Biol*, 2016. **18**(3): p. 246-54.
189. Kurmann, A.A., et al., *Regeneration of Thyroid Function by Transplantation of Differentiated Pluripotent Stem Cells*. *Cell Stem Cell*, 2015. **17**(5): p. 527-42.
190. Antonica, F., et al., *Generation of functional thyroid from embryonic stem cells*. *Nature*, 2012. **491**(7422): p. 66-71.
191. Ma, R., R. Latif, and T.F. Davies, *Human embryonic stem cells form functional thyroid follicles*. *Thyroid*, 2015. **25**(4): p. 455-61.
192. Toda, S., et al., *A new organotypic culture of thyroid tissue maintains three-dimensional follicles with C cells for a long term*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. **294**(4): p. 906-11.
193. Toda, S., et al., *Thyrocytes, but not C cells, actively undergo growth and folliculogenesis at the periphery of thyroid tissue fragments in three-dimensional collagen gel culture*. *Cell Tissue Res*, 2003. **312**(3): p. 281-9.

194. Toda, S., et al., *Culture models for studying thyroid biology and disorders*. ISRN Endocrinol, 2011. **2011**: p. 275782.
195. Hick, A.C., et al., *Reciprocal epithelial:endothelial paracrine interactions during thyroid development govern follicular organization and C-cells differentiation*. Dev Biol, 2013. **381**(1): p. 227-40.
196. Yamamoto, M., et al., *Interaction between thyrocytes and adipose tissue in vitro*. Pathol Int, 2016. **66**(3): p. 148-157.
197. Fukuda, K., et al., *Morphology and function of human benign tumors and normal thyroid tissues maintained in severe combined immunodeficient mice*. Cancer Lett, 1998. **132**(1-2): p. 153-8.
198. Fujii, E., et al., *Histopathological characteristics of human non-tumor thyroid tissues in a long-term model of adenomatous goiter xenografts in the NOD/Shi-scid, IL-2Rgamma(null) mouse*. Exp Toxicol Pathol, 2014. **66**(4): p. 203-9.
199. Lee, J., et al., *Morphological and Functional Changes in the Thyroid Follicles of the Aged Murine and Humans*. J Pathol Transl Med, 2016. **50**(6): p. 426-435.
200. Kim, P.S. and P. Arvan, *Hormonal regulation of thyroglobulin export from the endoplasmic reticulum of cultured thyrocytes*. J Biol Chem, 1993. **268**(7): p. 4873-9.
201. Morishita, Y., et al., *Thyrocyte cell survival and adaptation to chronic endoplasmic reticulum stress due to misfolded thyroglobulin*. J Biol Chem, 2020. **295**(20): p. 6876-6887.
202. Toda, S., et al., *Transforming growth factor-beta1 induces a mesenchyme-like cell shape without epithelial polarization in thyrocytes and inhibits thyroid folliculogenesis in collagen gel culture*. Endocrinology, 1997. **138**(12): p. 5561-75.
203. Kirkiles-Smith, N.C., et al., *Development of a humanized mouse model to study the role of macrophages in allograft injury*. Transplantation, 2009. **87**(2): p. 189-97.
204. Colonna, M., et al., *A time trend analysis of papillary and follicular cancers as a function of tumour size: a study of data from six cancer registries in France (1983-2000)*. Eur J Cancer, 2007. **43**(5): p. 891-900.
205. Leboulleux, S., et al., *Papillary thyroid microcarcinoma: time to shift from surgery to active surveillance?* Lancet Diabetes Endocrinol, 2016. **4**(11): p. 933-942.
206. Yamashita, S., et al., *Radiation Exposure and Thyroid Cancer Risk After the Fukushima Nuclear Power Plant Accident in Comparison with the Chernobyl Accident*. Radiat Prot Dosimetry, 2016. **171**(1): p. 41-6.
207. Yamashita, S., et al., *Lessons from Fukushima: Latest Findings of Thyroid Cancer After the Fukushima Nuclear Power Plant Accident*. Thyroid, 2018. **28**(1): p. 11-22.
208. Brindel, P., et al., *Menstrual and reproductive factors in the risk of differentiated thyroid carcinoma in native women in French Polynesia: a population-based case-control study*. Am J Epidemiol, 2008. **167**(2): p. 219-29.

209. Brindel, P., et al., *Anthropometric factors in differentiated thyroid cancer in French Polynesia: a case-control study*. *Cancer Causes Control*, 2009. **20**(5): p. 581-90.
210. de Vathaire, F., et al., *Thyroid cancer following nuclear tests in French Polynesia*. *Br J Cancer*, 2010. **103**(7): p. 1115-21.
211. Schonfeld, S.J., C. Lee, and A. Berrington de Gonzalez, *Medical exposure to radiation and thyroid cancer*. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 2011. **23**(4): p. 244-50.
212. Mathews, J.D., et al., *Cancer risk in 680,000 people exposed to computed tomography scans in childhood or adolescence: data linkage study of 11 million Australians*. *BMJ*, 2013. **346**: p. f2360.
213. Zhang, Y., et al., *Diagnostic radiography exposure increases the risk for thyroid microcarcinoma: a population-based case-control study*. *Eur J Cancer Prev*, 2015. **24**(5): p. 439-46.
214. Velegzhaninov, I.O., et al., *Differential Molecular Stress Responses to Low Compared to High Doses of Ionizing Radiation in Normal Human Fibroblasts*. *Dose Response*, 2015. **13**(1).
215. Bogdandi, E.N., et al., *Effects of low-dose radiation on the immune system of mice after total-body irradiation*. *Radiat Res*, 2010. **174**(4): p. 480-9.
216. Ding, L.H., et al., *Gene expression profiles of normal human fibroblasts after exposure to ionizing radiation: a comparative study of low and high doses*. *Radiat Res*, 2005. **164**(1): p. 17-26.
217. Franco, N., et al., *Low-dose exposure to gamma rays induces specific gene regulations in normal human keratinocytes*. *Radiat Res*, 2005. **163**(6): p. 623-35.
218. Mezentsev, A. and S.A. Amundson, *Global gene expression responses to low- or high-dose radiation in a human three-dimensional tissue model*. *Radiat Res*, 2011. **175**(6): p. 677-88.
219. Kuzmina, N.S., N. Lapteva, and A.V. Rubanovich, *Hypermethylation of gene promoters in peripheral blood leukocytes in humans long term after radiation exposure*. *Environ Res*, 2016. **146**: p. 10-7.
220. Torres, E.R.S., et al., *Integrated Metabolomics-DNA Methylation Analysis Reveals Significant Long-Term Tissue-Dependent Directional Alterations in Aminoacyl-tRNA Biosynthesis in the Left Ventricle of the Heart and Hippocampus Following Proton Irradiation*. *Front Mol Biosci*, 2019. **6**: p. 77.
221. Skinner, M.K., *Endocrine disruptors and epigenetic transgenerational disease etiology*. *Pediatr Res*, 2007. **61**(5 Pt 2): p. 48R-50R.
222. Menezo, Y., B. Dale, and K. Elder, *The negative impact of the environment on methylation/epigenetic marking in gametes and embryos: A plea for action to protect the fertility of future generations*. *Mol Reprod Dev*, 2019. **86**(10): p. 1273-1282.
223. Kitsiou-Tzeli, S. and M. Tzetis, *Maternal epigenetics and fetal and neonatal growth*. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2017. **24**(1): p. 43-46.

224. Dai, Z., V. Ramesh, and J.W. Locasale, *The evolving metabolic landscape of chromatin biology and epigenetics*. Nat Rev Genet, 2020.
225. Sher, G., et al., *Epigenetic and breast cancer therapy: Promising diagnostic and therapeutic applications*. Semin Cancer Biol, 2020.
226. Miguel, V., S. Lamas, and C. Espinosa-Diez, *Role of non-coding-RNAs in response to environmental stressors and consequences on human health*. Redox Biol, 2020: p. 101580.
227. Szumiel, I., *Ionizing radiation-induced oxidative stress, epigenetic changes and genomic instability: the pivotal role of mitochondria*. Int J Radiat Biol, 2015. **91**(1): p. 1-12.
228. Mothersill, C. and C. Seymour, *Are epigenetic mechanisms involved in radiation-induced bystander effects?* Front Genet, 2012. **3**: p. 74.
229. Cossetti, C., et al., *Soma-to-germline transmission of RNA in mice xenografted with human tumour cells: possible transport by exosomes*. PLoS One, 2014. **9**(7): p. e101629.
230. Anway, M.D., et al., *Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility*. Science, 2005. **308**(5727): p. 1466-9.
231. Ben Maamar, M., et al., *Alterations in sperm DNA methylation, non-coding RNA expression, and histone retention mediate vinclozolin-induced epigenetic transgenerational inheritance of disease*. Environ Epigenet, 2018. **4**(2): p. dvy010.
232. Mustonen, V., et al., *Fibroblasts from bank voles inhabiting Chernobyl have increased resistance against oxidative and DNA stresses*. BMC Cell Biol, 2018. **19**(1): p. 17.
233. Galvan, I., et al., *Chronic exposure to low-dose radiation at Chernobyl favours adaptation to oxidative stress in birds*. Functional Ecology, 2014. **28**(6): p. 1387-1403.
234. Hayes, J.D., A.T. Dinkova-Kostova, and K.D. Tew, *Oxidative Stress in Cancer*. Cancer Cell, 2020. **38**(2): p. 167-197.
235. Roudkenar, M.H., et al., *Disturbance in the regulation of miR 17-92 cluster on HIF-1-alpha expression contributes to clinically relevant radioresistant cells: an in vitro study*. Cytotechnology, 2020. **72**(1): p. 141-153.
236. Hebrant, A., et al., *Long-term EGF/serum-treated human thyrocytes mimic papillary thyroid carcinomas with regard to gene expression*. Exp Cell Res, 2007. **313**(15): p. 3276-84.
237. Malaguarnera, R., et al., *Insulin receptor isoforms and insulin-like growth factor receptor in human follicular cell precursors from papillary thyroid cancer and normal thyroid*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(3): p. 766-74.

238. Song, H.J., et al., *HIF-1alpha-mediated TERT Activation Inducing Autophagy through mTOR Promotes Papillary Thyroid Carcinoma Progression During Hypoxia Stress*. *Thyroid*, 2020.
239. Ramakrishnan, S., V. Anand, and S. Roy, *Vascular endothelial growth factor signaling in hypoxia and inflammation*. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2014. **9**(2): p. 142-60.
240. Corcoran, S.E. and L.A. O'Neill, *HIF1alpha and metabolic reprogramming in inflammation*. *J Clin Invest*, 2016. **126**(10): p. 3699-3707.
241. Kimura, S., *Thyroid regeneration: how stem cells play a role?* *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2014. **5**: p. 55.
242. Lan, L., et al., *Stem cells derived from goiters in adults form spheres in response to intense growth stimulation and require thyrotropin for differentiation into thyrocytes*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007. **92**(9): p. 3681-8.
243. Okamoto, M., et al., *Stem cell antigen 1-positive mesenchymal cells are the origin of follicular cells during thyroid regeneration*. *PLoS One*, 2013. **8**(11): p. e80801.
244. Zane, M., et al., *Normal vs cancer thyroid stem cells: the road to transformation*. *Oncogene*, 2016. **35**(7): p. 805-15.
245. Mitsutake, N., et al., *Characterization of side population in thyroid cancer cell lines: cancer stem-like cells are enriched partly but not exclusively*. *Endocrinology*, 2007. **148**(4): p. 1797-803.
246. 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.
247. Bosch de Basea, M., et al., *Subtle excess in lifetime cancer risk related to CT scanning in Spanish young people*. *Environ Int*, 2018. **120**: p. 1-10.
248. Likhtarov, I., et al., *Reconstruction of individual thyroid doses to the Ukrainian subjects enrolled in the Chernobyl Tissue Bank*. *Radiat Prot Dosimetry*, 2013. **156**(4): p. 407-23.
249. Ohba, T., et al., *Reconstruction of residents' thyroid equivalent doses from internal radionuclides after the Fukushima Daiichi nuclear power station accident*. *Sci Rep*, 2020. **10**(1): p. 3639.
250. Moure, A., et al., *Extracellular hemoglobin combined with an O₂-generating material overcomes O₂ limitation in the bioartificial pancreas*. *Biotechnol Bioeng*, 2019. **116**(5): p. 1176-1189.
251. Buenrostro, J.D., et al., *Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position*. *Nat Methods*, 2013. **10**(12): p. 1213-8.

252. Street, M.E., et al., *Current Knowledge on Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs) from Animal Biology to Humans, from Pregnancy to Adulthood: Highlights from a National Italian Meeting*. *Int J Mol Sci*, 2018. **19**(6).
253. Ward, M.H., et al., *Nitrate intake and the risk of thyroid cancer and thyroid disease*. *Epidemiology*, 2010. **21**(3): p. 389-95.
254. Xie, L., et al., *Association between dietary nitrate and nitrite intake and sitespecific cancer risk: evidence from observational studies*. *Oncotarget*, 2016. **7**(35): p. 56915-56932.
255. Cong, X., *Air pollution from industrial waste gas emissions is associated with cancer incidences in Shanghai, China*. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2018. **25**(13): p. 13067-13078.
256. Aschebrook-Kilfoy, B., et al., *Thyroid cancer risk and dietary nitrate and nitrite intake in the Shanghai women's health study*. *Int J Cancer*, 2013. **132**(4): p. 897-904.
257. Fiore, M., et al., *Role of Emerging Environmental Risk Factors in Thyroid Cancer: A Brief Review*. *Int J Environ Res Public Health*, 2019. **16**(7).

Titre : Développement de modèles in vitro et in vivo pour analyser la réponse aux radiations ionisantes du tissu thyroïdien humain normal

Mots clés : thyroïde, tissu normal, modèles 3D humains, radiation ionisante, carcinogénèse

Résumé : Le seul facteur étiologique démontré pour le cancer de la thyroïde est une exposition aux radiations ionisantes (RI) durant l'enfance. Les études épidémiologiques mesurent un risque significatif de développer un cancer suite à l'exposition pour une dose reçue à la thyroïde d'au minimum 50 mGy, le risque étant proportionnel à la dose. Ce risque est observé après une exposition externe à fortes doses/débats de dose (radiothérapie) et après une contamination à de plus faibles doses de radioisotopes de l'iode. Si des cancers radio-induits (R) se développent à des doses <50mGy, l'excès de cancers ne peut pas être mesuré par l'épidémiologie conventionnelle, d'autant plus que l'incidence des cancers spontanés de la thyroïde (S) augmente. En conséquence, il n'est pas possible de répondre aux interrogations sociétales sur les risques pour la santé d'exposition aux faibles doses délivrées lors d'exams d'imagerie médicale dans la région « tête et cou » chez l'enfant, ou reçues suite aux retombées des accidents de Tchernobyl et Fukushima, et aux essais nucléaires atmosphériques en Polynésie française.

Pour répondre à ces interrogations, une meilleure connaissance de l'effet des RI en fonction de la dose et du débit de dose sur la thyroïde humaine est nécessaire. La carcinogénèse thyroïdienne présente des spécificités d'espèces : chez la souris, l'incidence de cancers de la thyroïde S et R est faible, et les quelques tumeurs R qui se développent sont principalement des cancers folliculaires alors qu'ils sont majoritairement papillaires chez l'Homme (S et R).

Pour analyser la réponse aux RI du tissu thyroïdien humain normal, nous avons développé plusieurs approches à partir de biopsies de tissu normal provenant de patients ayant subi une thyroïdectomie : des cultures primaires de thyrocytes, des modèles 3D in vitro (thyrosphères, cultures organotypiques) et des xénogreffes chez la souris.

Pour les modèles 3D, le maintien de la polarité, de la différenciation cellulaire, de la complexité tissulaire et de l'activité physiologique des cultures ont été contrôlés. Nous avons obtenu des thyrosphères (6 patients) organisées en follicules délimitant un lumen composé de thyroglobuline. Nous avons développé des cultures organotypiques en matrigel selon le protocole publié par Toda et coll. (thyroïde de porc, 2002) (7 patients), et montré un choc hypoxique dans les tissus. Une oxygénation optimale du tissu a été obtenue par une culture en interface air-liquide (ALI) (3 patients). En culture ALI, les biopsies sécrètent l'hormone thyroïdienne T4 en réponse à la TSH (1 patient, 1 semaine). Ce protocole a permis un maintien du tissu sur 4 semaines. Les xénogreffes devraient permettre une analyse à des temps plus tardifs, et ont déjà permis le maintien du tissu sur 5 semaines sur des souris SCID/beige (3 patients).

En parallèle, nous avons comparé la prolifération, la survie et la cinétique d'induction/réparation des cassures après exposition aux RI de cultures primaires de thyrocytes de patients exposés (radiothérapie) pendant l'enfance (2 patients) ou non exposés (3 patients). Nous observons de façon reproductible que les thyrocytes exposés sont plus radiorésistants que les thyrocytes non exposés. Ces résultats suggèrent fortement l'existence d'une empreinte à long terme d'exposition aux RI dans le tissu normal, en accord avec l'identification de signatures moléculaires discriminant le tissu normal exposé et non exposé par C Ory et N Ugolin au LCE. Comme suggéré par l'équipe de C Dupuy, cette empreinte pourrait être due à la mise en place d'un stress oxydatif chronique dans la thyroïde suite à l'exposition aux RI.

Les modèles développés pendant cette thèse seront essentiels pour comprendre les effets et les risques des RI à faibles et fortes doses, associées ou non aux perturbateurs endocriniens, sur la thyroïde humaine, ainsi que les premières étapes de la carcinogénèse et l'origine de cette empreinte d'exposition persistante sur le long terme.

Title: Development of in vitro and in vivo models to analyze the normal human thyroid tissue response to ionizing radiation

Keywords: thyroid, normal tissue, 3D human models, ionizing radiation, carcinogenesis

Abstract: The only demonstrated etiologic factor for thyroid cancer is an exposure to ionizing radiation (IR) during childhood. Epidemiological studies can measure a significant risk to develop a cancer following thyroid doses above 50 mGy. This risk is observed after external exposure to high doses/dose rates (radiotherapy) and after contamination of iodine radioisotopes at lower doses.

As the risk decreases with the dose, if radiation-induced cancers (R) develop after thyroid doses <50mGy, an excess of cancers cannot be measured by conventional epidemiology, especially because the incidence of sporadic cancers (S) increases. Consequently, it is not possible to answer the societal debates concerning the risk associated to low doses exposure, such as the risk for patients during medical diagnosis by imagery technics in the "head and neck" area especially for children, following Chernobyl and Fukushima accidents fallout, and following contamination after the atmospheric nuclear tests in French Polynesia. To answer the questioning about the risk of low doses IR on human thyroid, a better knowledge of the exposure according to doses and dose rates is necessary. Thyroid carcinogenesis presents specificities among species. Indeed, in mice, S or R thyroid cancers incidence is low, and the few R tumors developing are mainly follicular cancers whereas there are mainly papillary cancers in humans (S and R).

In order to analyze the normal human thyroid tissue response to IR, we have developed several approaches using biopsies of non-pathological tissues from patients who have undergone thyroidectomy: primary thyrocytes cultures, in vitro 3D models (thyrospheres and organotypic cultures) and xenografts in mice.

For 3D models, maintenance of polarity, cell differentiation, tissue complexity and physiological activity of the cultures were controlled. We obtained thyrospheres (6 donors) organized in follicles delimiting a lumen composed of thyroglobulin. We used the matrigel-based protocol described by Toda et al. (2002) for organotypic cultures of porcine tissue, and showed a hypoxic stress in the human tissue (7 donors). An optimal oxygenation of the tissue was obtained by air-liquid interface culture (3 donors). In ALI organotypic cultures, a secretion of free thyroid hormone T4 was observed (1 donor, at 1 week), and this protocol allowed the tissue maintenance over 4 weeks. Mouse xenografts permitted human tissue maintenance over a period of at least one year, we already succeed in maintaining the thyroid tissue over 5 weeks in SCID/beige mice (3 donors).

In parallel, we compared the proliferation, the survival and the kinetics of DNA strand breaks induction/repair after exposure of thyrocytes from patients exposed (radiotherapy) during childhood (2 donors) or unexposed (3 donors), in primary cultures. We reproducibly observed that exposed thyrocytes are more radioresistant than unexposed thyrocytes. These results strongly suggest the existence of a long-term phenotypic signature of exposure to IR in normal thyroid tissue, consistent with the identification of molecular signatures discriminating exposed and unexposed normal thyroid tissue by C Ory and N Ugolin in the laboratory. As suggested by C Dupuy's team, this imprinting could be due to the development of a chronic oxidative stress following IR exposure in the thyroid. The models developed during this thesis will be essential to understand low and high doses IR effects and risks on the human thyroid. They will also be useful to assess the effects of endocrine disruptors (ED) on human thyroid, alone or in cocktail and estimate if this ED exposure may modify the radiosensitivity of the thyroid. These models will be used to analyse the first steps on radiation-induced thyroid carcinogenesis as well as the origin of this persistent long-term exposure imprinting.