



HAL
open science

Rôle de la NADPH oxydase 4 (NOX4) dans la dédifférenciation des cellules tumorales thyroïdiennes porteuses de la mutation BRAFV600E

Mickaëlle Radom

► **To cite this version:**

Mickaëlle Radom. Rôle de la NADPH oxydase 4 (NOX4) dans la dédifférenciation des cellules tumorales thyroïdiennes porteuses de la mutation BRAFV600E. Cancer. Université Paris-Saclay, 2024. Français. NNT : 2024UPASL012 . tel-04552540

HAL Id: tel-04552540

<https://theses.hal.science/tel-04552540v1>

Submitted on 19 Apr 2024

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.

Rôle de la NADPH oxydase 4 (NOX4)
dans la dédifférenciation des cellules
tumoraux thyroïdiennes porteuses de la
mutation BRAFV600E

*Role of NADPH oxidase 4 (NOX4) in the dedifferentiation of thyroid
tumor cells harboring BRAFV600E mutation*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

Ecole doctorale n°568 Signalisations et Réseaux Intégratifs en
Biologie (BIOSIGNE)

Spécialité de doctorat : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie
Graduate School: Life Sciences and Health. Référent: Faculté de médecine

Thèse préparée dans l'unité de recherche **Intégrité du Génome et Cancers**
(Université Paris Saclay, Institut Gustave Roussy) sous la direction de
Corinne DUPUY (DR-CNRS)

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 27 février 2024, par
Mickaëlle RADOM

Composition du Jury
Membres du jury avec voix délibérative

Anna CAMPALANS
DR – UMRE008 (SGCSR) CEA
Pierre-Antoine DE FOSSE Z
DR – UMR 7216-CNRS

Présidente

Jamel EL-BENNA
DR – Inserm U1149-CNRS ERL 8252, CRI

Rapporteur et Examineur

Livia LAMARTINA
MD-PhD – Institut Gustave Roussy

Rapporteur et Examineur

Examinatrice

Titre : Rôle de la NADPH oxydase 4 (NOX4) dans la dédifférenciation des cellules tumorales thyroïdiennes porteuses de la mutation BRAF^{V600E}

Mots clés : cancer papillaire de la thyroïde, mutation BRAF^{V600E}, NADPH oxydase 4, re-différenciation, radiothérapie métabolique à l'iode 131, épigénétique.

Résumé : La radiothérapie métabolique à l'iode 131 (RMI) constitue le traitement principal des cancers différenciés de la thyroïde (CDT). Cette thérapie métabolique est basée sur l'expression à la membrane basale des cellules thyroïdiennes, du transporteur de l'iode (NIS) codé par le gène SLC5A5. La mutation driver BRAF^{V600E} est présente dans 40 à 60% des CDTs. Les cancers papillaires de la thyroïde (CPTs) localement avancés et métastatiques arborant cette mutation sont de faible pronostic. BRAF^{V600E} est un puissant activateur de la signalisation MAPK conduisant à un processus de dé-différenciation associé à la répression du gène SLC5A5 et à la résistance à la RMI. La captation de l'iode constitue un challenge majeur pour le traitement des patients. Une nouvelle approche thérapeutique consiste en une stratégie de re-différenciation des cellules thyroïdiennes. Nos études précédentes ont montré que BRAF^{V600E} contrôle l'expression de la NADPH oxydase (NOX4) et que les ROS générées par cette dernière répriment le gène SLC5A5. L'inhibition de NOX4 ré-induit l'expression du NIS et cette réversibilité suggère une contribution à un mécanisme épigénétique.

L'objectif de la thèse était de déterminer les événements moléculaires et mécanistiques induits par NOX4 qui contribuent à la répression des gènes impliqués dans la différenciation thyroïdienne et dans l'efficacité de la radiothérapie métabolique.

Nos résultats montrent que NOX4 génère des dommages oxydatifs à l'ADN, lesquels favorisent la rétention d'acteurs épigénétiques tels que les DNMTs via une interaction avec les protéines de réparation de l'ADN, perturbant ainsi la fixation à l'ADN des facteurs de transcription de la différenciation thyroïdienne PAX8 et NKX2.1, et empêchant la transcription de gènes de manière prolongée. Nous démontrons aussi un effet des inhibiteurs de BRAF/MEK utilisés en clinique sur le mécanisme épigénétique dépendant de NOX4 et un intérêt clinique de l'inhibition de cette dernière conjointement à l'inhibition de BRAF/MEK dans la réexpression des gènes de la différenciation thyroïdienne.

Title: Role of NADPH oxidase 4 (NOX4) in the dedifferentiation of thyroid tumor cells harboring BRAF^{V600E} mutation

Key words: papillary thyroid cancer, BRAF^{V600E} mutation, NADPH oxidase 4 (NOX4), redifferentiation, radioiodine therapy, epigenetic.

Resume: The radioiodine therapy (RAI) constitutes the main treatment for differentiated thyroid cancer (DTC). This metabolic radiotherapy is based on the expression at thyroid cell basal membrane of the iodine transporter (NIS) encoded by *SLC5A5* gene. BRAF^{V600E} oncogene driver mutation is present in 40 to 60% of DTC. Locally advanced and metastatic papillary thyroid cancer (PTC) harboring BRAF^{V600E} mutation have poor prognosis. BRAF^{V600E} oncogene is a strong activator of MAPK signaling leading to a dedifferentiation process, which is associated with *SLC5A5* gene repression and radioiodine therapy refractoriness. The RAI uptake constitutes a major challenge for treatment of patients and in this sense a new therapeutic approach consists of thyroid cell redifferentiation strategy. Our previous studies showed that BRAF^{V600E} controls the NADPH oxidase (NOX4) expression and NOX4-derived ROS repress *SLC5A5* gene. NOX4 inhibition reinduces NIS expression and the reversibility suggests a contribution to an epigenetic mechanism.

The objective of the thesis was to determine the molecular and mechanistic events induced by NOX4-derived ROS that contribute to the repression of genes involved in differentiation process and in the efficiency of metabolic radiotherapy.

Our results showed that NOX4 generates specific oxidative damage to DNA, which promotes the retention of epigenetic actors such as DNMTs through interaction with DNA repair proteins, thereby disrupting the DNA binding of thyroid differentiation transcription factors, PAX8 and NKX2.1, and preventing gene transcription for prolonged periods. We also demonstrated an effect of BRAF/MEK inhibitors used clinically in NOX4-dependant epigenetic mechanism and a clinical interest of NOX4 inhibition in addition to BRAF/MEK inhibition in thyroid differentiation gene reinduction.

A ma très chère mère

Remerciements

Je souhaiterais tout d'abord adresser mes sincères remerciements aux différents membres ayant accepté de faire partie de ce jury de thèse : Dr Pierre-Antoine DEFOSSEZ, Dr Jamel EL BENNA, Dr Livia LAMARTINA, Dr Anna CAMPALANS et Dr Corinne DUPUY. Merci pour votre disponibilité, merci pour la lecture de ce manuscrit et pour les conseils et remarques avisés qui, j'en suis sûre, me permettront d'optimiser mes connaissances pour la suite de mon parcours professionnel.

Un immense Merci, à ma directrice de thèse, le Dr Corinne DUPUY, pour tout son soutien, ces connaissances apportées, sa gentillesse, sa disponibilité et sa bienveillance à mon égard. Son parcours professionnel, ses connaissances et idées dans le domaine de la science m'ont communiqué cette appétence pour la découverte scientifique et ont contribué à la réalisation de ce travail innovant dans le domaine de la cancérologie thyroïdienne. Encore merci !

Un remerciement chaleureux aux docteurs My-Chan DANG et Sophie DUPRE-CROCHET pour avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse. Vos conseils et encouragements ont été précieux dans la réalisation de ce travail.

Un grand merci au Dr Camille BUFFET pour sa contribution à l'initiation de ce travail, pour ses conseils et appréciations. Merci pour l'invitation à la journée du Groupe de Recherche Thyroïde GRT, le 16/03/2023.

Les travaux de thèse ont été effectués dans l'UMR9019 - Genetic stability and Oncogenesis sous la direction du Dr Patricia KANNOUCHE. Je tiens ici à lui témoigner ma gratitude, pour ses conseils qui m'ont permis d'approfondir mes travaux de thèse et à tous les membres de cette unité qui m'ont apporté un support scientifique et/ou technique dans l'accomplissement de cette œuvre.

A la team « Fantastic 6 » ; Marylin, Salma, Caroline, Thania et Mira. A nos expérimentations, discussions et réflexions scientifiques qui ont contribué à l'avancement de ce projet. A nos 'Lab night', à nos divers échanges et encouragements qui ont aussi rendu ces années de travail plus agréables. Dans le même registre, je remercie aussi Raphaël pour m'avoir apporté plusieurs connaissances techniques, ainsi que sa sympathie.

A la fondation pour la recherche médicale (FRM) qui par leur soutien financier durant la quatrième année de thèse, a contribué à la finalisation de ce projet.

A ma mère, son amour et son soutien indéfectible dans toutes mes décisions, à mon père et mon frère qui m'ont aussi soutenu et encouragé tout au long de ce parcours scientifique.

Enfin, il n'existe aucun mot pour qualifier ma reconnaissance envers toi, DIEU sans qui rien n'aurait été possible.

Sommaire

Abstract	2
Dédicace	4
Remerciements	5
Abbreviations	9
Figures de l'introduction	12
Article et congrès	13
Introduction	14
 <i>PARTIE I : La fonction thyroïdienne</i>	
1) Anatomie.....	15
2) Fonction de la thyroïde : synthèse des hormones thyroïdiennes (HTs).....	15
2.a) Contrôle de la synthèse des HTs : boucle de rétrocontrôle négatif.....	16
2.b) Autre hormone produite par la thyroïde : la calcitonine.....	17
3) Histologie/Cytologie de la thyroïde.....	18
4) Métabolisme de l'iode et synthèse des HTs.....	20
5) Marqueurs de différenciation : protéines nécessaires à la synthèse des HTs.....	20
5.a) NIS (Na ⁺ /I ⁻ symport) : indispensable au transport de l'iode.....	20
5.a.1) Régulation de l'expression du NIS.....	22
- Régulation par la TSH.....	22
- Régulation par l'iode.....	23
- Régulation par l'oestradiol.....	24
- Régulation par les cytokines et facteurs de croissance.....	24
5.b) Organification de l'iode et biosynthèse des HTs : rôle de la TPO (Thyroperoxydase)/système générateur de peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂) et de la Tg (Thyroglobuline).....	25
5.b.1) Thyroglobuline (Tg) : précurseur des HTs.....	25
5.b.2) Thyroperoxydase (TPO) : enzyme responsable de la synthèse des HTs...27	
6) Réaction d'organification de l'iode.....	28
7) Systèmes générateurs de H ₂ O ₂ : DUOX1/2.....	29
8) Endocytose, clivage protéolytique de la Tg et relargage des HTs.....	32
9) Contrôle de la synthèse des HTs par la TSH.....	34
9.a) Transduction du signal.....	35
- Signalisation TSH/TSHR/AC/AMPC/PKA.....	36
- Signalisation TSH/TSHR/PLC- Ca ²⁺ -PKC.....	36
8.b) Régulation transcriptionnelle de la fonction thyroïde : rôle des facteurs de transcription FOXE1, PAX8, NKX2.1.....	38

PARTIE II : La carcinogenèse thyroïdienne

1) Epidémiologie.....	44
2) Facteurs de risque.....	44
2.a) Rayonnements ionisants.....	45
2.b) Carence en iode.....	45
2.c) Facteurs héréditaires.....	46
2.d) Autres.....	46
3) Traitements conventionnels.....	47
3.a) Chirurgie.....	47
3.b) Radiothérapie métabolique à l'iode 131 (RMI).....	47
3.b.1) Aspects cliniques et rôle fondamental du NIS.....	48
3.c) Radiothérapie externe.....	51
3.d) Chimiothérapie cytotoxique.....	51
3.e) Thérapies ciblées.....	51
3.e.1) Immunothérapie et thérapies anti-angiogéniques.....	52
4) Types histologiques de cancers thyroïdiens (CT) et altérations génétiques.....	52
4.a) Cancer médullaire de la thyroïde (CMT).....	55
4.b) Cancers différenciés de la thyroïde ou cancers non médullaires.....	56
4.b.1) Carcinome folliculaire de la thyroïde (CFT).....	56
4.b.2) Carcinome papillaire de la thyroïde (CPT).....	58
- Mutation de l'oncogène BRAF ^{V600E} et conséquences.....	60
1) Dédifférenciation.....	63
2) Potentialisation de la sécrétion de TGF- β et signalisation...	65
4.b.3) Carcinome oncocytique de la thyroïde (COT).....	67
4.c) Carcinome anaplasique de la thyroïde (CAT).....	68
5) Nouvelle stratégie thérapeutique « Re-différenciation ».....	69

Partie III : Mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance thérapeutique et le processus de dédifférenciation

1) Stress oxydatif et CT.....	73
1.a) Espèces réactives de l'oxygène.....	73
1.b) Systèmes antioxydants.....	75
1.c) Stress oxydant et processus de dédifférenciation.....	77
1.c.1) Famille des NADPH oxydase (NOXs).....	78
1.c.2) Implication de NOX4.....	82
2) Dommages oxydatifs à l'ADN et mécanismes de réparation.....	84
a) BER (Base excision repair).....	84
b) MMR (Mismatch repair).....	86
3) Mécanismes épigénétiques et processus de dédifférenciation : lien avec le stress oxydatif.....	89
a) Acétylation/Méthylation des histones et cancers.....	90

b) Méthylation de l'ADN et cancers.....	91
c) Autres.....	94
Objectifs de la thèse.....	96
Résultats.....	97
Article 1.....	100
Données supplémentaires.....	146
Discussion et Perspectives.....	159
Bibliographie.....	168
Annexe.....	194
Article 2.....	195

Abbréviations

HT :	hormone thyroïdienne
T4 :	thyroxine
T3 :	triiodothyronine
TSH/TSHR :	Thyroid-Stimulating Hormone/récepteur de la TSH
FSH :	Hormone Folliculo-Stimulante
LH :	Hormone Lutéinisante
HCG :	Hormone Chorionique Gonadotrope
TRH :	Thyreotropin Releasing Hormone
NIS :	Na ⁺ /I ⁻ symporteur
MMI :	méthimazole
TPO :	thyroperoxydase
TNF-α/β :	Tumor necrosis factor- α/β
IFN-γ :	Interferon- γ
IL-1$\alpha/1\beta/6$:	Interleukine-1 $\alpha/1\beta/6$
TGF-β1 :	Transforming growth factor- β 1
PAX8 :	Paired box gene 8
Tg :	Thyroglobuline
IGF-1 :	Insulin-like Growth Factor-1
NADPH :	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
DUOX1/2 :	Dual oxydase 1/2
NOX :	NADPH Oxydase
ROS :	Espèces réactives de l'oxygène
EFP1 :	EF-hand binding protein 1
AMPc :	Adénosine monophosphate cyclique
MIT :	mono-iodotyrosines
DIT :	di-iodotyrosines
DIO1/2 :	5'-iodothyronine désiodinase de type 1 ou 2
DEHAL1 :	iodotyrosine déshalogénase 1
IYD-1:	Iodotyrosine deiodinase 1
MCT8 :	Monocarboxylate transporter 8
RCPG :	récepteur couplé aux protéines
GRK :	G protein-coupled receptor kinase
RGS :	Regulator of G protein signaling
AC :	adénylate cyclase
CREB :	cAMP-response element (CRE) binding protein
CRE :	AMPc-réponse élément
PLC :	phospholipase C
PIP2 :	phosphatidylinositol,4,5-bisphosphate
IP3 :	inositol 1,4,5-triphosphate
DAG :	diacylglycerol
MAPK :	Mitogen-activated protein kinase
NKX2.1 :	NK2 homeobox 1

TTF-1 :	Thyroid transcription factor 1
FOXE1 :	forhead-domain protein E1
NKX2.5 :	NK2 homeobox 5
HHEX :	Hematopoietically Expressed Homeobox
TTF-2 :	Thyroid transcription factor 2
PI3K :	phosphoinositide 3-kinase
IARC :	International Agency for Research on Cancer
CT :	cancer thyroïdien
PTEN :	Phosphatase and TENsin homolog
RI :	rayonnements ionisants
CMT :	cancer médullaire de la thyroïde
CNMT :	cancer non-médullaire de la thyroïde
RMI :	Radiothérapie métabolique à l'iode radioactif 131
TEM :	transition épithélio-mésenchymateuse
TME :	transition mésenchymo-épithéliale
NF-κB :	nuclear factor-kappa B
EGF :	epidermal growth factor
FGF :	fibroblast growth factor
HGF :	hepatocyte growth factor
PDGF :	platelet-derived growth factor
RET :	rearranged during transfection
GDNF :	glial cell line-derived neurotrophic factor
CFT :	cancer folliculaire de la thyroïde
PKB :	protéine kinase B
PPARγ :	Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma
CPT :	Carcinome papillaire de la thyroïde
CCD6 :	Coiled-coil domain-containing protein 6
CAT :	cancer anaplasique de la thyroïde
RTK :	récepteur tyrosine kinase
RC :	régions conservées
MEK :	Mitogen-activated Extracellular signal-regulated Kinase
ERK :	Extra-cellular signal-Regulated Kinase
PP2A :	protéine phosphatase 2
PPIase :	peptidyl-prolyl cis/trans isomerase
DUSP :	Dual Specificity Phosphatase
TCGA :	The Cancer Genome Atlas
MEC :	matrice extracellulaire
MMP :	matrix métalloprotéinase
TGF-βR :	récepteur du TGF- β
SMAD :	Sma-mothers against decapentaplegic
Smurfl ou 2 :	Smad ubiquitination regulatory factor 1 or 2
RhoA :	Ras homolog family member A
CDC42 :	cell division control protein 42
COT :	cancer oncocytaire de la thyroïde

TERT :	Telomerase Reverse Transcriptase
FDA :	Food and Drug Administration
APE/Ref1 :	apurinic apyrimidinic endonuclease/redox factor 1
SOD :	superoxyde dismutase
CAT :	catalase
GTPx :	glutathion peroxydase
GSR :	glutathion reductase
GST :	glutathion transférase
TRX :	thioredoxine
PRX :	peroxiredoxine
Glutathion :	γ -L-Glutamyl-L-cystéinylglycine
NAC :	N-acétylcystéine
HOCl :	acide hypochlorique
FAD :	Flavine adénine dinucléotide
Poldip2 :	Polymerase delta-interacting protein 2
Nrf2 :	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
NOXO1/A1 :	NOX organizer 1 / NOX activator 1
8-oxoG :	8-oxo-7,8-dihydroguanine
CpG :	déoxycytidine phosphate déoxyguanosine
BER :	Base excision repair
OGG1 :	8-oxoguanine DNA glycosylase-1
APE1 :	AP-endonuclease 1
PCNA :	proliférating cell nuclear antigen
FEN1 :	Flap-endonucléase 1
LigI/III :	ligase 1/III
XRCC1 :	X-ray repair cross-complementing protein 1
NER :	réparation par excision de nucléotides
MMR :	Mismatch repair
KMT :	histones lysine méthyltransférases
PRMT :	protéine arginine méthyltransférase
HAT :	histone acétyltransférase
HDAC :	histone désacétyltransférase
DNMT :	DNA méthyltransférase
TET :	Ten-eleven-translocation
UHRF1 :	Ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains 1
SWI/SNF :	switch/sucrose-non-fermenting
ISWI :	imitation switch
NuRD :	nucleosome remodeling deacetylase
CHD :	chromodomain-helicase-DNA binding
INO80 :	inositol requiring 80

Figures de l'introduction

Figure 1 : Anatomie de la thyroïde.....	15
Figure 2 : Mécanisme d'action des hormones thyroïdiennes.....	16
Figure 3 : Mécanisme de rétrocontrôle négatif de la synthèse des hormones thyroïdiennes...	17
Figure 4 : Représentation tridimensionnelle du follicule thyroïdien (gauche) et schéma d'une coupe histologique de la thyroïde (droite).....	18
Figure 5 : Variation de morphologie des cellules folliculaires selon leur état d'activation....	19
Figure 6 : Structure du NIS (Na ⁺ /I ⁻ symporteur).....	21
Figure 7 : Illustration de l'effet Wolff-Chaikoff.....	23
Figure 8 : Etapes de la synthèse hormonale thyroïdienne (T3 et T4).....	29
Figure 9 : Structure des Dual oxydases ½.....	30
Figure 10 : Signalisation TSH/TSHR dans les cellules folliculaires.....	37
Figure 11 : Contrôle transcriptionnel des gènes de la différenciation par les facteurs de transcription PAX8/NKX2.1/FOXE1.....	42
Figure 12 : Représentation schématique de la biosynthèse et du relargage des HTs, acteurs impliqués.....	43
Figure 13 : Estimation du nombre de nouveaux cas de cancers dans le monde en 2020, sexe et âge confondus.....	44
Figure 14 : Diagnostic des maladies de la thyroïde.....	48
Figure 15 : Les différentes cibles des thérapies ciblées.....	51
Figure 16 : Transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et processus inverse transition mésenchymo-épithéliale (TME).....	54
Figure 17 : Voies de signalisation principales activées durant le processus de carcinogenèse thyroïdienne.....	59
Figure 18 : Structure de l'oncogène BRAF et mutation BRAFV600E.....	60
Figure 19 : Signalisation MAPK dans les CPTs arborant la mutation BRAF ^{V600E}	62
Figure 20 : Dédifférenciation dans les CPTs, analyse intégrative.....	64
Figure 21 : Signalisation TGF-β.....	66
Figure 22 : Types histologiques de CTs et altérations génétiques.....	69
Figure 23 : Dosimétrie à l' ¹²⁴ I d'un patient présentant de multiples lésions métastatiques.....	70
Figure 24 : Tableau récapitulatif des sources exogènes et endogènes de ROS au niveau cellulaire.....	74
Figure 25 : Espèces réactives de l'oxygène (ROS) et conséquences cellulaires, molécules de détoxification.....	76
Figure 26 : Structure de la région conservée des membres de la famille NADPH oxydase.....	79
Figure 27 : Famille NADPH oxydase (NOX1/2/3/4/5).....	82
Figure 28 : Base Excision Repair (BER).....	85
Figure 29 : Mismatch repair (MMR).....	87
Figure 30 : Mécanismes épigénétiques et régulation transcriptionnelle.....	94

Article et congrès

Article 1 (en cours de soumission)

NOX4-derived oxidative DNA damage prevent the recruitment of the transcription factors PAX8 and NKX2.1 to chromatin in BRAF-mutated thyroid cancer cells.

Mickaëlle Radom¹, Camille Buffet², Juliana Cazarin^{1, 3}, Marylin Harinquet¹, Caroline Coelho deFaria¹, Eric Baudin⁴, Julien Hadoux^{1, 4}, Abir Al Ghuzlan^{1, 5}, Mohamed-Amine Bani⁵, Sophie Leboulleux⁴, Livia Lamartina⁴ and Corinne Dupuy^{1}*

Authors' Affiliations

¹ UMR 9019 CNRS, Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, 94805 Villejuif, France ; ² Sorbonne Université, Unité Thyroïde-Tumeurs endocrine, Groupe de Recherche Clinique n°16 Tumeurs Thyroïdiennes, AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France ; ³ Department of Biomedical Genetics, University of Rochester School of Medicine and Dentistry, Rochester, NY, 14620, USA; ⁴ Cancer Medicine Department, Gustave Roussy, Université Paris Saclay, 94805 Villejuif, France; ⁵ Cancer Medical Pathology and Biology Department, Institute Gustave Roussy, 94805 Villejuif, France.

Article 2 (en préparation)

The NADPH oxidase NOX4 is involved in the oxidative DNA damage-induced increase in affinity of CHD4 for chromatin in BRAF-mutated thyroid cancer cells.

Salma Fenniche^{1,2,3,4}, Marylin Harinquet^{1,2,3}, Mickaëlle Radom^{1,2,3}, Caroline Coelho de Faria^{1,2,3}, Mira Saleh^{1,2,3}, Abir Al Ghuzlan^{1,2,3,5}, Mohamed-Amine Bani⁵, Livia Lamartina⁶, Rabii Ameziane El Hassani⁴ and Corinne Dupuy^{1,2,3}*

Authors' Affiliations

¹ Université Paris-Saclay, F-91400 Orsay, France; ² UMR 9019 CNRS F-94805 Villejuif, France; ³ Gustave Roussy, F-94805 Villejuif, France; ⁴ Laboratoire de Biologie des Pathologies Humaines "BioPatH", Université Mohammed V de Rabat, Faculté des Sciences, BP1014 Rabat, 10001, Morocco; ⁵ Cancer Medical Pathology and Biology Department, Gustave Roussy, F-94805 Villejuif, France; ⁶ Cancer Medicine Department, Gustave Roussy, F-94805 Villejuif, France.

Communication orale

- **Congrès national:** Club oxydase 11-13 octobre 2021 (Article 1)
- **Congrès international :** 44th annual meeting of the European thyroid Association (Bruxelles) 10-13 septembre 2022 (Article 1)
- **Congrès national :** Groupe Recherche Thyroïde 16 mars 2023 (Article 1)

Communication affichée

- **Congrès national:** Club oxydase 11-13 octobre 2021 (Article 1)
- **GDR NOXROS :** 3ème réunion plénière 23-25 novembre 2022 (Article 1)

Introduction bibliographique



Partie I : La fonction thyroïdienne

1) Anatomie

La glande thyroïdienne est située à la base du cou, sous le larynx et en avant de la trachée. Elle se compose de deux lobes en position verticale, réunis entre eux par un segment horizontal appelé isthme thyroïdien (*Figure 1*). Par sa fonction endocrine la thyroïde est un tissu hautement vascularisé.

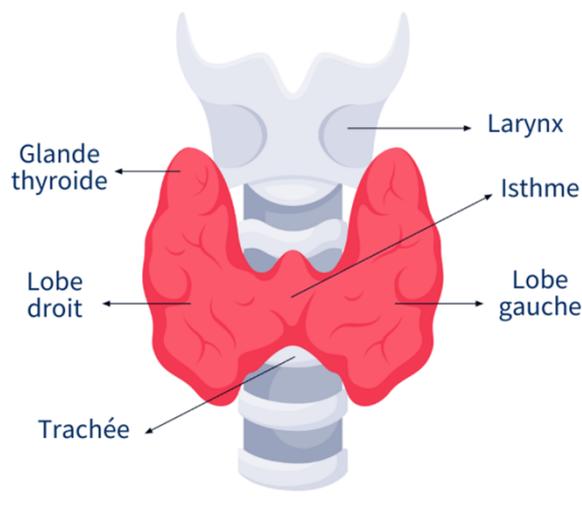


Figure 1 : Anatomie de la thyroïde
 Localisation et représentation schématique de l'organe thyroïdien (vue antérieure)
 Image : ELSAN Institut privé de radiothérapie de Metz

2) Fonction de la thyroïde : synthèse des hormones thyroïdiennes (HTs)

La thyroïde est une glande endocrine qui a pour unique fonction la sécrétion des HTs, ces dernières intervenant dans divers processus cellulaires et physiologiques. Parmi les processus cellulaires, il y a la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire ainsi que, la consommation d'oxygène, le métabolisme énergétique, la régulation calcique et, la modulation du cytosquelette. Parmi les processus physiologiques, se trouvent la régulation du système cardio-vasculaire et le développement des tissus.

La thyroïde est non seulement un organe assurant la synthèse des HTs mais aussi leur stockage. Les HTs sont au nombre de 3, à-savoir la thyroxine (T4), la triiodothyronine (T3) et la calcitonine, avec des cibles au niveau de plusieurs organes. La concentration sanguine de ces hormones chez l'homme varie selon de nombreux paramètres, parmi lesquels, l'âge.

Dans le cas des hormones T4 et T3, leurs concentrations sanguines, selon les données du guide pratique des analyses médicales (*Pascal Dieusaert, 2015*), fluctuent respectivement entre 8,6-25 pmol/L et 3,8-8,4 pmol/L. La transduction du signal se fait via des récepteurs nucléaires qui régulent l'expression de gènes impliqués dans les divers processus énoncés précédemment (*Figure 2*). Il est à noter, qu'il existe aussi des effets non génomiques des HTs avec une transduction de signal via des récepteurs membranaires, sur ce point les mécanismes restent encore à approfondir [1].

Le rôle de ces hormones a été initialement mis en évidence par diverses études portant sur des retards développementaux causés par un défaut dans la sécrétion des HTs tels que l'hypo ou l'hyperthyroïdie [2]. Le cancer de la thyroïde, selon l'atteinte et le type histologique, lui aussi, peut entraîner un dysfonctionnement de l'organe. Il est dans ce cas nécessaire chez certains patients ayant subi une thyroïdectomie totale ou résection totale de la thyroïde, d'apporter une supplémentation hormonale étant donné l'importance des HTs dans les processus physiologiques.

2.a) Contrôle de la synthèse des HTs : boucle de rétrocontrôle négatif

La sécrétion des hormones thyroïdiennes T3 et T4 est contrôlée par l'action d'une hormone sécrétée par l'hypophyse, la TSH (Thyroid-Stimulating Hormone).

La TSH ou Thyréostimuline ou encore Thyréotropine est une glycoprotéine de 30 kDa sécrétée par l'adénohypophyse. Elle a pour principale cible la thyroïde et a pour but, la stimulation des cellules thyroïdiennes afin d'initier la synthèse des HTs. En outre, elle permet aussi la croissance et le développement de la glande thyroïdienne, ainsi que le maintien d'un phénotype

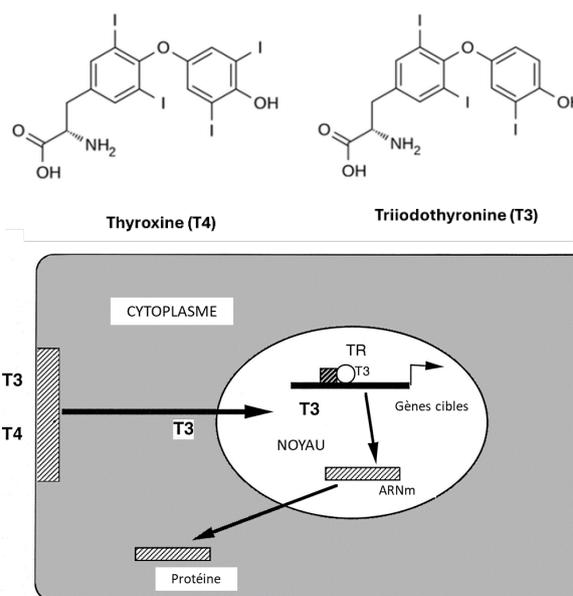


Figure 2 : Structure chimique des hormones thyroïdiennes T3 et T4 et mécanisme d'action [2]

différencié. Son activité mitogène est souvent associée à celle d'autres facteurs de croissance en présence.

Elle est formée de deux sous-unités, une sous-unité alpha commune avec d'autres hormones hypophysaires comme la FSH (Hormone Folliculo-Stimulante), LH (Hormone Lutéinisante) ou HCG (Hormone Chorionique Gonadotrope) et une sous-unité bêta apportant la spécificité de la thyroestimuline. Ces 2 sous-unités sont codées par 2 gènes localisés différemment au niveau chromosomique [3, 4].

La TSH régulant l'expression de plusieurs marqueurs de différenciation thyroïdienne et stimulant la sécrétion des hormones thyroïdiennes, son expression est alors finement contrôlée. La thyroestimuline est sous le contrôle d'une autre hormone, la TRH (Thyreotropin Releasing Hormone) ou Thyroéolibérine produite par les cellules de l'hypothalamus. La TRH est un neuromodulateur, synthétisée sous forme d'un tripeptide, elle subit une série de clivage permettant l'obtention de sa forme mature. La TRH tout comme la TSH sont régulées à leur tour par le produit dont elles contrôlent la sécrétion à savoir les HTs (*Figure 3*), il s'agit d'une boucle de rétrocontrôle négatif.

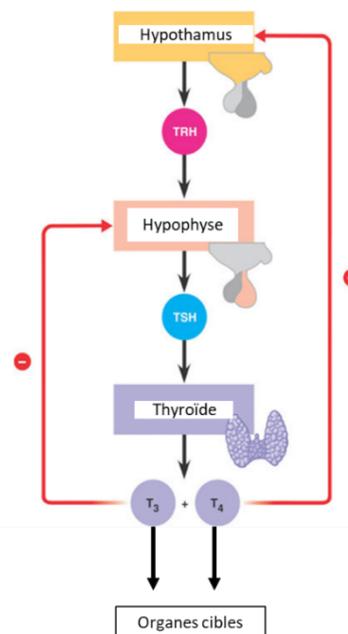


Figure 3 : Mécanisme de rétrocontrôle négatif de la synthèse des hormones thyroïdiennes

Source : <https://almaconsult-paris.com/wp-content/uploads/2017/08/Thyroid-Feedback-and-TSH.png>

2.b) Autre hormone produite par la thyroïde : la calcitonine

La calcitonine est une hormone peptidique produite par un autre type de cellules thyroïdiennes différentes de celles produisant les HTs : les cellules C. Sa fonction est aujourd'hui assez bien connue. En effet, elle est principalement considérée comme une hormone hypocalcémisante et hypophosphorémisante. Elle contribue à l'homéostasie du calcium avec pour action la diminution de la concentration plasmatique en calcium. Sa régulation est aussi différente de celle des autres HTs puisqu'elle est produite à la suite d'une élévation du taux de calcium

plasmatique. D'autres fonctions de la calcitonine restent à étayer selon les conditions physiologiques ou pathologiques [5-10].

3) Histologie/Cytologie de la thyroïde

Du point de vue histologique, la thyroïde est organisée en de multiples unités fonctionnelles, les « follicules thyroïdiens ». Ces derniers conditionnent la synthèse des HTs. Les follicules thyroïdiens sont composés d'une monocouche de cellules épithéliales nommées « cellules folliculaires ou thyrocytes/thyrocytes ». Ces cellules folliculaires sont agencées de manière à délimiter une cavité contenant une substance amorphe, jaunâtre et composée à 70% de glycoprotéines. Cette cavité appelée « colloïde » est le siège de la synthèse des HTs, thyroxine (T4) et triiodothyronine (T3).

Dans cet épithélium glandulaire thyroïdien, on retrouve également les cellules parafolliculaires ou cellules C. Ces dernières, en proportion moindre, environ 0,1% par rapport aux thyrocytes, sont au contact de la lame basale mais sans lien avec la cavité colloïdale.

Le pôle apical des cellules folliculaires présente des microvillosités et est en contact avec la colloïde tandis que le pôle basal à l'opposé est en contact avec la circulation sanguine.

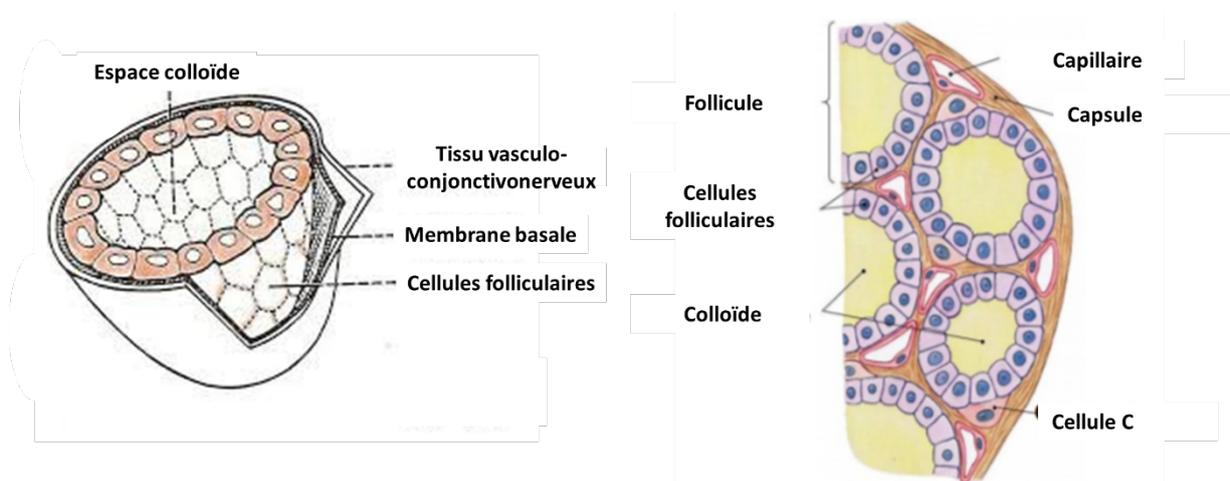


Figure 4 : Représentation tridimensionnelle du follicule thyroïdien (gauche) et Schéma d'une coupe histologique de la thyroïde (droite)

Source : http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/102/Chapitre_45.html#ref-Chap45-bib2 et <https://slideplayer.fr/slide/3274674/>

Entre les follicules, on retrouve d'autres types cellulaires baignant dans un tissu vasculo-conjonctif ou stroma, parmi lesquels, les fibroblastes constituant principalement le stroma, les cellules endothéliales formant le lit vasculaire, les cellules du système immunitaire entre autres (Figure 4).

Une variation morphologique des cellules folliculaires et donc des follicules thyroïdiens est observée selon leur degré d'activité. En effet, lorsque les thyrocytes sont actifs, c'est-à-dire, stimulés notamment par l'axe hypothalamo-hypophysaire hormonal avec pour but l'activation de la sécrétion des hormones thyroïdiennes, elles deviennent cylindriques et augmentent de volume afin de permettre le développement des organites responsable de la synthèse protéique.

Conjointement, une diminution du volume de la cavité colloïdale est souvent observée, corrélée avec une apparition de vacuoles de résorption au niveau apical. A l'inverse, lorsque les cellules folliculaires sont peu stimulées et donc hypo-actives, on constate un aplatissement ou réduction de la taille cellulaire, une diminution du nombre d'organites et en parallèle une augmentation du volume colloïdal (Figure 5).

La synthèse des HTs est dépendante de la polarité des cellules qui conditionne l'adressage de protéines membranaires spécifiques.

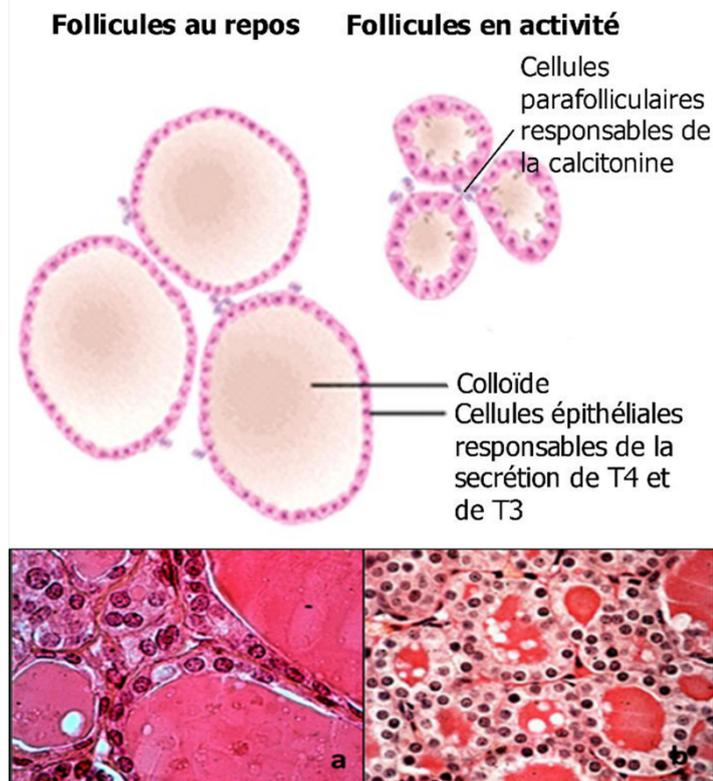


Figure 5 : Variation de morphologie des cellules folliculaires selon leur état d'activation

(a) (b) Coupe histologique et représentation schématique des cellules folliculaires respectivement au repos et en activité.

Source : <http://histoblog.viabloga.com/texts/la-glande-thyroide> et <https://causam.fr/index.php/medecine-et-sante-encyclopedie/1174-glande-thyroide-anatomie-et-fonctions>

4) Métabolisme de l'iode et synthèse des HTs

La thyroïde est le seul organe du corps humain qui capte et concentre l'iode. Cet oligoélément, issu de l'alimentation, est un régulateur de la fonction thyroïdienne. Il est indispensable à la synthèse des HTs, T3 et T4. Ce sont les seules hormones de l'organisme à posséder dans leur structure moléculaire des atomes d'iode indispensables à leur fonctionnalité.

Les cellules thyroïdiennes extraient et concentrent l'iode du plasma. La cellule maintient une concentration de 20 à 50 fois supérieure à celle du plasma qui est d'environ 50 à 100 µg/L. L'iode est présent dans la thyroïde sous forme d'anion iodure I⁻. Ce dernier est couplé à la protéine précurseur des HTs puis est stocké sous cette forme dans la cavité colloïde en attente d'un stimulus (activation de la signalisation TSH) permettant la synthèse des HTs ; cette réaction est appelée organification de l'iode. Le transport de l'iode est donc un processus essentiel pour la fonction thyroïdienne, il est assuré par la protéine NIS (Natrium/Iodide ou Na⁺/I⁻ symporteur).

5) Marqueurs de différenciation : protéines nécessaires à la synthèse des HTs

5.a) NIS (Na⁺/I⁻ symporteur) : indispensable au transport de l'iode

Marqueur de différenciation d'une importance capitale et localisé au pôle basal des cellules folliculaires, le NIS est un symporteur. Il permet le transport actif des ions iodures (I⁻) couplé au sodium (Na⁺), de la circulation sanguine à la cellule folliculaire. Le NIS est une glycoprotéine codée par le gène SLC5A5. Plusieurs études ont montré que différentes mutations de ce gène étaient corrélées à des physiopathologies thyroïdiennes comme l'hypothyroïdie congénitale.

Le NIS assure le transport actif de l'iode en utilisant la translocation des ions sodiques (Na⁺) via le gradient électrochimique généré par la pompe Na⁺/K⁺ ATPase présente à la membrane des cellules folliculaires (*Figure 12*). Le fonctionnement de cette dernière implique aussi la présence de canaux K⁺ voltage-dépendant tel que KCNQ1/KCNE2 afin d'assurer le maintien du potentiel membranaire des cellules folliculaires. L'étude des mécanismes de transport ionique au sein de cette protéine a permis de montrer l'existence d'une inhibition compétitive

de ce transporteur par certains types d'anions tels que le perchlorite (ClO_4^-), molécule aussi retrouvée dans certains polluants environnementaux [11-14]. Cette dernière est d'ailleurs commercialisée sous forme de perchlorate de sodium. En bloquant le site actif du NIS elle est essentiellement prescrite en cas d'hyperthyroïdie ou d'excès de sécrétion des HTs.

Le clonage du NIS en 1996 a permis la modélisation, la cristallisation et la caractérisation de la protéine. Ainsi, cette dernière est composée de 643 acides aminés et comporte 13 domaines transmembranaires avec l'extrémité N-terminale du côté extracellulaire et l'extrémité C-terminale du côté intracellulaire [12, 13] (Figure 6).

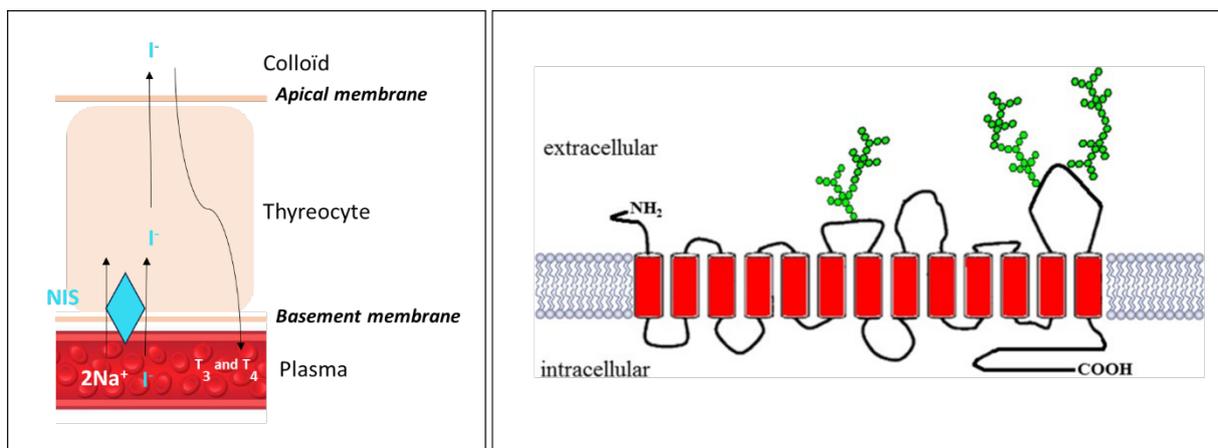


Figure 6 : Structure du NIS (Na^+/I^- symporteur) [419]

(a) Localisation du NIS au pôle basal des cellules folliculaires, symport de 2Na^+ et I^- . (b) Structure du NIS avec 13 domaines transmembranaires. En vert : sites de glycosylations.

Synthétisée dans le réticulum endoplasmique (RE), elle subit une maturation comprenant une série de phosphorylations et glycosylations et présente un poids moléculaire apparent final d'environ 85 kDa. Cette maturation est nécessaire et indispensable au trafic et à la localisation membranaire basale du NIS. Concernant le lien entre la localisation du symporteur et son état d'activation, la majorité des études montrent que l'activité de cette protéine est étroitement liée à sa localisation membranaire, c'est-à-dire qu'elle est fonctionnelle uniquement à la membrane plasmique.

Quelques mutations ont été identifiées, elles entraînent pour la majorité une diminution de l'activité du NIS en raison d'une rétention intracellulaire ou d'une protéine non fonctionnelle avec une incapacité pour la thyroïde de fixer l'iode [11,15].

Le transporteur de l'iode est exprimé dans d'autres tissus autres que la thyroïde avec une expression entre autres dans les glandes salivaires, la muqueuse gastrique, la glande mammaire

uniquement lors de la lactation, le placenta et les reins avec toutefois des fonctions qui restent à être élucidées.

Dans les glandes salivaires, la présence du NIS aurait deux fonctions ; elle contribuerait premièrement à recycler les ions iodures des composés iodés des tissus périphériques afin de les réintroduire par la salive et deuxièmement à participer à la défense antimicrobienne/antibactérienne en fournissant l'ion iodure, substrat de certaines enzymes du système immunitaire. Dans la muqueuse gastrique, le transporteur de l'iode serait nécessaire à l'absorption des ions iodures issus de l'alimentation et à l'inverse à leur excrétion par les reins. L'ARN messager du NIS a été détecté dans plusieurs autres tissus extra-thyroïdiens comme les ovaires, l'utérus, le côlon, les poumons et bien d'autres mais la présence et la fonction de la protéine dans ces tissus n'ont pas encore été caractérisées [16,17]. Les mécanismes contrôlant l'expression du NIS dans ces tissus extra-thyroïdiens restent à clarifier. Un exemple d'organe où la présence, la fonction et la régulation du NIS ont été clarifiées : la glande mammaire en période de lactation. Certaines études ont montré que la présence du symporteur dans la glande mammaire uniquement en période de gestation et lactation est nécessaire pour acheminer l'iode de la mère à l'enfant et ainsi permettre la synthèse des HTs par ce dernier. Selon d'autres travaux, effectués en particulier chez la souris, il a été montré que l'expression du NIS est contrôlée dans ce tissu par certaines hormones comme l'ocytocine, la prolactine et les œstrogènes [18-20]. Toutes ces données suggèrent que les mécanismes de régulation de l'expression du NIS sont tissus-spécifiques.

5.a.1) Régulation de l'expression du NIS

❖ *Régulation par la TSH*

Le NIS, comme d'autres gènes de différenciation est régulé positivement par la TSH de manière transcriptionnelle. De multiples études ont permis d'affirmer qu'il y a une synthèse de novo de NIS après activation de la signalisation TSH. D'autres auteurs ont montré que la demi-vie de la protéine NIS était de 5 jours en présence de TSH et 3 en son absence, confirmant ainsi l'implication de la TSH dans la stabilité du NIS. La thyroïdostimuline contrôle aussi via des modifications post-traductionnelles, et principalement par phosphorylation, la maturation, la stabilisation et la relocalisation à la membrane plasmique de vésicules de stockage contenant le NIS [13, 21-24]. A l'inverse, en absence de TSH, on observe une internalisation de ce

transporteur iodique [25]. Les mécanismes aboutissant à cette internalisation feraient intervenir les protéines de la machinerie d'endocytose avec notamment la formation de manteaux de clathrines à la suite de la reconnaissance d'un motif di-leucine. D'autres hypothèses ont été émises mais le mécanisme d'internalisation du NIS lors d'une déprivation en TSH reste encore à clarifier [11].

L'implication de la TSH dans la régulation de l'expression du NIS a été très étudiée et l'est encore. Depuis, il a été montré que d'autres facteurs intervenaient dans cette régulation.

❖ Régulation par l'iode

En effet, le principal facteur régulant l'accumulation de l'iode dans la thyroïde et donc l'activité du NIS, autre que la TSH, est l'iode lui-même puisqu'il a été montré que de fortes doses en iode diminuaient la fonction thyroïdienne et la biosynthèse des HTs. Wolff et Chaikoff [26] ont montré en 1948 que l'organification de l'iode était perturbée lorsque le niveau plasmatique et intra-thyroïdien de cet oligo-élément était élevé, cette découverte est aujourd'hui connue sous le nom de l'effet Wolff-Chaikoff (*Figure 7*). Ce mécanisme a permis d'envisager un schéma thérapeutique dans lequel une forte administration d'iode pouvait abolir les effets observés dans certaines pathologies thyroïdiennes comme l'hyperthyroïdie (sécrétion élevée des HTs).

L'effet Wolff-Chaikoff est inhibé dès lors où l'on expose les cellules thyroïdiennes au méthimazole (MMI) qui est un inhibiteur de la thyroperoxydase (TPO), enzyme responsable de l'organification de l'iode et donc de la synthèse des HTs. Ces données suggèrent que l'effet Wolff-Chaikoff est médié par des composants intracellulaires iodés [27, 28]. Parmi les composants iodés, on retrouve notamment les iodolipides qui sont connus pour avoir un effet inhibiteur sur l'adénylate cyclase, enzyme de la signalisation TSH et sur la TPO [29].

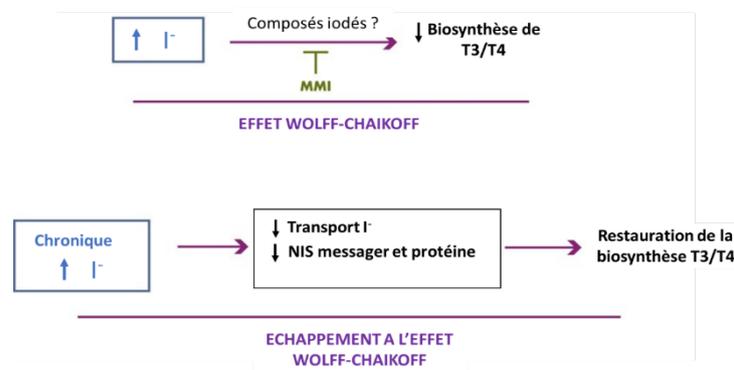


Figure 7 : Illustration de l'effet Wolff-Chaikoff

Les composés iodés sont les protéines, lipides et molécules des cellules folliculaires présentant un ou plusieurs atomes d'iode dans leur structure ; MMI : méthimazole inhibiteur de la TPO, enzyme catalysant la synthèse des HTs ; I⁻ : ion iodure

Quelques auteurs ont observé par la suite, une diminution de l'expression du NIS au niveau transcriptionnel et protéique lors d'un traitement chronique et aigu des cellules thyroïdiennes aux ions iodures en excès, ce qui pourrait en partie expliquer la restauration de la captation d'iode.

Au bout du compte, l'effet Wolff-Chaikoff est considéré aujourd'hui comme un processus d'autorégulation visant à protéger la thyroïde des effets délétères d'un excès d'iode et assurant ainsi un contrôle de la captation de l'iode pour la biosynthèse des HTs.

❖ *Régulation par l'œstradiol*

Il a été montré sur une lignée thyroïdienne de rat que les œstrogènes entraînent une augmentation de la croissance cellulaire, et cela associé à une diminution de l'expression du NIS et de la captation de l'iode [30, 31] en présence et en absence de TSH, avec pour conséquence un dysfonctionnement dans la biosynthèse des HTs. Chez l'homme, on observe un dimorphisme sexuel dans la survenue de certaines pathologies thyroïdiennes et notamment le goître à savoir une hypertrophie de la thyroïde en lien avec une carence en iode. Il a été proposé que la prévalence du goître plus élevée chez la femme par rapport à l'homme était en partie due à l'action des œstrogènes sur l'expression du NIS et la croissance cellulaire. Les études sur le sujet sont trop peu nombreuses et le mécanisme par lequel les œstrogènes influencent la fonction thyroïdienne reste à éclaircir.

Une corrélation positive a été établie entre les œstrogènes et l'augmentation de l'expression du NIS dans des situations pathologiques comme les tumeurs malignes du sein [32] et là encore les mécanismes sont à approfondir.

❖ *Régulation par les cytokines et facteurs de croissance*

Outre la TSH, certaines hormones et l'ion iodure, il a été montré que les cytokines, protéines libérées par le système immunitaire, jouent un rôle dans la modulation de l'expression du NIS et dans la fonction thyroïdienne. Les cytokines impliquées dans ce processus sont produites à la fois par les cellules immunitaires infiltrantes et les cellules folliculaires. Parmi les cytokines étudiées, il a été démontré que le TNF- α (Tumor necrosis factor- α), le TNF- β , l'IFN- γ (Interferon- γ), IL-1 α (Interleukine -1 α), IL-1 β , IL-6 et le TGF- β 1 (Transforming growth factor- β 1), entre autres, exercent via des actions différentes un effet inhibiteur sur la fonction thyroïdienne via la diminution de l'expression du NIS et de la captation de l'iode [33-36].

La plupart des études illustrent un effet de ces facteurs sur l'expression du NIS au niveau transcriptionnel mais d'autres établissent le fait que certains de ces facteurs ont un effet sur le NIS et la captation de l'iode de manière indirecte en agissant sur les protéines associées au fonctionnement du transport de l'iode. En effet, A.E.Pekary et ses collaborateurs ont indiqué que le TNF- α et le TGF- β 1 diminue l'expression et l'activité de la pompe Na⁺/K⁺ ATPase, perturbant ainsi le potentiel membranaire au sein de la cellule folliculaire et l'activité du NIS [37]. Il a été montré que l'IFN- γ inhibe la production d'AMPc (Adénosine monophosphate cyclique), effecteur de la signalisation TSH sur des cellules thyroïdiennes humaines en culture [38]. Le TGF- β , très étudié, intervient dans la répression du NIS de différentes manières. Comme les autres cytokines, il intervient au niveau transcriptionnel en empêchant l'interaction d'un facteur de transcription, PAX8 (Paired box gene 8), aux régions promotrices du gène SLC5A5 codant pour le transporteur de l'iode [39] et cela en séquestrant ce facteur de transcription via une interaction protéique. Cet effet du TGF- β sur l'expression du NIS a été observé non seulement dans la thyroïde mais aussi dans la glande mammaire en période de lactation [40].

L'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1) est un facteur de croissance impliqué notamment dans le métabolisme et la croissance cellulaire, sa sécrétion est dérégulée dans de nombreuses situations pathologiques. Dans la thyroïde, tout comme le TGF- β , l'IGF-1 inhibe l'expression du NIS en altérant la liaison de PAX8 au promoteur du gène codant ce dernier [19]. Dans des thyrocytes primaires, il a été montré dans d'autres conditions, que l'IGF-1 augmente l'expression du NIS induite par la TSH via un cross-talk entre les deux signalisations [41, 42]. Des études complémentaires restent nécessaires afin de déterminer les mécanismes précis de l'implication de ces différents facteurs dans la régulation du NIS.

5.b) Organification de l'iode et biosynthèse des HTs : rôle de la TPO (Thyroperoxydase)/système générateur de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et de la Tg (Thyroglobuline)

5.b.1) Thyroglobuline : précurseur des HTs

La thyroglobuline (Tg) est une glycoprotéine exclusivement exprimée par les cellules folliculaires. Elle est le précurseur des HTs puisque ces dernières sont formées après une série de modifications post-traductionnelles de la Tg, dont l'oxydation de l'iode suivie de l'iodation

de certains résidus tyrosines. La synthèse des hormones thyroïdiennes est dépendante de la disponibilité cellulaire en iode et en molécules oxydatives tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), formé à partir de dioxygène (O_2).

L'expression de la Tg tout comme d'autres marqueurs de différenciation, est sous le contrôle de la TSH au niveau transcriptionnel [43, 44].

La Tg est une protéine d'environ 660 kDa, traduite dans le réticulum endoplasmique puis excrétée et stockée dans la cavité colloïdale. A elle seule, elle représente 95% des protéines de cette cavité.

Tout au long du trafic vésiculaire, elle subit une série de modifications post-traductionnelles telles que glycosylation, sulfatation, phosphorylation et iodation, ce qui va lui permettre d'acquérir une forme mature avant d'être relarguée dans l'espace colloïdal via un processus d'exocytose. Quelques études ont montré que l'acquisition de la structure quaternaire de la thyroglobuline est nécessaire pour un export efficace vers l'espace colloïdal et que la TSH favorise le bon repliement de la protéine en influant sur la mise en place des modifications post-traductionnelles [45-47]. Plusieurs protéines chaperonnes du RE et de l'appareil de Golgi sont nécessaires au repliement de la protéine. En plus des modifications post-traductionnelles, la Tg subit dans son extrémité N-terminal des clivages protéolytiques à des sites discrets. La fonction biologique de ces clivages n'est pas complètement élucidée mais elle permettrait entre autres de produire des peptides iodés riches en hormones, et de faciliter par la suite la protéolyse et le relargage des HTs de la Tg. Tout comme de multiples processus cellulaires intervenant dans la biosynthèse des HTs, les clivages sont aussi accentués par l'activation de la signalisation TSH [48].

Des mutations du gène codant la Tg, responsable d'un phénotype d'hypothyroïdie (défaut dans la sécrétion des hormones thyroïdiennes) ont démontré la nécessité du repliement protéique optimal de la thyroglobuline pour la production des hormones thyroïdiennes [43, 45, 46].

La Tg, dans sa forme mature est observée sous forme d'homo-dimère, elle est envoyée dans la cavité colloïdale via des vésicules d'exocytose et ce processus est aussi contrôlé positivement par la TSH.

5.b.2) Thyroperoxydase (TPO) : enzyme responsable de la synthèse des HTs

La thyroperoxydase est l'hormone clé de l'hormonogénèse puisqu'elle catalyse le couplage oxydatif et l'iodation de résidus tyrosines de la Tg (réaction d'organification).

Plusieurs mutations du gène de la TPO sont responsables de formes d'hypothyroïdies congénitales due à un défaut d'organification de l'iode et de la synthèse des HTs. Il en est de même pour certaines maladies auto-immunes impliquant la présence d'auto-anticorps contre cette protéine.

La TPO est une hémoprotéine glycosylée de poids moléculaire de 110 kDa et transportée à la membrane apicale via des vésicules d'exocytose. Comme pour la Tg elle subit tout au long de son trafic vésiculaire une série de modifications post-traductionnelles permettant son expression à la membrane apicale et son activité. La glycosylation, dimérisation et la liaison héminique sont décrites comme des modifications post-traductionnelles qui permettent un repliement correct de la protéine, son expression à la membrane plasmique apicale, ainsi qu'une bonne activité enzymatique. Il a été montré que la TPO subit un clivage protéolytique à l'extrémité N-terminale lors de sa maturation mais les avis divergent sur le rôle de ce clivage dans la fonction de la protéine [80, 81]. D'autres protéines interviennent dans le repliement et l'adressage de la TPO [54, 55].

Comme toute peroxydase la TPO nécessite de l' H_2O_2 pour son activité. La NADPH oxydase DUOX2 (Dual oxydase 2) associée à la TPO produit cet H_2O_2 nécessaire et essentiel à la production des HTs.

Il est à noter que le maintien de la TPO à la membrane apicale est nécessaire pour son activité. La TPO est immuno-précipitée avec DUOX2, leur association à la membrane est fondamentale pour la synthèse des HTs. La proximité entre ces deux protéines permet aussi de protéger les cellules thyroïdiennes contre d'éventuels dommages causés par la production d' H_2O_2 extracellulaire. En effet, la TPO, en consommant l' H_2O_2 même en absence de l'iode, permet de diminuer la concentration de ces molécules oxydatives. Cependant, TPO et DUOX2 sont sensibles à l'oxydation et sont inhibées par des concentrations excessives d' H_2O_2 [82, 83].

Plusieurs transcrits de TPO de différentes tailles et issus d'épissages alternatifs différents ont été détectés dans la thyroïde normale, la raison à cela est toujours inconnue. Certains de ces

transcrits produisent des protéines inactives et sont alors retrouvés et impliqués dans certaines pathologies comme l'hypothyroïdie congénitale [55].

L'expression de la TPO comme pour l'expression du NIS, de la Tg et du récepteur à la TSH, le TSHR (Thyroid-Stimulating Hormone Receptor) est régulée positivement par la TSH, ainsi que son exocytose. L'ion iodure via l'effet Wolff-Chaikoff régule négativement l'expression de la TPO [84].

La TPO est majoritairement retrouvée dans la thyroïde mais son expression a été découverte dans d'autres tissus extra-thyroïdiens comme la peau, les reins, le thymus, le cœur, le tissu orbital et les tissus cancéreux et normaux du sein entre autres. La fonction de cette enzyme dans ces différents tissus n'est pas complètement élucidée mais la présence d'auto-anticorps contre la TPO serait impliquée dans des pathologies de type inflammatoire à ces différents niveaux [85-90].

En bref, la TPO est une enzyme qui requière comme substrat trois éléments essentiels à la synthèse hormonale qui sont la Tg (précurseur), l'iode et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 .

6) Réaction d'organification de l'iode

Dans l'espace colloïdal, la première étape de la biosynthèse des HTs fait intervenir une réaction d'oxydation. La TPO, elle-même, subit une oxydation grâce à la présence dans sa structure de quatre acides aminés conservés entre les différentes peroxydases, et situés dans l'environnement de la poche structurale où est localisé l'hème. Il est à noter que la liaison covalente de l'hème à la Tg nécessite aussi une réaction d'oxydation. L'iode est ensuite oxydé par la TPO pour former une espèce réactive d'iode qui se lie à des résidus tyrosines spécifiques de la Tg et cela via un transfert d'électrons entre divers acteurs, l'hème, les molécules H_2O_2 , la Tg, la TPO et l'iode. A la suite de ces réactions, des molécules de MIT (mono-iodotyrosines) avec une molécule d'iode par tyrosine, ou DIT (di-iodotyrosines) avec deux molécules d'iodes par tyrosine sont obtenues au sein de la Tg. Ces composés sont alors les précurseurs des HTs, T3 et T4, puisque la T3 est formée par l'assemblage entre une molécule de MIT et DIT tandis que la T4 est formée par le couplage de deux molécules DITs (*Figure 8*). Cette association est rendue possible grâce à plusieurs étapes enzymatiques dont le transfert d'un groupement iodophenoxy entre les molécules et ce transfert nécessite là encore plusieurs réactions d'oxydations. Les HTs ainsi que les précurseurs inactifs MIT et DIT sont alors libérés de la Tg par protéolyse.

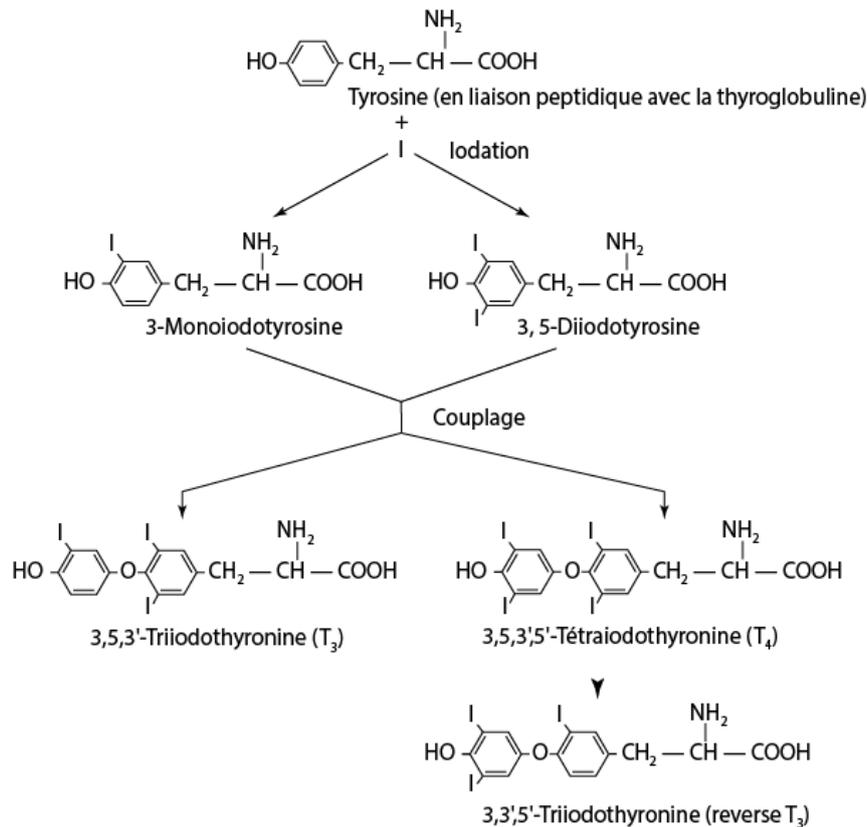


Figure 8 : Etapes de la synthèse hormonale thyroïdienne (T₃ et T₄)

La T₃ est considérée comme l'hormone thyroïdienne active mais dans les conditions physiologiques, c'est surtout la T₄ qui est majoritairement formée dans la thyroïde [48]. La T₃ est synthétisée à partir de la T₄ par l'action d'enzymes de type désiodase, DIO1/2 (5'-iodothyronine désiodinase de type 1 ou 2). Ces dernières sont observées sous forme dimérique et sont présentes dans de multiples tissus extra-thyroïdiens [91]. En fin de compte, la disponibilité de l'organisme en T₃ dépend de sa teneur dans la molécule de Tg, mais aussi de l'activité des iodothyronine désiodinases.

En dernier lieu, il a été observé une iodation de certains résidus tyrosines de la Tg, différents de ceux catalysés par la TPO. Cette iodation indépendante de la TPO aurait une fonction physiologique en permettant le stockage de l'iode dans la thyroïde [92].

7) Systèmes générateurs de H₂O₂ : DUOX1/2

Depuis longtemps, il a été démontré que les cellules folliculaires ou thyrocytes produisaient du H₂O₂ à la membrane apicale et cela de manière dépendante du calcium et du NADPH (Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate). Ce n'est que plusieurs années après que le lien

entre cette fonction et l'identification des enzymes DUOX1/2, anciennement appelées Thyroïde oxydases, responsables de cette génération de peroxyde d'hydrogène a été établi [49, 50]. Elles font parties de la famille des NADPH Oxydases (NOXs) qui comporte au total 7 membres et ont pour unique fonction la production d'espèces radicalaires et non radicalaires regroupées sous le nom d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). La famille des NADPH oxydases sera décrite ultérieurement.

Du point de vue structural, en plus de leur domaine d'homologie avec les autres membres de la famille des NADPH oxydases, elles comportent une région « EF hand » permettant la fixation du calcium et un septième domaine transmembranaire du côté de l'extrémité N-terminale, comportant une certaine homologie avec les protéines de type peroxydase. La fonction de ce domaine peroxydase-like reste à éclaircir mais il semble néanmoins essentiel dans la biosynthèse des HTs puisque les patients présentant une mutation dans ce domaine développent une hypothyroïdie [50]. Les DUOXs sont des protéines glycosylées de masse moléculaire comprise entre 180-190 kDa (*Figure 9*).

DUOX1 et DUOX2 sont toutes deux fortement exprimées dans la thyroïde. Dans les thyrocytes, DUOX1 et DUOX2 sont localisées à la membrane apicale. Des quantités substantielles de ces protéines sont aussi retrouvées dans le RE. La localisation apicale de ces enzymes est favorisée par la présence de partenaires dits de maturation empêchant leur rétention dans le RE

[52]. DUOAX1 et DUOAX2 sont respectivement les partenaires de maturation de DUOX1 et DUOX2. Les gènes DUOAX1/DUOAX2 sont localisés sur le chromosome 15 dans la région intergénique des gènes DUOX1/DUOX2. Ces facteurs de maturation sont des protéines transmembranaires (5 segments transmembranaires) glycosylées de respectivement 320 et 343 acides aminés. Il est à noter que les DUOXs ne nécessitent pas la présence de sous-unités cytosoliques pour leur fonctionnement contrairement à d'autres NADPH oxydases telles que la NADPH oxydase de phagocyte.

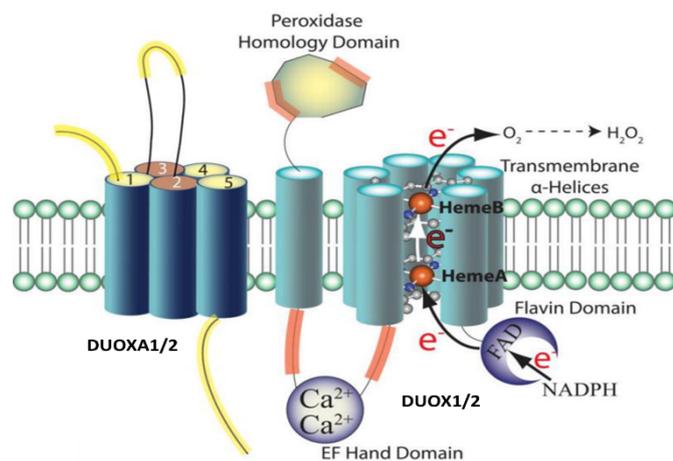


Figure 9 : Structure des Dual-oxydases 1/2 [51]
7 domaines transmembranaires dont un domaine avec une homologie avec les protéines de la famille peroxydase. La boucle EF permet la fixation de Ca²⁺. Présence obligatoire des facteurs de maturation DUOAX1/2 pour l'activité des DUOX1/2. Production d'O₂⁻ par la forme immature et de H₂O₂ par la forme mature.

Certaines études ont montré que la maturation et l'adressage des DUOXs à la membrane apicale font intervenir des interactions avec d'autres acteurs. D.Wang et ses collaborateurs ont montré par exemple une colocalisation des DUOXs dans le RE avec EFP1 (EF-hand binding protein 1), facteur d'élongation protéique, cette interaction favoriserait le repliement et la maturation des DUOXs [53]. Cav1, protéine d'ancrage et principal composant des microdomaines lipidiques ou raft lipidiques à la membrane plasmique, a été trouvée comme intervenant dans l'adressage et le maintien à la membrane plasmique apicale de DUOX2 et TPO [54, 55].

Sur la base de leur homologie avec NOX2, la sous-unité catalytique de la NADPH oxydase de phagocytes, les DUOXs devraient produire de l'anion superoxyde. Cependant, une génération de peroxyde d'hydrogène par les thyrocytes a été détectée dans de nombreuses études. Des récents travaux ont montré que la forme immature et partiellement glycosylée de DUOX2 génère de l'anion superoxyde en intracellulaire tandis que la forme mature génère du H₂O₂ [56, 57]. Les auteurs pensent donc que la présence dans la structure des DUOXs de la boucle extracellulaire « A-loop » qui permet l'interaction avec des facteurs de maturation entraînant le repliement, l'adressage subcellulaire correct des enzymes et les modifications post-traductionnelles (glycosylation) favorisent la dismutation intramoléculaire de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène. Le calcium est le principal régulateur de l'activité des DUOXs.

Il est dorénavant admis que c'est le peroxyde d'hydrogène généré par DUOX2 qui est utilisé par la TPO pour la biosynthèse des HTs puisque toutes les études mutationnelles concernant DUOX2 mettent en évidence une hypothyroïdie sévère associée à son absence d'activité ; DUOX1 ne restaurant pas le phénotype muté. La découverte de mutation bi-allélique dans le gène de DUOXA2 chez un patient hypothyroïdien renforce le rôle du complexe DUOX2-DUOXA2 dans la biosynthèse des HTs. De plus, la production d'H₂O₂ par DUOX1 est plus faible et les souris déficientes en DUOX1 ne présentent pas un phénotype d'hypothyroïdie. Néanmoins l'inactivation de DUOX2 chez les souris ne conduit qu'à un défaut partiel de l'organification de l'iode par la TPO suggérant que le complexe DUOX1-DUOXA1 pourrait avoir un rôle compensatoire [58, 59].

DUOX1. DUOX1 a été décrit dans d'autres tissus extra-thyroïdiens tels que les épithéliums des voies respiratoires [60-62], les glandes sécrétrices (dont la glande salivaire), la surface de certaines muqueuses (rectum, trachée, bronches) et certains types cellulaires comme les

kératinocytes, certaines cellules immunitaires dont les lymphocytes T, B et macrophages... avec un rôle dans la signalisation cellulaire et l'activité antimicrobienne [62, 63].

Les DUOXs sont des enzymes dont l'expression est inductible [64]. Dans la thyroïde, l'expression de DUOX1 est régulée positivement par l'effecteur de la signalisation TSH, l'AMPc [65]. Sabrina Rigutto et ses collaborateurs ont montré de plus, que PKA, protéine kinase de la signalisation TSH contrôle positivement l'activation de DUOX1 par phosphorylation [66].

DUOX1 est aussi impliquée dans de nombreux processus pathologiques. Elle intervient dans la carcinogenèse thyroïdienne, et spécialement dans les cancers radio-induits. La génération de ROS associée à son expression contribue à la mise en place d'instabilités génétiques [67-69]. Dans les mécanismes physiopathologiques, ses effets sont pléiotropes et les mécanismes de son implication sont à approfondir.

DUOX2. Les tissus extra-thyroïdiens dans lesquels est exprimée DUOX2 sont tout aussi variés, on l'y retrouve dans les mêmes tissus où l'on retrouve DUOX1 comme le long du tractus gastro-intestinal, les glandes salivaires, la surface de certaines muqueuses (rectum, trachée, bronches), les épithéliums des voies respiratoires, les kératinocytes, on l'y retrouve aussi dans le pancréas, la prostate, le foie [62, 70, 71-73]. Tout comme DUOX1, DUOX2 est retrouvée au niveau membranaire apical pour les cellules épithéliales. Dans les conditions physiologiques, les ROS générées par DUOX2 interviennent dans la signalisation cellulaire et la défense immunitaire. Elle est aussi impliquée dans des processus carcinogènes [62].

L'expression de DUOX2 est inductible [64, 74-77]. L'iode régule négativement l'expression de DUOX2 (effet Wolff Chaikoff) [78, 79]. Certains travaux démontrent un effet de la forskoline, activateur de l'adénylate cyclase sur l'expression de DUOX2 notamment avec une augmentation du messager [77]. Sabrina Rigutto et ses collaborateurs ont montré une augmentation de la production de H₂O₂ générée par DUOX2 après phosphorylation par la protéine kinase PKC aussi activée par la signalisation TSH [66].

8) Endocytose, clivage protéolytique de la Tg et relargage des HTs

La biosynthèse des HTs nécessite non seulement une disponibilité en ion iodure mais aussi son adressage à la cavité colloïdale, lieu de synthèse de ces hormones. L'adressage optimal de l'iode est rendu possible grâce à la présence de transporteurs au pôle basal et apical de la cellule. Au

pôle basal, on retrouve le NIS comme décrit précédemment et au pôle apical, plusieurs protéines semblent être impliquées dans l'efflux de l'iode.

Efflux de l'iode. Plusieurs protéines ont été décrites dans la littérature comme intervenant dans l'efflux de l'iode au niveau apical. Parmi ces protéines, on retrouve la pendrine, l'Anoctamine-1 et SLC26A7. Elles ont toutes été localisées au pôle apical des thyrocytes et leur perte de fonction ont été associées à un défaut partiel d'organification de l'iode. Aucun phénomène de compensation n'a été observé et les données concernant une potentielle régulation par la TSH sont à approfondir.

Relargage des HTs. A la suite de la réaction d'organification, la T3 et T4 stockées dans la lumière colloïdale doivent subir différents processus de maturation, tout en étant transportées selon un schéma spécifique à la cellule thyroïdienne, dans le but d'être relarguées dans la circulation au pôle basal des cellules.

T3 et T4 sont premièrement internalisées par un processus de micropinocytose, qui consiste en la formation de petites vésicules contenant du matériel colloïdal via la mise en place de pseudopodes ou invaginations membranaires consécutives à un réarrangement du cytosquelette. Tout comme le fait que l'exocytose de la Tg soit un phénomène régulé par la TSH, il en est de même pour les mécanismes d'endocytose, puisque la libération des HTs fait partie d'un processus hautement contrôlé [93, 94].

A la suite de l'endocytose, on observe plusieurs voies d'adressage pour les vésicules internalisées. Ces dernières peuvent fusionner avec des vésicules lysosomales afin de permettre la libération des hormones T3 et T4 ou encore être dirigées dans le réseau de synthèse et maturation protéique à des fins de recyclage ou encore être dirigées vers les voies de la dégradation ou encore être adressées directement au pôle basal des cellules via un mécanisme de transcytose [95].

Avant d'être relarguées dans la circulation sanguine au pôle basal des thyrocytes, les HTs T3 et T4 doivent être libérées du noyau de la Tg par protéolyse. Cette dernière a lieu lors de la fusion des endosomes avec des lysosomes contenant le matériel de protéolyse. Les cathepsines localisées à la fois dans la cavité colloïdale et dans le système endosomal des thyrocytes ont été identifiées comme intervenant dans le processus de protéolyse de la Tg. Leur activation dépend essentiellement du pH. La présence de cathepsines dans la lumière colloïdale permet

d'amorcer la protéolyse de la Tg [96]. Les cathepsines de type B, K, L, S, D, E, C, H, V sont exprimées dans la thyroïde et impliquées dans la protéolyse de la Tg [97-105].

Certaines études ont montré que la TSH intervient dans le relargage des HTs via la régulation de l'activité protéolytique des thyrocytes en modulant positivement l'expression des cathepsines et/ou leur activité enzymatique et/ou leur translocation aux compartiments lysosomaux et apicaux [97, 98, 102, 103, 105]. L'iode a un effet modulateur négatif sur la fonction protéolytique lysosomale via la modulation de l'expression des enzymes protéolytiques [106, 107].

La protéolyse des molécules de Tg iodées libère non seulement les hormones T3 et T4 mais aussi les résidus iodotyrosines, les MITs et DITs. Ces derniers sont dé-iodés par l'action d'une enzyme, l'iodotyrosine déshalogénase 1 (DEHAL1) de manière à permettre le recyclage de l'iode et à maintenir une homéostasie iodique. Cette dernière est régulée positivement par la TSH et négativement par l'iode [108-111].

Enfin, T4 et T3 sont libérées de la cellule par des transporteurs présents au niveau basal de la membrane plasmique des thyrocytes. Le transporteur majeur pour le transport des HTs est MCT8 (Monocarboxylate transporter 8). Il est observé à la membrane basale sous forme de monomères, dimères ou multimères [112, 113]. La fonction physiologique de cette oligomérisation est inconnue à ce jour. Dans la thyroïde, une régulation au niveau transcriptionnel de MCT8 par la TSH a été observée [114]. De plus, et comme il a été montré précédemment, l'exposition des cellules thyroïdiennes à un excès d'iode aboutit à un phénomène d'auto-régulation en diminuant l'expression des protéines de la différenciation via l'effet Wolff-Chaikoff. E.C.L de Souza et ses collaborateurs ont démontré que l'expression de MCT8 se retrouve diminuée pendant l'effet Wolff-Chaikoff, puis se normalise lors du processus d'échappement à cet effet au même titre que le NIS par exemple [115]. De la même manière, MCT8 est régulée positivement en réponse à une déficience en iode et cette action est la conséquence d'un processus compensatoire [116].

9) Contrôle de la synthèse des HTs par la TSH

La TSH se lie à son récepteur TSHR (Thyroid-Stimulating Hormone Receptor) localisé comme pour le NIS au pôle basal des cellules folliculaires et entraîne via la transduction d'un signal spécifique l'activation de la synthèse et la sécrétion des HTs. Il contrôle aussi l'expression des protéines impliquées dans la biosynthèse de ces HTs.

Le récepteur à la TSH appartient à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Du côté structural, il présente des homologies de séquence avec les deux autres récepteurs aux hormones hypophysaires, FSH (Hormone Folliculo-Stimulante) et LH (Hormone Lutéinisante). Ces domaines structuraux homologues correspondent à l'extrémité C-terminal (sous-unité bêta), cette dernière comportant 7 segments transmembranaires. Le segment N-terminal (sous-unité alpha) quand-à lui est responsable de la spécificité du TSHR.

La sous-unité bêta est active constitutionnellement et son interaction avec la sous-unité alpha la maintient dans un état inactif, de manière-à ce que le dimère soit activé uniquement lors de la fixation du ligand. En plus des glycosylations nécessaires au repliement de la protéine et à son expression à la membrane plasmique, TSHR subit plusieurs autres modifications post-traductionnelles. La palmitoylation, sulfatation, sialylation contribuent entre autres à permettre une meilleure fixation du ligand, la localisation à la membrane plasmique ou encore participent aux processus de désensibilisations [117]. Il a été observé, de plus, à la membrane des cellules folliculaires des dimères et oligomères de TSHR, ces derniers influencent la signalisation, l'internalisation et l'arrêt du signal. Des études complémentaires pour savoir si la dimérisation est conditionnée à la fixation du ligand sont à réaliser.

Désensibilisation du signal TSH. Les mécanismes de désensibilisation et d'arrêt du signal TSH sont encore à l'étude mais parmi ces mécanismes, on retrouve ceux intervenant dans la désensibilisation des autres RCPGs. Ainsi et comme dans d'autres tissus, des protéines GRKs (G protein-coupled receptor kinase), responsables de la phosphorylation de TSHR sont présents dans la thyroïde [118]. Il est à noter que les phosphorylations du TSHR peuvent aussi provenir de protéines kinases en aval de la voie de signalisation du récepteur à la TSH. Les phosphorylations sont des signaux pour le recrutement de β -arrestines, protéines adaptatrices permettant à leurs tours le recrutement de protéines impliquées dans les processus d'internalisations. Les vésicules contenant TSHR sont ensuite recyclées et envoyées à la membrane plasmique après une stimulation TSH [119]. D'autres mécanismes de désensibilisation dans les cellules folliculaires font intervenir les protéines RGS (Regulators of G protein signaling) qui agissent en aval et permettent une accélération du signal.

En outre, TSHR est exprimé majoritairement dans les cellules folliculaires de la thyroïde, mais il est également exprimé en plus faible proportion dans une large variété de tissus extra-thyroïdiens incluant l'antéhypophyse, l'hypothalamus, les ovaires, les testicules, la peau, les reins, le système immunitaire, les tissus péri-orbitaux entre autres. Plusieurs hypothèses sur le rôle fonctionnel du TSHR à ces différents sites émergent [120, 121].

9.a) Transduction du signal

La signalisation TSH-TSHR-AMPC-PKA a depuis longtemps été considérée comme la voie de signalisation centrale pour l'hormonogénèse ou biosynthèse des HTs, la prolifération cellulaire et la différenciation [122]. D'autres études ont montré que l'activation du TSHR par de plus fortes concentrations en TSH, pouvait aussi permettre une transduction du signal via la voie PLC- Ca^{2+} -PKC [123]. Plus tard, il a été montré que cette cascade de signalisation était activée pour des concentrations physiologiques de TSH.

L'activation de TSHR implique une dualité dans la transduction du signal avec à la fois l'activation de la cascade AC-AMPC-PKA et PLC- Ca^{2+} -PKC. Le cross-talk observé entre ces deux voies ajoute une complexité dans l'analyse des effets médiés par la TSH dans la prolifération et différenciation thyroïdienne.

Ainsi, TSH en se fixant sur son récepteur entraîne un changement conformationnel et une dimérisation permettant l'activation des protéines trimériques G associées.

- Signalisation TSH/TSHR/AC/AMPC/PKA

La sous-unité G_{α} se dissocie des sous-unités $G_{\beta\gamma}$, via l'échange d'un GDP (guanosine diphosphate) en GTP (guanosine triphosphate) et entraîne l'activation de l'adénylate cyclase (AC). Cette dernière génère l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) qui active à son tour la protéine kinase A (PKA) (*Figure 10*). PKA est une protéine kinase composée de deux sous-unités régulatrices et de deux sous-unités catalytiques. La liaison de l'AMPC au niveau des sous-unités régulatrices permet de dissocier et libérer les sous-unités catalytiques actives. Il a été montré dans des systèmes cellulaires que PKA peut elle-même subir une phosphorylation sur une de ses sous-unités régulatrices ce qui permettrait de créer un « état sensibilisé » favorisant ainsi la dissociation des sous-unités [124]. PKA phosphoryle ensuite plusieurs protéines dont des facteurs de transcription, cela aboutissant à la transcription de gènes cibles.

Un des substrats le mieux caractérisé de PKA est le facteur de transcription ubiquitaire CREB (cAMP-response element (CRE) binding protein). Celui-ci après phosphorylation se fixe sur l'ADN au niveau d'éléments de réponse CRE (AMPC-réponse élément), permettant ainsi la transcription de gènes dont les promoteurs contiennent CRE. Dans la lignée cellulaire folliculaire thyroïdienne de rat FRTL5, il a été démontré que l'activation de CREB via PKA

entraîne l'expression de gènes impliqués dans la croissance et la différenciation des thyrocytes [125, 126].

Implication de la signalisation TSH-TSHR-AC-AMPC-PKA dans la régulation transcriptionnelle des marqueurs de différenciation. La signalisation TSH-TSHR-AC-AMPC-PKA est principalement décrite comme étant la signalisation de l'hormonogénèse, de par son implication dans la régulation de l'expression de marqueurs de différenciation incluant le transporteur de l'iode (NIS), la Tg et la Thyroperoxydase (TPO) [127, 128] via le recrutement de facteurs de transcription spécifiques au niveau de leurs régions promotrices.

- Signalisation TSH/TSHR/PLC-Ca²⁺-PKC

La sous-unité G_α se dissocie des sous-unités G_{βγ}, via l'échange de GDP en GTP et entraîne l'activation de la phospholipase C (PLC) qui clive le PIP₂ (phosphatidylinositol,4,5-bisphosphate) en 2 effecteurs cellulaires, IP₃ (inositol 1,4,5-triphosphate) et DAG (diacylglycerol). Ce dernier active la protéine kinase C (PKC) tandis que IP₃ entraîne une augmentation du calcium intracellulaire via l'ouverture d'un canal au niveau du réticulum endoplasmique (Figure 10). L'augmentation du calcium permet entre autres de mettre en place des mécanismes tel que l'exocytose conduisant à la libération des HTs ou la production d'H₂O₂ nécessaire à leur synthèse par exemple. L'augmentation du calcium intracellulaire permet aussi via la calmoduline kinase, la phosphorylation de

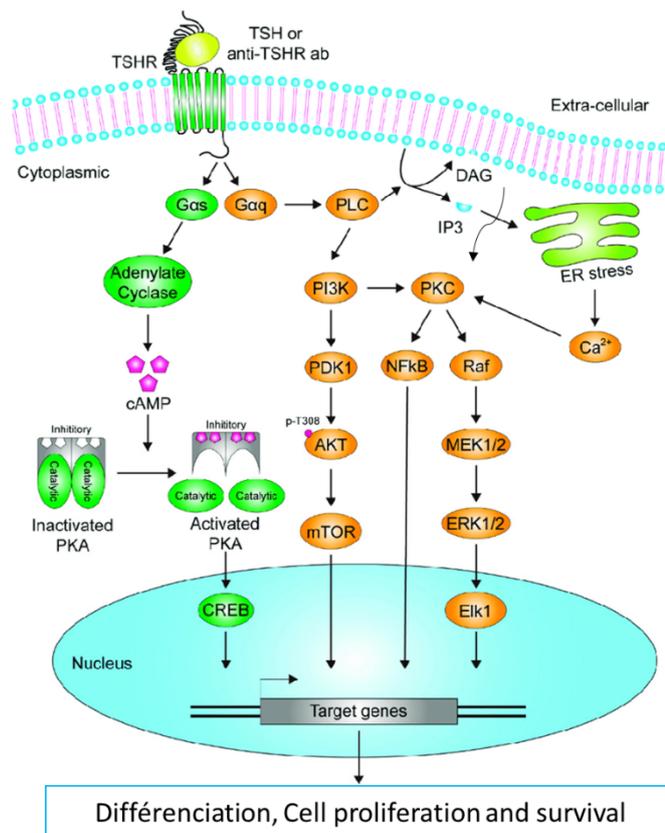


Figure 10 : Signalisation TSH/TSHR dans les cellules folliculaires [83]

TSH en se fixant sur son récepteur au pôle basolatéral entraîne un changement conformationnel permettant l'activation des protéines trimériques G associées. TSH stimule l'expression de gènes impliqués dans la différenciation et la sécrétion des HTs. Selon les stimuli, la signalisation TSH peut être aussi impliquée dans la croissance et prolifération. AC, adényl cyclase; CREB, cAMP response element binding; DAG, diacylglycerol; ELK1, ETS transcription factor; Ins(1,4,5)P₃, inositol-1,4,5-triphosphate; NF-κB, nuclear factor-κB; PKA, protein kinase A; PLC, phospholipase C; PtdIns(4,5)P₂, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate.

cibles cellulaires et indirectement l'activation de la PKC. Les membres de la famille PKC sont impliqués dans la transduction de signaux intervenant dans la croissance, la différenciation, l'apoptose. Ainsi, l'activation de PKC conduit à la phosphorylation et l'activation de facteurs de transcription impliqués dans ces divers processus.

Le DAG est aussi un activateur de la PKC entre autres. Les souris avec une mutation de la sous-unité $G_{q\alpha}$ et par conséquent une déficience d'activation de la signalisation PLC- Ca^{2+} -PKC présentent une diminution de la biosynthèse des HTs en réponse à la TSH. Cependant, le fait que cette biosynthèse ne soit pas complètement interrompue, suggère que la signalisation via $G_{s\alpha}$ reste la voie principale de la synthèse hormonale [129]. Les données indiquent aussi que ces voies de signalisation (AC-AMPC-PKA et PLC- Ca^{2+} -PKC) activées par la TSH contribuent et interviennent dans l'activation d'autres circuits de signalisation.

Cross-talk signalisation TSH et autres. Il a été montré par exemple dans les thyrocytes humains que la signalisation MAPK (Mitogen-activated protein kinase) est activée en réponse à une stimulation par la TSH et cela indépendamment de l'activation de la signalisation AC-AMPC [130]. Certains auteurs démontrent l'existence d'un cross-talk entre les signalisations MAPK et AC-AMPC dans la carcinogenèse thyroïdienne [131-133], d'autres en revanche, montrent que l'inhibition de la signalisation AC-AMPC stoppe la croissance des cellules cancéreuses thyroïdiennes via l'inhibition de facteurs de croissance responsables de l'activation de la signalisation MAPK [134-136]. D'autres données montrent que l'activité de PLC-PKC médiée par TSH est augmentée dans les cancers thyroïdiens, avec un impact sur la croissance et l'invasion tumorale [136].

En conclusion, le cross-talk entre les diverses voies de signalisation et l'intégration de signaux endogènes additifs apporte une complexité dans la compréhension des effets médiés par la TSH.

9.b) Régulation transcriptionnelle de la fonction thyroïde : rôle des facteurs de transcription PAX8, TTF1 et FOXE1

La biosynthèse des HTs n'est possible que grâce à l'expression de facteurs de transcription permettant l'expression des gènes codant pour les protéines décrites ci-dessus appelées marqueurs de différenciation thyroïdienne.

Plusieurs facteurs de transcription tels que PAX8 (paired-domain protein 8), NKX2.1 (NK2 homeobox 1) encore appelé TTF-1 (Thyroid transcription factor 1), FOXE1 (forhead-domain protein E1), NKX2.5 (NK2 homeobox 5) aussi connu sous le nom de PRH ou HHEX (Hematopoietically Expressed Homeobox), sont des régulateurs clés du développement précoce et sont impliqués dans le programme de différenciation des cellules folliculaires thyroïdiennes. Ces différents facteurs de transcription ont chacun une spécificité tissulaire mais leur expression conjointe dans les précurseurs des cellules thyroïdiennes et l'organe thyroïdien est essentielle d'une part à l'organogenèse thyroïdienne et au maintien du phénotype différencié. Nous nous intéresserons plus particulièrement à TTF-1, PAX8 et FOXE1 car ils ont été décrits comme régulant l'activité transcriptionnelle de la Tg, la TPO, du NIS et de TSHR. Les données concernant NKX2.5 dans le mécanisme de différenciation sont plus limitées. Il est essentiellement exprimé pendant l'embryogenèse et semble intervenir dans le contrôle de l'expression des autres facteurs de transcription durant cette période selon un schéma spatial et temporel. Récemment il a été retrouvé dans certains types de cancers thyroïdiens et associé à un pronostic favorable, néanmoins il ne sera pas abordé dans ce chapitre [137-139].

FOXE1 ou TTF-2 (Thyroid transcription factor 2) ou FKHL15. FOXE1 appartient à la famille des facteurs de transcription possédant un domaine « forkhead » conservé de liaison à l'ADN. Lorsqu'il se lie à l'ADN, FOXE1 est capable de modifier la structure de la chromatine afin de favoriser le recrutement d'autres facteurs de transcription.

FOXE1 se lie aussi à des motifs spécifiques dans des séquences régulatrices des régions promotrices de nombreux gènes. Les sites putatifs sur lesquels se lie FOXE1 partagent dans leur séquence centrale l'enchaînement de nucléotides suivant : AAACA. FOXE1 contrôle l'activation transcriptionnelle de la Tg et de la TPO. Il est capable d'agir avec d'autres facteurs de transcription afin de contrôler l'expression de ses gènes cibles. Quelques-uns de ses partenaires ont depuis été identifiés. Son activité est modulée en fonction de ses partenaires mais aussi de modifications post-traductionnelles [141]. FOXE1 peut aussi agir en tant que répresseur transcriptionnel de ces mêmes gènes en interférant dans l'activation transcriptionnelle médiée par PAX8/TTF-1 via l'interaction avec un cofacteur ayant une activité inhibitrice sur TTF-1 ou PAX8 [140, 142].

L'expression, la liaison à l'ADN et l'activité transcriptionnelle de FOXE1 sont contrôlées par la TSH et d'autres hormones de croissance comme l'IGF-1 puisqu'il possède dans sa séquence un site d'interaction aux facteurs de transcription activés en réponse à un stimulus hormonal.

Plus récemment, les gènes codant NIS et DUOX2 ont été reconnus comme des gènes cibles de FOXE1 [143].

Les mutations associées à ce gène chez l'homme sont responsables d'une dysgénésie de la thyroïde, associée à une hypothyroïdie congénitale. Des variations génétiques de FOXE1 sont aussi retrouvées dans certains types de cancers, y compris ceux affectant la thyroïde. Les polymorphismes génétiques entraînant la dérégulation de FOXE1 augmentent le risque de carcinogenèse thyroïdienne pour certains, interviennent dans la progression tumorale et les mécanismes de dédifférenciation pour d'autres [144]. Son expression diminue au cours de la progression tumorale (*Figure 11*).

TTF-1 ou NKX2.1. TTF-1 appartient à la famille des facteurs de transcription à homéodomaine. Ce domaine est conservé entre les différentes isoformes et permet la liaison à l'ADN. TTF-1 se fixe sur une séquence consensus comprenant l'enchaînement de nucléotides suivant, CAAG dans les zones promotrices de ses gènes cibles. Tout comme FOXE1, le gène codant pour la Tg est le premier gène cible de TTF-1 à avoir été identifié. Par la suite, les gènes de différenciation thyroïdienne dont ceux codant pour la TPO, le TSHR, le NIS, NKX2.5, la pendrine, DUOX1, DUOXA1 et les gènes codant les facteurs de transcription FOXE1, PAX8, HHEX ont été trouvés comme activés transcriptionnellement par la liaison de TTF-1 au niveau de leurs régions promotrices. Notons que TTF-1 est capable d'interagir avec des cofacteurs afin d'accomplir son rôle d'activateur transcriptionnel.

Une autre de sa particularité est qu'il est capable d'autoréguler son expression. La séquence consensus de fixation de TTF-1 est aussi présente dans les régions régulatrices de son gène. Il possède dans ces mêmes zones un élément de réponse CRE. Il peut être activé par la fixation du facteur de transcription CREB suite à l'activation de la signalisation TSH-AMPC-PKA. L'activité de TTF-1 est aussi modulée par des modifications post-traductionnelles. Des phosphorylations par PKA corrélées avec une amélioration de l'activité de TTF-1 ont été démontrées [140, 145].

Chez l'homme, les mutations associées à ce gène entraînent une dysgénésie de l'organe thyroïdien, corrélée à une hypothyroïdie congénitale [140]. TTF-1 est exprimé dans les cancers de la thyroïde dits « différenciés » car proche de l'histologie thyroïdienne normale et de meilleur pronostic. Son expression diminue au cours de la progression tumorale, elle est indétectable dans le cancer thyroïdien le plus agressif. Des altérations génétiques et des polymorphismes associés à TTF-1 ont été identifiés chez certains patients atteints d'un cancer

différencié, ce qui permet de corroborer un potentiel rôle de ce dernier dans la carcinogenèse thyroïdienne (*Figure 11*).

PAX8. PAX8 appartient à la famille des facteurs de transcription à « paired domain » et « homéodomaine », il est le principal régulateur du phénotype thyroïdien différencié. Il active transcriptionnellement la Tg, la TPO, le NIS, DIO1 et DUOX2. La séquence consensus de fixation de PAX8 comprend l'enchaînement des nucléotides GNNCAGCCATGCGTGACCN. Cette séquence s'entremêle avec la séquence consensus de TTF-1 au niveau des promoteurs de la Tg et de la TPO. La conséquence est la synergie d'action entre PAX8 et TTF-1 dans l'activation transcriptionnelle de leur gène cible. Plusieurs partenaires de PAX8 ont été identifiés, ces derniers sont spécifiques à chaque gène (*Figure 11*).

PAX8 régule aussi l'expression des facteurs de transcription HHEX et FOXE1. Comme son partenaire TTF-1, PAX8 régule sa propre expression grâce à la présence de sa séquence de fixation consensus dans la région promotrice de son gène. Tout comme FOXE1 et TTF-1, l'activité et la stabilité de PAX8 sont modulées en fonction de ses partenaires d'interaction ou de modifications post-traductionnelles [146]. Son expression est aussi activée en réponse à la TSH.

Les mutations de PAX8 chez l'homme causent une dysgénésie de la thyroïde, une hypothyroïdie congénitale. Dans les cancers thyroïdiens, il a été montré que PAX8 régule bon nombre de gènes impliqués dans la carcinogenèse comme les gènes des signalisations PI3K (phosphoinositide 3-kinase) / MAPK entres autres. Il est un marqueur oncogénique puisque les altérations génétiques affectant ce gène sont retrouvées dans de nombreux types de cancers thyroïdiens [140].

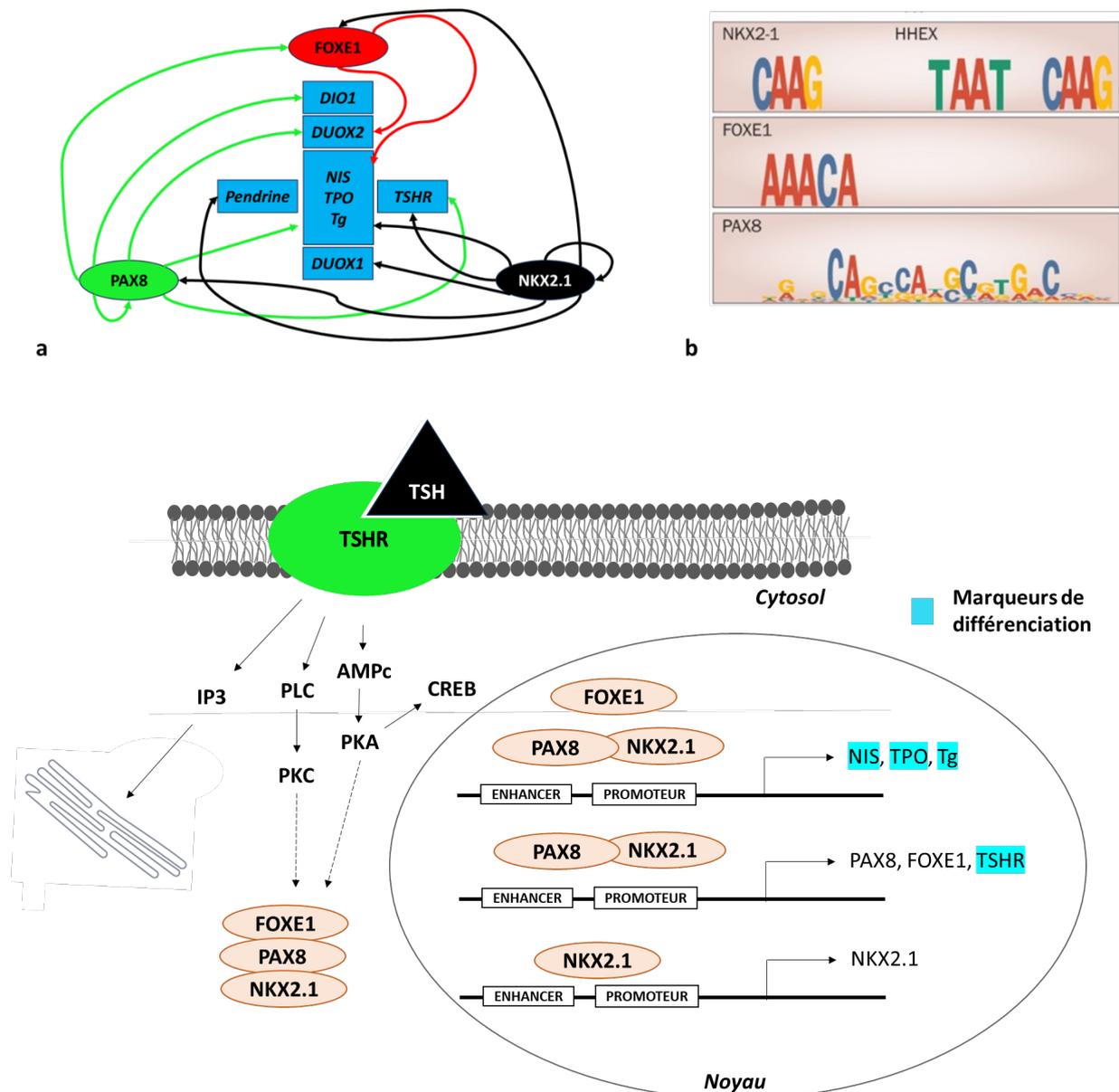


Figure 11 : Contrôle transcriptionnel des gènes de la différenciation par les facteurs de transcription PAX8/NKX2.1/FOXE1 [140]

(a). Activation transcriptionnelle de TSHR, NIS, TPO, Tg, NKX2.1, FOXE1, PAX8, pendrine, DUOX1 par NKX2.1. Activation transcriptionnelle de TSHR, Tg, TPO, NIS, FOXE1, DIO1, DUOX2 par PAX8. Activation transcriptionnelle de Tg, TPO, NIS, DUOX2 par FOXE1. Régulation positive de l'expression des facteurs de transcription par la signalisation TSH. (b). Séquences consensus des facteurs de transcription PAX8/NKX2.1/FOXE1. Panel du bas : Liaison des facteurs de transcription PAX8/NKX2.1/FOXE1 au niveau des séquences régulatrices et promotrices des gènes NIS, TPO, Tg, PAX8, NKX2.1, FOXE1, TSHR.

En conclusion, les différentes protéines décrites ci-dessus qui interviennent toutes dans la biosynthèse des HTs sont considérées comme des marqueurs de la différenciation thyroïdienne (Figure 12). L'expression de ces marqueurs est impactée dans différents processus physiopathologiques et en particulier lors de la carcinogenèse thyroïdienne. La compréhension des mécanismes impliqués dans la diminution de l'expression de ces marqueurs est donc capitale et représente un axe majeur de recherche.

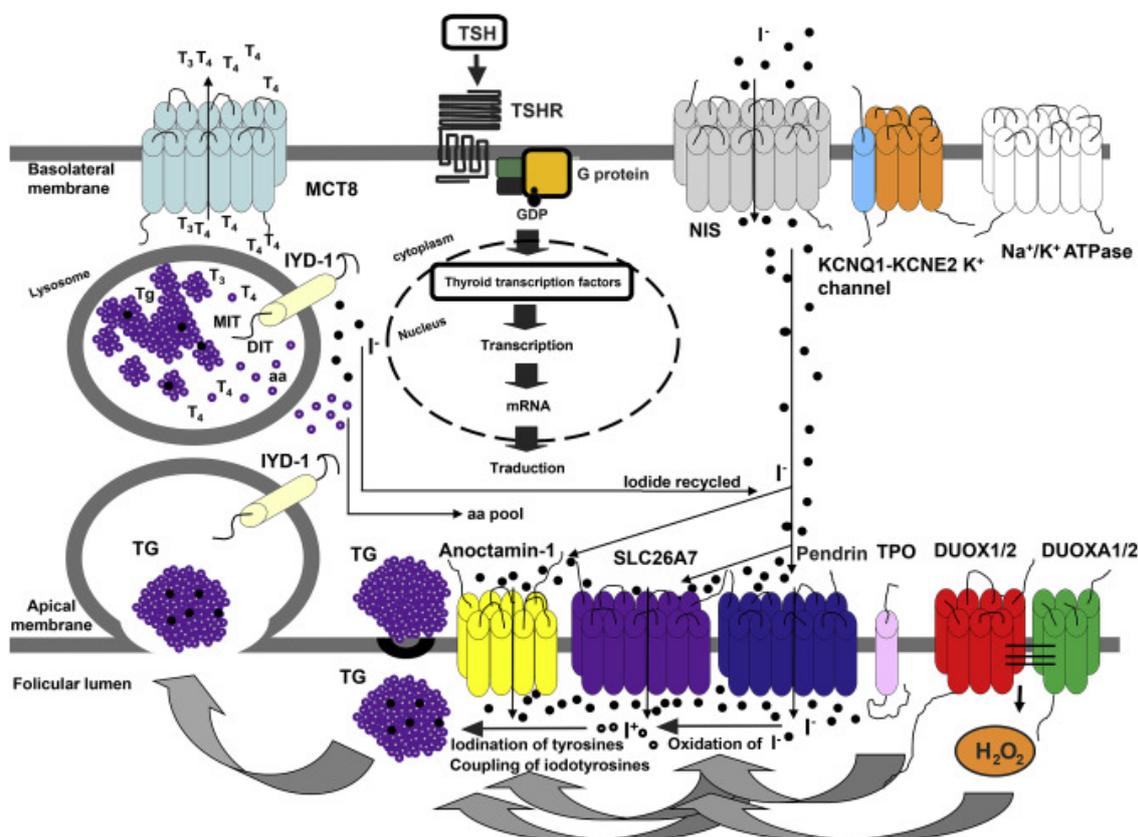


Figure 12 : Représentation schématique de la biosynthèse et du relargage des hormones thyroïdiennes, acteurs impliqués [147]

Les protéines impliquées dans ce processus sont représentées. Au pôle basal, on retrouve le transporteur de l'iode, le NIS: sodium/ iodide symporter; KCNQ1 and KCNE2: Voltage-gated K_p channels; TSHR: thyrotropin receptor; MCT8: SLC16A2 monocarboxylate transporter 8, thyroid hormone transporter. Au pôle apical, sont présents DUOX2: dual oxidase 2; DUOX2: maturation factor of dual oxidase 2; TPO: thyroperoxidase; et les transporteurs de l'iode au niveau apical dont l'implication a été démontrée par les données de littérature : Pendrine, SLC26A7, Anoctamin 1. L'oxydation de l'iode et son incorporation dans la thyroglobuline par l'iodation des tyrosines de la Tg puis le couplage des iodotyrosines dépend de la présence de la TPO et du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) produit par DUOX2. A la suite du couplage oxydatif des résidus de iodotyrosines, des molécules de DIT: diiodotyrosine, MIT: monoiodotyrosine sont obtenues au sein de la Tg. Endocytose de la Tg mature ou immature (non iodée) et fusion avec des vésicules lysosomales contenant des enzymes protéolytiques. Libération de la T₃ (condensation d'un DIT et MIT) et T₄ (condensation de deux DITs). Recyclage de l'iode par DEHAL1: iodotyrosine dehalogenase ou IYD-1: Iodotyrosine deiodinase 1. Libération des HTs au pôle basal par MCT8. L'activation de la signalisation TSHR (récepteur couplé aux protéines G) conduit à l'induction des protéines de synthèse des HTs, autrement dits facteurs de différenciation.

Partie II : La carcinogenèse thyroïdienne

1) Epidémiologie

Le cancer de la thyroïde fait partie des cancers endocriniens les plus répandus, avec une incidence en constante évolution au fil des années. Il reste un problème majeur de santé publique. Ainsi, en 2020, il se plaçait au 13^e rang des cancers les plus fréquents dans le monde [148] (Figure 13).

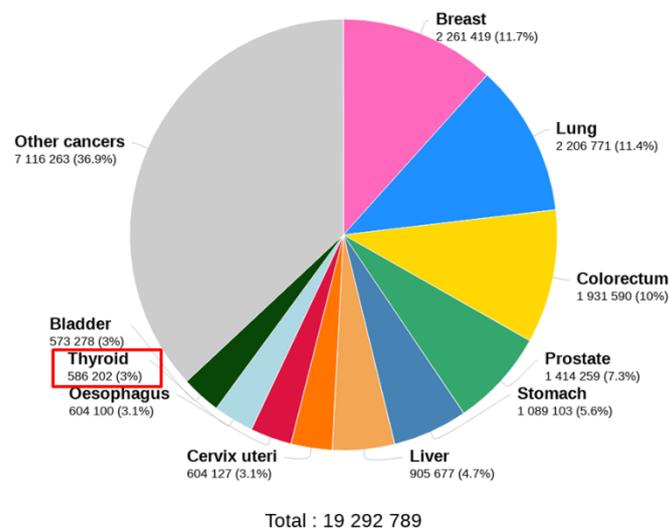


Figure 13 : Estimation du nombre de nouveaux cas de cancers dans le monde en 2020, sexe et âge confondus

Données : International Agency for Research on Cancer (IARC), GLOBOCAN 2020.

Il existe une forte disparité de fréquence d'apparition selon le sexe. Ainsi, en France par exemple, on observe une incidence de 6,2% chez les hommes contre 8,1% chez les femmes (<https://www.santepubliquefrance.fr/>). On retrouve aussi une hétérogénéité géographique certainement due à des facteurs environnementaux. La mortalité, quant-à-elle, reste faible par rapport au nombre de nouveaux cas diagnostiqués chaque année.

2) Facteurs de risque

L'incidence des cancers thyroïdiens (CTs) est influencée par des pratiques diagnostiques et cliniques optimisées, parmi elles notamment, l'imagerie médicale permettant ainsi la détection des cancers à un stade précoce de la maladie.

2.a) Rayonnements ionisants

L'exposition aux rayonnements ionisants (RI), qu'elle soit due aux procédés d'imageries médicales et thérapeutiques ou accidentelles comme les retombées radioactives, et cela principalement pendant l'enfance, est un facteur de risque avéré du cancer de la thyroïde [149-151]. En effet, une irradiation de la thyroïde conduit à la production de manière directe et indirecte, de dommages à l'ADN, qui lorsqu'ils s'accumulent sont responsable de pathologies et de la survenue de cancers [152].

Ainsi, suite-à l'accident nucléaire de Tchernobyl (1986), et à la libération de plusieurs radionucléides, parmi eux l'iode 131, une forte augmentation du nombre de CTs a été signalée dans les zones contaminées. Ces cancers, étant apparus plusieurs années après l'irradiation, ont permis d'émettre un lien entre le risque de cancer, la dose de rayonnements reçue et l'âge de l'exposition aux radiations. Une probable explication mécanistique à cela est le fait que les cellules thyroïdiennes présentent un fort potentiel prolifératif durant la vie fœtale et les premières années de l'enfance, et que les gènes impliqués dans le métabolisme de l'iode sont fortement exprimés à cette période de la vie [153-156]. De ce fait, l'organe thyroïdien est plus sensible aux RI durant l'enfance ce qui favorise l'accumulation mutationnelle responsable de la cancérogenèse. Les études sur l'incidence des CTs à l'âge adulte après expositions à des RI sont moins probantes, ce qui suggère une sensibilité moindre de la thyroïde aux RI à cette période de la vie [157, 158].

2.b) Carence en iode

Un autre facteur de risque avéré du cancer de la thyroïde, est la carence en iode. Une carence en iode affecte considérablement la fonction primaire de la thyroïde, en l'occurrence, la synthèse des hormones thyroïdiennes. Ainsi, un défaut de sécrétion des HTs entraîne une augmentation de la TSH (Thyroid Stimulating Hormone), hormone intervenant principalement dans la différenciation mais favorisant aussi la croissance et la prolifération des cellules thyroïdiennes [152, 159-161]. Il est à noter aussi qu'un taux extrêmement élevé d'iode peut augmenter également le risque de cancer [161-163]. En effet, l'iode en excès augmente la génération de ROS et donc potentiellement les dommages oxydatifs cellulaires, lesquels favorisent la carcinogenèse [30].

2.c) Facteurs héréditaires

L'incidence des formes héréditaires de CT est extrêmement faible. Ces formes dites familiales sont regroupées en deux catégories de types histologiques différents. La première est celle des cancers médullaires de la thyroïde (CMTs). 20 à 30% de ces cancers sont d'origine familiale [164]. La deuxième catégorie est celle dite des cancers non-médullaires de la thyroïde (CNMTs). Dans cette catégorie, plusieurs mutations génétiques ont été identifiées en faible proportion. La majorité des mutations décrites dans la littérature touchent des gènes codant pour des protéines qui ne sont pas totalement spécifiques à la thyroïde. De ce fait, ces mutations sont alors impliquées dans les prédispositions génétiques aux cancers affectant l'organe thyroïdien mais aussi plusieurs autres organes [165].

2.d) Autres facteurs

Affections bénignes de la thyroïde. Plusieurs autres facteurs ont été évoqués comme causes possibles du cancer thyroïdien mais leur lien causal n'a clairement pas été établi. Parmi eux les affections non cancéreuses de la thyroïde comme la présence de nodules bénins thyroïdiens ou goîtres à savoir une augmentation du volume thyroïdien. Les inflammations de la thyroïde appelées thyroïdites sont aussi des affections de type non cancéreuses mais potentiellement à risque par la suite. Il en est de même pour l'acromégalie, affection rare conduisant à un excès de sécrétion de facteurs de croissance et susceptible de conduire au développement d'un cancer thyroïdien [162].

Facteurs nutritionnels. Les facteurs nutritionnels, quant-à-eux, font encore l'objet d'études. Néanmoins, un lien semble exister entre obésité et augmentation du risque de cancer de la thyroïde [162] et notamment du fait que la dérégulation de la sécrétion de facteurs de croissance comme l'IGF-1 suite à un déséquilibre métabolique peut engendrer l'activation de voies mitogènes [166, 167].

Facteurs hormonaux. D'autres facteurs comme les facteurs hormonaux chez la femme sont suspectés depuis longtemps de jouer un rôle dans les cancers sporadiques de la thyroïde, du fait de l'incidence élevée de ce cancer chez la femme par rapport à l'homme [157, 159]. En effet, la communauté scientifique émet l'hypothèse d'un possible rôle de l'œstrogène dans le développement carcinogène. Quelques auteurs ont mis en évidence un possible crosstalk entre les signalisations TSH et œstrogène. In vivo ils ont montré que les œstrogènes potentialisent l'activation de la signalisation TSH et influencent la fonction thyroïdienne via la modulation de

l'expression de certains gènes de différenciation [168-174]. Chez l'homme, le lien entre les œstrogènes et la carcinogenèse thyroïdienne est plus difficile à évaluer. Des études complémentaires sont nécessaires pour clarifier le rôle de cette hormone dans le risque de CT.

Polluants environnementaux. Enfin et dans une moindre mesure, l'exposition à des polluants environnementaux chimiques, comme les pesticides, connus pour être des perturbateurs endocriniens ou encore des carcinogènes, sont également évoqués, mais leur effet est difficile à estimer [158, 175]. Au niveau thyroïdien, ils peuvent affecter l'axe hypothalamo-hypophysaire et entraîner une dérégulation dans la sécrétion de TSH. Certains anions comme le perchlorate, cité précédemment modulent la fonction thyroïdienne via l'inhibition du NIS et de l'organification de l'iode.

3) Traitements conventionnels

Le diagnostic des cancers de la thyroïde repose comme pour tous les cancers essentiellement sur l'utilisation de techniques d'imageries médicales adaptées, complété par des analyses histologiques et cytologiques à partir de prélèvements. Une fois le diagnostic établi, un protocole thérapeutique adéquat prenant en compte l'étendue et le type histologique du cancer est alors mis en place.

3.a) Chirurgie

La chirurgie est le traitement en première ligne des CTs. Elle consiste en l'ablation totale ou partielle de l'organe thyroïdien afin d'éviter toute trace de cellules résiduelles et tout risque de propagation.

3.b) Radiothérapie métabolique à l'iode radioactif 131 (RMI)

Le traitement chirurgical est consolidé par une irradiation à l'iode radioactif 131. Il s'agit d'une technique permettant d'irradier et d'éliminer les cellules tumorales thyroïdiennes de manière spécifique. Ce traitement repose sur l'expression par les cellules thyroïdiennes tumorales du transporteur de l'iode (NIS) responsable de sa captation et l'expression du système d'organification de l'iode.

3.b.1) Aspects cliniques et rôle fondamental du NIS

Diagnostic. Le NIS est une protéine d'importance majeure en clinique. Du point de vue diagnostique, sa présence et son rôle permet par le biais de certaines techniques d'imagerie médicale dont la scintigraphie, d'étudier la structure de la glande thyroïde et son fonctionnement. Cette technique repose sur le fait que l'iode soit capté de manière exclusive par les cellules folliculaires de la thyroïde qui l'utilisent pour la synthèse des HTs. Lors d'une scintigraphie, un radiotracer est administré, dans ce cas l'iode¹²³, celui-ci via le NIS est transporté et fixé par le tissu thyroïdien selon le degré d'activité des cellules. L'iode¹²³ après fixation et désintégration émet des rayonnements de type gamma qui sont captés par des gamma-caméras puis analysés par traitement informatique. Les émissions radioactives du traceur permettent donc de visualiser les zones d'hyperfixation « zones chaudes » où l'activité d'hormono-synthèse est intense et a contrario celles d'hypofixation appelées « zones froides » (Figure 14).

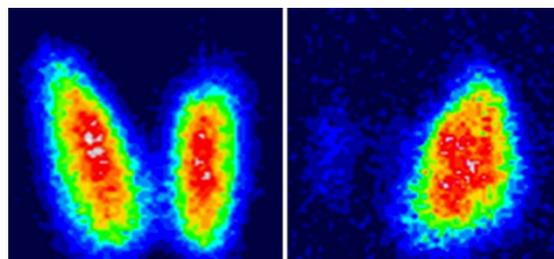


Figure 14 : Diagnostic des maladies de la thyroïde

Scintigraphie de la thyroïde à l'iode 123 montrant un cas normal à gauche et un nodule chaud volumineux à droite. Les zones sont colorées en fonction du degré de fixation du marqueur radioactif.

©CHU Avicenne

Dans le cadre de pathologies thyroïdiennes dont font partie les cancers de la thyroïde, ce processus permet d'analyser les atteintes thyroïdiennes avec la présence de nodules, et la localisation éventuelle des atteintes extra-thyroïdiennes ou métastases.

Thérapie. Dans le cadre des CTs, le NIS est une protéine présentant un enjeu capital et cela du point de vue thérapeutique. RMI est utilisée en première ligne lorsqu'une chirurgie est impossible et en deuxième ligne afin d'éliminer les cellules résiduelles. Cette technique est aussi une technique de choix pour cibler les foyers métastatiques. Comme pour la scintigraphie, RMI est basée sur la capacité des cellules thyroïdiennes à capter et fixer l'iode. Le radioisotope utilisé dans ce cas est l'I¹³¹. Ce dernier subit une désintégration bêta et émet des rayonnements gamma. Dans ce contexte thérapeutique il est administré en plus forte dose, ce qui permet l'irradiation des cellules tumorales thyroïdiennes de manière spécifique. L'irradiation des cellules aboutit à la formation de dommages cellulaires entraînant la mort des cellules.

A cette radiothérapie métabolique est associée une hormonothérapie de freinage. La TSH est l'hormone de la biosynthèse des HTs mais entraîne un effet prolifératif dans certains environnements tumoraux. Afin de maximiser les chances de rémission, une administration d'HTs est envisagée afin de maintenir la sécrétion de TSH à un taux faible via le rétrocontrôle négatif des HTs sur la sécrétion des hormones de l'axe hypothalamo-hypophysaire [176, 177]. Il est à noter que la supplémentation hormonale permet aussi de compenser la perte ou réduction de biosynthèse des HTs après une chirurgie puisque rappelons-le ces dernières interviennent dans divers processus physiologiques. La TSH quant à elle, peut aussi être administrée en amont du protocole de radiothérapie métabolique afin de potentialiser l'expression des gènes de l'organification de l'iode et d'accroître l'efficacité de cette méthode.

Dans certains types de CTs, on observe souvent un état de dédifférenciation des cellules tumorales associé à une diminution de l'expression des gènes impliqués dans la fonction thyroïdienne auxquels appartient celui codant le NIS, ce qui entraîne une perte d'efficacité de la RMI. La principale stratégie thérapeutique consiste aujourd'hui à comprendre les mécanismes intervenant dans la répression du NIS dans le but de réinduire l'expression ce gène afin de cibler les cellules cancéreuses via l'iode radioactif 131 .

La RMI est envisagée aujourd'hui comme un outils diagnostique et thérapeutique pour la détection et destruction de cancers non thyroïdiens dans lesquels le NIS serait fonctionnellement exprimé. Il a été montré que le NIS était exprimé dans plus de 80% des cancers du sein et dans plusieurs modèles d'animaux transgéniques porteurs d'adénocarcinomes mammaires via l'expression d'oncogènes, suggérant que la RMI pourrait être un outil utile dans le traitement de ces cancers [178, 179]. D'autres études ont rapporté une augmentation de l'expression du NIS et de son activité dans des lignées d'adénocarcinomes mammaires en réponse à un traitement à l'acide rétinoïque par exemple [180]. Des essais cliniques et des études additionnelles sont nécessaires pour déterminer l'importance de l'activité du NIS dans les cancers, le mode de régulation de la protéine et l'efficacité de la RMI dans ces types de cancer. De plus et partant de ce fait, un élargissement de cet outils thérapeutique à d'autres types de cancers extra-thyroïdiens n'exprimant pas le NIS de façon endogène est aussi envisagé. En effet, le but étant de transférer les cellules tumorales avec le gène codant le NIS par thérapie génique afin de rendre ces cellules sensibles à l'irathérapie.

Un obstacle fréquemment mentionné concernant l'utilisation de la radiothérapie métabolique dans les cancers extra-thyroïdiens, est la notion que ce traitement pourrait être inefficace en raison du temps de demi-vie du NIS endogène ou exogène et d'autre part du fait que les cellules non thyroïdiennes ne possèdent pas la machinerie de fixation et d'organification de l'iode. Le raisonnement est le suivant, l'absence d'organification de l'iode dans ces cellules fait que l'isotope radioactif n'est pas retenu dans les cellules pour un temps suffisamment long pour permettre la dégradation cellulaire.

Aujourd'hui, les expériences réalisées *in vitro* et *in vivo* sur modèles animaux montrent que les cellules transduites via l'utilisation de promoteurs tissu/cellule-spécifiques sont alors capables d'accumuler l'iode radioactif et deviennent sensibles à la dégradation en l'absence de systèmes d'organification [181-183]. En bref, ces résultats démontrent que l'induction du NIS via thérapie génique ou transduction de son gène ou induction de son expression endogène dans les tumeurs non thyroïdiennes peut conduire à une activité du NIS suffisante pour une destruction par irathérapie. Le degré de rétention de l'iode semble tissu-spécifique, il en est de même pour le mode de régulation de l'expression, de l'adressage et de l'activité du NIS, les études doivent être approfondies [184].

Une précaution majeure à prendre lors de l'utilisation de la radiothérapie métabolique pour des tumeurs extra-thyroïdiennes exprimant le NIS de manière endogène ou par thérapie génique est de prévenir la destruction des cellules thyroïdiennes saines par l'administration de l'I131. En effet, en raison de sa capacité à organiser l'iode, la thyroïde agit comme un réservoir pour l'isotope entraînant ainsi la destruction de la glande et limitant la quantité d'isotope disponible pour les tumeurs extra-thyroïdiennes exprimant le NIS. Il est donc essentiel de réguler négativement et sélectivement le NIS dans la thyroïde avant le début du traitement par une hormonothérapie de freinage [185]. Cette dernière n'est pas le seul moyen de réprimer le NIS puisque de fortes doses d'I⁻ via l'effet Wolff-Chaikoff a la même conséquence mais cet effet doit être étudié dans les autres organes exprimant le NIS au préalable [186].

Ces données montrent que la compréhension des mécanismes aboutissant à l'induction de l'expression du transporteur de l'iode en condition tumorale dans le but de déboucher sur un protocole de radiothérapie métabolique à l'iode radioactif constitue une nouvelle forme d'alternative thérapeutique aux traitements conventionnels et est aujourd'hui un axe majeur de recherche.

3.c) Radiothérapie externe

Il s'agit d'une technique qui consiste à soumettre la tumeur à des rayons énergétiques puissants tuant alors les cellules anormales. Elle est utilisée très rarement dans les CTs en général mais plutôt dans la forme la plus agressive du CT [187]. Cette alternative est proposée aux patients qui ne peuvent être traités par RMI ou ceux chez qui cette dernière n'a pas été totalement efficace. Elle peut être utilisée au niveau local dans des cas de tumeurs avancées qui ne concentrent pas l'iode ou pas suffisamment, et pour des métastases non résécables ou difficiles à traiter et la plupart du temps en combinaison avec une chimiothérapie cytotoxique.

3.d) Chimiothérapie cytotoxique

La chimiothérapie est un traitement médicamenteux non sélectif qui empêche la prolifération des cellules cancéreuses ou non en perturbant les mécanismes de réplication et de divisions cellulaires. Comme pour la radiothérapie externe, son utilisation est limitée uniquement aux patients présentant une maladie évolutive lorsque tous les autres modes de traitement n'ont pas fonctionné. Les réponses avec ce mode de traitement dans le CT sont le plus souvent partielles et transitoires.

3.e) Thérapies ciblées

Les thérapies ciblées sont basées sur l'utilisation de molécules pharmaceutiques qui agissent à différents niveaux de la cellule. En effet, ces molécules peuvent cibler des facteurs de croissance qui sont des messagers déclenchant la transmission d'informations au sein de la cellule, des récepteurs ou des protéines intracellulaires le plus souvent impliquées dans la transduction du signal (Figure 15). Ces différents acteurs sont mutés ou dérégulés dans les cancers. Ces molécules sont utilisées pour soigner les CTs de très mauvais pronostic et quand les traitements précédents n'ont démontré aucune efficacité.

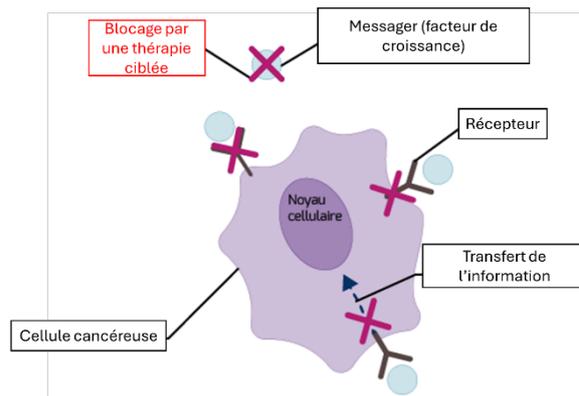


Figure 15 : Les différentes cibles des thérapies ciblées [188]

3.e.1) Immunothérapie et thérapie anti-angiogénique

La progression tumorale est la conséquence d'acquisition d'altérations génétiques par les cellules cancéreuses mais aussi d'intégration de signaux provenant du microenvironnement tumoral. Ce dernier contribue à l'échappement de la tumeur au système de surveillance immunitaire. De ce fait, une nouvelle approche thérapeutique est de comprendre les événements par lesquels les cellules tumorales ne sont plus reconnues par les cellules du système immunitaire afin de pouvoir à nouveau les mobiliser dans cette optique de défense en aboutissant à l'élimination des cellules anormales. La découverte de marqueurs immunosuppresseurs produits à la fois par les cellules cancéreuses et les cellules immunitaires a conduit les chercheurs à développer des anticorps dirigés contre ces molécules immunomodulatrices, l'objectif étant de lever l'inactivation du système immunitaire.

La progression tumorale fait intervenir en plus de l'échappement au système immunitaire, un autre processus appelé angiogenèse. En effet, au cours de l'acquisition d'un phénotype agressif, les cellules tumorales comme pour les cellules du microenvironnement sécrètent des facteurs qui permettent la prolifération des cellules endothéliales entre autres aboutissant à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins [189]. Ce processus permet à la tumeur d'être alimentée en oxygène et nutriments. La compréhension des mécanismes aboutissant à l'angiogenèse a permis de développer des molécules inhibant les acteurs de ce processus.

Ces molécules sont actuellement utilisées dans des essais cliniques chez des patients qui présentent un stade avancé de CTs. Elles sont utilisées seules ou en association avec des thérapies ciblées [420, 421].

4) Types histologiques de CTs et altérations génétiques

Un développement tumoral survient en général quand les cellules perdent leur phénotype différencié pour acquérir un caractère dédifférencié, caractérisé par un mécanisme prolifératif anormalement accru accompagné d'un échappement des cellules au processus de mort cellulaire programmée (apoptose). Une tumeur maligne se forme en général à la suite d'altérations génétiques ou épigénétiques survenant au sein d'une cellule, qui prolifère alors de manière anarchique et crée un ensemble de cellules pourvues du même matériel et contexte génétique. Les processus épigénétiques seront abordés dans le chapitre suivant.

La transformation tumorale apparaît lorsque les capacités de réparation des défaillances génétiques et/ou moléculaires par les cellules sont dépassées et ne sont plus en mesure ni d'effectuer la restauration des caractéristiques physiologiques ni d'induire la mort cellulaire.

Au fur et à mesure de la progression tumorale, les cellules cancéreuses acquièrent des mutations et caractéristiques qui leur permettent de croître en modifiant leur microenvironnement. Elles sont capables de soutenir le processus angiogénique, d'échapper au système immunitaire et d'acquérir des capacités migratoires afin de s'étendre via le sang et la lymphe dans le but de former de nouveaux foyers ou métastases. Ce processus par lequel les cellules cancéreuses développent cette capacité à migrer et envahir d'autres tissus est appelé transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et est assez bien décrite aujourd'hui.

La TEM est un processus physiologique qui se manifeste durant le développement embryonnaire et les processus de cicatrisation, elle est aussi utilisée par les cellules cancéreuses afin de former des métastases à distance. C'est un mécanisme transitoire qui peut être réversible, le processus inverse est appelé transition mésenchymo-épithéliale (TME). Certaines études montrent que les cellules cancéreuses utilisent la TME dans les sites secondaires afin de s'adapter à leur nouveau microenvironnement [190].

Il s'agit d'un mécanisme en plusieurs étapes et qui est rendu possible grâce à l'activation de la machinerie transcriptionnelle des cellules en réponse aux signaux du microenvironnement. Les mutations acquises lors de la cancérogenèse par les cellules cancéreuses permettent aussi de mettre en place les programmes transcriptionnelles de TEM.

Les voies de signalisation activées pendant la TEM durant le développement embryonnaire sont celles qui sont activées durant la progression tumorale, parmi ces voies de signalisation on retrouve notamment celles activées par les cytokines TGF- β , NF- κ B (nuclear factor-kappa B) ou les facteurs de croissance EGF (epidermal growth factor), FGF (fibroblast growth factor), HGF (hepatocyte growth factor), IGF et bien d'autres. Il est à noter que ces différents ligands peuvent être sécrétés par les cellules tumorales elles-mêmes ou par les cellules du microenvironnement [191].

Lors de la première étape, les cellules perdent leur caractéristique épithéliale et notamment leur jonction inter-cellulaire et leur capacité d'adhésion à la membrane basale via la diminution d'expression des gènes codant pour les protéines d'adhésion (E-cadhérine...). Les cellules sécrètent ensuite des métalloprotéases permettant la digestion de la membrane basale sous-jacente puis acquièrent un phénotype mésenchymateux via l'activation de l'expression de gènes codant pour des protéines (Vimentine, Fibronectine, Intégrine...) permettant l'invasion, l'intra/extravasation, la dissémination et la migration via un remodelage du cytosquelette (Figure 16).

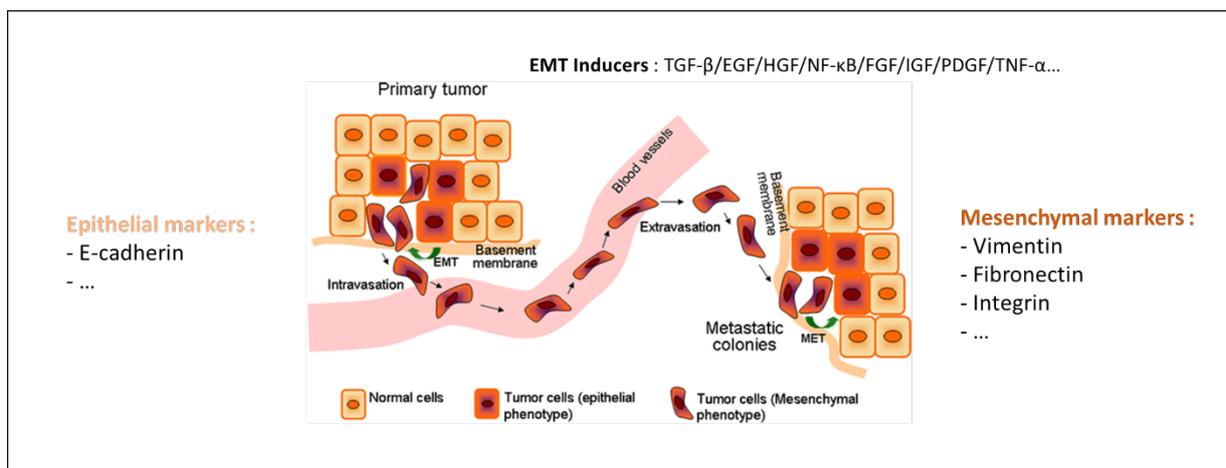


Figure 16 : Transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et processus inverse transition mésenchymo-épithéliale (TME) [192]

Sécrétion de facteurs par les cellules du microenvironnement et mutations acquises par les cellules tumorales de la tumeur primaire permettant l'activation du programme transcriptionnelle de la TEM. Perte d'expression des protéines permettant le maintien d'un caractère épithélial (E-cadhérine...). Sécrétion de métalloprotéases par les cellules cancéreuses permettant la digestion de la membrane basale. Intravasation/Extravasation (entrée des cellules dans la circulation sanguine puis sortie). Remodelage du cytosquelette et acquisition d'un phénotype mésenchymateux par l'activation de gènes codant pour des marqueurs mésenchymateux (Vimentine, Fibronectine, Intégrine...). Processus inverse TME, par les cellules cancéreuses au site métastatique secondaire afin de mieux s'adapter au nouveau microenvironnement. Facteurs inducteurs de la TEM : TGF- β , EGF, HGF, FGF, IGF, PDGF (platelet-derived growth factor), NF- κ B, TNF- α ...

Il existe quatre types de CTs qui se distinguent selon plusieurs critères, l'histologie, le type de cellules d'où démarre la carcinogénèse, les altérations génétiques, l'agressivité et la répartition au sein de la population. Plus de 80% des cancers qui se développent dans la thyroïde sont des cancers papillaires et folliculaires, ils sont dits « différenciés » et de bon pronostic. Ces deux types de cancers peuvent évoluer vers une forme dite « anaplasique » très agressive, suite à l'accumulation de mutations génétiques. Enfin, dernier type de CT, le carcinome médullaire d'origine non folliculaire, il est considéré comme cancer rare de la thyroïde.

Comme pour tous les autres cancers, les cellules cancéreuses thyroïdiennes issues des différents types histologiques présentent lors du processus métastatique une affinité pour la colonisation de certains organes en particulier, du fait d'un microenvironnement favorable. En médecine, plusieurs classifications ont été établies pour décrire la taille et le degré d'expansion des tumeurs. Plus la classification est basse, plus le pronostic est bon, l'atteinte est faible c'est-à-dire que la tumeur est de petite taille, localisée sans développement métastatique, et inversement pour les stades élevés. Les protocoles de soins aujourd'hui sont individualisés et prennent en compte le grade dans la classification tumorale (taille, atteintes ganglionnaires, extension métastatique), le contexte génétique tumoral et individuel, et d'autres facteurs personnels.

4.a) Cancer médullaire de la thyroïde

Le cancer médullaire de la thyroïde (CMT) se développe à partir des cellules parafolliculaires ou cellules C, situées entre les follicules thyroïdiens et qui sont responsables de la sécrétion de la calcitonine. Il représente environ 4% des CTs et peut surgir de manière sporadique (75%) mais les autres formes observées sont familiales (25%). Les gènes mutés dans les formes familiales de CMT sont aujourd'hui bien définis.

Altérations génétiques. Les patients atteints des formes héréditaires de CMT sont porteurs pour la plupart dans leur lignée germinale, de la mutation dite « driver » du proto-oncogène RET (rearranged during transfection). En général, une mutation driver détermine le développement d'un cancer [164].

RET est un récepteur à activité tyrosine kinase activé par des ligands de la famille GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor). L'activation de la signalisation intervient dans de multiples processus physiologiques. RET est activé par autophosphorylation à la suite de la liaison du ligand et d'ions calcique Ca^{2+} puis initie par phosphorylation l'activation de voies de transduction de signaux en intracellulaire [193]. Parmi les voies de signalisation activées par RET, on retrouve les signalisations MAPK ou PI3K (phosphoinositide 3-kinase) principalement [194] (voir figure 17).

Les mutations associées au gène RET ont aussi été trouvées dans 25 à 30% des cas de CMTs survenue de manière inopinée. D'autres mutations somatiques dans d'autres gènes et oncogènes ont été répertoriées et des polymorphismes associés à certains gènes codant pour des protéines

du cycle cellulaire, des suppresseurs de tumeurs ont aussi été découverts dans les CMTs sporadiques [195-197] (*Figure 22*).

Le cancer médullaire présente une probabilité de propagation plus importante par rapport aux cancers différenciés (folliculaire et papillaire) mais reste de meilleur pronostic par rapport au cancer anaplasique, le plus offensif.

4.b) Cancers différenciés ou cancers non médullaires de la thyroïde (CNMTs) : carcinomes folliculaire, papillaire et oncocytique

Les cancers différenciés de la thyroïde prennent naissance à partir des cellules folliculaires ou thyrocytes, responsables de la synthèse des HTs. Ils représentent la majorité des CTs diagnostiqués et sont dits différenciés en raison de leur ressemblance histologique avec le tissu thyroïdien normal et du fait dans certains cas de l'expression de quelques marqueurs de différenciation comme la Tg. Comme pour les CMTs, une grande proportion de ces cancers différenciés apparaissent de manière aléatoire mais il existe aussi quelques formes familiales. Par ces caractéristiques, les cancers différenciés sont en général de meilleur pronostic par rapport au cancers médullaire et anaplasique. On observe un haut niveau d'hétérogénéité dans les cancers non médullaires puisque dans chaque type folliculaire et papillaire, il existe de multiples sous-types avec une variabilité notamment au niveau histopathologique et génétique. Ces différents sous-types ne seront pas abordés ici.

4.b.1) Carcinome folliculaire de la thyroïde (CFT)

Les cancers folliculaires représentent environ 10% des CTs diagnostiqués juste après les cancers papillaires et dans la pratique ont tendance à se propager plus facilement que ces derniers. Ce type de cancer se développe avec l'âge puisqu'il est retrouvé essentiellement chez les personnes âgées, et chez des personnes vivantes dans des régions où l'on observe une carence en iode.

Altérations génétiques. Les cancers folliculaires sont caractérisés par un fort taux de mutations affectant le proto-oncogène « driver » RAS (30 à 40% des cas). RAS permet l'activation des voies de signalisation MAPK et PI3K/AKT (ou protéine kinase B, PKB) responsables respectivement de la prolifération et survie cellulaire (*Figure 17*).

RAS est une petite GTPase de la famille des protéines G monomériques. Ancrée à la membrane plasmique, elle est activée par de nombreux récepteurs membranaires, particulièrement les récepteurs tyrosine-kinase qui sont eux activés par de nombreux ligands dont les facteurs de croissance. En plus de la liaison du ligand sur le récepteur, l'activation de RAS est rendue possible grâce à l'échange d'un GDP contre un GTP. RAS intervient dans le remodelage du cytosquelette et dans de nombreux processus physiologiques comme la différenciation, prolifération, survie cellulaire via le recrutement et l'activation de protéines kinases effectrices de nombreuses voies de signalisation.

D'autres mutations somatiques peuvent être associées à RAS, rendant ainsi le comportement cancéreux plus agressif [198, 199]. Parmi les autres gènes somatiques mutés, on retrouve des oncogènes, des suppresseurs de tumeurs, des gènes codant pour les facteurs d'initiation de la traduction, les effecteurs des signalisations MAPK et PI3K, les régulateurs transcriptionnels, les régulateurs de la synthèse protéique et des protéines intervenant dans d'autres processus cellulaires [195, 200, 201].

Excepté la mutation « driver » RAS, une autre forme d'altération génétique a été découverte dans 30 à 60% des CMTs, il s'agit du réarrangement chromosomique PAX8-PPAR γ (Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma). La protéine de fusion qui en découle possède le domaine de fixation à l'ADN (acide desoxyribonucléique) de PAX8 spécifique à la thyroïde et l'intégralité de la séquence de PPAR γ codant pour un récepteur nucléaire (Figure 22).

Cette protéine de fusion en interférant avec la fonction de PAX8 dans la différenciation et en agissant comme un inhibiteur de la forme sauvage PPAR γ favorise le processus oncogénique [203]. De plus, le promoteur de PAX8 contrôle l'expression de la protéine de fusion et cette dernière se retrouve alors plus fortement exprimée dans les cancers différenciés par rapport aux anaplasiques. Récemment d'autres types de réarrangements chromosomiques ont été découverts dans les CFTs mettant en jeu PPAR γ et un facteur de transcription de la famille de CREB avec le même effet oncogénique.

Concernant les gènes codant pour les protéines de la différenciation, très peu de mutations associées au développement tumoral ont été trouvées. Quelques rares mutations ou polymorphismes affectant les gènes codant pour la Tg, TSHR, TPO, FOXE1, la pendrine ont été reportés, selon les auteurs la perte de fonction ou dérégulation de ces protéines entraînent

une dyshormonogénèse responsable d'une stimulation chronique de la thyroïde par la TSH, amenant à la cancérogenèse [204-210].

4.b.2) Carcinome papillaire de la thyroïde (CPT)

Les cancers papillaires de la thyroïde (CPTs) sont les cancers les plus fréquents, ils représentent 80-85% des cancers diagnostiqués. Comme pour les CFTs, les cancers papillaires sont classés comme différenciés et prennent naissance à partir des cellules folliculaires, il existe aussi quelques sous-types de CPTs. Des formes familiales ou héréditaires sont aussi détectées dans 5% des cas. Les études sur les prédispositions génétiques sont en cours. Les cancers papillaires sont majoritairement sporadiques avec toutefois une disparité selon le sexe. Les cancers différenciés dont les CPTs sont en général et majoritairement de bons pronostics, surtout lorsque la détection est précoce.

Un facteur de risque avéré du CPT est l'irradiation de la région tête et cou pendant l'enfance. Plusieurs altérations génétiques ont été trouvées chez les patients présentant des CPTs radio-induits.

Parmi elles, une forte prévalence de la translocation RET-PTC (environ 90% des cas) [211]. RET, dans la thyroïde est exprimée uniquement dans les cellules parafolliculaires ou cellules C comme énoncé dans les CMTs. PTC ou CCD6 (Coiled-coil domain-containing protein 6) est un gène qui code pour une protéine ubiquitaire considérée comme un suppresseur de tumeur car elle intervient dans la réponse aux dommages à l'ADN. Les deux gènes sont localisés sur le même chromosome et la protéine de fusion obtenue comporte le domaine tyrosine kinase de RET et la partie terminale 5' de CCD6, cette construction permet donc une expression de RET dans les cellules folliculaires de la thyroïde.

D'autres translocations impliquant RET et d'autres partenaires ont aussi été observées. La protéine de fusion nouvellement composée entraîne la dimérisation du domaine tyrosine kinase de RET et son activation constitutive, ainsi qu'une activation constitutive de la signalisation MAPK conduisant alors à la prolifération anarchique des cellules exprimant ce type de réarrangement. Dans ce contexte la translocation RET-PTC est considérée comme une altération génétique « driver » puisqu'elle conduit au développement tumoral. La signalisation PI3K-AKT est aussi activée par RET-PTC dans certaines conditions, appuyant ainsi son rôle dans la prolifération cellulaire [212]. Dans les cas sporadiques de CPTs, les réarrangements chromosomiques RET-PTC surviennent dans 10 à 20% des cas (*Figure 17*).

Les mécanismes conduisant à cette translocation chromosomique ont été faiblement étudiés mais impliqueraient des acteurs de la réparation des dommages à l'ADN. Plus récemment, une étude menée par Ameziane-El-Hassani.R et ses collaborateurs a montré que l'augmentation de la génération de ROS corrélée à l'augmentation de l'expression de DUOX1 suite aux radiations, contribue à la mise en place d'une instabilité génétique sur le long terme via la production de dommages à l'ADN [68, 69].

D'autres mutations « driver » ont été révélées, parmi elles les mutations affectant les proto-oncogènes BRAF (40-45%) et RAS (10-20%) [213, 214] (Figure 22).

Plusieurs types de réarrangements impliquant BRAF ou d'autres protéines ont aussi été découverts. Des mutations somatiques ont été trouvées dans les CPTs en association avec les mutations de gènes drivers ou seules. Parmi elles, on retrouve comme pour les CFTs, des gènes codant pour des protéines de la traduction, des effecteurs de la signalisation MAPK (70%) et PI3K (faible proportion), des gènes de la réparation de l'ADN, des suppresseurs de tumeurs, des protéines de la régulation transcriptionnelle et d'autres protéines impliquées dans d'autres processus cellulaires [215-217] (Figure 22).

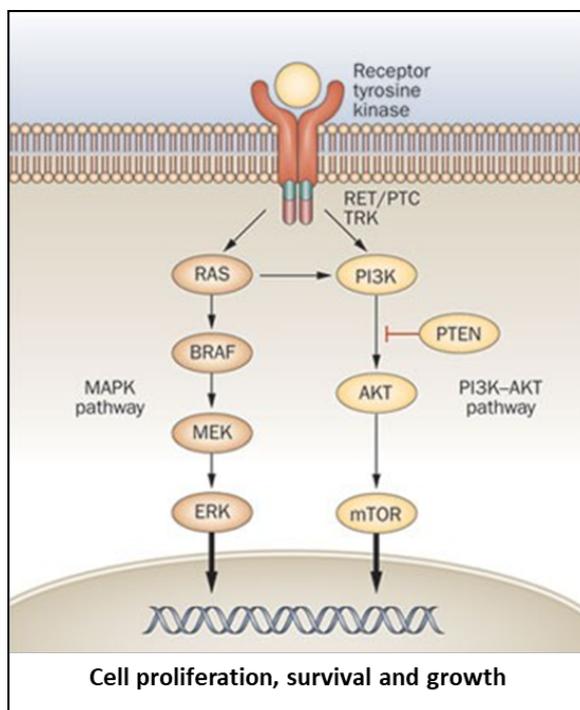


Figure 17 : Voies de signalisation principales activées durant le processus de carcinogénèse thyroïdienne [213]

Signalisation MAPK et PI3K-AKT activées dans les CMTs, CFTs, CPTs et les cancers anaplasiques de la thyroïde (CATs). L'activation de ces deux voies de signalisation aboutissent à la prolifération, croissance et survie cellulaire. La signalisation MAPK est activée par les oncogènes mutés RAS, BRAF, RET et les protéines de fusion incluant un récepteur tyrosine kinase (RTK). La signalisation PI3K-AKT est activée par RAS muté, les altérations génétiques incluant les RTKs et les effecteurs en aval tels que PTEN (Phosphatase and TENSin homolog), AKT1 ou encore la sous-unité de PI3K, PIK3CA.

▪ **Mutation de l'oncogène BRAF^{V600E} et conséquences dans les CPTs**

BRAF. BRAF est une protéine kinase effectrice de la signalisation MAPK appartenant à la famille des protéines RAF (A-RAF, B-RAF et C-RAF). Les membres de la famille RAF présentent trois régions conservées (RC). La première RC 1 est une région autorégulatrice et de liaison à la protéine RAS-GTP, la deuxième RC 2 est une région charnière et la troisième RC 3 est le domaine catalytique serine/thréonine kinase (*Figure 18*).

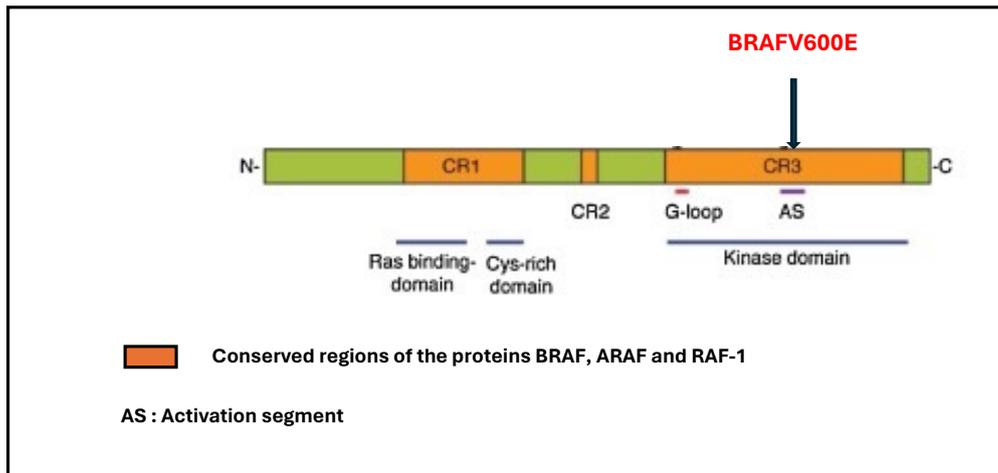


Figure 18 : Structure de l'oncogène BRAF et mutation BRAFV600E [421]

Dans sa forme inactive, le domaine N-terminal autorégulateur inhibe via des interactions intra-protéiques le domaine C-terminal kinase afin d'empêcher une probable activation de la signalisation via un contact avec les substrats ou protéines activatrices de BRAF. Cette dernière semble aussi maintenue dans sa conformation inactive via des interactions protéiques.

En condition physiologique, l'activation de BRAF est un processus qui se déroule en plusieurs étapes. BRAF est activée à la suite d'une liaison avec RAS liée à une molécule de GTP après échange de son GDP. Cette dernière elle-même est activée en réponse à une stimulation et activation des récepteurs tyrosines kinases (RTKs) principalement mais aussi d'autres types de récepteurs membranaires par des signaux externes. La fixation de BRAF à RAS permet un changement conformationnel de la protéine, ce qui entraîne l'exposition du domaine catalytique serine-thréonine kinase. Là encore une interaction protéique permettrait de stabiliser BRAF dans sa conformation « ouverte » ou active. Il est à noter qu'après sa liaison à RAS, BRAF est recrutée à la membrane plasmique, à cet endroit son activité peut être modulée par d'autres acteurs via des modifications post-traductionnelles ou via des interactions protéiques [219]. Les

phosphorylations de BRAF à la membrane contribuent à la déstabilisation de sa conformation inactive et permettent à l'inverse un maintien dans sa conformation active.

BRAF dans sa forme active complète forme un homodimère ou hétérodimère [220]. Les données indiquant une possibilité d'oligomérisation de BRAF sans liaison à RAS sont controversées. Une fois active, BRAF permet l'activation de la signalisation MAPK par phosphorylation. BRAF phosphoryle MEK1/2 (Mitogen-activated Extracellular signal-regulated Kinase 1/2) qui à son tour phosphoryle ERK1/2 (Extra-cellular signal-Regulated Kinase 1/2) qui à son tour phosphoryle et active des facteurs de transcription intervenant dans les processus cellulaires comprenant la prolifération, croissance, différenciation cellulaire entres autres (*Figure 17*).

BRAF est la principale protéine kinase de la famille RAF dont le gène est altéré dans de nombreux cancers. Les mutations de BRAF affectent les sites d'autophosphorylation et de dimérisation ou encore les sites de liaison à RAS et modulent ainsi l'activation ou le maintien de la signalisation MAPK. En condition physiologique, le signal est interrompu à l'arrêt de l'exposition des cellules aux signaux externes.

Arrêt du signal ou rétrocontrôle négatif. Le contrôle du niveau d'activation de la signalisation MAPK s'effectue à deux niveaux.

Le premier niveau d'autorégulation est assuré par ERK1/2. En phosphorylant BRAF, il permet le recrutement de protéines dont l'activité est la déphosphorylation de résidus phosphorylés, perturbant ainsi la liaison de BRAF à RAS et empêchant le processus de dimérisation qui permet son activation [221]. La phosphorylation de BRAF par ERK1/2 entraîne le recrutement de deux protéines phosphatases, PP2A (protéine phosphatase 2) et Pin-1 ou PPIase (peptidyl-prolyl cis/trans isomerase). En déphosphorylant BRAF, elles contribuent à déstabiliser les homo/hétérodimères à des fins de recyclage et diminuent ainsi le signal. En plus de BRAF, ERK1/2 phosphoryle d'autres cibles de la signalisation MAPK avec pour objectif l'atténuation du signal [222]. Il est à noter que les sites de phosphorylation dépendants de ERK1/2 peuvent être mutés, plusieurs mutations ont été décrites dans la littérature.

Le deuxième niveau de contrôle de l'activité de la signalisation MAPK concerne d'autres types de protéines phosphatases, les DUSPs (Dual Specificity Phosphatases). Les différents membres de la famille DUSP présentent une variabilité dans la spécificité du substrat, dans leur distribution tissulaire, dans leur localisation subcellulaire et leur mode de régulation. Dans la thyroïde, deux DUSPs contrôlent le niveau d'activation de la signalisation MAPK en

désactivant ERK1/2 par déphosphorylation. L'expression des DUSPs 5 et 6 semble être contrôlée par la signalisation MAPK et dépendante de ERK1/2. Les équipes d'Anna Kucharska, Marchetti S et leurs collaborateurs ont montré que DUSP 5 et 6 sont aussi capables d'être phosphorylées par ERK1/2 [223-226], ce qui influencerait sur leur stabilité.

Dans les CPTs, DUSP5 et 6 sont surexprimées. Cette surexpression est probablement corrélée à l'augmentation et l'activation chronique de la signalisation MAPK dans ce type de cancer. En raison de leur rôle physiologique, l'hypothèse la plus probable est que l'augmentation de l'expression de ces protéines, en contrôlant le taux de p-ERK1/2, atténuent la signalisation MAPK, laquelle lorsqu'elle est suractivée peut conduire à l'apoptose. Elles auraient donc un rôle antitumoral [226]. L'ensemble de ces données augmentent ainsi le niveau de complexité concernant les mécanismes de modulation de la signalisation MAPK.

BRAF^{V600E}. La mutation BRAF^{V600E} consiste en une substitution de la valine avec l'acide glutamique en position 600 de la protéine, elle est présente dans 45 à 60% des CPTs [199, 213, 216]. Selon certaines études, cette mutation cause un mimétisme des phosphorylations de BRAF à la membrane et permet une stabilisation de cette dernière dans sa conformation active. Depuis longtemps, il a donc été établi que BRAF^{V600E} permet la formation d'un monomère constitutivement actif, indépendamment de la liaison à RAS, indépendamment des processus de dimérisation et insensible au rétrocontrôle négatif exercé par ERK1/2 [222, 227, 228]. Récemment le fait que BRAF^{V600E} soit active sous forme de monomère a été remis en cause mais ces données semblent assez controversées [227, 229]. Des études supplémentaires doivent permettre d'approfondir le mode d'activation de BRAF^{V600E}.

En attendant, l'hypothèse d'une monomérisation de BRAF^{V600E} est majoritaire dans la littérature scientifique et les données indiquent que la forte activation de la signalisation MAPK observée

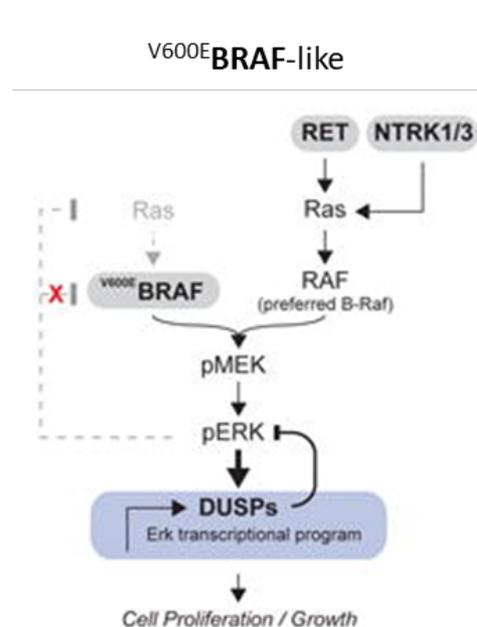


Figure 19 : Signalisation MAPK dans les CPTs arborant la mutation BRAF^{V600E} [443]

BRAF^{V600E}, monomère constitutivement actif permettant la phosphorylation de MEK1/2 puis ERK1/2. Absence de rétrocontrôle négatif sur le signal par la phosphorylation médiée par ERK1/2. Expression des DUSPs contrôlée par la signalisation MAPK et déphosphorylation de ERK1/2 et MEK1/2.

avec ce type de mutation de BRAF est due à l'absence de régulation du signal par le contrôle de la dimérisation (voir figure 19).

Conséquences de la mutation $BRAF^{V600E}$ dans les CPTs. Certaines études ont montré que la mutation $BRAF^{V600E}$ comparée aux autres mutations affectant BRAF permet une haute intensité d'activation de la signalisation MAPK [226]. Cette activation constitutive et de forte intensité de la signalisation MAPK est associée à un phénotype prolifératif et invasif. Comparé aux autres types de CTs, peu d'altérations génétiques sont retrouvées dans les CPTs, seules ou en association avec la mutation driver $BRAF^{V600E}$. Par conséquent, le développement et la progression des tumeurs arborant ce type de mutation sont majoritairement dus aux événements qui découlent de l'activation constitutive de la signalisation MAPK [216].

1) Dédifférenciation.

Les CPTs mutés $BRAF^{V600E}$ peuvent devenir réfractaires à l'irathérapie, c'est-à-dire incapables de capter l'iode radioactif, en raison d'une répression de l'expression du gène codant le NIS. Des études ont montré qu'en plus du NIS, les gènes permettant l'organification de l'iode et plus généralement les gènes de la différenciation sont également réprimés sous l'action de cet oncogène.

Le projet TCGA (The Cancer Genome Atlas) consiste en une analyse multifactorielle de 496 CPTs. Cette analyse comprend la classification des caractéristiques histologiques, moléculaires, génétiques, épigénétiques, l'expression génique et protéique, les signalisations, l'état de différenciation entre autres, des CPTs. Ce projet a été développé dans le but de faciliter la classification des CPTs et de leur sous-type et ce, dans le but d'améliorer la prise en charge des patients.

Tous les critères d'analyse ne seront pas abordés ici mais dans un premier temps les auteurs ont classé les CPTs selon qu'ils soient mutés pour $BRAF^{V600E}$ (ou présentent des caractéristiques génétiques et phénotypiques identiques à ceux mutés $BRAF^{V600E}$) ou RAS (y compris les CPTs qui présentent des caractéristiques génétiques et phénotypiques similaires à ceux mutés RAS). Ils ont ensuite évalué le niveau d'activation de la signalisation MAPK en déterminant le profil d'expression de nombreux gènes régulés positivement ou négativement par MEK1/2 et ont aussi évalué le profil d'expression au niveau transcriptionnel de plusieurs gènes de la différenciation, dont ceux impliqués dans le métabolisme de l'iode et la fonction thyroïdienne.

L'intégration de toute ces données a permis d'établir un score de différenciation thyroïdienne et d'obtenir une signature spécifique des CPTs arborant la mutation BRAF^{V600E}. Les résultats confirment dans un premier temps, la forte activation de la signalisation MAPK dans les CPTs mutés pour BRAF^{V600E}. Les gènes de la fonction thyroïdienne analysés (Tg, TPO, pendrine, NIS, SLC5A8, DIO1 et 2, DUOX1 et 2) présentent une expression faible, voire nulle, et cette répression génique est associée à un faible score de différenciation [216]. D'autres gènes de différenciation non cités dans l'étude intégrative comme le gène TSHR affichent une expression faible dans les CPTs avec la mutation BRAF^{V600E} avec néanmoins une variabilité interindividuelle [230] (Figure 20).

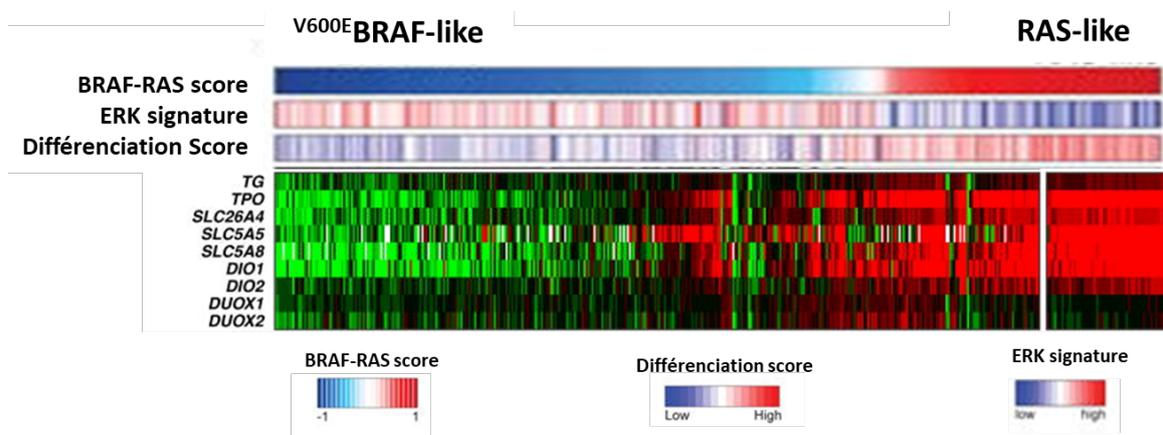


Figure 20 : Dédifférenciation dans les CPTs, analyse intégrative [216]

Classification des CPTs selon leur état mutationnel (score BRAFV600E-like ou RAS-like). Analyse de la signature de ERK1/2, du score de différenciation et de l'expression des gènes de différenciation thyroïdienne (Tg, TPO, pendrine, NIS, SLC5A8, DIO1, DIO2, DUOX1, DUOX2). Forte activation de la voie de la signalisation MAPK (signature de ERK1/2 élevé) associée à un faible score de différenciation et une faible expression des gènes de la différenciation.

En plus de son implication dans les processus de dédifférenciation, la mutation BRAF^{V600E} dans les CPTs, dits histologiquement différenciés et de bon pronostic, peut favoriser dans certains cas un terrain mutationnel et conduire ainsi à des caractéristiques clinico-pathologiques agressives avec notamment une invasion extra-thyroïdienne. Les métastases issues du CPT représentent un challenge thérapeutique en raison du fait que les cellules soient réfractaires à l'irathérapie qui constitue le principal traitement et le traitement de première ligne des CPTs métastatiques. Ces données soulignent donc l'importance de la compréhension des mécanismes amenant au processus de dédifférenciation.

2) Potentialisation de la sécrétion de TGF- β

Une étude fondamentale menée par Garcilaso Riesco-Eizaguirre et ses collaborateurs a montré une implication de BRAF^{V600E} dans le mécanisme de dédifférenciation et aussi de TEM via la sécrétion du facteur de croissance TGF- β [231]. Ce résultat a depuis été confirmé par d'autres équipes [232, 233]. Il apparaît que les acteurs de la signalisation TGF- β sont surexprimés dans les CPTs et que cette molécule sécrétée agit de manière autocrine sur les cellules cancéreuses. L'activation de la signalisation TGF- β conduit à la répression du NIS et à l'activation du programme transcriptionnel responsable de la TEM [232]. Ainsi, une coopération existe entre les signalisations MAPK et TGF- β dans le processus d'invasion cellulaire [231] ainsi que dans la mise en place du processus de TEM [234] et il a été montré qu'une augmentation de l'expression de TGF- β est inversement corrélée à l'expression du NIS. Ces études ont démontré que le TGF- β est un acteur clé de la dédifférenciation et de la progression tumorale dans les CPTs.

TGF- β en plus d'être un facteur de croissance, est une cytokine multifonctionnelle produite à l'origine par les cellules du système immunitaire mais aussi par les cellules cancéreuses. Elle appartient à la superfamille des facteurs de croissance transformants (TGF- β 1/2/3 et d'autres protéines de signalisation) et intervient dans de nombreux processus physiologiques comme le développement, la croissance et l'homéostasie des différents tissus ou organes et des processus cellulaires comme la croissance et prolifération des cellules, l'apoptose ou mort cellulaire programmée, la cicatrisation, la régulation des réponses immunitaires...

Structure du TGF- β . TGF- β est synthétisée sous forme d'une pré-pro-protéine latente (pré-pro-TGF- β) qui va subir une série de clivages protéolytiques. TGF- β tout au long de son trafic vésiculaire puis après sécrétion au niveau de la matrice extracellulaire (MEC) va être associée à des complexes protéiques dans le but de la garder dans un état inactif et d'apporter un contrôle supplémentaire dans l'activation de cette signalisation.

Activation du TGF- β . L'activation du TGF- β par sa libération du complexe semble être spécifique au type cellulaire et au tissu. TGF- β est libérée du complexe protéique par l'action d'enzymes de la MEC comme les MMPs (matrix métalloprotéinases). Son activation dépend aussi de mécanismes allostériques. Les liaisons entre les protéines du complexe et TGF- β peuvent être déstabilisées selon certains paramètres cellulaires comme le pH, l'état d'oxydation, d'autres interactions protéiques permettant ainsi la libération de cette dernière.

Signalisation du TGF- β , voie canonique. Une fois libre, le TGF- β peut alors se fixer sur son récepteur membranaire TGF- β R. Ce dernier est alors composé de deux types de sous-unités (1 et 2) qui présentent une activité catalytique kinase. Il existe un troisième type de sous-unité sans activité catalytique mais qui médie la liaison du ligand au récepteur. TGF- β se lie au TGF- β R2 qui phosphoryle et active TGF- β R1. Ce dernier phosphoryle à son tour les effecteurs de la signalisation TGF (Figure 21).

La voie canonique de transduction du signal TGF fait intervenir les protéines SMAD (Sm-mothers against decapentaplegic). Il existe trois classes de SMAD, les R-SMADs qui comportent SMAD2 et 3, la co-SMAD dont l'unique membre est SMAD4 et les I-SMADs avec SMAD6 et 7. SMAD2 et 3 sont associées dans le cytosol à une protéine d'ancrage et lors de l'activation de la signalisation, elle se dissocient de cette protéine suite à leurs phosphorylations faites par TGF- β R1. Elles s'associent ensuite à SMAD4 et forment un hétérodimère qui migre vers le noyau et active la transcription de gènes impliqués dans les processus biologiques.

Terminaison du signal. Il est à noter que parmi les gènes dont la transcription est activée par l'activation de la signalisation TGF- β , on retrouve ceux codant les SMAD6 et 7, qui, à l'inverse, sont impliquées dans la terminaison du signal, et cela de différentes manières. Elles empêchent les associations entre les R-SMADs et TGF- β R1 ou SMAD4 par une inhibition compétitive en s'associant à TGF- β R1. Elles sont aussi capables de

recruter des phosphatases qui déphosphorylent les résidus phosphorylés et interrompent la progression du signal ou encore de recruter les facteurs permettant l'internalisation des TGF- β Rs pour une possible dégradation ou un recyclage. Elles agissent directement comme répresseurs transcriptionnels en empêchant la fixation des hétérodimères SMAD2/3 et 4 à l'ADN via une inhibition compétitive ou en interagissant avec des co-répresseurs

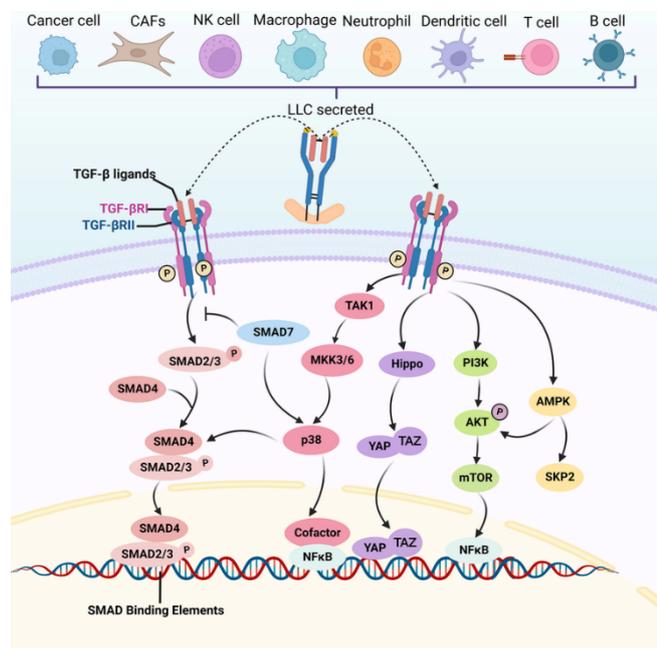


Figure 21 : Signalisation TGF- β [235]

Ligand TGF- β sécrété par les cellules du microenvironnement et par les cellules cancéreuses. Fixation du ligand sur son récepteur, autophosphorylation et phosphorylation des effecteurs. Voie canonique, effecteurs SMADs. Voie non canonique, effecteurs des signalisations MAPK, PI3K, Hippo, AMPK...

transcriptionnels. Enfin , les I-SMADs servent de plateforme pour le recrutement d'enzymes E3 ubiquitine ligases comme Smurf1 ou 2 (Smad ubiquitination regulatory factor 1 or 2) afin de permettre la dégradation des TGF- β Rs [236, 237]. Notons aussi que la fonction des I-SMADs est contrôlée par des modifications post-traductionnelles et des interactions protéiques.

Signalisation du TGF- β , voie non canonique. L'activation de la signalisation TGF- β peut aussi passer par d'autres types d'effecteurs appartenant à d'autres voies de signalisation cellulaire indépendamment des SMADs. Il a été montré que la transduction du signal TGF- β pouvait passer par des effecteurs des signalisations PI3K-AKT, MAPK-JNK, RhoA (Ras homolog family member A)-CDC42 (cell division control protein 42), MAPK-ERK1/2 [236] (*Figure 21*).

TGF- β dans les cancers. Une activation aberrante de la signalisation TGF- β est retrouvée dans de nombreux cancers. Les différents acteurs de la signalisation TGF- β y compris le TGF- β lui-même sont souvent augmentés dans ces situations pathologiques. Ajouté à cela, le fait que TGF- β est aussi produit par les cellules du microenvironnement tumoral et souvent dans le but de contribuer au développement cancéreux. Cette cytokine agit en tant qu'immunosuppresseur et inhibe la réponse immunitaire antitumorale, c'est aussi un promoteur de l'angiogenèse. En dernier lieu, le TGF- β est un puissant activateur de la TEM. Les mécanismes par lesquels TGF- β contribue à la mise en place de ces processus sont assez bien connus et sont toujours à l'étude pour certains. TGF- β est donc un acteur majeur de la progression tumorale.

En fin de compte, deux voies de signalisation prédominent dans les CPTs mutés pour l'oncogène BRAF en position V600E, la signalisation MAPK et TGF- β . Ces deux signalisations interagissent et communiquent entre elles afin de promouvoir la dédifférenciation d'une part et la progression des cellules tumorales. Les mécanismes et acteurs impliqués sont à éclaircir.

4.b.3) Cancer oncocytique de la thyroïde (COT)

Longtemps considéré comme un sous-type de CFT, le cancer oncocytique de la thyroïde ou cancer à cellules de Hürthle est classé aujourd'hui comme le troisième et dernier type de cancer différencié. Il s'agit d'un cancer extrêmement rare puisqu'il représente 3 à 4% des CTs diagnostiqués. Les COTs sont sporadiques, ils surviennent plus fréquemment chez les personnes âgées avec une disparité d'apparition selon le sexe. Du point de vue clinique, c'est

le cancer le plus agressif des cancers différenciés. C'est un cancer moins sensible à l'irathérapie comparé aux CFTs et CPTs. L'origine cellulaire des cancers à cellules de Hürthle est controversée. Quelques marqueurs de différenciation ont été récemment trouvés faisant dire que l'origine serait folliculaire [238]. En condition physiologique, les cellules de Hürthle présentent une abondance de mitochondries en intracellulaire dont la fonction reste inconnue. De ce fait ces cellules présentent une certaine sensibilité à l'hypoxie.

Concernant les altérations génétiques, de nombreuses mutations (50 à 60% des COTs) dans l'ADN mitochondrial ont été observées surtout dans les gènes codant pour les sous-unités de du complexe I de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale, accompagnées d'une altération de la chaîne respiratoire mitochondriale et d'une déficience énergétique. Ces mutations conduisent à l'accumulation de mitochondries anormales. D'autres mutations somatiques ont été trouvées dans plusieurs gènes codant pour des protéines des signalisations RTK/RAF/RAS/AKT et dans une faible proportion des protéines de remodelage de la chromatine et de la réparation de l'ADN. Les COTs sont aussi caractérisés par des altérations chromosomiques, des cas d'aneuploïdie ont été détectés dans une fréquence assez élevée. Le mécanisme conduisant à ces altérations chromosomiques n'est pas connu et leurs rôles dans la progression tumorale ne sont pas clairs [239] (*Figure 22*). Les études sont insuffisantes du fait de la rareté de ce type de cancer.

4.c) Cancer anaplasique de la thyroïde

Les carcinomes anaplasiques de la thyroïde (CATs) sont les CTs les plus agressifs, le taux de survie à compter du diagnostic est d'environ 6 mois et ils représentent environ 1% des CTs diagnostiqués. Ils sont essentiellement détectés chez les personnes âgées, une prédominance féminine est encore observée dans ce type cancéreux [240].

Les CATs sont issus de la prolifération des cellules folliculaires. Ils peuvent évoluer de manière directe ou à partir des types cancéreux différenciés papillaires et folliculaires suite à une accumulation mutationnelle. On y retrouve donc en plus des altérations génétiques retrouvées dans les cancers différenciés (BRAF, RAS, RET...), d'autres mutations dans d'autres oncogènes (TERT, Telomerase Reverse Transcriptase) ou suppresseurs de tumeurs (p53) aboutissant à un phénotype plus agressif. Des mutations dans les gènes codant les protéines du cycle cellulaire, du remodelage de la chromatine, du remodelage du cytosquelette, de la

régulation de l'expression génique, de la signalisation PI3K-AKT et des protéines de la réparation de l'ADN ont été trouvées [241]. Une faible proportion de CATs peut se développer de manière sporadique indépendamment de la présence d'un contexte tumoral au préalable via la survenue de mutations somatiques [242] (*Figure 22*). Les marqueurs de différenciation sont complètement réprimés dans les CATs.

Les carcinomes anaplasiques selon tous ces événements préalablement cités restent un challenge pour la prise en charge thérapeutique des patients atteints. Les traitements conventionnels permettent aujourd'hui un bref ralentissement de la progression de la maladie puisque l'établissement de métastases résecables et principalement non résecables restent la majeure cause de décès du CT. Les CATs sont incurables, d'où la nécessité de comprendre les mécanismes aboutissant à la survenue et à la progression de la maladie dans le but de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

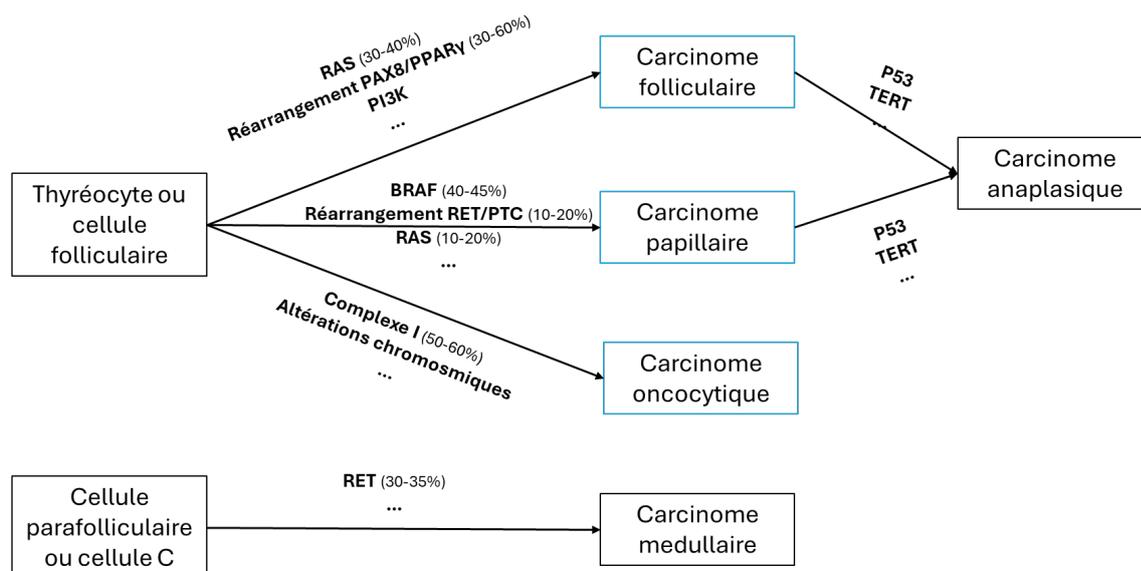


Figure 22 : Types histologiques de CTs et altérations génétiques
En bleu : cancers différenciés

5) Nouvelle stratégie thérapeutique « Re-différenciation »

Les conséquences de l'activation constitutive de BRAF^{V600E} conduisent à un processus de dédifférenciation des cellules tumorales thyroïdiennes. La répression de l'expression du NIS

peut mener à une impasse thérapeutique si les traitements en termes de re-différenciation n'ont démontré aucune efficacité.

La découverte des altérations génétiques dans les différents types de CTs et leurs conséquences a permis de développer de nouvelles molécules qui conduisent à la restauration de signalisations dont l'état d'activation est proche de la physiologie. Dans le cas des CPTs arborants la mutation BRAF^{V600E}, les molécules pharmaceutiques développées permettent l'inhibition de différents composants de la signalisation MAPK. Un des premiers essais cliniques sur l'homme, menée par Alan L Ho et ses collaborateurs avec le Selumetinib, inhibiteur de MEK1/2 a montré des résultats positifs sur la réinduction du transporteur

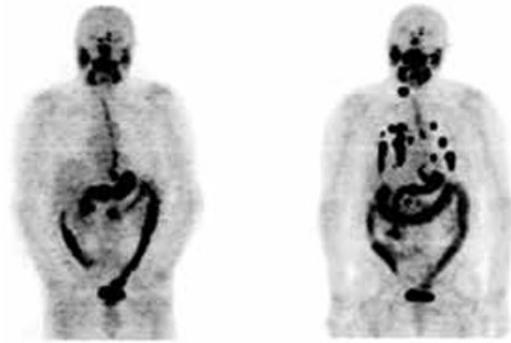


Figure 23 : Dosimétrie à l'¹²⁴I d'un patient présentant de multiples lésions métastatiques [496]

Panel de gauche : avant traitement. Panel de droite : après traitement Selumetinib, restauration de la captation de l'iode et visualisation par dosimétrie ¹²⁴I des nodules métastatiques.

de l'iode [243]. Les patients ont ainsi été traités dans un premier temps avec un analogue de la TSH et une dosimétrie de contrôle à l'iode 124 a été effectuée. Les lésions métastatiques non visibles dans ce cas le sont devenues ensuite chez certains patients après le traitement par le Selumetinib. Ces patients ont ainsi pu bénéficier ensuite d'un traitement par irathérapie (Figure 23).

Cependant, il a été observé un différentiel dans la réponse selon si les patients présentaient des tumeurs mutées BRAF ou RAS. En effet, un meilleur taux de réponse a été observé chez les patients présentant des tumeurs mutées pour l'oncogène RAS. Une des explications est que l'activation de la signalisation MAPK dans les cancers arborant des mutations de BRAF est beaucoup plus forte en raison notamment de l'absence de rétrocontrôle négatif du signal médié par ERK1/2. Par conséquent, l'inhibition de cette signalisation par le Selumetinib peut dans certains cas être incomplète.

In vitro, l'inhibition de MEK1/2 a permis de restaurer l'expression des gènes de la différenciation dans des cellules thyroïdiennes mutées BRAF^{V600E} [244].

Par la suite, plusieurs types d'inhibiteurs de la signalisation MAPK ont été développés avec des cibles différentes au sein de la signalisation MAPK avec une efficacité variable. La Food and Drug Administration (FDA) aux Etats-Unis a approuvé trois inhibiteurs de kinases dans le

traitement des cancers avancés réfractaires à l'iode 131, le sorafenib (2013), le lenvatinib (2015) et le selpercatinib (2020). Ces molécules bloquent les tyrosines kinases suractivées dans la signalisation MAPK telles que RET, RET-PTC entres autres [199].

Le dabrafenib, inhibiteur de BRAF et le trametinib, inhibiteur de MEK1/2 sont aujourd'hui utilisés ensemble dans le traitement des formes avancées de différents types de cancers porteurs de la mutation BRAF^{V600E}. L'association de ces deux molécules a montré une potentialisation de l'activité antitumorale dans les modèles pré-cliniques. Dabrafenib et trametinib sont actuellement utilisées dans plusieurs essais cliniques de phase II, dans plusieurs pays, chez des patients présentant un CT localement avancé ou métastatique muté BRAF^{V600E}. Ce traitement a permis chez certains patients une diminution du volume tumoral et a amélioré la survie à long terme [245, 246].

Cette association a aussi permis la réinduction du NIS et des gènes de l'organification de l'iode [247-249]. Un essai clinique de phase II (MERAIODE) mené par S.Leboulleux et son équipe à l'institut Gustave Roussy, a montré que l'association du dabrafenib et du trametinib est efficace dans la restauration de la captation de l'iode chez les patients porteurs d'un cancer différencié de la thyroïde muté BRAF^{V600E}.

Chez certains patients (10%), une absence de réinduction de la captation de l'iode a été observée après traitement dabrafenib/trametinib ou autres inhibiteurs de la signalisation MAPK. Les mécanismes impliqués dans cette absence d'effet sont à élucider. Une possible explication à cela, est le développement de résistances aux inhibiteurs de BRAF^{V600E} [250], avec la survenue de mutations secondaires permettant l'activation de voies de signalisation parallèles. Ces données démontrent encore plus la nécessité de mieux comprendre les mécanismes conduisant au processus de dédifférenciation.

La survenue de ces mécanismes de résistance a conduit les auteurs à envisager d'autres modes de stratégie thérapeutique comme les combinaisons [251]. Une de ces options s'appuie sur la combinaison de molécules inhibant la signalisation MAPK avec d'autres signalisations activées en parallèle.

En résumé, la re-différenciation thyroïdienne, en conduisant à la réexpression du NIS ainsi qu'à celle des gènes de l'organification de l'iode pour bénéficier de l'irathérapie reste aujourd'hui une des meilleures options thérapeutiques pour les patients présentant un CPT muté BRAF^{V600E} localement avancé ou métastatique. Des études complémentaires permettant de mieux appréhender d'une part les mécanismes de résistance aux inhibiteurs de la signalisation MAPK

et d'autre part ceux impliqués dans la répression du NIS dans les CPTs mutés BRAF^{V600E}, pourraient contribuer à l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Part III : Mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance thérapeutique et le processus de dédifférenciation thyroïdienne

L'étude des mécanismes régulant l'expression du NIS a mis en évidence pour la première fois, aux alentours des années 2000, une probable régulation redox. Cinzia Puppini et ses collaborateurs ont montré que le facteur APE/Ref1 (apurinic apyrimidinic endonuclease/redox factor 1) sensible à l'état redox des cellules intervient dans l'activation transcriptionnelle du NIS [252, 253]. Plus tard, un des mécanismes de l'effet Wolff–Chaikoff impliquant les ROS a été publié. Leoni S.G et ses collaborateurs ont montré que l'excès d'iode entraîne l'augmentation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui régule négativement l'expression transcriptionnelle et protéique du NIS ainsi que son activité [254]. Plusieurs autres équipes ont par la suite confirmé une régulation de l'expression du NIS, de sa localisation membranaire et de son activité par les ROS.

Ces données indiquent un rôle potentiel du stress oxydatif dans la dédifférenciation et dans les mécanismes sous-jacents.

1) Stress oxydatif et cancer thyroïdien

1.a) Espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Les ROS sont des espèces oxygénées rendus chimiquement réactives par la présence dans leurs structures d'électrons non appariés. En d'autres termes ce sont des molécules instables auxquelles il manque un électron. Parmi ces espèces, on retrouve les radicaux libres avec l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le radical hydroxyl (HO°). Sont aussi regroupés dans cette classification, des dérivés non radicalaires dont le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'oxygène singulet (1O_2). Certaines espèces réactives de l'oxygène sont des précurseurs pour la synthèse d'autres espèces. L'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 par exemple peuvent conduire à la formation de radical hydroxyl HO° par la réaction d'Haber-Weiss ou Fenton en présence de fer par exemple.

Les espèces réactives de l'oxygène sont produites par de multiples sources exogènes et endogènes. Parmi les sources exogènes, on retrouve les radiations ionisantes (rayons X, α , β , γ) qui par la radiolyse de l'eau produisent des radicaux peroxydes ($H_2O \longrightarrow HO^\circ + H^+$).

Plusieurs systèmes endogènes professionnels et non professionnels sont responsables d'une production de ROS cellulaire. Parmi les systèmes professionnels c'est-à-dire dont l'unique fonction est la synthèse d'espèces réactives de l'oxygène on retrouve les différents membres de la famille des NADPH oxydases (NOXs). Les systèmes non professionnels sont des systèmes dont l'activité entraîne une production de ROS secondaires et parmi ces systèmes on retrouve la chaîne respiratoire mitochondriale, certaines enzymes cellulaires comme la xanthine oxydase, la gluco-oxygénase, la lipo-oxygénase, la cyclo-oxygénase entres autres (Figure 24).

Sources of ROS	
Endogenous	Exogenous
NAD(P)H oxidase Mitochondria Peroxisomes Cytochrome P450 Xanthine oxidase Cyclooxygenase Lipoxygenase γ -Glutamyl transpeptidase	Environmental toxins Ionizing radiation Ultraviolet light Electrical fields Chemotherapeutics Inflammatory cytokines

ROS

Figure 24 : Tableau récapitulatif des sources exogènes et endogènes de ROS au niveau cellulaire [255]

Les ROS selon leur réactivité sont des espèces plus ou moins diffusibles. Le radical hydroxyl, espèce oxydante la plus réactive est celle qui présente la durée de vie la plus courte car elle oxyde des substrats au niveau de son lieu de production. Peu de données existent sur la diffusibilité des ROS au sein de la cellule. Ces espèces qu'elles soient polarisées ou pas diffèrent dans leur capacité à diffuser à travers les membranes et dans leur capacité réactionnelle. Le peroxyde d'hydrogène, non polarisée, est la molécule la plus stable des espèces oxygénées, et est celle qui diffuse le plus facilement à travers les membranes biologiques [256]. Dans la physiologie cellulaire, il est important de noter que les ROS présentent une action locale au niveau de leur site de production du fait de la présence dans la cellule de multiples systèmes de détoxification.

1.b) Systèmes antioxydants

Les ROS ainsi que les produits oxydés sont dégradés ou détoxifiés par l'action de composés antioxydants, parmi lesquels on retrouve des systèmes enzymatiques et non enzymatiques.

Systèmes enzymatiques. Les systèmes de détoxification enzymatique sont présents dans la majorité des cellules de l'organisme. Une grande partie de ces enzymes sont de type oxydoréductase. Parmi ces enzymes, on retrouve notamment les métalloprotéines comme la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase (CAT) qui utilisent dans leur site actif des cofacteurs comme le fer, le cuivre, ou le zinc qui permettent le transfert d'électrons nécessaire à la réduction des ROS. Les autres enzymes comme la glutathion peroxydase (GTPx), la glutathion reductase (GSR), la glutathion transférase (GST), le système thioredoxine (TRX)/thioredoxine reductase ou encore la peroxiredoxine (PRX) catalysent la réduction des ROS grâce à la présence de cystéines dans leur site actif. Ces cystéines sont oxydées par les ROS et nécessitent la présence d'autres molécules cofacteurs à propriété oxydo-réductrice comme le NADPH, le glutathion (γ -L-Glutamyl-L-cystéinyglycine) pour un retour à l'état initial.

La thyroïde exprime les gènes codant pour les enzymes antioxydantes citées précédemment.

Systèmes non enzymatiques. Parmi les systèmes non enzymatiques, on retrouve des composés dont le but est d'inhiber la propagation des réactions radicalaires en fournissant des hydrogènes aux radicaux libres présents ou encore de piéger les espèces réactives, c'est l'effet « scavenger ». Certaines de ces molécules sont présentes et synthétisées par l'organisme mais d'autres sont souvent retrouvées dans l'alimentation. Certaines molécules sont des donneurs d'ions hydrogène grâce à la présence le plus souvent d'acides aminés aromatiques dans leur structure, d'autres, grâce à la présence de groupements fonctionnels comme les groupements thiols entre autres dans leur structure, favorisent un échange d'électrons après oxydation, permettant aux radicaux très réactifs de former des espèces beaucoup moins réactives qui sont recyclées par la suite. Certains antioxydants après oxydation peuvent aussi devenir à leur tour des pro-oxydants mais sont réduits par la présence d'autres antioxydants, on conclut alors à un mécanisme de synergie entre les antioxydants. Parmi les molécules antioxydantes, on retrouve des composés liposolubles comme la vitamine A, la vitamine E, et des composés hydrosolubles comme la vitamine C, le glutathion, le pyruvate, l'acide urique, l'acide lipoïque, le NAC (N-acétylcystéine)...

Il existe aussi des composés qui séquestrent les métaux de transition et inhibent ainsi la réaction de Fenton et donc la formation d'espèces délétères.

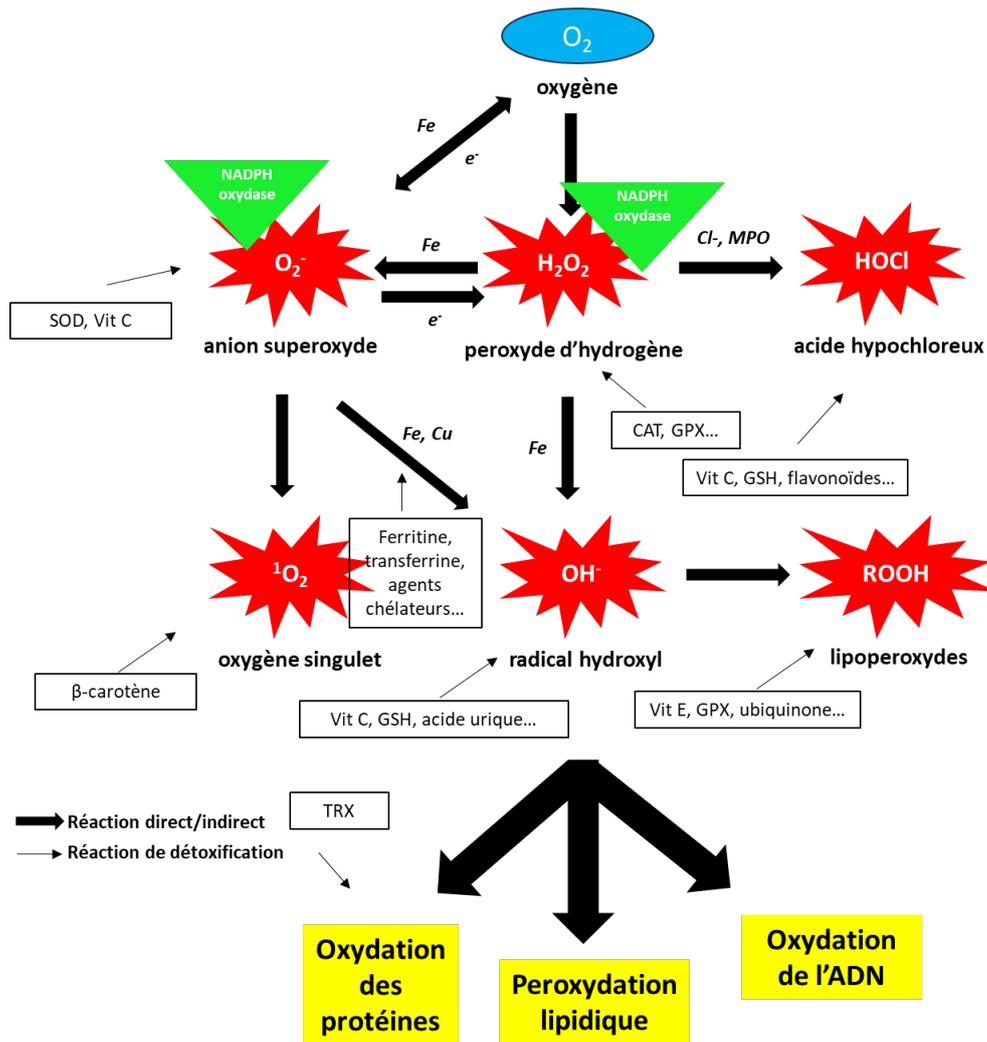


Figure 25 : Espèces réactives de l'oxygène (ROS) et conséquences cellulaires, molécules de détoxification

CAT : catalase ; *GPx* : Glutathion peroxydase ; *TRX* : système thioredoxine ; *GSH* : glutathion ; *Fe* : fer ; *HOCl* : acide hypochlorique formé par l'action de la myeloperoxydase, responsable de l'effet bactéricide ; *Cl⁻* : ion chlorure ; *e⁻* : électron. Formation d'anion superoxyde et de peroxyde d'hydrogène par les NADPH oxydases.

Pour finir, il y a des systèmes de défense cellulaire secondaire qui empêchent l'accumulation de macromolécules (lipides, protéines et ADN) oxydées. Parmi ces systèmes, on retrouve des enzymes de la réparation de dommages oxydatifs pour l'ADN, des phospholipases pour les lipides et des protéases entre autres pour les protéines [257] (Figure 25).

1.c) Stress oxydant et processus de dédifférenciation

Homéostasie redox. Dans la cellule, la concentration de ROS est finement régulée, on parle d'homéostasie rédox. Les ROS en concentration physiologique sont indispensables à la physiologie et au métabolisme cellulaire. Elles interviennent notamment dans l'immunité innée avec un rôle anti-microbien direct via l'oxydation des structures bactériennes. Les ROS sont impliquées dans la signalisation cellulaire, elles sont des messagers secondaires et influencent divers processus cellulaires via l'oxydation de résidus cystéines des protéines effectrices dans ces voies de signalisation. Quelques mécanismes d'implication des ROS dans les signalisations cellulaires sont bien décrits dans la littérature. Comme nous l'avons vu plus haut, elles participent aussi à la synthèse hormonale notamment avec le cas des HTs.

Stress oxydant. La perturbation de l'équilibre redox, qui se traduit par une augmentation des ROS, conduit à des situations pathologiques dues à une dérégulation de la signalisation cellulaire et de l'immunité. Un déséquilibre redox peut ainsi aboutir à l'oxydation irréversible de composants cellulaires du fait d'une saturation des moyens de détoxification cellulaire (stress oxydant), entraînant ainsi la survenue de processus inflammatoires et tumorigènes.

Stress oxydant dans les cancers. Dans les cancers, le stress oxydatif intervient à toutes les étapes de l'initiation à la progression tumorale. Les mécanismes sont assez bien documentés. Un stress oxydant chronique via l'oxydation de composants cellulaires conduit bien souvent au recrutement de cellules immunitaires responsables de l'installation et du maintien d'une composante inflammatoire. Ce terrain inflammatoire constitue un environnement pro-néoplasique puisque les cytokines produites sont capables d'activer ou d'interférer dans des voies de signalisation mitogènes. Les dommages oxydatifs à l'ADN sont responsables de mutations génétiques, d'altérations épigénétiques et de la mise en place d'instabilités génétiques. Les altérations génétiques/épigénétiques entraînent la dérégulation de l'expression d'oncogènes ou de suppresseurs de tumeurs et/ou d'autres gènes contribuant au mécanisme de cancérogenèse. De multiples études ont montré que le stress oxydatif impacte plusieurs voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire comme les signalisations MAPK, PI3K-AKT, les signalisations activées en réponse aux facteurs de croissance (EGF, IGF-1...) ou des voies de signalisation anti-apoptotiques notamment via la modulation de l'activité des effecteurs ou de leurs expressions [258].

Implication du stress oxydant dans la carcinogenèse thyroïdienne et la dédifférenciation. Par son implication dans la synthèse des HTs, la thyroïde est un organe où la production de ROS est une des plus importante comparé aux autres organes. L'analyse des dommages oxydatifs à l'ADN dans la glande thyroïdienne de souris montre que le taux est 8 à 10 fois plus important par rapport à d'autres organes [259]. Dans les CPTs, Zing Hong Eng et ses collaborateurs montrent que le niveau de ROS est significativement plus élevé par rapport aux atteintes bénignes de la thyroïde [345]. Une autre étude menée par l'équipe de Marina Muzza montre que le stress oxydant dans les CTs évolue parallèlement à l'agressivité tumorale et au taux d'activation de la signalisation MAPK. Cette équipe a confirmé un fort taux de stress oxydant dans les CPTs inversement corrélé avec le score de différenciation thyroïdien [260]. Du côté des défenses antioxydantes dans les CTs, les données semblent controversées. L'analyse des sélénoprotéines GPx1 and TrxR1 dans des CPTs montrent que leur expression est diminuée dans ce type de situation pathologique [261]. Plusieurs autres études, en revanche, montrent que l'expression de certaines enzymes antioxydantes (GPXs, SODs) est augmentée dans les CPTs [260-263]. Une des hypothèses à cela est que l'augmentation de ces acteurs antioxydants à titre compensatoire à l'élévation du niveau de ROS permettrait le maintien de la concentration de ROS à un niveau permettant la survie des cellules cancéreuses.

Parmi les acteurs impliqués dans la génération de ROS pouvant conduire à un stress oxydatif, nous nous sommes intéressés aux enzymes NADPH oxydases (NOXs). Dans la thyroïde, 3 membres de la famille des NADPH oxydases (NOXs) sont présents. DUOX2 qui génère l' H_2O_2 nécessaire à l'organification de l'iode pour la synthèse des HTs, DUOX1 dont le rôle dans ce processus reste controversé et NOX4 qui génère du H_2O_2 en intracellulaire de manière constitutive.

1.c.1) Famille des NADPH oxydases (NOXs)

Les NADPH oxydases sont des complexes enzymatiques membranaires appartenant à la classe des oxydoréductases. La famille des NADPH oxydases comporte 7 membres, NOX1/2/3/4/5 et DUOX1/2, identifiés sur la base de certaines propriétés structurelles communes et conservées. Ces structures conservées incluent 6 domaines transmembranaires avec des sites de fixation hémiques, un site de liaison aux coenzymes NADPH et FAD ((Flavine adénine dinucléotide) à l'extrémité C-terminal côté intracellulaire (*Figure 26*). Le domaine N-terminal présente une certaine variabilité selon les

différents membres. D'autres caractéristiques structurales supplémentaires telles que le « EF hands » motif constitué de 2 hélices alpha reliées par une boucle d'acides aminés permettant l'insertion d'un ion calcique ou encore un domaine transmembranaire supplémentaire en N-ter ou encore un domaine d'homologie aux peroxydases sont limités à certains membres de la famille.

Leur unique fonction est la production de ROS. Les NOXs via le transport d'électrons du NADPH au FAD puis aux hèmes pour finir au dioxygène, catalysent la réaction d'oxydation du NADPH par l'oxygène, cela aboutissant à la formation d'anion superoxyde et de NADP^+ . L'anion superoxyde est rapidement dismuté en peroxyde d'hydrogène, plus stable, par l'action de la superoxyde dismutase (SOD) d'où la difficulté de mesurer la production d' O_2^- avec les outils de détection actuels.

Comme énoncé précédemment, les ROS générées par les NOXs participent à différents processus physiologiques comme l'immunité, la signalisation cellulaire, l'apoptose.

✚ Autres membres de la famille NOX : NOX1/NOX2/NOX3/NOX5

NOX2. La première NOX découverte et aujourd'hui la mieux étudiée est la NOX2. Elle a été mise en évidence par l'observation d'un phénomène appelé « burst respiratoire » autrement dit une consommation accrue de l'oxygène indépendamment de la chaîne respiratoire mitochondriale accompagnée d'une production de ROS dans plusieurs types cellulaires mais essentiellement dans les phagocytes et neutrophiles qui sont des cellules du système immunitaire avec un rôle bactéricide.

NOX2 est une glycoprotéine d'environ 70-90 kDa, elle est constitutivement associée à p22phox, partenaire fonctionnel puisqu'en absence de ce dernier NOX2 est instable et non détectable. NOX2 produit des ROS uniquement après activation par un signal. L'activation de

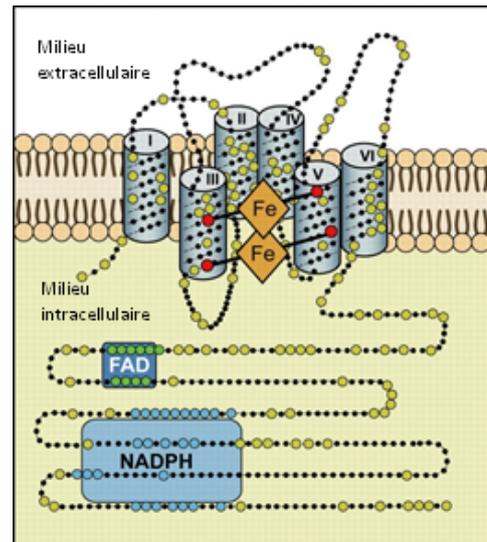


Figure 26 : Structure de la région conservée des membres de la famille NADPH oxydase [70]

Tous les membres de la famille NADPH oxydase partagent 6 domaines transmembranaires hautement conservés. En rouge, sont représentés les histidines dans les domaines transmembranaires III et V permettant la fixation des hèmes. L'extrémité C-terminal contient les sites de fixation au FAD et NADPH. Les cercles en vert représentent les acides aminés conservés entre NOX1, NOX2, NOX3 et NOX4.

NOX2 à la suite d'un stimulus requière la translocation de facteurs cytosoliques au complexe membranaire NOX2/p22phox, cœur catalytique de l'enzyme. Ces facteurs cytosoliques codés par des gènes différents sont les protéines p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} et la GTPase Rac, elles sont assemblées de manière séquentielle selon un modèle précis et qui fait aussi intervenir des modifications post-traductionnelles dont majoritairement des phosphorylations. Une fois assemblé, le complexe est actif et génère de l'anion superoxyde (*Figure 27*). D'autres modifications post-traductionnelles ont aussi été rapportées avec un effet sur l'activité du complexe et les interactions entre les partenaires [48, 91, 289-298].

Outre sa présence dans les neutrophiles et phagocytes, NOX2 est aussi exprimée dans un grand nombre de type cellulaire, on la retrouve dans les neurones, les cardiomyocytes, les myocytes du tissu squelettique, les hépatocytes, les cellules endothéliales et les cellules souches hématopoïétiques [70]... NOX2 est principalement localisée au niveau de la membrane plasmique et des membranes endosomales. Il s'agit d'une protéine bien caractérisée dans les cellules du système immun.

NOX1. Protéine homologue de NOX2 (environ 60% d'homologie), NOX1 génère de l'anion superoxyde [249]. Tout comme NOX2, elle présente le même mode d'activation via l'interaction avec des facteurs cytosoliques (*Figure 27*). Parmi ces facteurs, on retrouve NOXO1 (NOX organizer 1) homologue de p47^{phox}, NOXA1 (NOX activator 1) homologue de p67^{phox}. Les protéines p22^{phox} et Rac sont également essentielles à son activité [299-303]. De la même manière, les modifications post-traductionnelles que subit NOX1 modulent les interactions protéiques entre les partenaires, sa localisation subcellulaire et son activité [295, 275, 304-312].

NOX1 est hautement exprimée dans le côlon selon un gradient spécifique puisque l'on retrouve une forte expression dans la partie distale et une faible dans la partie proximale de cet organe. On retrouve aussi NOX1 dans plusieurs autres tissus et types cellulaires avec notamment les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses vasculaires, les ostéoclastes, les cellules de l'utérus, de la prostate, du placenta entre autres [70]. Les données concernant sa localisation subcellulaire diffèrent selon le type cellulaire [279, 313, 314].

NOX3. NOX3 est exprimée fortement dans l'oreille interne, essentiellement dans les épithéliums sensoriels cochléaire et vestibulaire ainsi que le ganglion spiral. Elle joue un rôle dans la perception de l'équilibre et de la gravité en étant impliquée dans la formation des

otoconies, dépôts de carbonate de calcium sur les cellules sensorielles ciliées de l'oreille interne [315]. D'autres études ont révélé la présence de NOX3 dans l'os du crâne, le cerveau, certains tissus fœtaux incluant la rate, le foie, les poumons et les reins [315, 316]. Compte-tenu de cette distribution tissulaire limitée, il y a peu d'informations sur la localisation subcellulaire de NOX3. Les études sur l'organe vestibulaire évoquent essentiellement une localisation à la membrane plasmique.

L'activation de NOX3 est dépendante de la sous-unité membranaire p22^{phox} [317, 318]. Les données *in vitro* indiquent que NOXO1, NOXA1, p47^{phox}, p67^{phox} et Rac sont des partenaires essentiels à l'activité de NOX3 (*Figure 27*) [319, 320]. Certaines données sont aussi en faveur d'une activation constitutive de NOX3. Dans ce sens, des études complémentaires sont donc requises afin de clarifier le rôle de ces facteurs cytosoliques dans l'activation ou la régulation de l'activité de NOX3.

NOX5. NOX5 est la seule NOX qui ne requiert ni p22^{phox}, ni les autres sous-unités cytosoliques pour son activation. En revanche, elle présente une plus longue extrémité N-terminale par rapport aux autres NOXs qui contient quatre motifs « EF hand » impliqués dans la fixation des ions calcium.

Son activité est donc régulée par la concentration intracellulaire en Ca²⁺. En absence de calcium, la production de ROS générée par NOX5 est faible voire nulle (*Figure 27*) [321-323]. NOX5 génère tout comme NOX1/2/3, de l'anion superoxyde (O₂⁻) et comme pour les autres NOXs, son activité est aussi modulée par des interactions protéiques et des modifications post-traductionnelles [310, 324-334]. Il existe différentes isoformes de NOX5, résultant d'un épissage alternatif. Celles-ci, présentent une distribution tissulaire variée et se distinguent par leur mode de régulation et leur mécanisme d'action [325, 335, 336].

NOX5 est une protéine de 85 kDa, son expression est élevée dans quelques organes dont les testicules, la rate et les ganglions lymphatiques [337, 338]. Dans une moindre proportion, elle est aussi présente dans les muscles vasculaires lisses, la moëlle osseuse, le pancréas, le placenta, les ovaires, l'utérus, l'estomac, le tractus gastro-intestinal, dans divers tissus fœtaux... avec des actions variées [70, 316, 325]. La localisation subcellulaire de NOX5 comme pour les autres protéines est fonction du type cellulaire et de son mécanisme d'implication [330, 339].

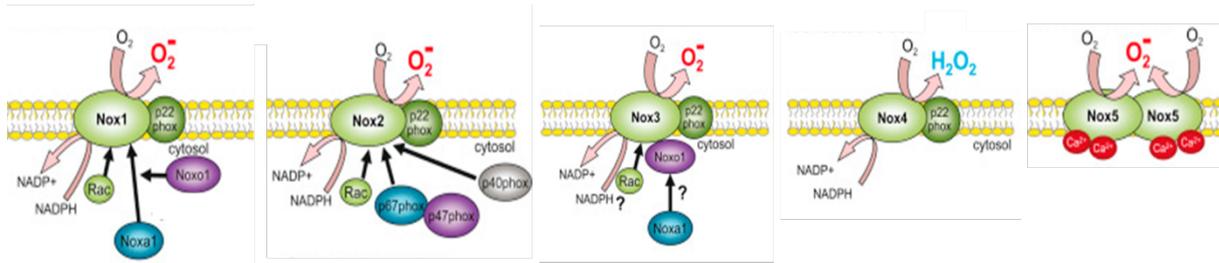


Figure 27 : Famille NADPH oxydase (NOX1/2/3/4/5) [340]

Activité dépendante des sous-unités cytosoliques pour NOX1/2/3. Activité constitutive pour NOX4. Activité dépendante du calcium pour NOX5.

1.c.2) Implication de NOX4

Elle présente environ 39% d'homologie avec les autres membres de la famille NOX. Peu d'études sur les mutations affectant NOX4 ont été révélées, en revanche plusieurs variants d'épissage ont été répertoriés à ce jour dans différents tissus avec une implication dans la physiologie et la physiopathologie [264-266].

NOX4 produit du H_2O_2 . Il a été démontré scientifiquement que la troisième boucle extra-cytosolique « E-loop » de NOX4 plus longue que celles de NOX1 ou NOX2, contenant une histidine, source de protons permet l'accélération de la dismutation spontanée de O_2^- en H_2O_2 . La suppression des acides aminés par mutagenèse de la boucle E de NOX4, tout en préservant l'expression et la localisation subcellulaire de l'enzyme, a permis la détection d'anion superoxyde [267].

Dans l'immense majorité des travaux, il a été montré que NOX4 est une enzyme dépendante de la protéine membranaire $p22^{phox}$. Des études fonctionnelles démontrent que la $p22^{phox}$ joue un rôle clé dans la stabilisation de NOX4 et l'activité de NOX4. L'inverse est également vrai puisque NOX4 stabilise aussi $p22^{phox}$ [268, 269]. NOX4 ne nécessite pas de sous-unités cytosoliques pour son activité, c'est la seule des NOXs à posséder une activité constitutive de génération de ROS directement liée à son niveau transcriptionnel (Figure 27). Cependant, cette activité peut être modulée dans certaines conditions par des interactions protéiques ou par des modifications post-traductionnelles [270-277]. En 2009, Poldip2 (Polymerase delta-interacting protein 2), protéine multifonctionnelle et principalement impliquée dans le remodelage du cytosquelette et la réparation de l'ADN a été identifiée comme un régulateur de l'activité de

NOX4 dans les cellules musculaires lisses vasculaires [274]. Une association de cette protéine avec NOX4 a aussi été observée dans des thyrocytes de rat en culture [174].

D'autres études mettent en lumière une possible régulation de l'activité de NOX4 de manière redox puisqu'elle possède des cystéines au niveau de la boucle extracellulaire « E-loop » qui peuvent subir des modifications de type redox [278].

Protéine de 65 kDa, NOX4 est fortement exprimée dans le rein, mais on la retrouve également dans plusieurs types cellulaires dont les cellules endothéliales, les ostéoclastes, les cellules musculaires lisses, les cellules souches hématopoïétiques, les fibroblastes, les kératinocytes, les mélanocytes, les neurones... [70]

La localisation subcellulaire de NOX4 est variée, elle dépend essentiellement du type cellulaire et du type d'implication de NOX4 dans les mécanismes physiologiques. Dans les cellules musculaires lisses vasculaires, NOX4 est décrite à la membrane plasmique [279, 280], dans les cellules endothéliales, elle est principalement retrouvée au niveau du RE [281]. Une localisation mitochondriale dans certains types cellulaires est aussi observée [282]. Enfin, d'autres travaux ont permis la découverte de NOX4 au niveau nucléaire et périnucléaire avec une implication dans la signalisation nucléaire et les dommages à l'ADN [264, 283].

Comme les autres NOXs, l'expression de NOX4 est inductible par de multiples facteurs et l'activation des signalisations associées. Parmi ces signalisations on retrouve la signalisation du TGF- β_1 , celle du TNF- α , de l'angiotensine II, de la TSH ou encore les signalisations activées en réponse à un stress du RE, à l'hypoxie et l'ischémie etc. [70] On observe aussi une régulation redox de NOX4 puisqu'il a été montré que le facteur Nrf2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2), acteur fondamental de la réponse antioxydante, contrôle positivement l'expression de cette dernière [284]. Tout cela est rendu possible grâce à la présence de plusieurs séquences de fixation pour des facteurs de transcription au niveau du gène codant NOX4.

Rôle de NOX4 dans la carcinogenèse thyroïdienne et la dédifférenciation. Dans la thyroïde, NOX4 présente une localisation périnucléaire et la dérégulation de son expression comme pour DUOX1 est associée au processus de carcinogenèse. L'analyse de l'expression des NOXs dans la thyroïde a révélé que seule NOX4 est augmentée dans les CPTs sporadiques [285]. NOX4 est particulièrement augmentée dans les CPTs arborant la mutation BRAF^{V600E} [285]. L'équipe de Ping Tang a montré que l'inhibition de NOX4 dans les CPTs diminue la prolifération cellulaire et module la glycolyse en condition hypoxique (insuffisance en oxygène) [286].

L'inhibition de NOX4 dans le CT, permet aussi de lever la résistance à certains agents de chimiothérapie et de thérapies ciblées en favorisant l'apoptose [287]. L'ensemble de ces données indiquent un rôle des ROS générées par NOX4 dans l'oncogenèse, dans la progression tumorale et même dans les mécanismes de résistance, mais ces mécanismes restent à approfondir. Azouzi.N et ses collaborateurs montrent que la signalisation TGF- β /SMAD3 contrôle l'activation transcriptionnelle de NOX4 et que la génération de ROS associée à cette augmentation de l'expression de NOX4 est impliquée dans la répression de SLC5A5 codant le NIS dans les CPTs arborant la mutation BRAF^{V600E} [232]. Par ailleurs ces auteurs montrent que l'expression de NOX4 est inversement corrélée à la différenciation thyroïdienne. SLC5A5 n'étant pas le seul gène réprimé dans ce type de cancer, ces données suggèrent un rôle de NOX4 dans les mécanismes de dédifférenciation. Une inhibition de NOX4 dans des thyrocytes en culture a montré une augmentation de l'expression de FOXE1, PAX8, TPO [288].

2) Dommages oxydatifs à l'ADN et mécanismes de réparation

La lésion oxydative à l'ADN la plus courante et la plus étudiée est appelée 8-oxoG (8-oxo-7,8-dihydroguanine), elle résulte de l'oxydation de la base guanine. Les dinucléotides CpG (déoxycytidine phosphate déoxyguanosine) sont répartis de manière spécifique au sein du génome. Ils sont retrouvés en abondance dans certaines régions et forment ce que l'on appelle les îlots CpG. Ces derniers sont présents essentiellement dans les régions promotrices de certains gènes et compte-tenu de leur abondance en base guanosine, ces régions sont sensibles à l'oxydation. 8-oxoG est considérée aujourd'hui comme un biomarqueur du stress oxydatif, plusieurs outils de détection ont été développés afin d'évaluer le rôle du stress oxydant dans l'initiation et la progression des processus pathologiques.

a) BER (Base Excision Repair)

BER est la voie majeure de réparation des 8-oxoGs. Ces lésions sont reconnues par l'enzyme OGG1 (8-oxoguanine DNA glycosylase-1), glycosylase permettant l'excision de la base oxydée, entraînant alors la présence d'un site apurinique ou abasique au sein de la molécule d'ADN, ce procédé initie le processus de réparation. En bref, ces sites apuriniques sont transformés en extrémité simple brin 5' ou 3' par l'action d'une endonucléase APE1 (AP-endonuclease 1). A partir de cette étape, deux voies permettant la continuité de la réparation

avec une cinétique différente et faisant intervenir des acteurs différents se dessinent, ces deux voies sont appelées « long patch » and « short patch ». Elles permettent le remplacement du site abasique ou de la séquence manquante par l'ajout de nucléotides puis la ligature de ces derniers via l'action d'enzymes de type ADN polymérase et ADN ligase [341] (Figure 28).

OGG1. L'expression d'OGG1 est régulée en fonction de l'état redox cellulaire. Nrf2, facteur de transcription redox contrôlant l'expression des gènes codant pour les enzymes de détoxification contrôle aussi la transcription d'OGG1 [205, 362]. Une particularité de cette enzyme est sa capacité à moduler la transcription en se fixant sur les 8-oxoGs dans les régions promotrices de gènes indépendamment de son rôle dans la réparation. Il s'agit d'une enzyme dont l'activité est aussi régulée par l'état oxydatif cellulaire, elle est inhibée par oxydation des cystéines de son centre catalytique [342]. La liaison d'OGG1 catalytiquement inactive à son substrat entraîne une conformation allostérique de la chromatine favorisant pour certains gènes, la reconnaissance de motifs reconnus par les protéines de la machinerie transcriptionnelle permettant ainsi la transcription.

Cancers. Une déficience en OGG1 par des altérations génétiques comme des polymorphismes ou épigénétiques amène à une accumulation mutationnelle puisque la persistance de 8-oxoG augmente le risque mutagène. Des polymorphismes associés à OGG1 ont été trouvés chez certains patients atteints d'un CT [343]. L'expression d'OGG1 est diminuée dans les CFTs [344]. Une étude menée par Zing Hong Eng et ses collaborateurs montrent que l'expression d'OGG1 est augmentée dans les CPTs [345]. Selon les données du TCGA, l'expression d'OGG1 est inversement corrélée à l'activation de la signalisation MAPK dans les CPTs, ce qui suggère que les dommages oxydatifs pourraient avoir une implication dans le mécanisme de dédifférenciation [67].

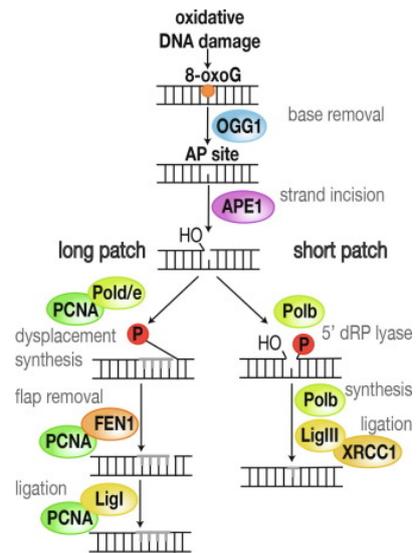


Figure 28 : Base Excision Repair (BER) [533]

Détection de la base oxydée 8-oxoG par OGG1 (8-oxoguanine DNA glycosylase-1), création d'un site apurinique et recrutement de l'endonucléase APE1. Voie « long patch » : nucléotides ajoutés par les polymérases delta et epsilon en combinaison avec PCNA (proliferating cell nuclear antigen). Ancien brin éliminé par FEN1 (Flap-endonucléase 1) et ligature par ligase I (LigI). Voie « short patch » : remplacement de la base manquante par polymérase bêta et ligature par ligase III (LigIII). Présence de la protéine d'ancrage XRCC1 (X-ray repair cross-complementing protein 1).

Autre voie de réparation des dommages oxydatifs. Les dommages oxydatifs à l'ADN non réparés peuvent conduire à l'apparition d'autres types de dommages. La présence de 8-oxoG est fortement mutagène puisque les intermédiaires de réparation comme les sites apuriniques peuvent en cas de réparation imparfaite ou manquante aboutir à des cassures chromosomiques simples et/ou doubles brins [341]. Ameziane-El-Hassani R et ses collaborateurs montrent que l'exposition des cellules folliculaires au H₂O₂ provoque une augmentation des cassures double brins, matérialisées par l'augmentation de la phosphorylation de l'histone H2AX (γ H2AX) [346]. Cette dernière fait partie des protéines structurant la chromatine, elle est phosphorylée en réponse aux cassures de l'ADN et permet le recrutement de protéines de la réparation. Un marquage de γ H2AX montre que les dommages à l'ADN sont plus importants dans les CPTs comparément aux nodules thyroïdiens bénins et aux tissus thyroïdiens normaux [347]. En plus des cassures, la 8-oxoG peut être la source de mésappariements. Un mauvais appariement de 8-oxoG avec l'adénine peut entraîner des transitions GC vers AT et des transversions GC vers TA durant le processus de réplication [67].

Les lésions oxydatives de manière générale sont réparées par BER et NER (réparation par excision de nucléotides). Ce dernier ne sera pas abordé dans l'étude car il intervient essentiellement dans l'élimination de lésions étendues qui impactent sur la conformation de l'ADN. De nouvelles données émergent et montrent que la voie de réparation des mésappariements MMR (Mismatch repair) est aussi impliquée dans la réponse aux dommages oxydatifs. Des niveaux basaux et induits de dommages oxydatifs plus élevés ont été trouvés dans des cellules dépourvues d'un ou plusieurs acteurs de la voie MMR [397]. Plusieurs gènes codant pour les protéines de cette voie ont été retrouvés muté ou alors leur expression dérégulée dans les cancers y compris les CTs [348].

b) Mismatch repair (MMR)

La voie de réparation MMR comme son nom l'indique intervient principalement dans la réparation des mésappariements (appariement de 2 bases non complémentaires) durant le processus de réplication, elle peut aussi réparer les insertions/délétions de nucléotides. Les protéines intervenant dans la voie MMR sont conservées entre les espèces et sont regroupées en 2 catégories, l'une regroupant les protéines homologues de MutS et l'autre, les protéines homologues de MutL. Les dommages oxydatifs sont reconnus par les homologues de MutS. Chez l'homme, deux hétérodimères composent MutS, MSH2/MSH6 (MutS α) et MSH2/MSH3 (MutS β). Les sous-unités MSH2/MSH6 sont spécifiques aux mésappariements tandis que

MSH2/MSH3 reconnaissent particulièrement les lésions hétérologues insertions-délétions. Une fois la reconnaissance et la fixation de l'hétérodimère MSH2/MSH6 aux dommages, les homologues de MutL sont recrutés et interagissent avec l'hétérodimère afin de former un complexe de réparation. Là encore, plusieurs hétérodimères de MutL ont été identifiés, MutL α (MLH1/PMS2), MutL β (MLH1/PMS1) et MutL γ (MLH1/MLH3). MutL α est principalement identifié comme interagissant avec MutS. Comme dans la voie de réparation BER, le complexe MutS/MutL (MSH2-MSH6/MLH1-PMS2) permet le recrutement des protéines et enzymes qui vont permettre la réparation (ADN endo/exonucléase, polymérase, ligase) (Figure 29).

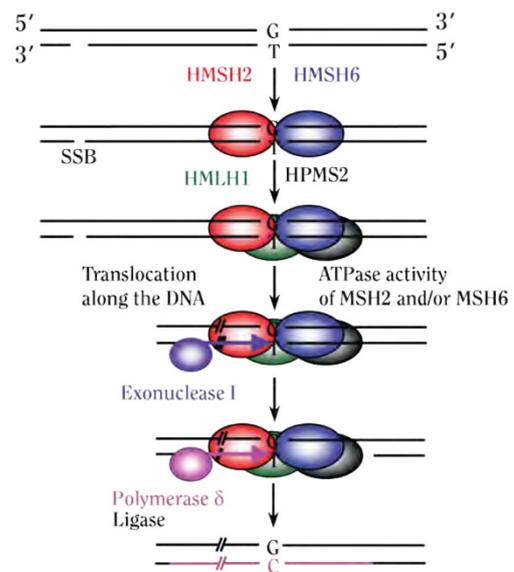


Figure 29 : Mismatch repair (MMR) [349]

Détection du mésappariement par l'hétérodimère MSH2/MSH6. Recrutement de MLH1/PMS2. Intervention de l'exonucléase I, de la polymérase delta et d'une ligase.

MSH2/MSH6. Les gènes codant MSH2/MSH6 sont considérés comme des gènes de ménage, le facteur E2F contrôlant le cycle cellulaire, contrôle aussi leur expression. MSH2 et MSH6 forment un hétérodimère stable, la présence de l'un est nécessaire à la stabilité de l'autre [350]. Des modifications post-traductionnelles comme les phosphorylations contrôlent la translocation nucléaire de MSH2/MSH6 et leur liaison aux dommages [351]. Concernant la réparation des dommages oxydatifs, il a été montré que l'hétérodimère MSH2/MSH6 qui présente par ailleurs une activité ATPase, est activé par la reconnaissance et la liaison aux mésappariements incluant 8-oxoG avec les autres nucléotides [352]. Une coopération entre les systèmes BER et MMR via une interaction entre les acteurs de ces voies dans la réparation des dommages oxydatifs a été démontrée [353] mais ces informations restent à approfondir.

Cancers. Comme énoncé précédemment, une déficience de la voie MMR avec des mutations des acteurs (MSH2, MSH6, MLH1 ou PMS2) ou la dérégulation de leur expression par des altérations épigénétiques a été retrouvée dans plusieurs types de cancers. C'est aussi le cas dans certains CTs différenciés où des polymorphismes, des mutations et des altérations épigénétiques associés à ces gènes ont été trouvés et corrélés à la mise en place d'instabilités génétiques et à des caractéristiques clinicopathologiques agressives [354, 355]. Dans les cancers déficients en MMR, les cellules présentent un taux mutationnel de 100 à 1000 fois plus

important que les cellules normales [348], suggérant que la réparation des dommages oxydatifs est inefficace dans ces conditions. Par l'analyse des données du TCGA, Ameziane El Hassani.R et ses collaborateurs montrent que les protéines MSH2, MSH6 ainsi que POLH (ADN polymérase de la voie MMR) sont augmentées dans les CPTs mutés BRAF^{V600E} [67]. Les données évaluant le lien entre les voies de réparation des dommages oxydatifs BER et MMR sont à étudier.

Conséquences cellulaires liées à la présence de 8-oxoG. En bref, la présence de 8-oxoGs affecte les processus transcriptionnels et répliationnels. En conduisant au recrutement de protéines de la signalisation BER, 8-oxoG perturbe la liaison d'autres protéines à la chromatine. C'est le cas notamment pour les facteurs de transcription [341, 356]. Certaines études montrent aussi que la survenue de 8-oxoGs dans des séquences codantes de gènes bloque le processus d'élongation de la transcription. Enfin, l'émergence de dommages oxydatifs 8-oxoGs peut conduire à la modification de la structure secondaire de l'ADN. L'une des structures secondaires pouvant être affectée par la présence de ces dommages oxydatifs est la structure G-quadruplex. Il s'agit d'une structure à 4 brins (ADN ou ARN) formée par des liaisons spécifiques entre 4 résidus guanines et qui intervient dans plusieurs processus cellulaires tels que la régulation de l'expression génique, la réplication, la stabilité du génome [341] ... Ce type de structure est plus fréquemment observé dans les régions promotrices de certains gènes, probablement en raison là encore de leur abondance en base guanine et dans les régions 5'-UTR de certains ARN messagers. Ces structures peuvent être stabilisées ou au contraire déstabilisées par la présence de 8-oxoG et des acteurs de la voie BER [357, 358].

De plus en plus d'auteurs s'accordent à dire que 8-oxoG peut être considérée comme une marque épigénétique, intervenant dans la modulation de l'expression des gènes via la liaison des protéines de la voie de réparation BER [359, 360]. 8-oxoG agit aussi dans la régulation de l'expression génique en servant de plateforme au recrutement de facteurs épigénétiques via la liaison de protéines des voies de la réparation. Dans la littérature OGG1, MSH2/MSH6 sont des protéines qui ont été décrites comme servant de plateforme au recrutement de facteurs épigénétiques [360, 361] . Ces données témoignent d'un lien étroit entre les dommages oxydatifs et les processus épigénétiques dans la régulation transcriptionnelle des gènes.

3) Mécanismes épigénétiques dans le processus de dédifférenciation : lien avec le stress oxydatif

Les mécanismes épigénétiques regroupent l'ensemble des processus moléculaires qui permettent de modifier l'expression des gènes mais sans conséquence sur les séquences génétiques. Les modifications épigénétiques sont réversibles et peuvent aussi être transmises au cours des divisions cellulaires. La répression réversible du gène SLC5A5 par NOX4 [232] suggère une implication des ROS produites par NOX4 dans un processus épigénétique.

Conformation de la chromatine et lien avec le processus transcriptionnel. Les histones sont des protéines qui interviennent dans la compaction de l'ADN. Elles constituent l'unité de base sur laquelle s'enroule l'ADN. L'association d'un tétramère d'histones H3-H4 et d'histones H2A-H2B forme un octamère d'histones sur lequel s'enroule une portion d'ADN afin de former un nucléosome. Les régions internucléosomiques sont marquées par la présence d'un autre type d'histone, l'histone H1. La formation des nucléosomes représente le premier niveau de compaction de l'ADN, s'en suit alors d'autres niveaux de compaction faisant intervenir des protéines de types non histones afin de former la chromatine. Il existe aussi des variants d'histones, localisés à certains endroits de la chromatine qui influent sur la structure et fonction chromatinienne.

L'état de compaction de l'ADN est un facteur déterminant dans la modulation de l'expression des gènes. L'euchromatine, forme décondensée de la chromatine, transcriptionnellement active en raison de son accessibilité par les facteurs de transcription comprend une forte densité de gènes. A l'inverse, l'hétérochromatine est une forme condensée de la chromatine, elle comprend une plus faible densité de gènes, et est souvent localisée en région périnucléaire. Deux formes d'hétérochromatines sont observées dans les cellules, l'hétérochromatine constitutive composée essentiellement des régions centromériques et télomériques comportant des séquences répétitives et l'hétérochromatine facultative pouvant être transcriptionnellement active de manière transitoire.

Le remodelage de la chromatine est un processus dynamique assuré par des modifications post-traductionnelles effectuées sur des résidus spécifiques au niveau de l'extrémité N-terminale des histones. Les protéines responsables de ces modifications sont appelées « writers », les modifications post-traductionnelles sont ensuite lues par d'autres types de protéines dites « readers » qui médient la réponse transcriptionnelle en permettant le recrutement de divers

acteurs. Enfin, ce processus étant spatialement et temporellement limité, les modifications sont enlevées par des protéines appelées « erasers » (*Figure 30*).

Plusieurs types de modifications post-traductionnelles affectant les histones ont été décrites dans la littérature comme l'ubiquitination, la phosphorylation. Seules l'acétylation et la méthylation, modifications les plus étudiées seront abordées dans ce chapitre.

a) Acétylation/Méthylation des histones

La méthylation des histones consiste en l'ajout de groupements méthyls sur des résidus lysines et arginines. Selon le type, la position du résidu méthylé, ainsi que le nombre de groupement méthyl apposé sur les résidus, ce processus peut être associé à l'activation ou la répression transcriptionnelle. Les enzymes responsables de ce type de modification sont les histones lysine méthyltransférases (KMTs) et les protéines arginine méthyltransférases (PRMTs), en revanche, le retrait de ces modifications est assuré par les histones/arginines déméthylases. L'analyse des résidus présentant les modifications, corrélé à la modulation transcriptionnelle positive ou négative a conduit les scientifiques à établir ce que l'on appelle un « code histone ». Les marques d'histones H3K27me1, H3K36me3 sont par exemple associées à des régions transcriptionnelles actives tandis que d'autres marques comme H3K27me2,3 et H4K20me3 sont associées à des zones inactives transcriptionnellement [363].

La propriété majeure des histones est qu'elles sont chargées positivement grâce à la présence d'acides aminés basiques (lysine et arginine), ce qui permet les interactions avec l'ADN chargé négativement. L'acétylation des histones consiste en la mise en place d'une liaison covalente entre un groupement acétate et un résidu lysine, permettant ainsi la neutralisation des charges positives et l'ouverture de la chromatine. En général, l'acétylation des histones est associée à un état transcriptionnel actif tandis que la désacétylation à un état transcriptionnel inactif. Les enzymes qui ajoutent et retirent les groupements acétates sont respectivement appelées histones acétyltransférases (HATs) et histones désacétyltransférases (HDACs). Comme pour la méthylation, il existe des marques activatrices ou répressives de la transcription (*Figure 30*).

Cancers. Les altérations épigénétiques modifient l'état de compaction de la chromatine et dérégulent l'expression de nombreux gènes. Dans les cancers, des modifications aberrantes des histones aboutissant à la répression de gènes codant pour des suppresseurs de tumeurs ou l'activation d'oncogènes ont été observées. Les anomalies épigénétiques interviennent dans la

promotion et la progression tumorale. De nombreuses études ont montré une désacétylation des histones au niveau du promoteur de SLC5A5 codant le NIS, associée à la répression de son expression [248, 364]. L'utilisation d'inhibiteurs d'HDACs *in vitro* a réinduit l'expression du transporteur de l'iode, ainsi que celle d'autres gènes de la différenciation comme la Tg, TSHR et TPO. En clinique, les résultats obtenus avec les inhibiteurs de HDACs concernant la captation de l'iode restent mitigés. Une alternative thérapeutique envisagée est la combinaison d'inhibiteurs de la signalisation MAPK avec les inhibiteurs de HDACs. Des résultats *in vitro* ont montré un effet potentialisateur de ces combinaisons dans la réexpression des gènes de l'organification de l'iode et la captation de l'iode. Cet effet est par ailleurs augmenté par un traitement TSH [248]. Ces données démontrent l'implication de mécanismes épigénétiques dans le processus de dédifférenciation thyroïdien.

b) Méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est un processus qui permet l'ajout d'un groupement méthyle CH₃ sur les cytosines des dinucléotides CG. Comme pour l'acétylation des histones, la méthylation de l'ADN est un processus épigénétique qui régule l'expression des gènes. Il s'agit principalement d'une marque répressive.

Au sein du génome, les méthylations sont souvent retrouvées au niveau des promoteurs des gènes en raison de leur abondance en îlots CpG (50%) mais aussi dans les régions intragéniques (25%) et intergéniques (25%). Les groupements méthyles empêchent la transcription en perturbant la liaison des facteurs de transcription. Comme toutes les marques épigénétiques, les méthylations sont reconnues par les protéines « readers » qui interviennent dans la répression en permettant le recrutement d'HDACs qui maintiennent la chromatine dans un état fermé. Il y a donc une coopération entre les marques retrouvées au niveau des histones et celles retrouvées au niveau de l'ADN [365, 366]. De la même manière, la méthylation de l'ADN est associée à la méthylation des histones dans le processus de répression transcriptionnel puisque les mutations des gènes permettant la méthylation des histones affectent la méthylation de l'ADN [367]. On observe ainsi une coopération entre les acteurs qui interviennent dans la méthylation des histones et de l'ADN.

La méthylation de l'ADN est un processus physiologique qui intervient dans l'empreinte génomique parentale, dans l'inactivation du chromosome X, dans le contrôle de l'expression génique durant le développement et au cours des divisions cellulaires. Ce procédé est dérégulé

dans les cancers. Les enzymes catalysant cette modification sont les DNMTs (DNA méthyltransférases). Chez l'homme, elles sont au nombre de trois. DNMT1 qui contribue à maintenir le profil de méthylation du brin parental aux brins filles lors du processus de réplication, DNMT3a et DNMT3b qui sont impliquées dans les méthylation de novo. La déméthylation de l'ADN quant à elle, peut être un processus passif ou actif. De manière passive, une déméthylation peut être observée au cours des divisions cellulaires par un phénomène de dilution suite à un manque de maintien de la méthylation. Elle est observée lors d'une perte d'expression ou une perte d'activité de DNMT1. De manière active, la déméthylation fait intervenir plusieurs réactions enzymatiques ainsi que les protéines de la famille TET (Ten-eleven-translocation), accompagnées de protéines « associées à la déméthylation de l'ADN » [368]. Cette voie active permet la suppression des groupements méthyles en combinant la modification enzymatique de ces groupements et l'intervention des protéines de la réparation. Certaines de ces modifications enzymatiques peuvent aussi être éliminées de manière passive car elles ne sont pas retenues lors du processus de réplication [368]. D'autres données suggèrent que les DNMTs, elles-mêmes, puissent être impliquées dans la déméthylation de l'ADN dans certaines conditions, soit par leur activité intrinsèque ou par la modulation de cette activité par des interactions protéiques et notamment avec les protéines de la réparation [368] (*Figure 30*).

DNMT1. DNMT1 est une protéine ubiquitaire. Contrairement aux autres DNMTs, DNMT1 se lie préférentiellement à l'ADN hémi-méthylé. Durant la réplication, elle est localisée principalement au niveau des fourches de réplication, lieu de synthèse des brins d'ADN filles. Dans ce processus réplicatif, la protéine UHRF1 (Ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains 1) s'avère être un cofacteur de DNMT1 puisqu'elle se lie à l'ADN hémi-méthylé et permet le recrutement de DNMT1. Dans les cancers, elle est souvent impliquée dans la répression de gènes comme ceux codant les suppresseurs de tumeurs mais les mécanismes de son implication restent incorrectement compris. DNMT1 intervient dans le processus de réparation des dommages à l'ADN. Certaines données montrent que DNMT1 tout comme d'autres acteurs de modification de la chromatine dont l'histone désacétylase sirtuin 1 (SIRT1) sont recrutés au niveau des cassures doubles brins de l'ADN pendant la phase S du cycle cellulaire. Ning Ding et ses collaborateurs ont aussi montré que DNMT1 est recrutée aux sites de dommages oxydatifs via une interaction avec des protéines de la réparation [361].

DNMT3a/DNMT3b. Contrairement à DNMT1, DNMT3a et DNMT3b sont capables de se lier à l'ADN hémi-méthylé et non méthylé. Elles ont la même structure mais présentent un modèle d'expression tissulaire différent. Durant la période embryonnaire, l'expression de DNMT3a et

DNMT3b est forte mais durant la croissance une régulation négative de leur expression se met en place. Dans les cellules somatiques adultes, l'expression de DNMT3a et DNMT3b est faible. Tandis que DNMT3a est pratiquement ubiquitaire, DNMT3b est faiblement exprimée dans les tissus différenciés, excepté la thyroïde, les testicules et la moëlle osseuse [369]. Le rôle de cette dernière semble prédominant pendant l'embryogenèse et moins durant le processus de différenciation. Les données concernant DNMT3a et DNMT3b dans la carcinogenèse sont plus limitées mais des mutations de ces protéines ou des modifications épigénétiques entraînant la dérégulation de leur expression ont été trouvées dans certains types de cancers. Xiaxia.Man et ses collaborateurs montrent que l'expression de DNMT3a et DNMT3b est augmentée dans les cancers avancés du sein, cela associé à un faible pronostic [399]. Il a aussi été observé dans d'autres types de cancers, une action conjointe de DNMT3b et de DNMT1 dans la méthylation de gènes [398].

Cancers. La dérégulation de la méthylation joue un rôle initiateur dans la survenue de cancers et dans la progression. Une hyper-méthylation a été observée au niveau de certains promoteurs codant pour des suppresseurs de tumeurs par exemple, associée à une hypo- acétylation de la chromatine. L'utilisation d'inhibiteurs de HDACs et de DNMTs a démontré un effet dans la réexpression de ces gènes réprimés. A l'inverse des gènes codant pour les suppresseurs de tumeurs, une hypo-méthylation est souvent observée dans les oncogènes. Dans les CPTs mutés BRAF^{V600E}, en plus de l'hypo-acétylation retrouvée au niveau du promoteur du NIS, plusieurs données démontrent une hyper-méthylation de cette région [248]. Yong Won Choi et ses collaborateurs montrent que la mutation BRAF^{V600E} régule positivement l'expression de DNMT1 et que cette dernière intervient dans la méthylation du promoteur du NIS [370]. Une corrélation inverse entre l'expression du NIS et le degré de méthylation des îlots CpG a été observée. L'utilisation d'inhibiteurs de DNMTs in vitro a cependant montré des effets mitigés sur la réexpression du NIS et la captation de l'iode mais potentialisés par l'usage d'inhibiteurs de HDACs [248]. Une méthylation aberrante a également été trouvée au niveau de promoteurs de gènes tels que SLC5A8, pendrine, TSHR et TTF-1 [216, 371-374]. Les études à ce sujet sont à approfondir.

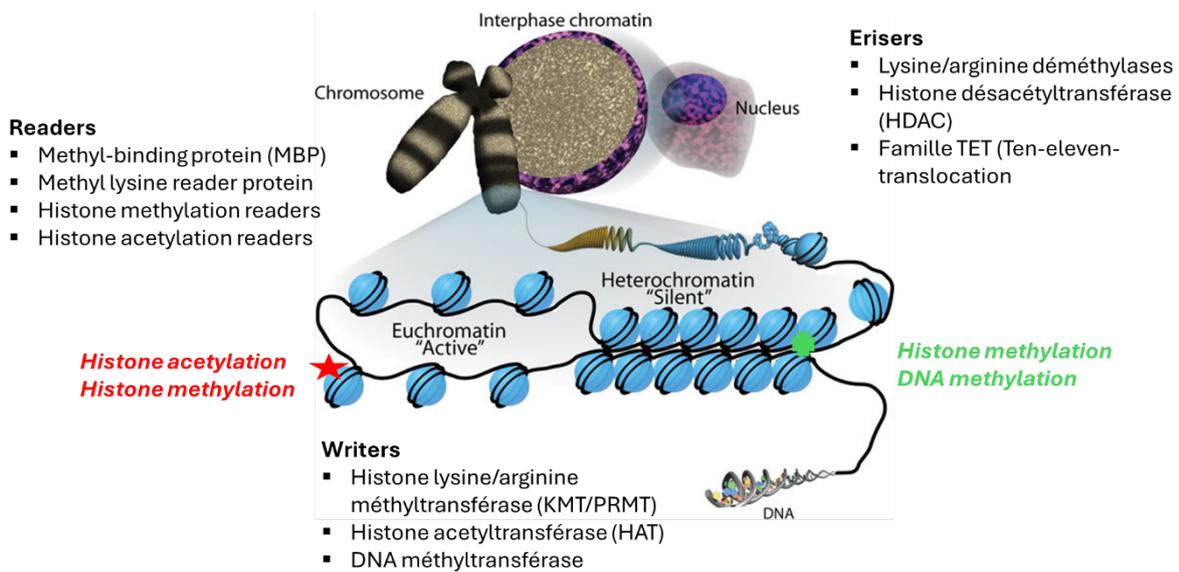


Figure 30 : Mécanismes épigénétiques et régulation transcriptionnelle [375]

Modélisation de l'état de compaction de la chromatine. L'hétérochromatine, compacté est associée à la répression transcriptionnelle. L'euchromatine, lâche, est associée à une activation transcriptionnelle.

Modifications activatrices de la transcription : acétylation et méthylation des histones. Modifications répressives : méthylation des histones, méthylation de l'ADN. Protéines responsables du remodelage de la chromatine « writers », « readers », « erisers ».

c) Autres mécanismes épigénétiques et acteurs

D'autres protéines interviennent dans le remodelage de la chromatine en utilisant l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP (adénosine triphosphate) afin de déstabiliser les contacts entre nucléosomes et ADN. Elles peuvent entraîner le glissement ou l'éjection des nucléosomes, elles modulent l'espacement de ces derniers, elles peuvent aussi modifier la composition des nucléosomes avec des variants d'histones. Elles interviennent au sein de complexes protéiques qui sont au nombre de quatre, on retrouve les protéines de la famille SWI/SNF (switch/sucrose-non-fermenting), les protéines de la famille ISWI (imitation switch), le complexe NuRD (nucleosome remodeling deacetylase) qui comporte des protéines de la famille CHD (chromodomain-helicase-DNA binding) et les protéines de la sous-famille INO80 (inositol requiring 80) [376].

Autres types d'acteurs épigénétiques récemment découverts intervenant dans la régulation transcriptionnelle, les miRNAs. Il s'agit de petits ARNs (de 20-25 nucléotides), simple brin, non codant qui permettent la répression de gènes en s'appariant à des ARN messagers cibles dont la séquence est complémentaire, entraînant ainsi l'inhibition de la traduction ou la

dégradation des cibles. Les miRNAs interviennent dans de nombreux processus physiologiques et l'expression aberrante de certains miRNAs est associée à des processus pathologiques. Plusieurs gènes codant pour des miRNAs ont été découverts dans le génome. L'expression des miRNAs est aussi régulée par des mécanismes épigénétiques comme la méthylation de l'ADN. Dans les CPTs mutés BRAF^{V600E}, une dérégulation épigénétique de certains miRNAs intervenant dans la régulation transcriptionnelle de suppresseurs de tumeurs et d'oncogènes contribuant à l'agressivité tumorale a été mise en évidence [216].

Stress oxydatif et mécanismes épigénétiques. Une accumulation de 8-oxoG dans des cellules rénales de rat a été observée principalement en région périnucléaire et au niveau de l'hétérochromatine en raison de sa localisation dans le noyau [403]. De manière intéressante, par sa faible densité en gènes, l'hétérochromatine est moins riche en dinucléotides et îlots CpG que l'euchromatine, le taux élevé d'oxydation observé au niveau de cette structure compacte serait dû à la différence d'accessibilité des enzymes de la réparation. De ce fait, le remodelage de la chromatine s'annonce être essentiel à la modulation transcriptionnelle mais aussi à l'efficacité de la réparation [341]. Dans l'euchromatine, 8-oxoG est plutôt observée dans les régions à forte teneur en dinucléotides GC, ainsi on peut retrouver cette base oxydée dans les régions promotrices de certains gènes.

Comme décrit précédemment, 8-oxoG est considérée comme une marque épigénétique. Cette modification de l'ADN influe sur les liaisons de protéines dont les facteurs de transcription à l'ADN. Plusieurs connexions sont observées entre les dommages oxydatifs, les protéines de la réparation, la méthylation de l'ADN et les autres marques épigénétiques [341]. Il a été démontré que OGG1 recrute CHD4, protéine du complexe de remodelage NuRD aux sites de dommages oxydatifs par exemple. Il en est de même pour l'hétérodimère MSH2/MSH6 qui recrute DNMT1 aussi à des sites de dommages oxydatifs [341, 360, 361]. Toutes ces données démontrent un rôle des ROS dans la régulation transcriptionnelle via la mise en place et/ou la contribution à des mécanismes épigénétiques lesquels peuvent contribuer à la dédifférenciation et à la progression tumorale.

OBJECTIFS DE LA THESE

Les cancers papillaires de la thyroïde (CPT) localement avancés et métastatiques arborant la mutation BRAF^{V600E}, sont de faible pronostic en raison de la mise en place d'un processus de dédifférenciation conduisant à la répression de gènes impliqués dans la captation et l'organification de l'iode. La re-différenciation cellulaire est devenue une stratégie thérapeutique. L'équipe a montré que la mutation BRAF^{V600E} dans les CPTs augmente l'expression de la NADPH oxydase 4 (NOX4) via la sécrétion et l'activation de la signalisation du TGF- β et que les ROS générées par NOX4 interviennent dans la répression du gène SLC5A5 codant pour le transporteur de l'iode, le NIS [232]. In vitro, les antioxydants ou l'inhibition de NOX4 par ARN interférence dans les cellules thyroïdiennes tumorales mutées BRAF^{V600E} ont conduit à la réexpression du NIS. La réversibilité de ce processus suppose que NOX4 intervient dans la répression génique via la mise en place de mécanismes épigénétiques.

L'objectif de cette thèse est donc de 1- déterminer les évènements moléculaires et mécanistiques régulés par NOX4 qui contribuent à l'extinction réversible des gènes impliqués dans la différenciation thyroïdienne dont SLC5A5, et 2- d'analyser l'effet d'inhibiteurs de BRAF/MEK utilisés en clinique sur le mécanisme épigénétique dépendant de NOX4 dans les cellules cancéreuses thyroïdiennes mutées BRAF^{V600E}.

Résultats



Article 1

Les dommages oxydatifs à l'ADN générés par NOX4 empêchent le recrutement des facteurs de transcription PAX8 et NKX2.1 à la chromatine dans les cellules cancéreuses thyroïdiennes arborant la mutation BRAF^{V600E}

Mickaëlle Radom¹, Camille Buffet², Juliana Cazarin^{1,3}, Marilyn Harinquet¹, Caroline Coelho de Faria¹, Eric Baudin⁴, Julien Hadoux^{1,4}, Abir Al Ghuzlan^{1,5}, Mohamed-Amine Bani⁵, Sophie Leboulleux⁴, Livia Lamartina⁴ and Corinne Dupuy^{1*}

Authors' Affiliations

¹ UMR 9019 CNRS, Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, 94805 Villejuif, France ; ² Sorbonne Université, Unité Thyroïde-Tumeurs endocrine, Groupe de Recherche Clinique n°16 Tumeurs Thyroïdiennes, AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France ; ³ Department of Biomedical Genetics, University of Rochester School of Medicine and Dentistry, Rochester, NY, 14620, USA; ⁴ Cancer Medicine Department, Gustave Roussy, Université Paris Saclay, 94805 Villejuif, France; ⁵ Cancer Medical Pathology and Biology Department, Institute Gustave Roussy, 94805 Villejuif, France.

Mots-clés : NOX4, ROS, dommages oxydatifs à l'ADN, BRAFV600E, cancer de la thyroïde

Résumé de l'article

Les cancers papillaires de la thyroïde (CPTs) sont les cancers thyroïdiens (CTs) les plus fréquents (80 à 90%). 40 à 60% des CPTs arborent la mutation driver BRAF^{V600E} responsable d'une forte activation de la signalisation MAPK, amenant à un processus de dédifférenciation cellulaire associé à la répression des gènes de la différenciation thyroïdienne. Parmi ces gènes, le gène SLC5A5 codant le transporteur de l'iode, le NIS, dont la présence s'avère être capitale pour l'efficacité de la radiothérapie métabolique à l'iode radioactif, principal traitement des CPTs localement avancés et métastatiques. Précédemment, l'équipe a montré que l'inhibition de la NADPH oxydase 4 (NOX4) conduit à la réexpression du NIS. Nous avons donc analysé dans ce travail, les événements mécanistiques induits par NOX4 qui contribuent à la répression du NIS.

Nos données montrent que NOX4 est présente dans la membrane nucléaire de plusieurs lignées cellulaires issues de cancers de la thyroïde, différenciés et anaplasiques porteurs de la mutation BRAF^{V600E}. NOX4 génère des ROS dans l'environnement périnucléaire et produit des dommages oxydatifs à l'ADN. En analysant la 8-oxoG, dommage oxydatif le plus abondant lors d'un stress oxydatif, nous montrons que les dommages oxydatifs sont répartis de manière non stochastique au sein du génome et sont aussi retrouvés au niveau des gènes de la différenciation thyroïdienne. Deux systèmes de réparation de l'ADN, interviennent dans la réparation de la 8-oxoG induite par NOX4 dans nos modèles cellulaires, le système de réparation par excision de bases (BER) et le système de réparation des mésappariements de l'ADN. Nous montrons que des acteurs de la réparation appartenant à ces deux systèmes, à savoir les protéines OGG1, MSH2, MSH6 coopèrent avec des modificateurs épigénétiques tels que la DNA méthyltransférases 1 (DNMT1) dans la répression des gènes en perturbant la fixation à la chromatine des facteurs de transcription de la différenciation thyroïdienne PAX8 et NKX2.1.

Dans un second temps, nous avons analysé l'effet d'inhibiteurs de BRAF/MEK utilisés en clinique sur le mécanisme épigénétique dépendant de NOX4 et montrons une régulation différentielle des expressions protéiques de l'hétérodimère MSH2/MSH6 et OGG1 par la signalisation MAPK. Enfin, nous avons démontré un intérêt clinique de l'inhibition de NOX4 conjointement à l'inhibition de BRAF/MEK dans la potentialisation du recrutement des facteurs de transcription PAX8 et NKX2.1 à la chromatine et dans la réexpression des gènes de la différenciation thyroïdienne.

Article 1



NOX4-derived oxidative DNA damage prevent the recruitment of the transcription factors PAX8 and NKX2.1 to chromatin in BRAF-mutated thyroid cancer cells.

Mickaëlle Radom¹, Camille Buffet², Juliana Cazarin^{1, 3}, Marylin Harinquet¹, Caroline Coelho de Faria¹, Eric Baudin⁴, Julien Hadoux^{1, 4}, Abir Al Ghuzlan^{1, 5}, Mohamed-Amine Bani⁵, Sophie Leboulleux⁴, Livia Lamartina⁴ and Corinne Dupuy^{1*}

Authors' Affiliations

¹ UMR 9019 CNRS, Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, 94805 Villejuif, France ; ² Sorbonne Université, Unité Thyroïde-Tumeurs endocrine, Groupe de Recherche Clinique n°16 Tumeurs Thyroïdiennes, AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France ; ³ Department of Biomedical Genetics, University of Rochester School of Medicine and Dentistry, Rochester, NY, 14620, USA; ⁴ Cancer Medicine Department, Gustave Roussy, Université Paris Saclay, 94805 Villejuif, France; ⁵ Cancer Medical Pathology and Biology Department, Institute Gustave Roussy, 94805 Villejuif, France.

*correspondence: corinne.dupuy@gustaveroussy.fr

KEYWORDS: NOX4, ROS, Oxidative DNA damage, BRAF^{V600E}, thyroid cancer

Abstract

Radioiodine therapy (RAI), which is the cornerstone of the treatment of distant metastasis from differentiated thyroid cancers (DTC), can be effective only in the presence of RAI uptake in tumor cells that is dependent upon the expression of the iodide transporter NIS. The majority of DTC are papillary with a BRAF^{V600E} mutation present in 45% to 60% of cases. This mutation is associated with an absence of RAI uptake with a low NIS expression and a low differentiation score. A promising approach for the treatment of these RAI-refractory patients is to re-enhance RAI uptake by promoting tumor redifferentiation.

NOX4-derived ROS contribute to NIS repression in BRAF-mutated thyroid cancer cells. Deletion of NOX4 promotes reactivation of NIS. This reversibility suggests a contribution to an epigenetic mechanism. Our results show that NOX4 produces oxidative DNA damage in BRAF-mutated thyroid cancer cells. These damages are converted into transcription-blocking damages by DNA repair proteins including OGG1 and MSH2/MSH6 proteins. This prevents the binding to the chromatin of PAX8 and NKX2.1 (TTF1), two transcription factors involved in the regulation of the expression of thyroid-specific genes. We provide a molecular basis for how NOX4 can promote thyroid dedifferentiation.

Introduction

Radioiodine therapy is based on the ability of thyroid cells to uptake and concentrate iodide. The sodium iodide symporter (NIS), localized in the basolateral membrane, mediates the active transport of iodide from the blood stream into the thyroid cells. Iodide is then handled by the unique iodide-metabolizing machinery. This machinery, which is under the control of TSH, concentrates iodine into the cells and plays a key role on radioiodine efficacy [1]. Dedifferentiation is related to a decrease or even a loss of the expression of both thyroid specific genes (SLC5A5 (NIS), TPO, Tg, TSHR) and thyroid transcription factor genes (PAX8 and NKX2.1 (TTF1)) that play a crucial role in the regulation of gene transcription activity in thyroid follicular cells [2].

The absence or loss of radioactive iodine (RAI) uptake in thyroid cancer cells is a major challenge for the treatment of patients with differentiated thyroid cancers (DTC). An approach for the treatment of RAI-refractory patients is to re-enhance RAI uptake or to re-differentiate tumors [1]. Restoring RAI uptake is indeed the first step of redifferentiation.

Most DTC are differentiated papillary cancers (PTC) (80% of patients) which are characterized in particular by the presence of the BRAF^{V600E} mutation in 45% to 60% of cases. This mutation is associated with tumor aggressiveness and with a low expression level of the genes involved in iodide metabolism and a low tumor differentiation score [3] finally resulting in RAI refractoriness. The exact mechanism underlying this phenomenon is unclear. BRAF is a powerful activator of the MEK/MAP kinase pathway. Although it has been observed in an engineered mouse model that inhibition of mutated BRAF or MEK leads to a reactivation of NIS expression associated with an uptake of iodide by thyroid tumors [4], heterogeneous results were observed in humans [5]. Therefore, understanding the mechanisms underlying the loss of expression of NIS and genes involved in thyroid function is important to identifying new molecular targets and proposing new treatment modalities.

Several studies have clearly demonstrated that reactive oxygen species (ROS), through numerous redox reactions, regulate cellular functions including gene expressions. In cells, NADPH oxidases (NOXs/DUOXs), which are membrane-bound complexes, are totally devoted to the production of ROS [6]. The thyroid cells express three of them: DUOX2 whose role is to provide H₂O₂ necessary for TPO as well as DUOX1 and NOX4 whose roles in this tissue are still unknown. We previously showed that BRAF^{V600E} controls NOX4 expression and that NOX4-derived ROS contribute to the repression of NIS at the transcriptional level [7]. In fact, the level of NOX4 expression is significantly increased in mutated BRAF human and murine tumors and is inversely correlated to thyroid differentiation suggesting that genes involved in thyroid differentiation in addition to NIS might be silenced by a mechanism controlled by NOX4-derived ROS [7].

The reversibility of the extinction of *SLC5A5* gene encoding NIS by NOX4 suggests its contribution to an epigenetic mechanism including methylation of genes by DNA methyltransferases (DNMTs) and/or deacetylation of histones by histones deacetylases (HDACs). DNA methylation is a key player in the regulation of gene expression and genes can

be aberrantly silenced by promoter CpG island hypermethylation. ROS can promote epigenetic changes. 8-oxoGuanine (8-oxoG) is the most abundant of base damage during oxidative stress. Increased 8-oxoG is associated with carcinogenesis and can be repaired by Base Excision Repair (BER), a multistep process that requires several activated proteins such as OGG1, and by regulating non-canonical Mismatch repair (MMR). MMR proteins MSH2 and MSH6 play important role in repairing clustered oxidative damage found in GC-rich regions of the genome including promoter CpG island [8]. Recent results have linked repair of oxidative damage by MSH2-MSH6 to transcriptional inhibition by DNMT1 at sites of DNA damage [9]. Herein, we show that NADPH oxidase NOX4, as H₂O₂ generating system, produces oxidative DNA damage in BRAF-mutated thyroid cancer cells. These damages are converted into transcription blocking damage by OGG1 and MMR proteins by affecting in particular the binding of PAX8 and NKX2.1 (TTF1) to the chromatin, two key transcription factors involved in the regulation of the expression of thyroid-specific genes. Adding inhibition of the MAPK pathway to the knockdown of NOX4 potentiates the recruitment of the two transcription factors to the chromatin. Collectively, our results provide novel mechanism insights on the role of NOX4-derived ROS on thyroid dedifferentiation process.

Material and Methods

Key resources table.

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
Rabbit monoclonal anti-NOX4 U0TR1B492	Abcam	109225
Mouse p22phox (44.1)	Santa Cruz Biotechnology	Sc-130551
Anti-LaminB1 [EPR8985(B)]	Abcam	
Polyclonal anti-MSH6	Life technologies	#A3000 22 A (WB)
Anti-MSH2	Abcam	#Ab70270
OGG1/2 (G5) WB	Santa Cruz	Sc376935
8-oxoG clone 483.15	SIGMA	MAB3560
Anti 8oxodG	Sigma/Millipore	AB5830 (OxiDIP)
Anti-8 oxodG (15A3)	Biotechnie/R&D	4354-MC050 (cytometry)
b-Tubuline (BT7R)	Therscientific	MA5-16308
Mouse Anti-Vinculin [Vin54]	Abcam	Ab130007
Mouse monoclonal anti-DNMT1	Abcam	Ab13537
Anti-DNMT3a	Abcam	Ab2850
Anti-DNMT3b	Ozyme/Biolegend	#695202
Rabbit PAX8 (D2521)	Cell Signaling	#59019
Rabbit TTF1 D2E8	Cell Signaling	#123735
Anti phospho-p44/42 MAPK	Ozyme/cell signaling	4370
ERK	Cell signaling	#4696
Rabbit p-MEK1/2 ser217/221	Ozyme/Cell signaling	#9121
Mouse MEK L38C12	Ozyme/Cell signaling	#4694
p-SMAD3	Abcam	Ab51451
Monoclonal SMAD3 (5G11)	Thermo	MA5 15663
Anti g-H2AX phosphor s139 [EP854(2)Y]	Abcam	Ab81299
Anti-gH2AX (JBW301)	Millipore/Sigma	05-636-l
Anti-H2AX	Abcam	Ab11175
Mouse monoclonal Myc-Tag (9B11)	Cell signaling	22765
Mouse monoclonal antilaminA/C	Santa Cruz	Sc-7292
Anti-LaminB1 [EPR8985(B)]	Abcam	Ab133741

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Chemicals		
Dabrafenib	Selleck	S2807

Trametinib	Selleck	S2673
Interferin	OZYME	POL409-10
Protease inhibitor	Roche/Sigma	04693116001
Phosphatase inhibitor	Roche	04906845001
TEW-7197	Selleck Chem	
NucPE1	Med Chem Express	1404091-23-1
X-Treme HP DNA transfection reagent	SIGMA	6366236001
Diphenylene iodonium chloride	Sigma	300260
Critical Commercial Assays		
Fast Universal SYBR Green Master Kit (ROX)	Roche	04913850001
Taqman Universal Master Mix	Thermo	#4364338
RNA isolation Kit	Macherey Nagel	740955-50
DNA isolation Kit		
MeDIP Kit		
ATAC Kit		
Maxima Reverse transcription Kit	Thermo	EP0743
Qiashredder	Qiagen	79654
Experimental Models: Cell lines		
BCPAP	DSMZ-German Collection	
8505C	DSMZ-German Collection	
PDX563		
Oligonucleotides		
Primers for RT-qPCR	This paper	See table S
Recombinant DNA		
mycOGG1	Addgene	
pcDNA3.1 EYFP H148Q/I125L	Addgene	#25872
Software and Algorithms		
GraphPad Prism		
ImageJ		

Experimental procedures

Cell culture, chemicals, treatments and Plasmids.

Cell lines: BCPAP and 8505C were obtained from DSMZ-German Collection and maintained at 37°C and 5% CO₂ in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (4.5 g/L glucose) (Life technologies) and RPMI-1640, respectively, supplemented with 10% (vol/vol) FCS (Life technologies) and penicillin/streptomycin (100 mg/ml; Life technologies). Primary human thyroid cells were cultured as previously described [10].

PDX generation and PDX cell line

The PDX563 cell line was derived from a 76-year-old female with BRAF^{V600E}-mutated anaplastic thyroid cancer (ATC). In 2010, the patient was originally diagnosed with 3-cm right papillary thyroid carcinoma with extrathyroidal extension. She was treated with total thyroidectomy followed by the administration of 100 mCi I-131. After initial treatment, the control I-131 whole body scintigraphy and FDG-PET were normal. Her serum thyroglobulin level was 0.8 ng/mL under LT₄ treatment. In 2017, the serum thyroglobulin level increased to 3.3 ng/mL. The CT scan found a 13 mm right latero-tracheal mass, a 4 mm lymph node in the left compartment VI and pulmonary micro-nodules. The FDG-PET showed a high uptake in the latero-tracheal mass, and its biopsy demonstrated a recurrence of the papillary carcinoma. The patient received a second treatment with 100 mCi of I-131, and no uptake was found on post-therapy whole body scintigraphy. End of 2018, the FDG-PET showed an increase in uptake of all lesions and the appearance of uptake in the right arm. Biopsy of the right arm revealed an anaplastic carcinoma of the thyroid with a marked infiltration of macrophages. The patient received Dabrafenib-Trametinib combination treatment and external beam radiation to the neck and to the right arm. Despite treatment, the neck tumor continued to grow and the patient died in 2021.

Fresh fragments of tissue biopsy of ATC were implanted in the sub-renal capsule of NOD scid gamma (NSG) mice obtained from Charles River Laboratories. Xenografts were then serially propagated subcutaneously from mice to mice up to five passages to generate a viable tumor bank. Patient-derived cell line was developed from PDX samples. They were processed by enzymatic digestion with the tumor dissociation kit (Ref.130-095-929, Miltenyi Biotec) and mechanic degradation with the gentleMACs™ dissociator. Cells were cultured with DMEM/F12+GlutamMAX™ 10% FBS and 10% enriched with hydrocortisone 0.4 µg/ml, cholera toxin 8.4 ng/ml, adenine 24 µg/ml and ROCK inhibitor 5 µM (Y-27632, S1049 Selleckchem) until a stable proliferation of tumor cells was observed.

Ethics

The patient participating in the study was fully informed and sign an informed consent. The MATCH-R trial has been approved by the ethics committee at Institut Gustave Roussy, the

French National Agency for Medicines and Health Products Safety (ANSM) and is conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. All animal procedures and studies have been approved by the French Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (APAFIS#2790-2015112015055793).

Tight chromatin fractionation and whole-cell protein extraction

The tight chromatin fractionation protocol was adapted with slight modifications from O'Hagan et al [11]. Briefly, cell pellets were suspended in buffer A (10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.34 M sucrose, 10 % glycerol, 1mM DTT, 1 x protease and phosphatase inhibitor cocktail. Triton X-100 was then added to the cell suspension to reach a final concentration of 0.1%. and incubated for 5 min on ice before centrifugation for 4 min at 1300 x g, 4°C. The supernatant that is enriched in cytoplasm soluble proteins was discarded and the nuclei pellet was washed with buffer A, then resuspended in buffer B (3 mM EDTA, 0.2 mM EGTA, DTT 1 mM, 1 x protease and phosphatase inhibitor cocktail) and incubated 10 min on ice. The nuclei suspension was centrifuged for 4 min at 1700 x g, 4°C. The supernatant was discarded and the pellet, corresponding to the chromatin fraction, was washed in buffer B and centrifuged for 1 min at 10,000 g, 4°C. The chromatin fraction was washed with buffer C (50 mM Tris/HCl pH 8, NaCl 0.45 M, IGEPAL 0.05 %, 1 x protease and phosphatase inhibitor cocktail to solubilize proteins weakly bound to chromatin and centrifuged for 1 min at 10,000 g, 4°C. The remaining pellet was lysed in TEX buffer (100 mM Tris-HCl pH 7.0 containing 2.5% (wt/vol) SDS, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 4 M urea, and a mixture of phosphatase and protease inhibitors (Calbiochem) using Qias shredder (Qiagen) and referred as tight chromatin. Whole cell extracts were prepared from 1/10 of the pellet collected after treatment before beginning the tight chromatin isolation. Vinculin and LaminB immunoblotting served as cytoplasmic and nuclear controls, respectively.

siRNA Knockdown

Cells were transfected at 50%–60% confluence with specific human siRNA against NOX4 (silencer select siRNA, ThermoFisher), scrambled siRNA control (ThermoFisher), or siRNA against p22phox (on target-plus siRNA pool, Horizon Perkin Elmer company) , siRNA against OGG1 (silencer select siRNA, ThermoFisher), siRNA against DNMT1 (on target-plus siRNA pool, Horizon Perkin Elmer company), siRNA against MSH2 (Stealth Select RNAiTM, ThermoFisher) and siRNA against MSH6 (Eurogentec, Target sequences is 5'-CCCUGGCAAACAGAUUAAA-3') using the INTERFERIN transfection reagent (Polyplus-Transfection) according to the manufacturer's protocol.

Protein extraction and western blotting

Western blot analysis was performed with lysates prepared as previously described [12]. Membranes were probed with primary antibodies (Table 1) overnight at 4°C under constant

agitation. Membranes were washed 3 times with TBS-T and incubated with goat anti-rabbit IgG-HRP antibody (Southern Biotech) or goat anti-mouse IgG-HRP antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc) for 45 minutes at room temperature. Membranes were washed again 3 times with TBS-T and the proteins were visualized by enhanced chemiluminescence.

Flow cytometry analysis of 8-oxoG.

Cells were fixed in 70% ethanol at -20°C and washed with PBS before to be permeabilized with 0.1% Triton X-100/PBS for 15 min at room temperature. The cells were then washed with PBS and blocked in 2.5 % bovine serum albumin/PBS for 30° min at room temperature. The cells were treated with 50 µg/ml RNase incubated with anti 8-oxodG (Biotechne/R&D systems 4354-MC-050, 1:50 diluted in 2.5% BSA/PBS) for 1 hour at 37°C. The cells were then washed one time with 0.2% BSA/PBS and incubated with the secondary antibodies Alexa 488 antimouse in 0.2% BSA/PBS for 1 hour at 37°C before propidium iodide staining. Cytofluorimetric acquisition and analysis were performed on a BD Accuri C6 plus Flow cytometer.

Nuclear H2O2 production by FACS analysis

The measurement of nuclear H2O2 was achieved using NucPE1 (Nuclear Peroxy Emerald 1, ChemScene) [13]. The cells were incubated for 45 min at 10 µM NucPE1 in the dark. The incubation was followed by washing and analysis by flow cytometry.

Cell viability assays

The cell viability was assessed by using the resazurin assay according to the manufacturer recommendations.

Plasmid transfection

Twenty-four hours before the experiment, Human thyrocytes from primary culture (2.5 × 10⁵ cells/well) were seeded in 6-well plates. Cells were transiently transfected following the manufacturer's instructions using 3 µl of X-tremGENE HP DNA transfection reagent (Roche) and 1 µg of total DNA consisting of the BRAFV600E/pcDNA3.1 plasmid. Experiments were performed 48 h post-transfection.

Plasmid/siRNA cotransfection

Twenty-four hours before the experiment, BCPAP and PDX cell lines (4 × 10⁵ cells/well) were seeded in 6-well plates. Cells were transiently transfected following the manufacturer's instructions using 4 µl of jetPRIME siRNA and DNA transfection reagent (Ozyme), 10 µM of siRNA and 400 ng of total DNA (Myc-OGG1/pcDNA3.1 plasmid). Experiments were performed 72 h post-transfection.

RNA extraction, cDNA synthesis and Real time PCR

Total RNA from cell samples were purified with the Nucleospin RNA II kit (Machery Nagel). RNA yield was determined on a spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA). 1 µg of DNase-treated RNA was reverse-transcribed using Maxima reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific) and oligodT in a total reaction volume of 20 µl of PCR buffer according to the manufacturer's protocol for 60 min at 55°C. Quantitative PCR (qPCR) was performed on an ABI 7500 system (Applied Biosystems) using Taqman gene expression assays (Thermo Fisher Scientific): SLC5A5 (Hs00950365_m1); NOX4 (Hs04980925_m1); MSH2 (Hs00954125_m1); MSH6 (Hs00943000_m1); TSHR (Hs01053846_m1); OGG1 (Hs00213454_m1).

OxiDIP assays

The 8-oxodG-enriched genomic fragments from BCPAP cells were obtained as previously described [14]. Briefly, genomic DNA was extracted by using Dneasy Blood & Tissue kit (Cat. no. 69504, Qiagen). 20 µg of genomic DNA were sonicated in 130 µl TE buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5 M EDTA pH 8.0) using microtube AFA Fiber Snap-Cap (PN520045) and Covaris instrument. DNA shearing settings were based on Covaris standard parameters for fragmentation to achieve 300bp. 4 µg of fragmented DNA were denatured 10 min at 95°C, put immediately on ice for 10 min before to be immuno-precipitated overnight at 4°C with 4 µl of polyclonal antibodies against 8-oxodG (AB5830 Millipore) in a final volume of 200 µl IP buffer (110 mM NaH₂PO₄, 110 mM Na₂HPO₄ pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.05% Triton X-100, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5 M EDTA pH 8.0). Then, 25 µl Dynabeads Protein G (Cat. No. 10003D, ThermoFisher Scientific, previously saturated with 0.5% bovine serum albumin diluted in PBS) was added for 3h at 4°C, under constant rotation, and washed three times with 1 ml washing buffer (110 mM NaH₂PO₄, 110 mM Na₂HPO₄ pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.05% Triton X-100). The immune-complexes were then disrupted by incubation in 200 µl lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8, 1% SDS, 0.5 mg/ml Proteinase K) for 4 h at 37°C, and 1 h at 52°C following addition of 100 µl lysis buffer. MinElute PCR purification kit was used to purify the ssDNA immuno-precipitated (Cat. No. 28004, Qiagen) in a final volume of 72 µl EB buffer (provided in the kit). All the steps of OxiDIP-seq protocol, including the washes of the immunocomplexes, were carried out in low-light conditions, and 50 µM *N-tert*-butyl- α -phenylnitron (stock solution: 28 mM in H₂O; B7263, Sigma) was added to each Dneasy Blood&Tissue buffer, IP and washing buffers, to preserve the oxidized DNA. The recovered ssDNA was converted to dsDNA using Random Primers DNA Labeling System (Cat. No. 18187013, ThermoFisher Scientific).

Preparation of OxiDIP sequencing libraries

Enriched DNA from OxiDIP and Input DNA fragments were end-repaired, extended with an 'A' base on the 3' end, ligated and amplified for indexation (11 cycles) using SureSelectXT Low Input Target Enrichment (Agilent) with the Bravo Platform (Agilent). Libraries were purified after PCR with AMPure XP beads (Beckman Coulter). The final libraries were pooled and sequenced using the onboard cluster method, as paired-end sequencing (2x50 bp reads) on Illumina NovaSe-6000 sequencer at Gustave Roussy.

MeDIP-seq library construction and sequencing

Genomic DNA was isolated from BCPAP cells using the Dneasy Blood & Tissue kit (Qiagen). Methyl-DNA immunoprecipitation (MeDIP) was performed as recommended by the manufacturer (Active Motif, Carlsbad, CA, USA). In brief, 20 µg of genomic DNA were sonicated in 130 µl TE buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5 M EDTA pH 8.0) using microtube AFA Fiber Snap-Cap (PN520045) and Covaris instrument, producing DNA fragments averaging 300bp. 1 µg of fragmented DNA were denatured 10 min at 95°C, put immediately on ice for 10 min before to be immuno-precipitated overnight at 4°C with a 5-methylcytosine-specific antibody. Immunoprecipitated DNA was bound to magnetic beads, washed and eluted. The library construction for MeDIP sequencing was achieved according to the protocol recommended by the manufacturer (Active Motif). The immunoprecipitated DNA was purified by using the MinElute PCR purification kit (Qiagen) and eluted in a final volume of 15 µl.

Enriched DNA from MeDIP and Input DNA fragments were end-repaired, extended with an 'A' base on the 3' end, ligated and amplified for indexation (11 cycles) using SureSelectXT Low Input Target Enrichment (Agilent) with the Bravo Platform (Agilent). Libraries were purified after PCR with AMPure XP beads (Beckman Coulter). The final libraries were pooled and sequenced using the onboard cluster method, as paired-end sequencing (2x50 bp reads) on Illumina NovaSe-6000 sequencer at Gustave Roussy.

Read processing and identification of OxiDIP, and MeDIP-enriched regions in cells

Vector contamination was visible on 97% of the upstream reads of OxiDIP and MeDIP sequenced reads, leading the rest of the analysis of these technologies to be analyzed as single-ended libraries, by ignoring R1 mates. Reads were trimmed using FastP [15], allowing detection of sequence bias. OxiDIP-Seq, and MeDIP-Seq libraries were mapped on the human genome from Ensembl, version GRCh38.104. Sambamba [16] was used to remove reads with mapping quality below 30, and all reads without mates mapped in proper pair. Duplicated reads were marked with Sambamba, but not removed for downstream analysis. OxiDIP sequenced reads GC bias was assessed by DeepTools, as described in protocol of Hahm et al. 2022 [17]. Samtools [18] and Picard [19] were used to assess quality of the mapping and

showed a good overall mapping quality. Peaks over mapped reads were called using Macs2 [20], duplicated reads were kept. The remaining 2% to 3% of non-contaminated reads present in OxiDIP-Seq and MeDIP-Seq were used to assess fragment size while calling peaks with Macs2. Differential peak analysis was performed using edgeR [21] with CSAW [22] for OxiDIPSeq, and edgeR with MEDIPS [23] for MeDIP-Seq, in order to account for the specific bias of this technology. Quality controls of each step of the differential analysis were performed with DeepTools, CSAW, and MEDIPS.

ATAC sequencing analysis

For ATAC-sequencing, BCPAP, 8505C and PDX cells were extracted and library preparation was performed according to the instructions provided in the ATAC-Seq Kit (Active Motif 53150). Raw reads qualities were assessed by FastQC [24] and FastQScreen [25], showing good overall quality for ATACSeq. Graft reads of ATAC-Seq were mapped on the human genome from Ensembl, version GRCh38.104. Sambamba [16] was used to remove reads with mapping quality below 30, and all reads without mates mapped in proper pair. Duplicated reads were marked with Sambamba, but not removed for downstream analysis. ATAC-Seq reads were shifted using DeepTools [26] as described in protocol of Buenrostro et al. 2013 [27]. Additional ATAC-Seq quality controls were performed with ATACSeqQC [28]. As reads were shifted previously, ATAC-Seq was called using the same parameters as the other libraries. Peaks were annotated using Homer [29]. Peak calling quality controls were done using DeepTools, ChipSeeker [30], and in-house python scripts. Differential peak analysis was performed using edgeR [21] with CSAW [22].

Quantification and statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software. Data was analyzed by One- or Two-way ANOVA or Student's t-test, with the minimum level of significance set at $P < 0.05$.

Results

NOX4 is involved in oxidative DNA damage in BRAF-mutated thyroid cells.

NOX4 is the only NOX with a constitutive ROS-generating activity that depends directly on its gene expression [31]. NOX4 is active in different intracellular compartments including the nucleus. Herein, compared to normal thyrocytes NOX4 appears to be highly expressed in nuclear fractions of three human cancer cell lines harboring the BRAF^{V600E} mutation, with a higher expression in 8505C and Patient-Derived cell line (PDX563) (Fig 1A). The membrane protein p22^{phox} is its functional partner and controls both NOX4 stability and function [32]. RNAi-mediated depletion of NOX4 or p22^{phox} in all BRAF-mutated thyroid cell lines decreases significantly the nuclear H₂O₂ level evaluated by FACS using NucPE1, a nuclear-localized fluorescent H₂O₂ sensor (Fig 1B). Based on these results we postulated that NOX4-dependent ROS production might be involved in oxidative DNA damage such as the formation of 8-oxo7,8-dihydroguanine (8-oxoG). As shown in figure 1C NOX4 or p22^{phox} knockdown decreased significantly the level of 8-oxoguanine in the three cell lines. We next performed a Chromatin immuno-precipitation followed by high-throughput sequencing analysis of 8-oxoG distribution. Analysis of the genomic distribution of 8-oxoG peaks from two biological replicates showed that they were enriched within intergenic and intron regions (Fig. 2A). The mapping of 8-oxoG on genome of BCPAP cells clearly showed that 8-oxoG enrichment was abolished by RNAi-mediated NOX4 depletion (Fig. 2B). The sequence alignment analysis highlighted that 8-oxoG enrichment, occurring at genomic regions including *SLC5A5* (NIS), *TPO*, *TG* and *TSHR* genes, was impacted by this deletion.

NOX-derived ROS mediates recruitment of MSH2, MSH6 and OGG1

8-oxodG is either repaired by the base excision repair (BER) pathway, a multistep process that requires several activated proteins including the DNA glycosylase OGG1, or either by the mismatch repair (MMR) system. The predominant mismatch-binding factor in human cells is MutSa formed from the heterodimer MSH2 and MSH6 that was shown to be involved in the repair of clustered oxidative DNA lesions [8]. We first examined and compared the levels of MSH2, MSH6 and OGG1 proteins in both cytosolic and chromatin fractions of thyrocytes and BRAF-mutated thyroid cells (Fig. 3A). The levels of these DNA repair proteins were all increased in cytosolic fractions of tumoral cells. The levels of MSH2 and MSH6 tightly bound to chromatin were also increased. Overall, these data suggest a role of these proteins in thyroid tumors driven by BRAF^{V600E}. Since the treatment of BRAF^{V600E} mutated thyroid cells with N acetyl cysteine (NAC), an antioxidant, or with Diphenylene Iododim (DPI), an inhibitor of NADPH oxidases, decreased the binding of MSH2, MSH6 and OGG1 to chromatin (Fig 3B and 3C), we analyzed their binding to chromatin following knockdown of NOX4 and p22^{phox}. Notably, the deletion of NOX4 or p22^{phox} reduced significantly the amount of MSH2, MSH6 and OGG1 tightly bound to chromatin without affecting their total levels in the three cell lines (Fig 4A and Supplemental Fig. S1 and S2). In addition, NOX4 and p22^{phox} knockdown decreased the affinity for the chromatin of Myc-tagged OGG1 transfected in BCPAP and PDX cells (Fig 4B

and Supplemental Fig. S3). Taken together these results reveal the key role of NOX4-derived ROS in increasing the affinity of OGG1, MSH2 and MSH6 for chromatin in BRAF-mutated thyroid cells.

NOX-derived ROS mediates recruitment of DNMT1 protein but not DNMT3a/b

The DNA methylases DNMT1 and DNMT3a,b are known as major mediators of maintenance methylation and de novo methylation of DNA in carcinogenesis. BRAF^{V600E} controls the expression of DNMT1 [33]. Accordingly, DNMT1 was found to be increased in the three human cancer cell lines harboring the BRAF^{V600E} mutation while DNMT3a,b were increased in only two (BCPAP, PDX) (Fig 5A). Treatment of BRAF-mutated thyroid cells with NAC or DPI as well as with siRNA directed against NOX4 or p22phox altered the tightness of binding of DNMT1 to chromatin (Fig 5B, 5C, 6A and Supplemental fig. S4). On the contrary, the binding of DNMT3a and DNMT3b to chromatin and their total level of expression were both increased in these conditions (Fig 6B and Supplementary Fig. S4). The knockdown of DNMT1 reproduced this result suggesting the existence of a possible compensation (Fig. 6C). From the Cancer genome Atlas (TCGA) [34], we compared DNMT1 and DNMT3b mRNA expression levels in both BRAF wild type -PTC and BRAF mutated-PTC (Fig 7A). While DNMT1 was significantly increased in PTCs harboring BRAF mutation the opposite was observed for DNMT3b. In addition, an inverse and highly significant correlation was found between DNMT1 and the Thyroid Differentiation Score (TDS) while a positive correlation was found between DNMT3b expression and the TDS suggesting that, unlike DNMT1, DNMT3b may be associated with thyroid differentiation (Fig. 7B). Taken together the results show that NOX4-derived ROS promotes chromatin recruitment of DNMT1 but decreases the binding to chromatin of two other DNMTs as well as their respective level of expression. Finally, combining siRNA-mediated MSH2/MSH6 or OGG1 depletion with Decitabine (DAC), a DNMT1 inhibitor, resulted in a strongly increased reactivation of *SLC5A5* gene indicating that MMR and OGG1 proteins cooperate with DNMT1 to maintain silencing of this gene (Fig. 8A). These results were reproduced by combining siRNA-mediated NOX4 or p22^{phox} depletion with DAC (Fig 8B). Taken together these results support a NOX4-mediated recruitment of MMR, OGG1 and DNMT1 proteins on damaged chromatin, which may synergistically cooperate together in the repression of *SLC5A5* gene.

OGG1 and MMR proteins are involved in the recruitment of DNMT1 to chromatin

Since the mismatch repair proteins, MSH2 and MSH6, as well as OGG1, were previously shown to be involved in DNMT1 recruitment to chromatin after treatment of human embryonic carcinoma NCCIT cells with 1 mM H₂O₂ [9] we evaluated the knockdown of these proteins on the binding of DNMTs to chromatin in BRAF-mutated thyroid cancer cells. MSH6 being unstable in the absence of MSH2 we chose to selectively delete MSH2. Interestingly, decreases of OGG1 and MMR proteins expression were significantly associated to a decrease of the level of DNMT1 in tight chromatin fractions and whole extracts (Fig. 9). Once again, the decrease of DNMT1 tightly bound to the chromatin was associated with an increase of the total level of

expressions of DNMT3a/3b as well as of their affinity for the chromatin (Supplemental Fig. S5). Taken together these results show that MMR and OGG1 proteins are involved in the recruitment of DNMT1 to sites of oxidative DNA damage produced by NOX4. In order to determine the role of NOX4 in genome wide DNA methylation profile, we performed a Methylated DNA immunoprecipitation coupled with next-generation sequencing (MeDIP seq). The analysis of the distribution of the DNA methylation peaks in different genomic region of BCPAP cells showed that the majority of reads were present in intron and intergenic regions (Fig. 10A). The DNA methylation enrichment peaks in the genome (Fig. 10B) and at specific regions (Fig 10C) were decreased by NOX4 deletion. These results support a role of NOX4 in both recruitment to chromatin and activity of DNMT1.

NOX-derived ROS mediates recruitment of transcription factors NKX2.1 and PAX8

The promoters of the main thyroid differentiation markers (TPO, Tg, TSHR and NIS) are regulated by the specific combination of the transcription factors NKX2.1 and PAX8. NAC or DPI treatment of BRAF-mutated thyroid cells increased the binding of PAX8 and TTF1 to chromatin as well as their total level of expression, indicating that both recruitment and expression of these proteins are redox sensitive (Fig. 11A and 11B). We then analyzed the inhibitory effect of NOX4 on the binding of these proteins to chromatin. Remarkably, knockdown of NOX4 or p22^{phox} increased significantly the affinity of the two transcription factors for chromatin in BRAF-mutated thyroid cell lines analyzed (BCPAP, PDX) (Fig 11C and supplemental Fig. S6). PAX8 being undetectable in 8505C cells only the effect on NKX2.1 was analyzed and the same result was obtained. Knockdown of OGG1 or both MSH2 and MSH6 facilitated also the recruitment of the two transcription factors at the chromatin in BRAFmutated cell lines. Their total level of expressions appeared also modulated depending on the cell lines (Fig.12 and supplemental Fig S7 and S8). These results show that NOX4-derived ROS prevent PAX8 and NKX2.1 binding to the chromatin through oxidative damage-induced recruitment of DNA repair proteins to the chromatin.

To further investigate the impact of NOX4 deletion on genome-wide chromatin accessibility we performed Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing (ATAC-seq) on BCPAP, 8505C and PDX563 tumoral thyroid cells. A relatively clear footprint of TF occupancy was detected near the aggregated PAX8 and NKX2.1 full sites in accessible chromatin regions in all control and p22^{phox}-deleted cells (Fig. 13 A and Supplemental fig. S9). In addition, the level of compaction of PAX8 and NKX2.1 genes was not affected by p22^{phox} deletion (Fig 13B). Intergenic and intron regions represented the most enriched genomic feature of the accessible regions in the BRAF-mutated thyroid cell lines (Fig. 13C). Most of the peaks were 0-1 kb and 10–100 kb away from TSS. This distribution was not affected by p22^{phox} deletion (Fig. 13D). Finally, abrogation of p22^{phox} expression did not modulate accessibility to the set of genes involved in thyroid hormone biosynthesis (Fig 13E).

MSH2 and MSH6 are increased in BRAF-mutated papillary thyroid carcinomas

From TCGA data, we compared MSH2 and MSH6 mRNA expression levels in BRAF^{WT}-PTCs (n = 170) and BRAF^{MUT}-PTCs (n = 220). Both MSH2 and MSH6 were significantly increased in PTCs harboring BRAF mutation (Fig. 14). To investigate whether MSH2 and MSH6 are regulated by mutated BRAF we transduced primary human thyrocytes with expression vector carrying cDNA for BRAF^{V600E}. Western-blot analysis shows that overexpression of the activated oncogene induced an increase in both MSH2 and MSH6 protein levels in addition to DNMT1 showing that BRAF^{V600E} regulates MSH2 and MSH6 expressions (Fig. 14B).

Clinical evidence linking MAPK pathway inhibition with increased molecular differentiation in patients has been provided; supporting that MAPK is a critical regulator of thyroid tumor differentiation. The combination Dabrafenib/trametinib inhibits mutated BRAF and MEK, respectively. Treatment of BRAF-mutated thyroid cell lines for 72 hours with the combination led to downregulation of MMR proteins in addition to DNMT1 in BRAF-mutated thyroid cell lines indicating that the MAPK pathway controlled the expression of these proteins in tumor cells (Fig 15 and supplemental Fig. S10). Importantly, this treatment had an opposite effect on OGG1 expression, which was up-regulated in this condition (Fig 16A and 16 B). This was associated with a decrease of γ H2AX, a marker of DNA damage (Fig 16C and 16D).

NOX4 cooperates with the MAPK pathway in thyroid dedifferentiation process

Knockdown of NOX4 or p22^{phox} in combination with Dabrafenib/Trametinib treatment increased the recruitment of NKX2.1 and PAX8 to the chromatin (Fig 17A and 17B)). This was associated with an increase of both expression of NIS and TSHR at the mRNA levels indicating that the NADPH oxidase NOX4 cooperates with MAPK pathway in thyroid dedifferentiation process (Fig. 18A and 18B).

We previously shown that the TGF- β 1 signaling pathway upregulates NOX4 in BRAF-mutated thyroid cells at the transcriptional level in a Smad3-dependent manner [7]. Treatment of BRAF-mutated cells with an inhibitor of TGF-beta receptor increased recruitment of PAX8 and NKX2.1 to the chromatin and this effect was potentialized when the inhibitor was combined with MAPK kinase pathway inhibitors. This resulted in an increase of both TSHR and NIS mRNA expressions ((Fig 19A et 19B).

Discussion

The findings reported here add new insights to our understanding on epigenetic role of 8-oxoG in Braf-mutated thyroid cancers and highlight the contribution of oxidative DNA damage in redox-mediated control of gene expression in thyroid dedifferentiation process by altering the recruitment of two key transcription factors, PAX8 and NKX2.1. It has been previously shown that oxidative damage, induced by treatment of cancer cells with hydrogen peroxide (H₂O₂), causes localization of epigenetic silencing complexes to GC-rich regions of the genome, resulting in reduced gene expression [11]. This raised the question concerning the role of endogenous H₂O₂ generating enzymatic systems in epigenetic mechanisms associated with oxidative DNA damage, this being all the more important as H₂O₂ induces DNA damage in a dose dependent manner, its production in cells is tightly regulated and its spatial distribution is not uniform [35, 36]. Thus, the regulation of epigenetic mechanisms must depend on the nuclear level of H₂O₂. NADPH oxidases are 'professional producers of ROS' as their primary function is to generate ROS. NOX4 is one of them with a constitutive H₂O₂ generating activity that depends directly on its gene expression. Since we previously found that NOX4 expression is increased in BRAF-mutated thyroid tumors, we undertook to study its role in an epigenetic mechanism that would contribute to the repression of genes involved in thyroid differentiation. NOX4 is active in different intracellular compartments and organelles including nuclei where it was associated with disease progression [37, 38]. In the present study, we show that, compared to normal thyrocytes, BRAF-mutated thyroid cells well express NOX4 in the nuclear environment where it produces H₂O₂ that is directly responsible for the formation of 8-oxoG DNA damage. Genome-wide mapping of 8-oxoG in BCPAP cells revealed that the majority of 8-oxoG are distributed in intergenic regions, which are regulatory regions. A strong reduction of 8-oxoG was found in genomic DNA when NOX4 was deleted demonstrating the direct role of this NADPH oxidase in the generation of oxidative DNA damage. Removal of oxidized bases is initiated by OGG1 [39]. Interestingly, it was shown that oxidative stress triggers the preferential assembly of OGG1 and other proteins involved in BER on open chromatin regions, suggesting repair of active chromosome regions [40].

In addition to play a prominent role in recognition and excision of 8-OxoG sites, OGG1 acts also as a transcriptional modulator that can control transcription factor homing, or recruit chromatin remodelers [41]. Moreover, the non-canonical Mismatch repair (MMR) system, including proteins MSH2 and MSH6 plays important role in repairing clustered oxidative damage found in GC-rich regions of the genome including promoter CpG island [8]. A higher level expression of MSH2 was found in malignant thyroid tumors compared to benign tumors [42] suggesting a functional activation of MMR genes. However, the involvement of MMR proteins in the development and progression of thyroid cancer remained to be demonstrated. Knockdown of NOX4 or its functional partner p22^{phox} as well as treatment with antioxidants inhibited both OGG1 and MMR proteins recruitment to the chromatin in BRAF^{V600E} mutated thyroid cells. Remarkably, deletion of these DNA repair proteins reactivated the expression of

SLC5A5 gene encoding NIS indicating that 8-oxoG produced by NOX4 was converted into transcription-blocking damage by OGG1 and MMR proteins. Therefore, 8-oxoG serves as an epigenetic modification that affects gene transcription in BRAF-mutated thyroid cancer cells. This study reveals a role of OGG1 and MMR proteins as transcription blockers in thyroid tumors driven by BRAF^{V600E}. Thus, as previously described in colorectal cancer cells, besides to play an important role in the maintenance of DNA integrity, OGG1 and MMR proteins appear to prevent also transcription of genes in thyroid tumors from interfering with the repair process. The 8-oxoG is frequently studied as a potent mutagenic oxidative base. However, compared to other tumors, thyroid tumors show a low overall density of somatic mutations, indicating a good support by both BER and MMR systems. Accordingly, loss of MSH2 and MSH6 was associated with an hypermutated phenotype found in anaplastic thyroid carcinoma, which is a highly undifferentiated and aggressive malignant tumor [43].

DNA methylation is altered in thyroid cancer. The papillary thyroid cancer (PTC) has one of the lowest frequencies of DNA methylation, both in global DNA and gene promoters [34]. The BRAF^{V600E} mutation, which is more associated with the classical subtype of PTC, correlates with an increase in DNA hypomethylation. However, aberrant hypermethylation of the promoter region of genes, such as *SLC5A5* (NIS), *NKX2.1* (TTF1) and *TSHR* has been demonstrated in thyroid tumors including BRAF-mutated tumors [44]. The DNA methylases DNMT1 and DNMT3a,b are known as major mediators of maintenance methylation and de novo methylation of DNA in carcinogenesis. DNMT1 was shown to be required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells [45]. Recent data suggest that DNMT1 can also modulate gene expression independent of its catalytic activity and participates in multiple processes including the cell cycle and DNA damage repair [46]. BRAF^{V600E} controls the expression of DNMT1 and its expression is found to be increased in PTCs expressing the oncogene [33]. However, the redifferentiation effect of DNMTs inhibitors such as 5-azacytidine in human thyroid cancer cell lines has not shown any significant effect on NIS mRNA reinduction and/or radioiodine uptake increase [47]. Several publications suggest that drug combination may be a powerful redifferentiation strategy. Our data show that NOX4 controls chromatin recruitment of DNMT1, but not that of DNMT3a and DNMT3b. On the contrary, both expressions and recruitments of these two DNMTs to chromatin were increased after knockdown of NOX4. This result was somewhat different from that it was previously observed after treatment of cells with exogenous H₂O₂ where both DNA methyltransferases DNMT1 and DNMT3b, contained in an epigenetic complex, were recruited to sites of damaged chromatin [11]. The effect of 8-oxoG on DNA methylation may depend on the different contexts of promoter sequences and nuclear environment.

Combining siRNA-mediated MSH2/MSH6 or OGG1 depletion with Decitabine (DAC), a DNMTs inhibitor, resulted in a strong increased reactivation of *SLC5A5* gene indicating that OGG1 and MMR proteins may cooperate with DNMT1 to maintain silencing of this gene (Fig. 8A). Importantly, these results are reproduced by combining siRNA-mediated NOX4 or p22^{phox}

depletion with DAC (Fig. 8B). Taken together these results support a NOX4-mediated recruitment of OGG1 and MMR proteins on damaged chromatin, which may synergistically cooperate with DNMT1 in repression of *SLC5A5* gene. We found that increase in affinity of DNMT1 for chromatin was dependent on OGG1 and MMR proteins.

The promoters of the main thyroid differentiation markers (TPO, Tg, TSHR and NIS) are regulated by the specific combination of the transcription factors NKX2.1 (TTF1) and PAX8. It has been previously shown that a redox regulation of Pax-8 and NKX2.1, is involved in their increased DNA-binding activities by thyrotropin in rat thyroid FRTL-5 cells [48]. We show here that NOX4-derived ROS, by promoting the recruitment of OGG1 and MMR proteins to damage chromatin, affect the recruitment of the two transcription factors to chromatin in BRAF-mutated thyroid cancer cells. NKX2.1 (TTF1) and PAX8 are responsible for thyroid organogenesis and for maintenance of differentiation of thyrocytes. Therefore, by affecting the binding of these two key transcription factors to chromatin, NOX4 contributes to thyroid differentiation process (Fig. 20).

Loss of differentiation features correlates with the degree of MAPK activation, which is higher in tumors with BRAF^{V600E} mutation. These tumors have lost the expression of thyroid specific genes, particularly those encoding for the iodide-metabolizing machinery and have become radioiodine refractory. The demonstration in genetically engineered mouse model of BRAF mutant thyroid cancer that MAPK pathway inhibition restores the expression of genes that mediates iodide uptake and organification (NIS, TPO, Tg) to enhance tumor RAI avidity has renewed interest for redifferentiation strategy [4]. Clinical evidence linking MAPK pathway inhibition with increased molecular differentiation in patients has been provided, supporting that MAPK is a critical regulator of thyroid tumor differentiation. The combination Dabrafenib/Trametinib synergistically increased iodide uptake in human BRAF-mutated thyroid cancer cell lines [49]. Here we show that the expression of MSH2 and MSH6 are increased in BRAF^{V600E}-mutated thyroid tumors and that the oncogene controls their respective expression through an ERK dependent pathway. MSH2 and MSH6 expression, along with several other DNA repair genes, increase in the presence of the E2F transcription factors. The ERK cascade plays a pivotal role in the control of cell cycle progression, in particular, through the regulation of the phosphorylation of Rb protein, which is an inhibitor of E2F [50]. Thus, this study brings new elements concerning the mechanism by which the activation of the MAPK pathway contributes to thyroid dedifferentiation. On the other hand, the MAPK pathway inhibition leads to an increase of OGG1 expression, which is associated with a decrease of γ H2AX, a marker of DNA damage. This unexpected result suggests that OGG1 could confer protection against damage during treatment and thus contribute to resistance. This remains to be further investigated.

Inhibition of MAPK transcriptional output did not translate into sufficient redifferentiation in all patients treated, suggesting that either more potent pathway inhibition may be required or

that biologic factors beyond MAPK inhibition may be critical. Our data show that NOX4 or p22^{phox} knockdown potentiates the effect of the drug combination on the recruitment of PAX8 and NKX2.1 to the chromatin and this is correlated with a higher reactivation of *SLC5A5* and *TSHR* genes. Previously, Missero et al showed that the activation of the RAF/MEK/ERK pathway accounts for only part of NKX2.1 (TTF1) inactivation [51]. Here, we identify NOX4 pathway as a pathway acting in concert with the RAF/MEK/ERK cascade to totally repress NKX2.1 (TTF1) and PAX8 functions. Thyrotropin (TSH), via its receptor (TSHR), controls the thyroid function by modulating, in particular, the expression and activity of the two transcription factors. The re-expression of TSHR indicate that thyroid tumor cells became again sensitive to TSH.

A TGF- β 1 transcriptional output signature was present in advanced RAI-refractory human BRAF-mutant thyroid cancers [52]. TGF- β 1 was first shown to play a major role as a local modulator of thyroid by inhibiting both growth and differentiation in several species [53, 54]. BRAFV600E expression induces the production of functional TGF- β 1, which leads to a TGF- β driven autocrine loop that mediates, at least in part, the effects of the BRAFV600E oncoprotein, in particular the decreased expression of NIS [55] and the promotion of cell migration, invasiveness, and EMT [56]. We previously identified NOX4 as a new key effector of TGF- β 1 in BRAF^{V600E}-induced thyroid tumors [7]. Using a genetically engineered mouse model of BRAF mutant thyroid cancer, Lockett et al showed that pSMAD3, which is activated by TGF- β 1, was increased in BRAF-mutant thyroid cancers and suppression of both MAPK and pSMAD pathways led to enhancement of radioiodine uptake in mouse cancer cells [52]. Based on these results we evaluated the combined effect of Dabrafenib/Trametinib with Vactosertib, an inhibitor of the TGF- β 1 pathway, on human BRAF mutated thyroid cancer cells. Pharmacologic Inhibition of TGF-beta pathway with MAPK pathway photocopies the results obtained with the combination of knockdown of NOX4 or p22^{phox} with MAPK pathway inhibition.

Until now the precise mechanism underpinning the additive effect of SMAD and MEK inhibition on iodide uptake was unclear. Here we show that TGF- β -induced signalling through SMAD contributes in particular to the suppression of NIS by altering the recruitment of PAX8 and NKX2.1 via NOX4-dependent oxidative damage. The translational implication of this findings should be explored in future clinical trials by using combination of drugs targeting the MAPK pathway and the TGF- β 1 pathway.

Acknowledgments:

We thank Pr Martin Schlumberger for his critical reading of the manuscript. This work was performed thanks to Gustave Roussy's core facilities (Cell imaging).

Conflict of interest statement :

Mickaëlle Radom, Camille Buffet, Juliana Cazarin, Marylin Harinquet, Caroline Coelho de Faria, Eric Baudin, Julien Hadoux, Abir Al Ghuzlan, Mohamed-Amine Bani, Sophie Leboulleux, Livia Lamartina and Corinne Dupuy declare that no competing financial interests exist.

Funding statement:

Corinne Dupuy received financial support from Electricité de France (EDF), GEFLUC and Institut National Du Cancer (INCA) PLBIO22-187. Mickaëlle Radom was the recipient of a doctoral fellowship from the French Ministry of Research and technology (MRT), Juliana Cazarin was the recipient of fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) Caroline Coelho de Faria was the recipient of a fellowship from French National research Agency (ANR). Marylin Harinquet, Eric Baudin, Julien Hadoux, Abir Al Ghuzlan, Mohamed-Amine Bani, Sophie Leboulleux, Livia Lamartina have nothing to declare.

References

1. Lamartina L, Anizan N, Dupuy C, Leboulleux S, Schlumberger M. Redifferentiation facilitated radioiodine therapy in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2021 28(10):T179T191.
2. Lara P Fernández, Arístides López-Márquez and Pilar Santisteban. Thyroid transcription factors in development, differentiation and disease *Nat Rev Endocrinol* 2015 11(1):29-42.
3. Xing M (2007). BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocr Rev* 28: 742-62.
4. Chakravarty D, Santos E, et al. (2011) Small-molecule MAPK inhibitors restore radioiodine incorporation in mouse thyroid cancers with conditional BRAF activation. *J Clin Invest*. 121:4700-11.
5. Ho AL, Grewal RK, Leboeuf R, Sherman EJ, et al. (2013) Selumetinib-enhanced radioiodine uptake in advanced thyroid cancer. *N Engl J Med*. 368:623-32.
6. Ameziane-El-Hassani R, Schlumberger M, Dupuy C. (2016) NADPH oxidases: new actors in thyroid cancer? *Nat Rev Endocrinol*. 12: 485-94.
7. Azouzi N, Cailloux J, Cazarin JM, Knauf JA, et al (2016) NADPH Oxidase NOX4 Is a Critical Mediator of BRAFV600E-Induced Downregulation of the Sodium/Iodide Symporter in Papillary Thyroid Carcinomas. *Antioxid Redox Signal*. 26
8. Zlatanou A, Despras E, Braz-Petta T, et al (2011). The hMsh2-hMsh6 complex acts in concert with monoubiquitinated PCNA and Pol η in response to oxidative DNA damage in human cells. *Mol Cell*. 43:649-62.
9. Ding N, Bonham ME, Hannon BE et al (2016) Mismatch repair proteins recruit DNA methyltransferase 1 to sites of oxidative DNA damage *J Mol Cell Biol*. 8:244-54.
10. Ameziane-El-Hassani R, Talbot M, de Souza Dos Santos MC, Al Ghuzlan, A., Hartl D., Bidart J.M., De Deken, X., Miot, F., Diallo, I., de Vathaire, F., et al. (2015). NADPH oxidase DUOX1 promotes long-term persistence of oxidative stress after an exposure to irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 5051.
11. Heather M O'Hagan, Wei Wang, Subhojit Sen, Christina Destefano Shields, Stella S Lee, Yang W Zhang, Eriko G Clements, Yi Cai, Leander Van Neste, Hariharan Easwaran, Robert A Casero, Cynthia L Sears, Stephen B Baylin. Oxidative damage targets complexes containing DNA methyltransferases, SIRT1, and polycomb members to promoter CpG Islands. *Cancer Cell* 2011 20(5):606-19.
12. Weyemi, U., Caillou, B., Talbot, M., Ameziane-El-Hassani, R., Lacroix, L., Lagent-Chevallier, O., Al Ghuzlan, A., Roos, D., Bidart, J.M., Virion, A. et al. (2010). Intracellular expression of reactive oxygen species-generating NADPH oxidase NOX4 in normal and cancer thyroid tissues. *Endocr Relat Cancer* 17, 27.
13. Dickinson BC, Tang Y, Chang Z, Chang CJ. A nuclear-localized fluorescent hydrogen peroxide probe for monitoring sirtuin-mediated oxidative stress responses in vivo. *Chem Biol*. 2011 18(8):943-8.
14. Amente S, Di Palo G, Scala G, Castrignanò T, Gorini F, Coccozza S, Moresano A, Pucci P, Ma

- B, Stepanov I, Lania L, Pelicci PG, Dellino GI, Majello B. Genome-wide mapping of 8-oxo7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine reveals accumulation of oxidatively-generated damage at DNA replication origins within transcribed long genes of mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 2019 47(1):221-236.
15. Chen, Shifu, et al. "fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor." *Bioinformatics* 34.17 (2018): i884-i890.
 16. Tarasov, Artem, et al. "Sambamba: fast processing of NGS alignment formats." *Bioinformatics* 31.12 (2015): 2032-2034.
 17. Hahm, Ja Young, et al. "8-Oxoguanine: From oxidative damage to epigenetic and epitranscriptional modification." *Experimental & Molecular Medicine* 54.10 (2022): 16261642.
 18. Danecek, Petr, et al. "Twelve years of SAMtools and BCFtools." *Gigascience* 10.2 (2021): giab008.
 19. McKenna, Aaron, et al. "The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data." *Genome research* 20.9 (2010): 12971303.
 20. Gaspar, John M. "Improved peak-calling with MACS2." *BioRxiv* (2018): 496521.
 21. Robinson, Mark D., Davis J. McCarthy, and Gordon K. Smyth. "edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data." *bioinformatics* 26.1 (2010): 139-140.
 22. Lun, Aaron TL, and Gordon K. Smyth. "csaw: a Bioconductor package for differential binding analysis of ChIP-seq data using sliding windows." *Nucleic acids research* 44.5 (2016): e45.
 23. Lienhard, Matthias, et al. "MEDIPS: genome-wide differential coverage analysis of sequencing data derived from DNA enrichment experiments." *Bioinformatics* 30.2 (2014): 284-286.
 24. Andrews, S. Fastqc. "A quality control tool for high throughput sequence data. Augen, J.(2004). *Bioinformatics in the post-genomic era: Genome, transcriptome, proteome, and information-based medicine.*" (2010).
 25. Wingett, Steven W., and Simon Andrews. "FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control." *F1000Research* 7 (2018).
 26. Ramírez, Fidel, et al. "deepTools: a flexible platform for exploring deep-sequencing data." *Nucleic acids research* 42.W1 (2014): W187-W191.
 27. Buenrostro, Jason D., et al. "Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position." *Nature methods* 10.12 (2013): 1213-1218.
 28. Ou, Jianhong, et al. "ATACseqQC: a Bioconductor package for post-alignment quality assessment of ATAC-seq data." *BMC genomics* 19 (2018): 1-13.
 29. Heinz S, Benner C, Spann N, Bertolino E et al. Simple Combinations of Lineage-Determining Transcription Factors Prime cis-Regulatory Elements Required for Macrophage and B Cell Identities. *Mol Cell* 2010 May 28;38(4):576-589. PMID: 20513432

30. Yu, Guangchuang, Li-Gen Wang, and Qing-Yu He. "ChIPseeker: an R/Bioconductor package for ChIP peak annotation, comparison and visualization." *Bioinformatics* 31.14 (2015): 2382-2383.
31. Bedard, K. & Krause, K.H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* **87**, 245-313 (2007).
32. Ambasta, R.K. et al. Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase. *J Biol Chem* **279**, 45935-41 (2004).
33. Choi YW, Kim HJ, Kim YH, Park SH, Chwae YJ, Lee J, Soh EY, Kim JH, Park TJ B-RafV600E inhibits sodium iodide symporter expression via regulation of DNA methyltransferase 1. *Exp Mol Med*. 2014 46(11):e120.
34. Cancer Genome Atlas Research Network (2014). Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell* 159:676-690.
35. Antunes F, Cadenas E. Estimation of H₂O₂ gradients across biomembranes. *FEBS Lett*. 2000 475(2):121-6.
36. Huang BK, Sikes HD. Quantifying intracellular hydrogen peroxide perturbations in terms of concentration. *Redox Biol*. 2014;2:955-62.
37. Pendergrass KD, Gwathmey TM, Michalek RD, Grayson JM, Chappell MC The angiotensin II-AT1 receptor stimulates reactive oxygen species within the cell nucleus. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 384(2):149-54.
38. Kaushik D, Ashcraft KA, Wang H, Shanmugasundaram K, Shah PK, Gonzalez G, Nazarullah A, Tye CB, Liss MA, Pruthi DK, Mansour AM, Chowdhury W, Bacich D, Zhang H, Watson AL, Block K, O'Keefe D, Rodriguez R Nuclear NADPH oxidase-4 associated with disease progression in renal cell carcinoma. *Transl Res*. 2020, 223:1-14.
39. Rosenquist TA, Zharkov DO, Grollman AP. Cloning and characterization of a mammalian 8oxoguanine DNA glycosylase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 94(14):7429-34.
40. Amouroux R, Campalans A, Epe B, Radicella JP. Oxidative stress triggers the preferential assembly of base excision repair complexes on open chromatin regions. *Nucleic Acids Res*. 2010 38(9):2878-90.
41. Wang R, Hao W, Pan L, et al (2018) The roles of base excision repair enzyme OGG1 in gene expression. *Cell Mol Life Sci*. 75:3741-3750.
42. Evren B, Yilmaz S, Karadag N et al (2021) DNA repair proteins may differentiate papillary thyroid cancer from chronic lymphocytic thyroiditis and nodular colloid goiter *Sci Rep* 11:9932.
43. Kristine S Wong, Jochen H Lorch, Erik K Alexander, Matthew A Nehs, Jonathan A Nowak, Jason L Hornick, Justine A Barletta Clinicopathologic Features of Mismatch RepairDeficient Anaplastic Thyroid Carcinomas *Thyroid* 2019 29(5):666-673.
44. Zafon C, Gil J, Pérez-González B, Jordà M. DNA methylation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2019 26(7):R415-R439.

45. Robert MF, Morin S, Beaulieu N, Gauthier F, Chute IC, Barsalou A, MacLeod AR. DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells. *Nat Genet.* 2003 33(1):61-5.
46. Mohan KN. DNMT1: catalytic and non-catalytic roles in different biological processes. *Epigenomics.* 2022 14(10):629-643.
47. Buffet C, Wassermann J, Hecht F, Leenhardt L, Dupuy C, Groussin L, Lussey-Lepoutre C. Redifferentiation of radioiodine-refractory thyroid cancers. *Endocr Relat Cancer.* 2020 27(5):R113-R132.
48. F Kambe, Y Nomura, T Okamoto, H Seo Redox regulation of thyroid-transcription factors, Pax-8 and TTF-1, is involved in their increased DNA-binding activities by thyrotropin in rat thyroid FRTL-5 cells *Mol Endocrinol*
49. Zhang H & Chen D (2018) Synergistic inhibition of MEK/ERK and BRAF V600E with PD98059 and PLX4032 induces sodium/iodide symporter (NIS) expression and radioiodine uptake in BRAF mutated papillary thyroid cancer cells. *Thyroid Research* 11: 13.
50. Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res.* 2002 Mar;12(1):9-18.
51. C Missero, MT Pirro, R Di Lauro Multiple ras downstream pathways mediate functional repression of the homeobox gene product TTF-1 *Mol Cell Biol* 2000 Apr;20(8):2783-93
52. Luckett KA, Cracchiolo JR, Krishnamoorthy GP, Leandro-Garcia LJ, Nagarajah J, Saqcena M, Lester R, Im SY, Zhao Z, Lowe SW, de Stanchina E, Sherman EJ, Ho AL, Leach SD, Knauf JA, Fagin JA. Co-inhibition of SMAD and MAPK signaling enhances 124I uptake in BRAF-mutant thyroid cancers. *Endocr Relat Cancer.* 2021 28(6):391-402.
53. Grubeck-Loebenstien B, Buchan G, Sadeghi R, Kissoner-ghis M, Londei M, Turner M, Pirich K, Roka R, Niederle B, Kassal H, Waldhäusl W, and Feldmann M. Transform- ing growth factor beta regulates thyroid growth. Role in the pathogenesis of nontoxic goiter. *JClin Invest* 83: 764–770, 1989.
54. Taton M, Lamy F, Roger PP, and Dumont JE. General inhibition by transforming growth factor beta 1 of thyro- tropin and cAMP responses in human thyroid cells in primary culture. *Mol Cell Endocrinol* 95: 13–21, 1993.
55. Riesco-Eizaguirre G, Rodríguez I, De la Vieja A, Costa- magna E, Carrasco N, Nistal M, and Santisteban P. The BRAFV600E oncogene induces transforming growth factor beta secretion leading to sodium iodide symporter repres- sion and increased malignancy inthyroid cancer. *Cancer Res* 69: 8317–8325, 2009.
56. Knauf JA, Sartor MA, Medvedovic M, Lundsmith E, Ryder M, Salzano M, Nikiforov YE, Giordano TJ, Ghossein RA, and Fagin JA. Progression of BRAF-induced thyroid cancer is associated with epithelial-mesenchymal transition re- quiring concomitant MAP kinase and TGFbeta signaling. *Oncogene* 30: 3153–3162, 2011.

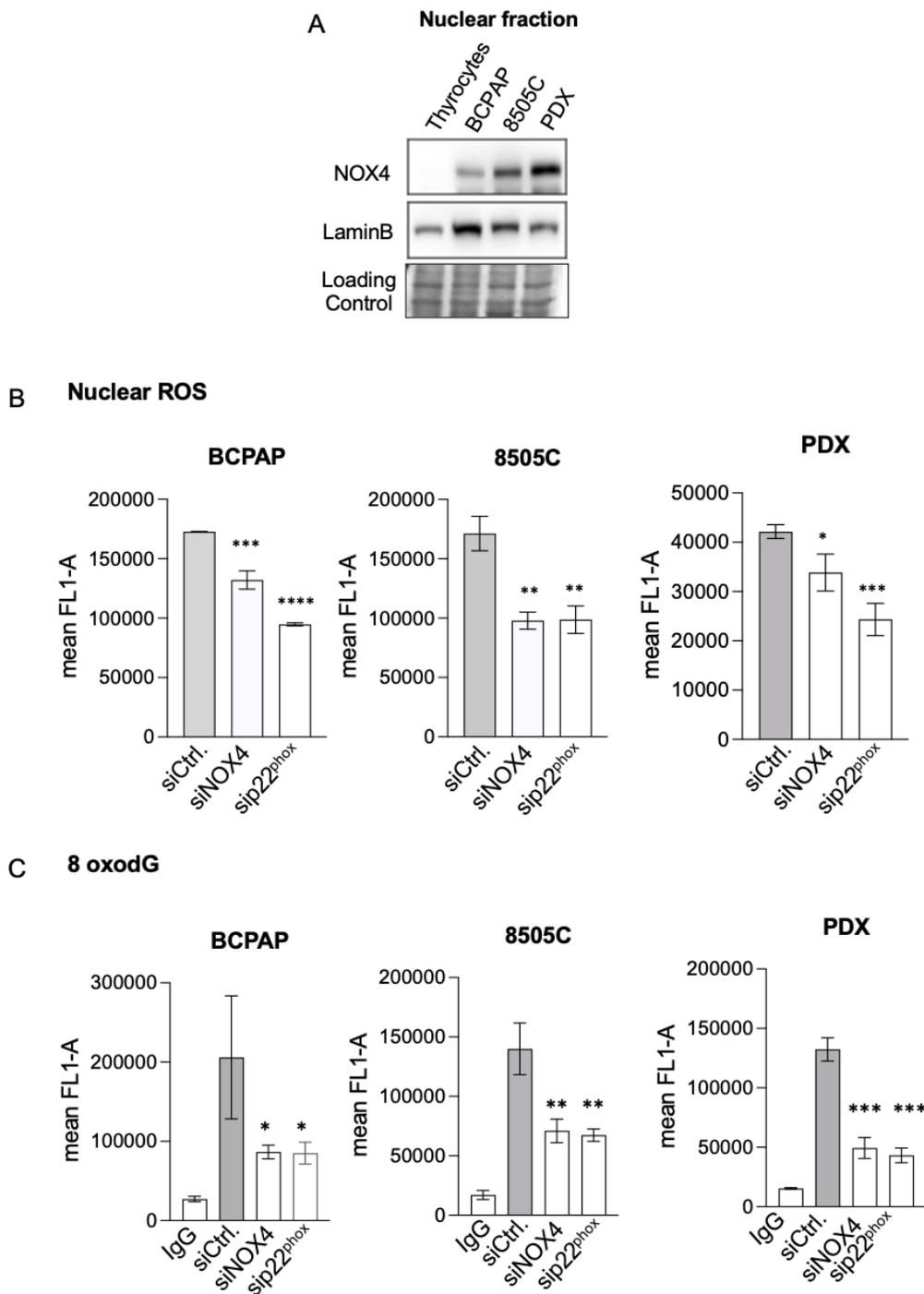


Figure 1 : Knockdown of NOX4 or p22phox reduces oxidative-DNA damage . A) Western-blot analysis of NOX4 protein expression in nuclear fractions of thyrocytes and BRAF-mutated thyroid cells. B) The nuclear level of ROS was measured in BRAF-mutated thyroid cells by NucPEI fluorescence using flow cytometry. The cells were transduced with siRNA control or siRNA against NOX4 or p22phox for 72h. Graphs show the quantification of fluorescence mean. C) Quantification of 8-oxoG of BRAF-mutated thyroid cells by FACS analysis of immune-stained 8-oxoG cells. The cells were transduced with siRNA control or siRNA against NOX4 or p22^{phox} for 72h. Graphs show the quantification of fluorescence mean. Values are mean \pm SE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$. (n=3)

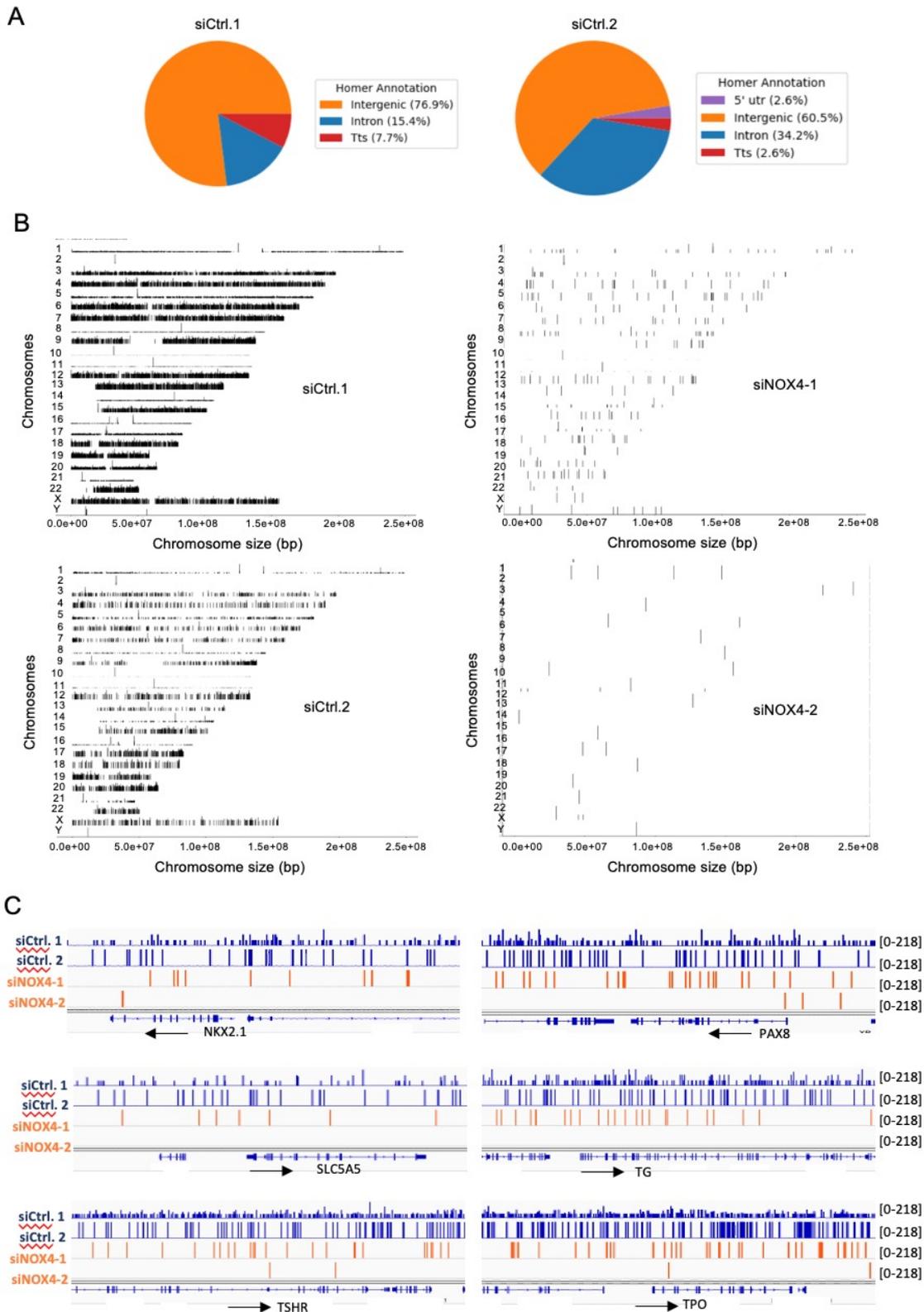


Figure 2: OxidIP seq analysis of BCPAP cells deleted or nor for NOX4. A) Genomic distribution of 8 oxoG in two replicates siRNA control. B) Mapping of 8-oxoG on genome of BCPAP cells deleted or not for NOX4. C) 8-oxoG enrichment peaks on selected genes in conditions siRNA control and siRNA NOX4.

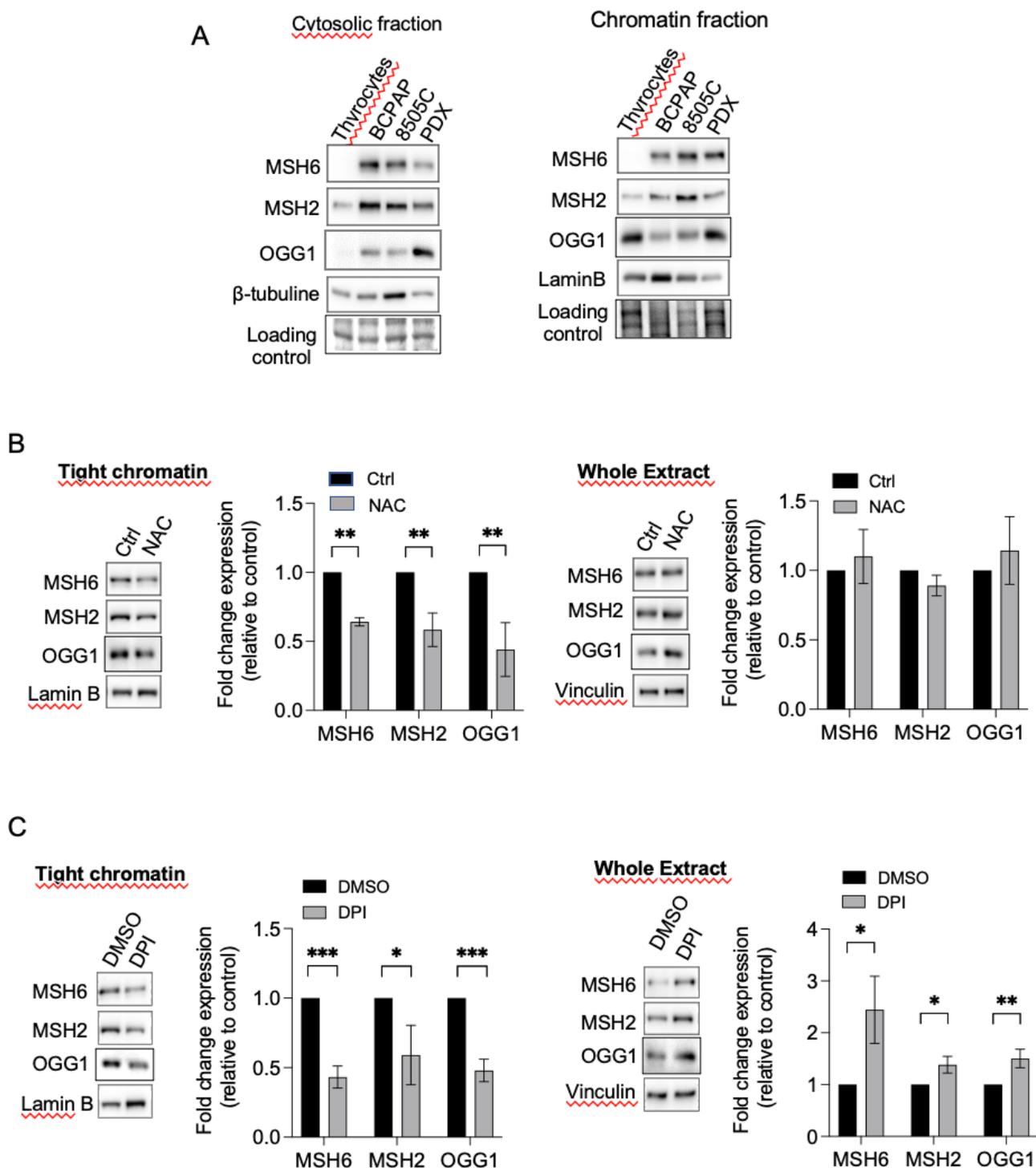


Figure 3: Anti-oxidant (NAC) or NADPH oxidase inhibitor (DPI) alters the recruitment of OGG1, MSH2 and MSH6 to chromatin in BRAF-mutated thyroid cells. A) Western-blot analysis of MSH6, MSH2 and OGG1 protein expressions in Cytosolic and chromatin fractions of BRAF-mutated thyroid cells. B) BCPAP cells were pre-treated with 5 mM NAC for 2 hours before to be analysed for OGG1, MSH2 and MSH6 protein expressions in tight chromatin fraction and whole extract. C) BCPAP cells were pre-treated with 1 μ M DPI for 6 hours before to be analysed for OGG1, MSH2 and MSH6 protein expressions in tight chromatin fraction and whole extract. Densitometry quantification of protein levels normalized to Lamin B or Vinculin levels and presented as fold change compared with control cells. Values are mean \pm SE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$. (n=3)

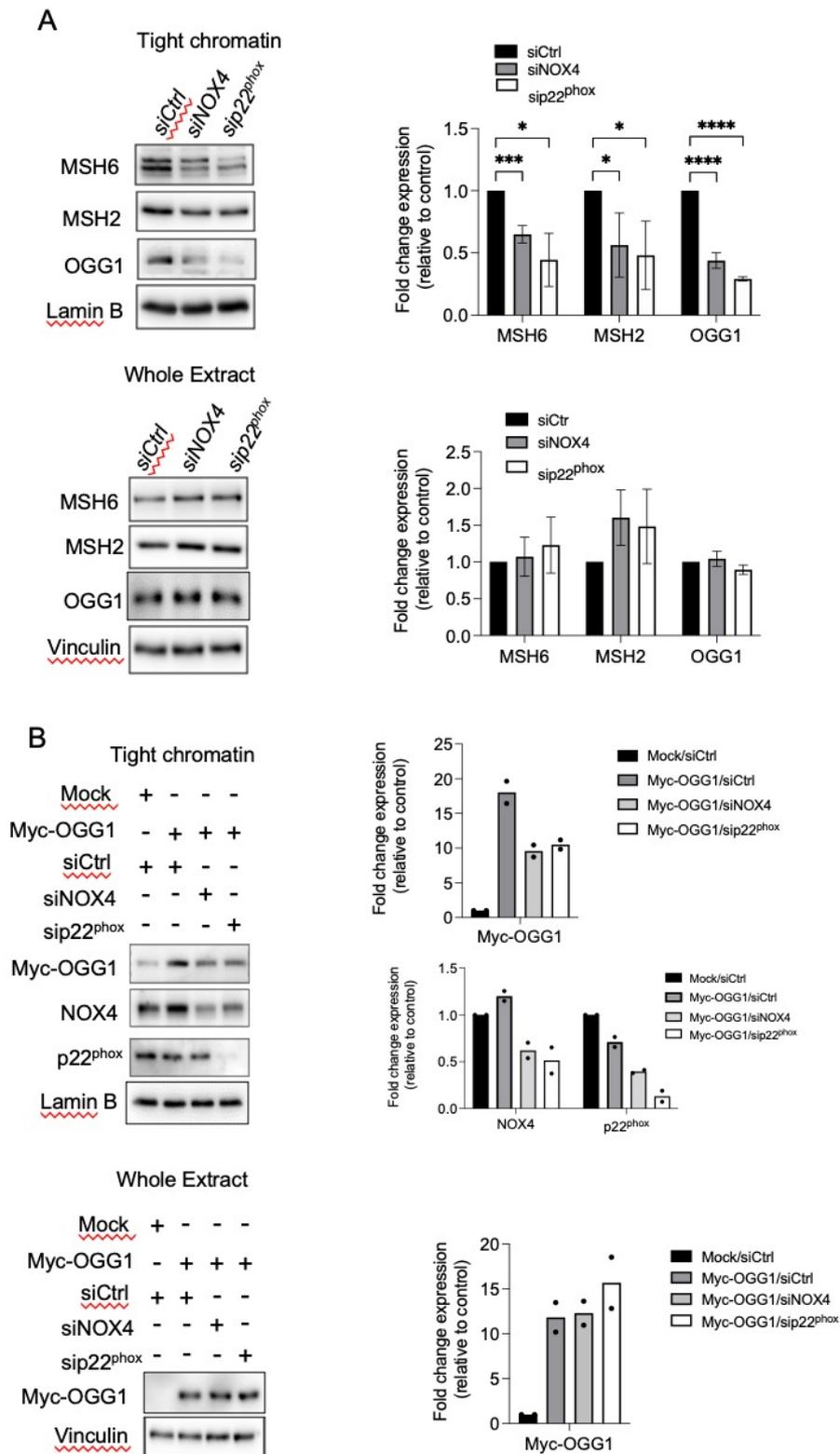


Figure 4: Knockdown of NOX4 or p22phox reduces the recruitment of OGG1, MSH2 and MSH6 to chromatin. A) Western blot analysis of MSH6, MSH2, OGG1, protein expression levels in Tight chromatin fraction and whole extract 72h after knocking down of NOX4 or p22^{phox} by RNA interference in BCPAP cells. B) BCPAP cells were transiently transfected with empty vector (Mock) or c-Myc-tagged OGG1 (Myc-OGG1) plasmids in the presence of siRNA control or siRNA NOX4 for 72h and Myc-OGG1. NOX4 and p22^{phox} protein expressions were analysed in tight chromatin fraction and whole extract. Densitometry quantification of protein levels normalized to Lamin B or Vinculin levels and presented as fold change compared with control cells (n=2).

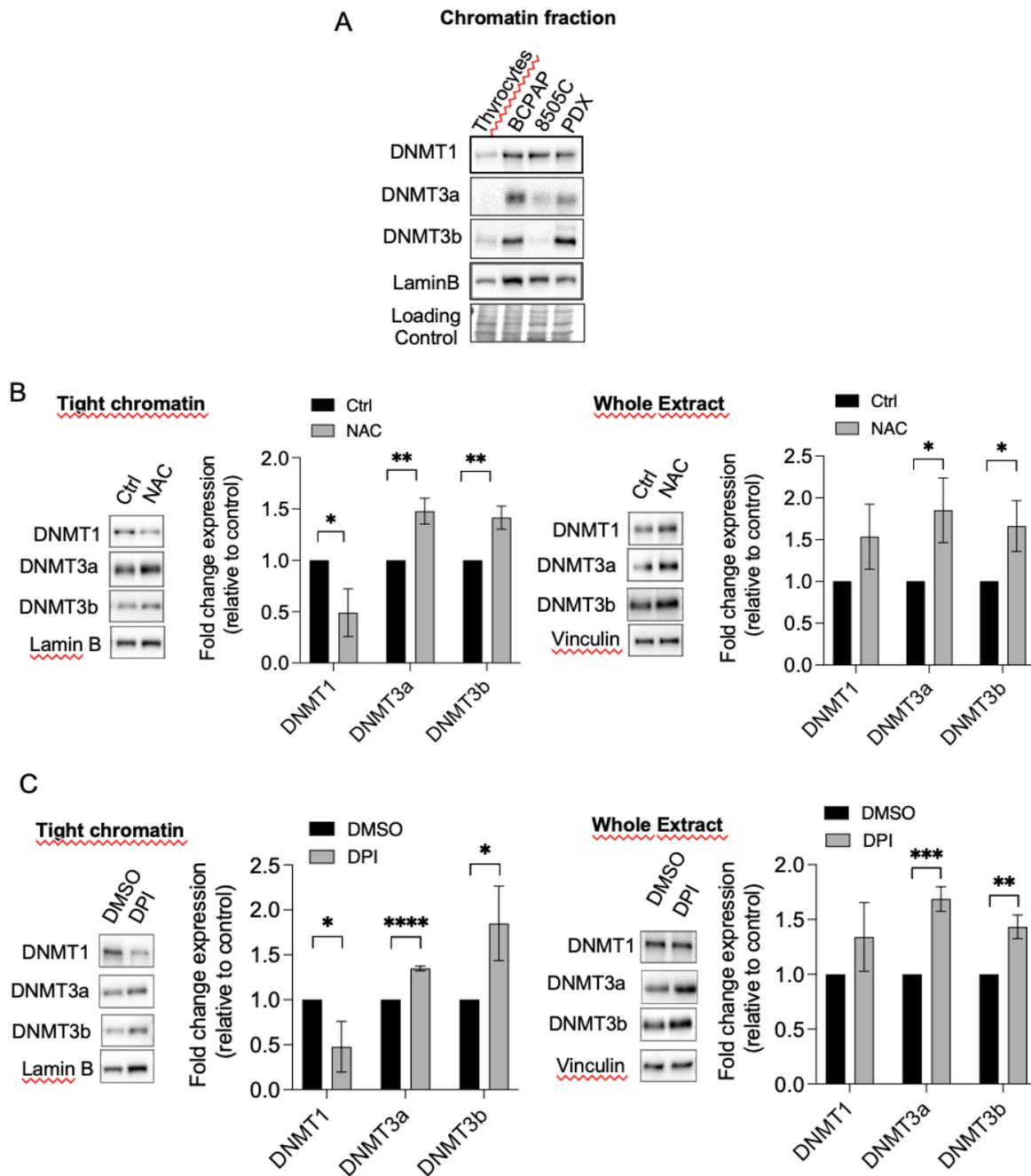


Figure 5: Anti-oxidant (NAC) or NADPH oxidase inhibitor (DPI) alters the recruitment of DNMT1 to chromatin in BRAF-mutated thyroid cells. A) Western-blot analysis of DNMT1, DNMT3a and DNMT3b in chromatin fraction of thyrocytes and BRAF-mutated thyroid cells. B) BCPAP cells were pre-treated with 5 mM NAC for 2 hours before to be analysed for DNMT1, DNMT3a and DNMT3b protein expressions in tight chromatin fraction and whole extract. C) BCPAP cells were pre-treated with 1 μ M DPI for 6 hours before to be analysed for DNMT1, DNMT3a and DNMT3b protein expressions in tight chromatin fraction and whole extract. Densitometry quantification of protein levels normalized to Lamin B or Vinculin levels and presented as fold change compared with control cells. Values are mean \pm SE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$. (n=3)

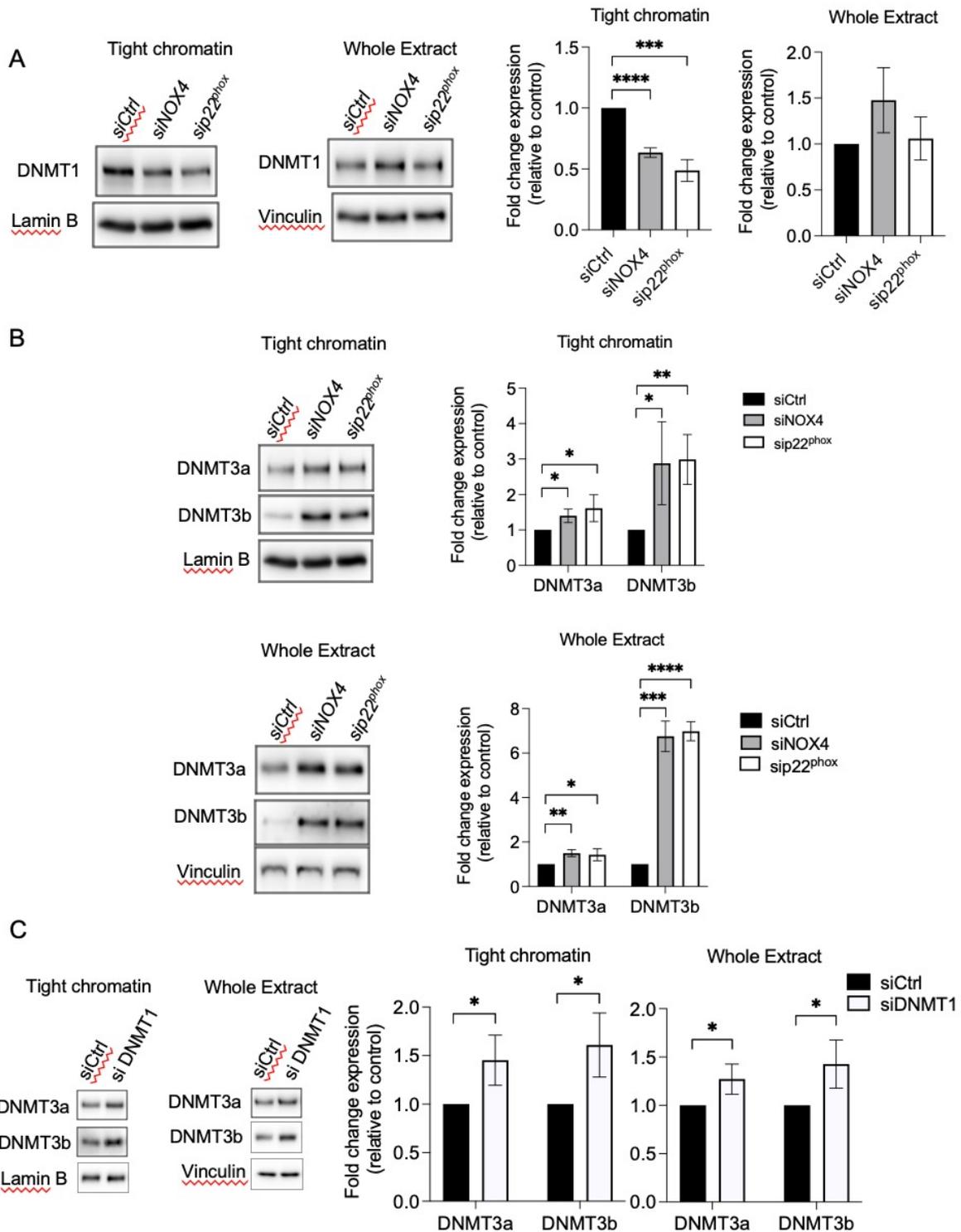


Figure 6: Knockdown of NOX4 or p22^{phox} reduces the recruitment of DNMT1 to chromatin. A) Western blot analysis of DNMT1 protein expression in Tight chromatin fraction and whole extract 72h after knocking down of NOX4 or p22^{phox} by RNA interference in BCPAP cells. B) Western blot analysis of DNMT3a and DNMT3b protein expression levels in Tight chromatin fraction and whole extract 72h after knocking down of NOX4 or p22^{phox} by RNA interference in BCPAP cells. C) Western blot analysis of DNMT3a and DNMT3b protein expression in Tight chromatin fraction and whole extract 72h after knocking down of DNMT1 by RNA interference in BCPAP cells. Densitometry quantification of protein levels normalized to Lamin B or Vinculin levels and presented as fold change compared with control cells. Values are mean \pm SE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$. (n=3)

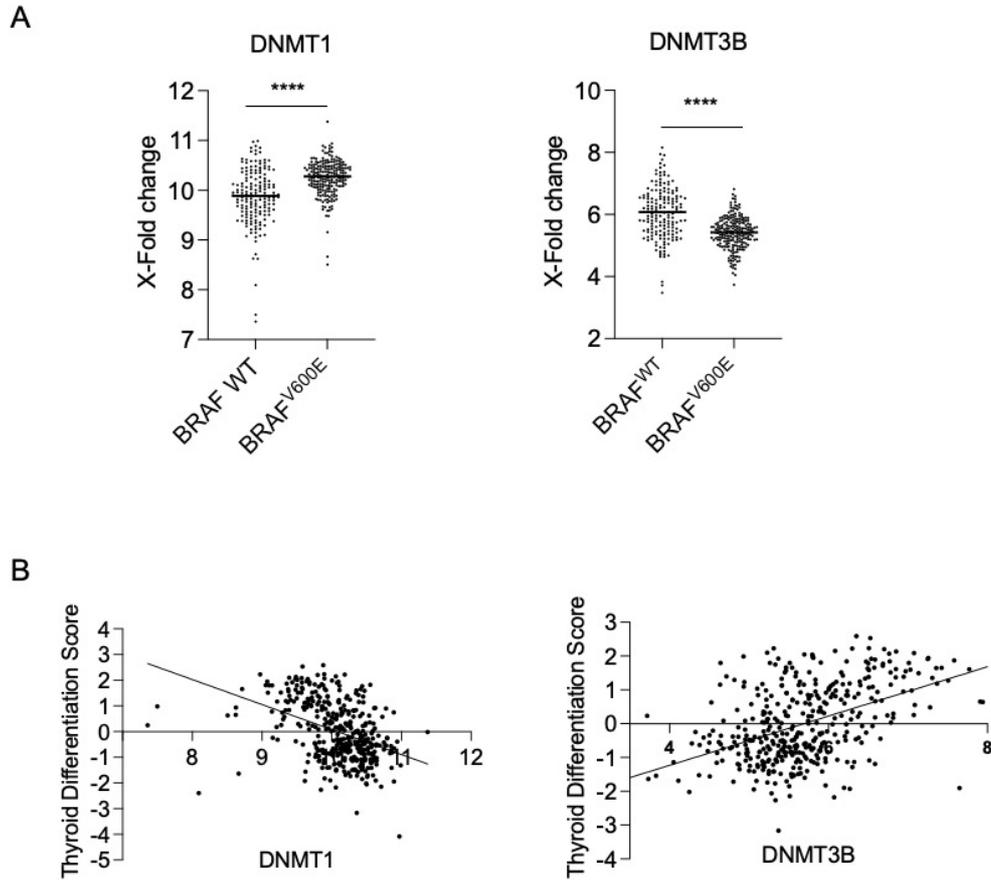
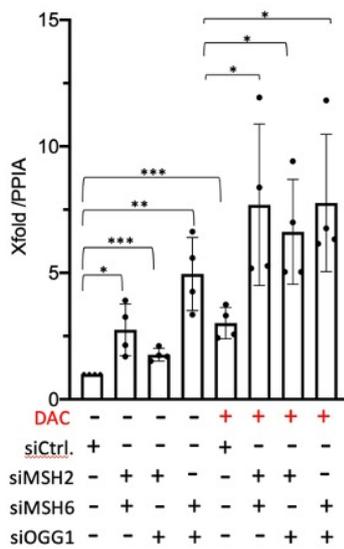


Figure 7: BRAF^{V600E} regulates differently DNMT1 and DNMT3b expressions. A) Correlation analysis between DNMT1 mRNA or DNMT3b mRNA levels and BRAFV600E mutation in 390 PTCs (170 BRAFWT and 220 BRAFV600E PTCs). B) Correlative analysis between DNMT1 or DNMT3b and Thyroid Differentiation Score in 390 PTCs.

A



B

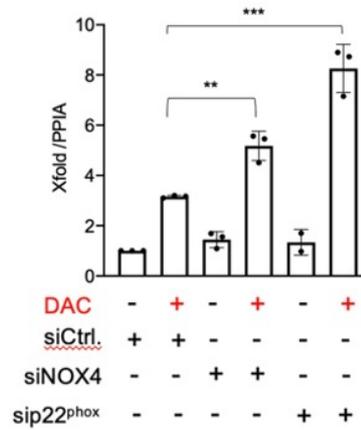


Figure 8: DNMT inhibition and knockdown of MSH2, MSH6 and OGG1 synergize to increase NIS mRNA expression. A) QRT-PCR analysis of NIS mRNA levels in BCPAP cells transfected with siRNA control or/and siRNA MSH2 or/and siRNA MSH6 or/and siRNA OGG1 and 24h later treated for additional 48 in the presence or in the absence of 1 μ M DAC. B) QRT-PCR analysis of NIS mRNA levels in BCPAP cells transfected with siRNA control or siRNA NOX4 or siRNA p22phox and 24h later, treated for additional 48h in the presence or in the absence of 1 μ M DAC. Values are mean \pm SE. * p < 0.05, ** p < 0.01, and *** p < 0.001.

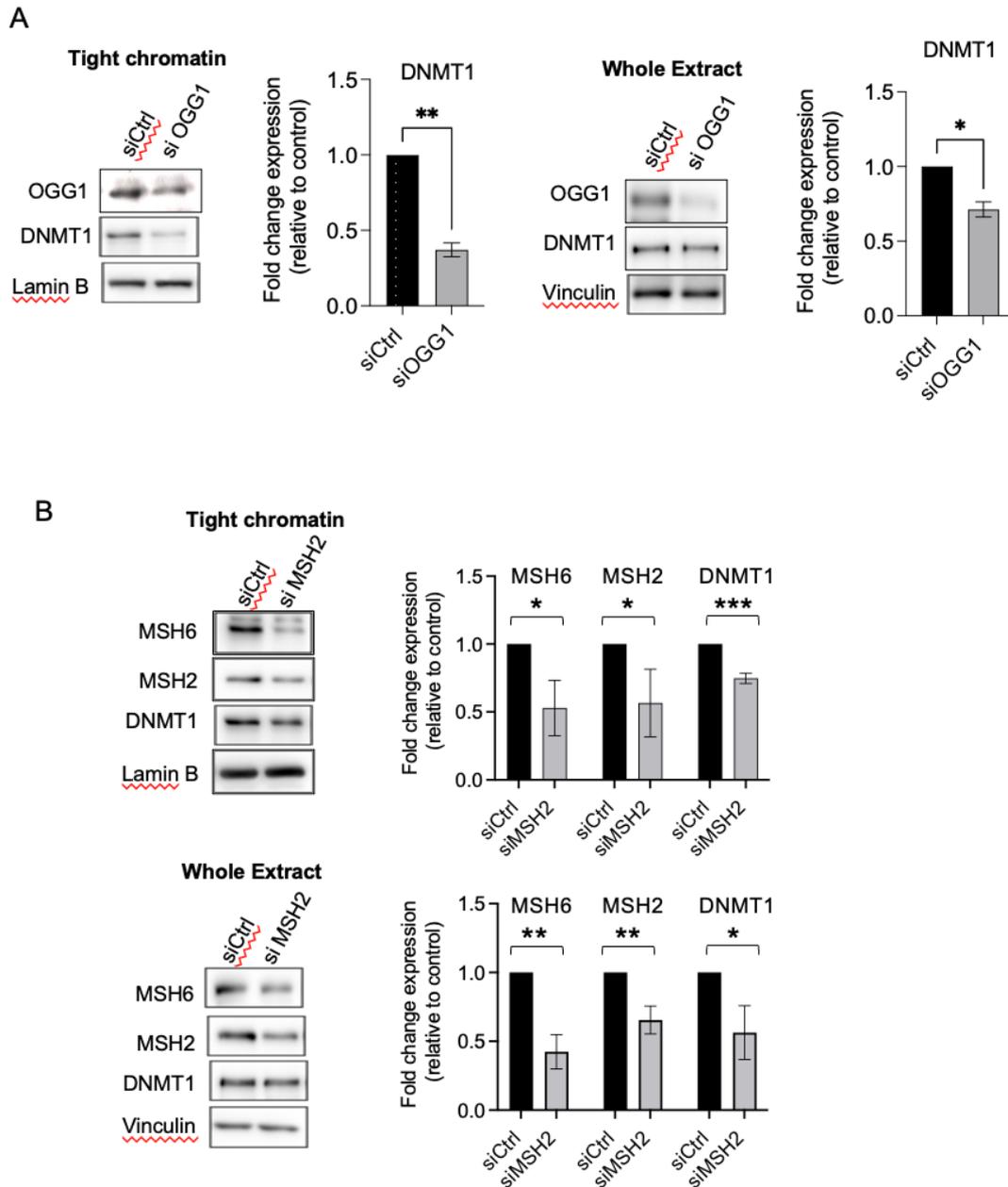


Figure 9: Knockdown of OGG1 or MSH2 reduces the recruitment of DNMT1 to chromatin. A) Western blot analysis of DNMT1 protein expression in Tight chromatin fraction and whole extract 72h after knocking down of OGG1 by RNA interference in BCPAP cells. B) Western blot analysis of DNMT1 protein expression in Tight chromatin fraction and whole extract 48h after knocking down of MSH2 by RNA interference in BCPAP cells. Densitometry quantification of protein levels normalized to Lamin B or Vinculin levels and presented as fold change compared with control cells. Values are mean \pm SE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$. (n=3)

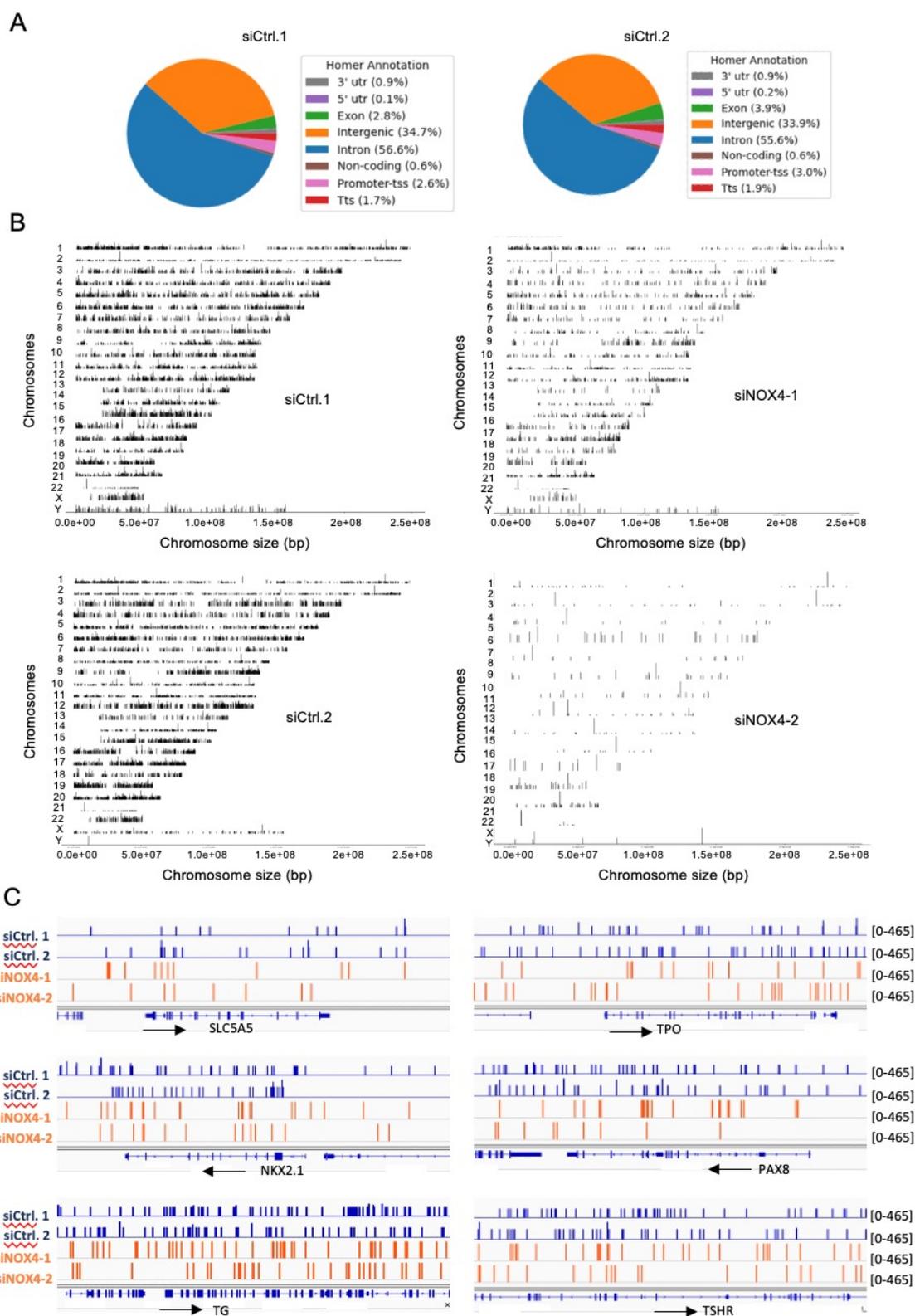


Figure 10: MeDIP seq analysis of BCPAP cells deleted or nor for NOX4. A) Genomic distribution of 5-methylcytosine (5-mC) in two replicates siRNA control. B) Mapping of 5-mC on genome of BCPAP cells deleted or not for NOX4. C) 5-mC enrichment peaks on selected genes in conditions siRNA control and siRNA NOX4.

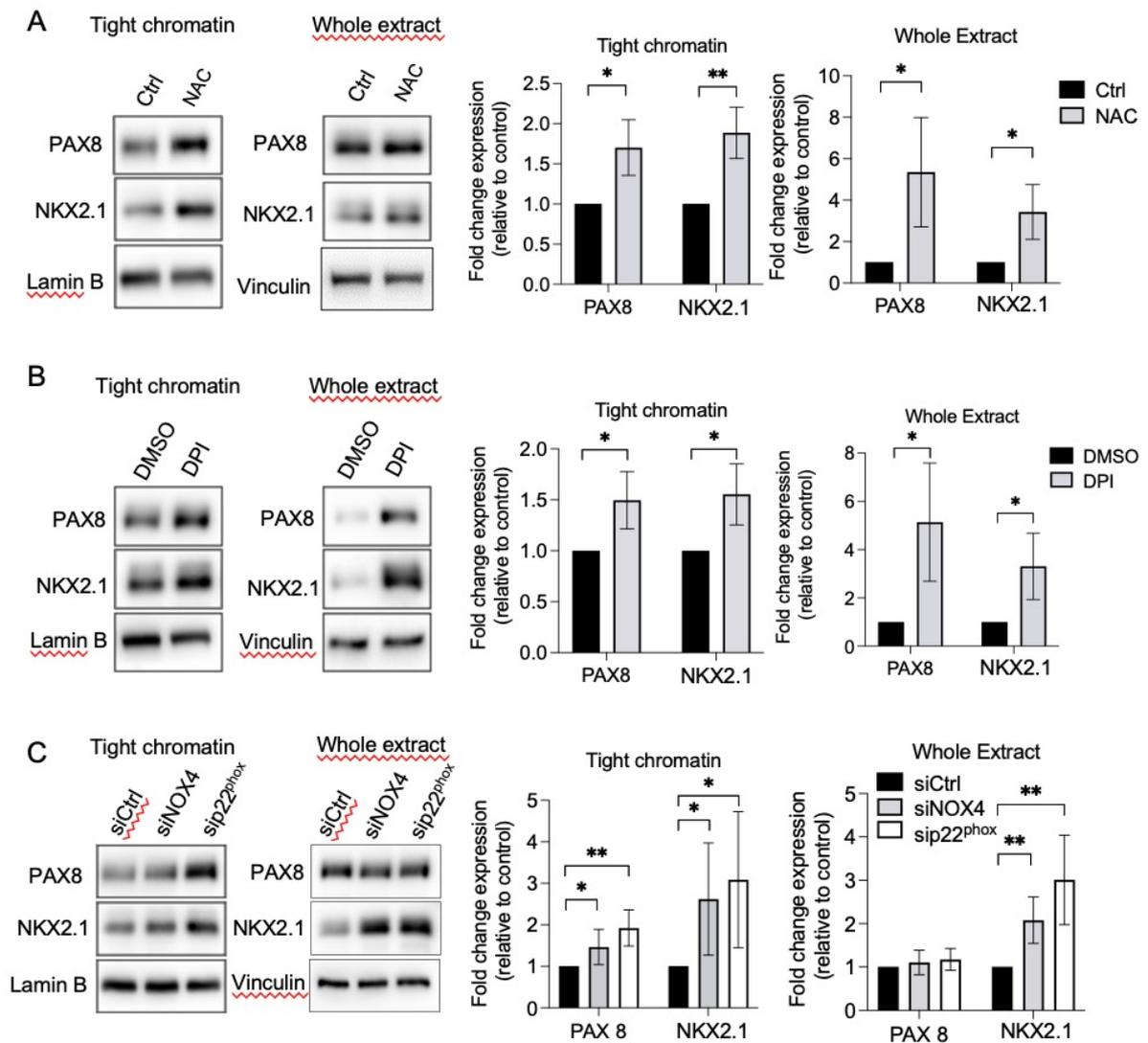


Figure 11: NOX4 inhibits recruitment of PAX8 and NKX2.1 to chromatin. A) BCPAP cells were pre-treated with 5 mM NAC for 2 hours before to be analysed for PAX8 and NKX2.1 protein expressions in tight chromatin fraction and whole extract. B) BCPAP cells were pre-treated with 1 μ M DPI for 6 hours before to be analysed for PAX8 and NKX2.1 protein expressions in tight chromatin fraction and whole extract. C) Western blot analysis of PAX8 and NKX2.1 protein expressions in Tight chromatin fraction and whole extract 72h after knocking down of NOX4 or p22phox by RNA interference in BCPAP cells. Densitometry quantification of protein levels normalized to Lamin B or Vinculin levels and presented as fold change compared with control cells. Values are mean \pm SE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$. (n=3)

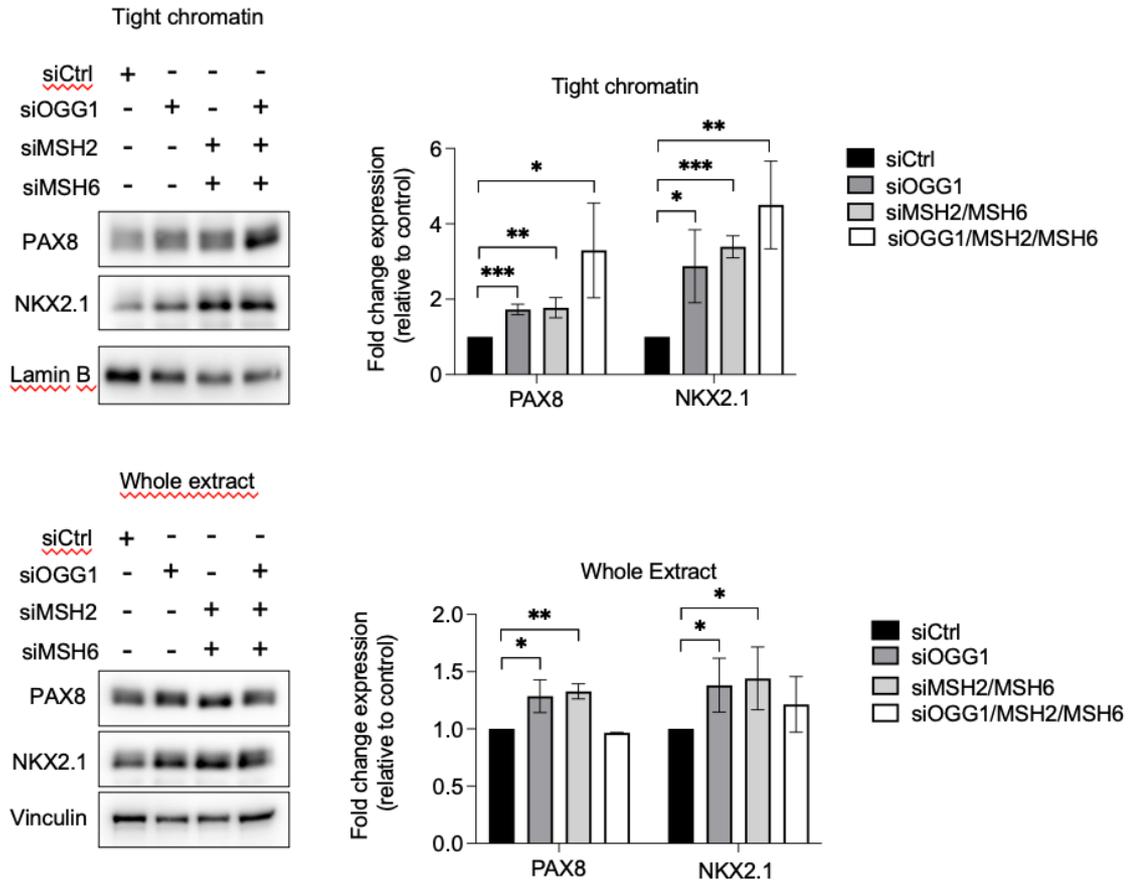


Figure 12: OGG1, MSH2 and MSH6 inhibit recruitment of PAX8 and TTF1 to chromatin. Western blot analysis of PAX8 and TTF1 protein expressions in Tight chromatin fraction and whole extract 72h after knocking down of OGG1, MSH2 or/and MSH6 by RNA interference in BCPAP cells. Densitometry quantification of protein levels normalized to Lamin B or Vinculin levels and presented as fold change compared with control cells. Values are mean \pm SE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$. (n=3)

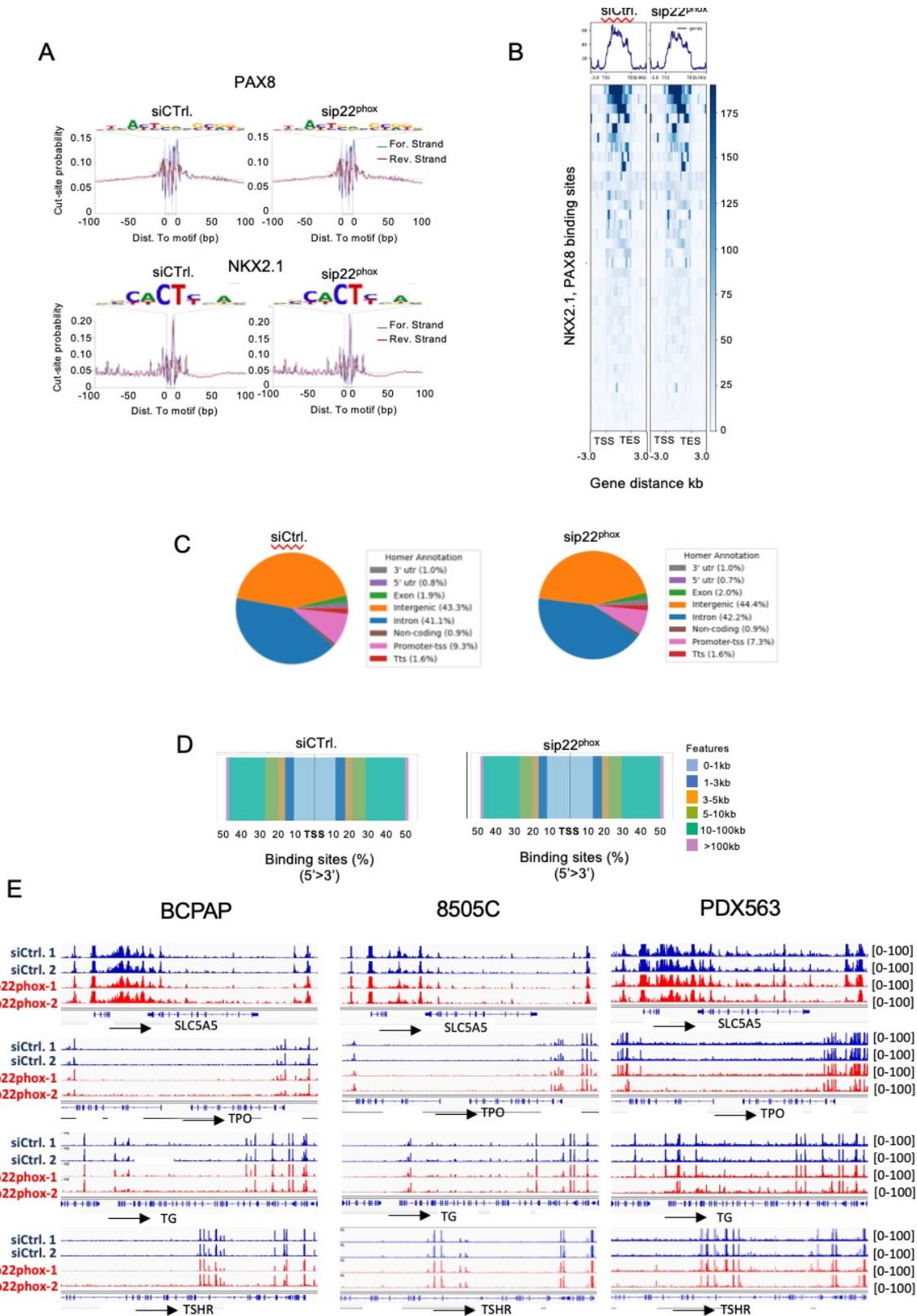
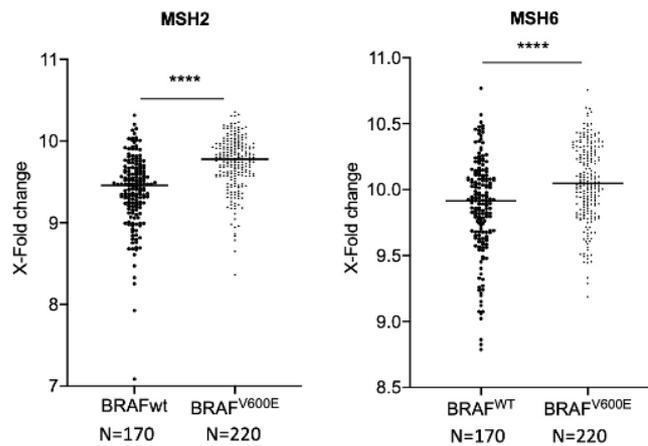


Figure 13: ATAC-seq analysis of BRAF-mutated thyroid cells deleted or not for p22phox. A) ATAC-seq footprint at the PAX8 and NKX2.1 full sites. Cut sites probability, insertions per site are normalized to have the same average depth of insertions ± 100 bp away from motif center. The DNA sequences of the bottom are the motif of PAX8 and NKX2.1, respectively. B) Tornado plots of ATAC seq signals representing sites around the NKX2.1 and PAX8 genes (± 3 kb center). C) Genomic distribution of ATAC-seq peaks in BCPAP cells transduced for 72h with siRNA control and siRNA p22phox. D) Distribution of transcription factor-binding loci relative to TSS. E) Representative sequencing tracks for the *SLC5A5*, *TPO*, *TG* and *TSHR* loci show distinct ATAC-seq peaks. The ATAC-seq data have been normalized to take sequencing depth into account and the scale on the y-axis was chosen for optimal visualization of peaks for each sample.

A



B

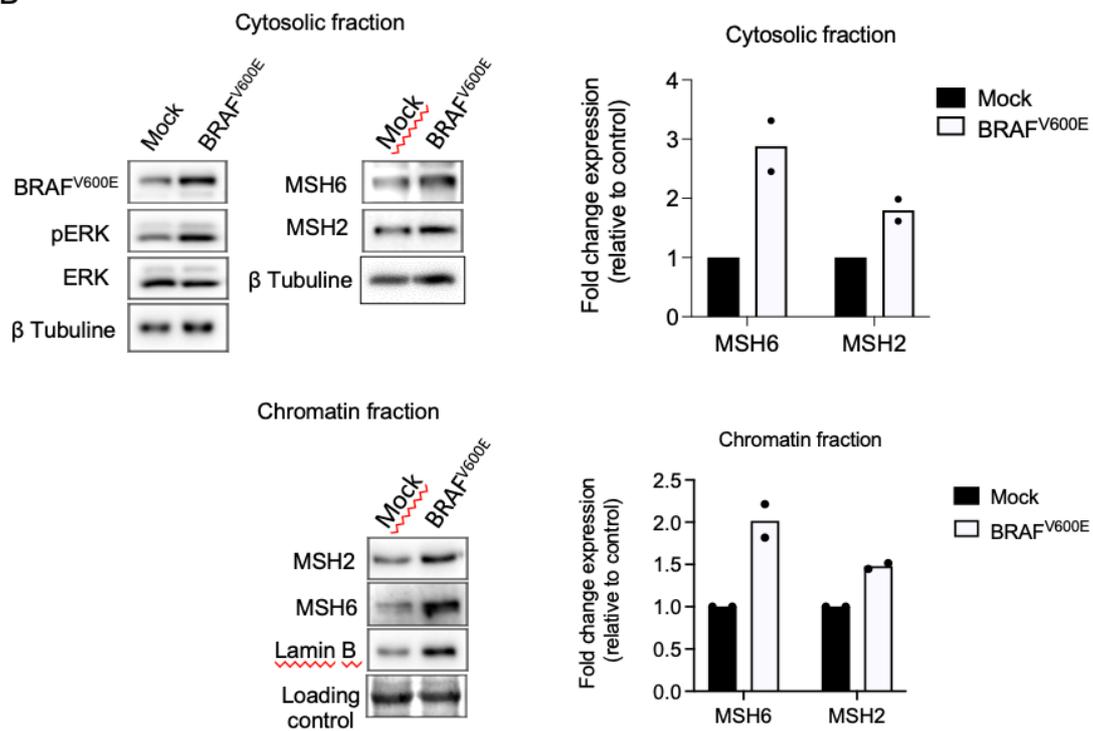


Figure 14: BRAF^{V600E} regulates MSH2 and MSH6 expressions. A) Correlation analysis between MSH2 mRNA or MSH6 mRNA levels and BRAFV600E mutation in 390 PTCs (170 BRAFWT and 220 BRAFV600E PTCs). B) Human primary thyrocytes were transiently transfected with empty vector (Mock) or BRAFV600E plasmids for 48h and phosphor-ERK, ERK, MSH6 and MSH2, protein expressions were analysed by western-blot in cytosolic and chromatin fractions. (n=2).

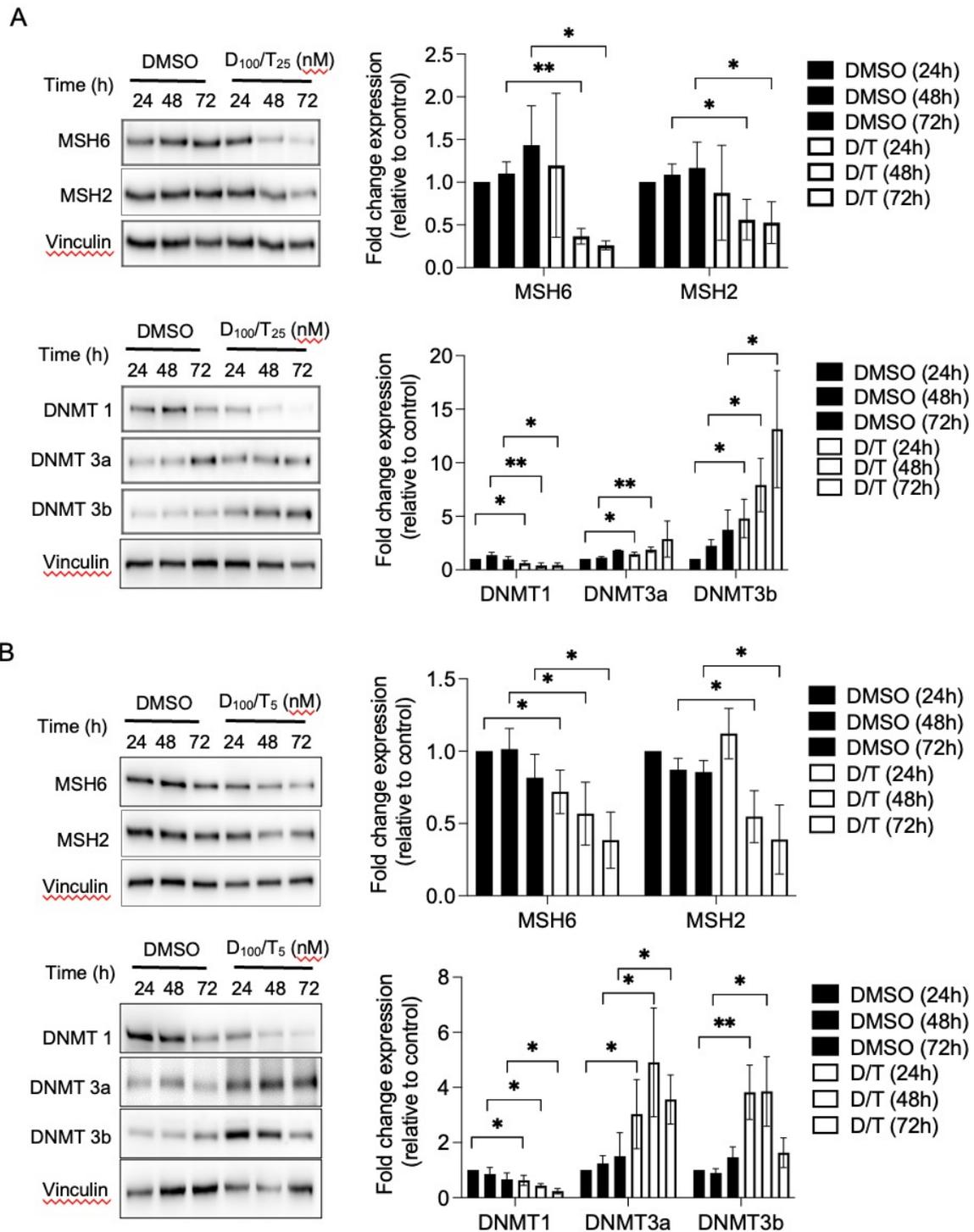


Figure 15: Dabrafenib plus trametinib combination inhibits MMR and DNMT1 protein expressions in BRAF-mutated thyroid cells. A) Immunoblot detection of MSH2, MSH6, DNMT1, DNMT3a and DNMT3b in BCPAP cells after treatment by the combination Dabrafenib plus Trametinib. Densitometric quantification of protein levels normalized to vinculin levels and presented as fold change compared with vehicle-treated cells. Student t-test is realized by comparing combination versus DMSO for each corresponding time of kinetic. Values are mean±SE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$. (n=3). B) Immunoblot detection of MSH2, MSH6, DNMT1, DNMT3a and DNMT3b in PDX cells after treatment by the combination Dabrafenib plus Trametinib. Densitometric quantification of protein levels normalized to vinculin levels and presented as fold change compared with vehicle-treated cells. Student t-test is realized by comparing combination versus DMSO for each corresponding time of kinetic. Values are mean±SE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$. (n=3)

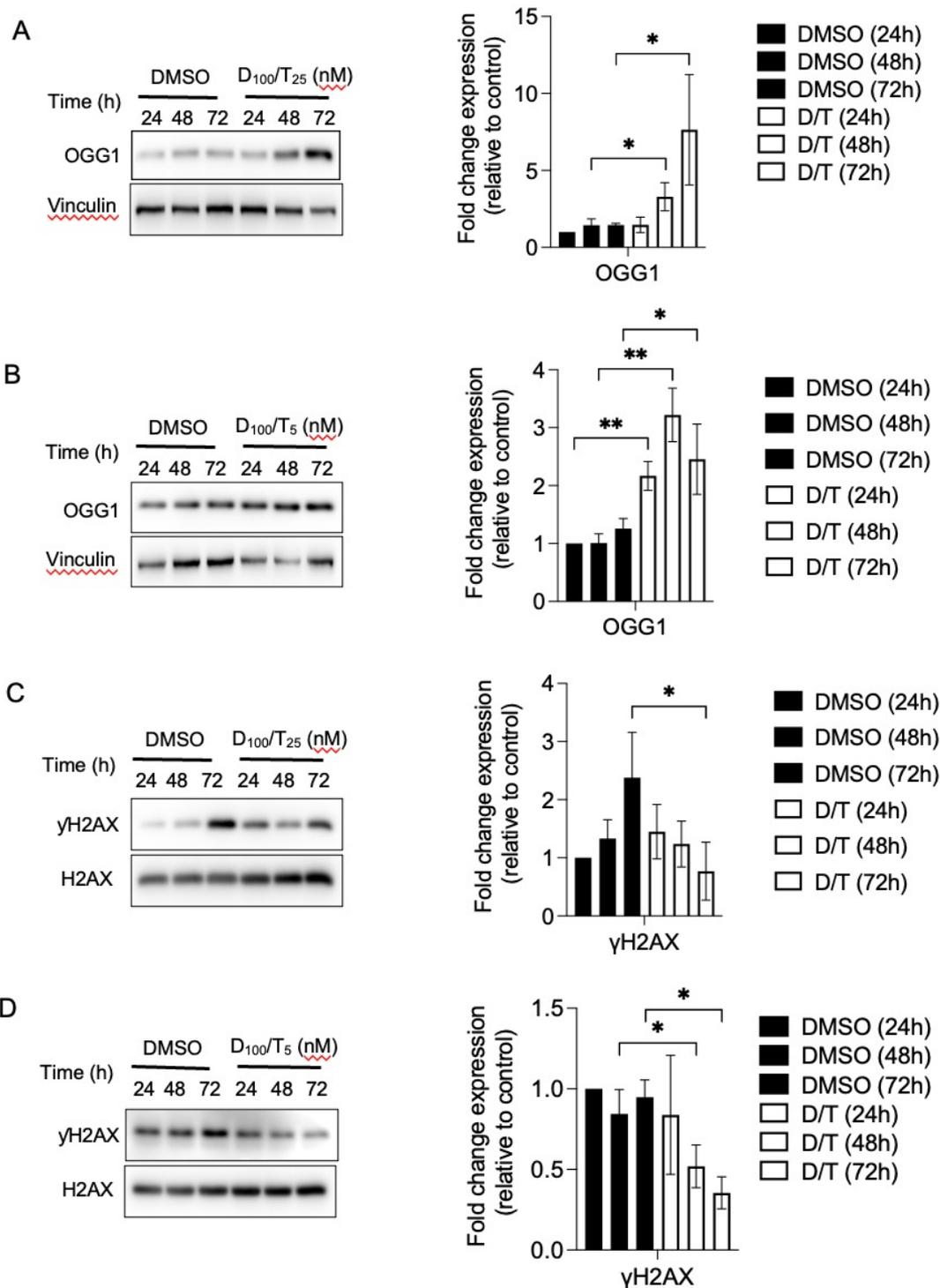


Figure 16: Dabrafenib plus trametinib combination increases OGG1 protein expression in BRAF-mutated thyroid cells. A) Immunoblot detection of OGG1 in BCPAP cells after treatment by the combination Dabrafenib plus Trametinib. Densitometric quantification of protein levels normalized to vinculin levels and presented as fold change compared with vehicle-treated cells. Student t-test is realized by comparing combination versus DMSO for each corresponding time of kinetic. Values are mean±SE. *p < 0.05, **p < 0.01, and ***p < 0.001. (n=3). B) Immunoblot detection of OGG1 in PDX cells after treatment by the combination Dabrafenib plus Trametinib. Densitometric quantification of protein levels normalized to vinculin levels is performed as in (A). C) Immunoblot detection of γH2AX in BCPAP cells after treatment by the combination Dabrafenib plus Trametinib. Densitometric quantification of protein levels normalized to vinculin levels is performed as in (A). D) Immunoblot detection of γH2AX in PDX cells after treatment by the combination Dabrafenib plus Trametinib. Densitometric quantification of protein levels normalized to vinculin levels is performed as in (A).

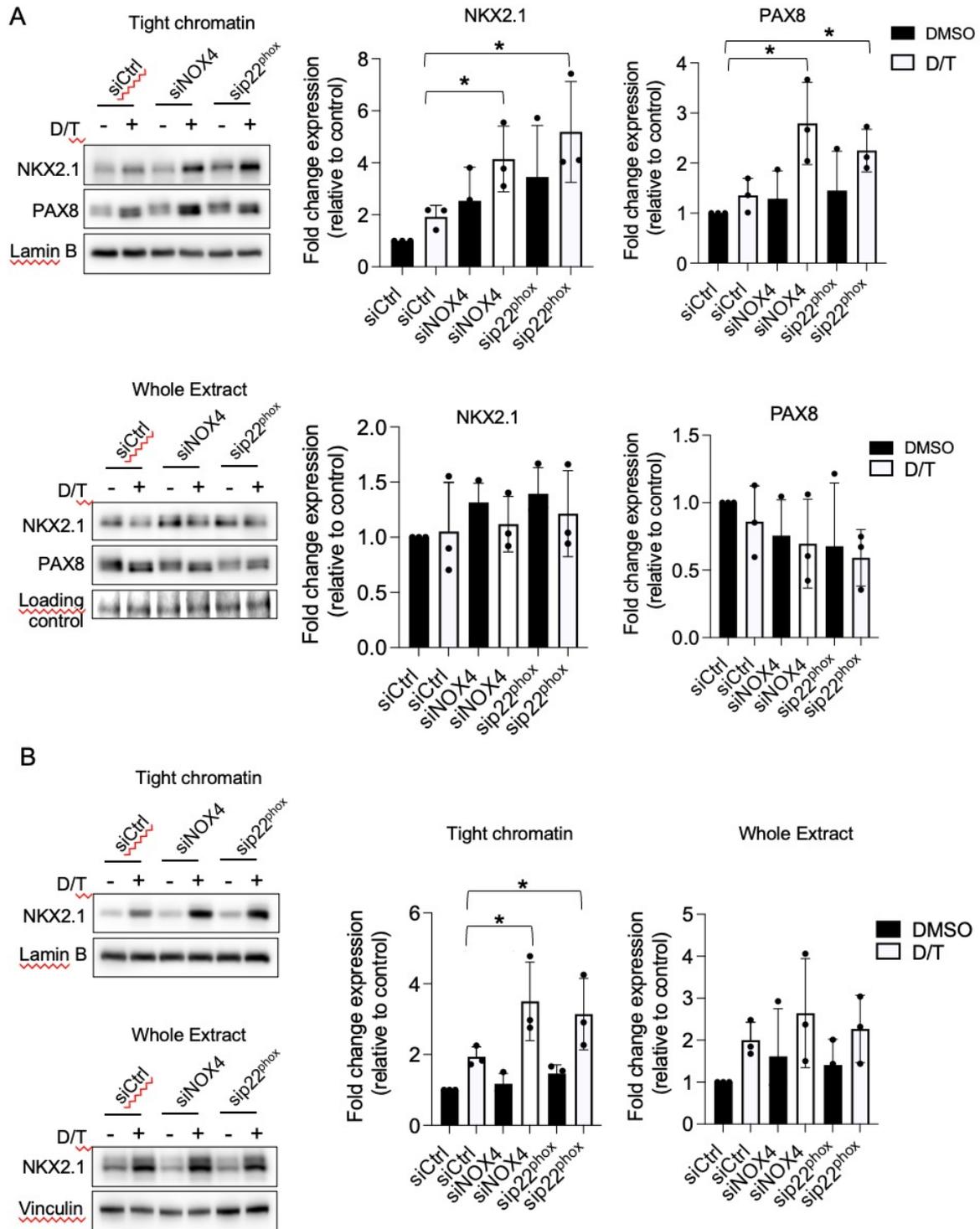
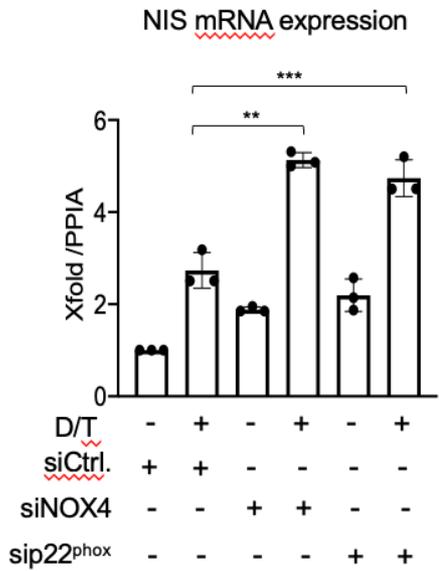


Figure 17: MAPK pathway inhibition and knockdown of NOX4 and p22phox synergize to promote PAX8 and NKX2.1 recruitment to chromatin. A) Western-blot analysis of PAX8 and NKX2.1 protein expressions in tight chromatin fraction and whole extract of BCPAP cells transduced with siRNA control or siRNA NOX4 or siRNA p22phox and treated with Dabrafenib plus trametinib combination for 48h. Densitometric quantification of protein levels normalized to loading control and presented as fold change compared with siRNA control-transduced cells. B) Western-blot analysis of NKX2.1 protein expressions in tight chromatin fraction and whole extract of 8505C cells transduced with siRNA control or siRNA NOX4 or siRNA p22phox and treated with Dabrafenib plus trametinib combination for 48h. Densitometric quantification of protein levels normalized to loading control and presented as fold change compared with siRNA control-transduced cells. Values are mean \pm SE. * $p < 0.05$. (n=3)

A



B

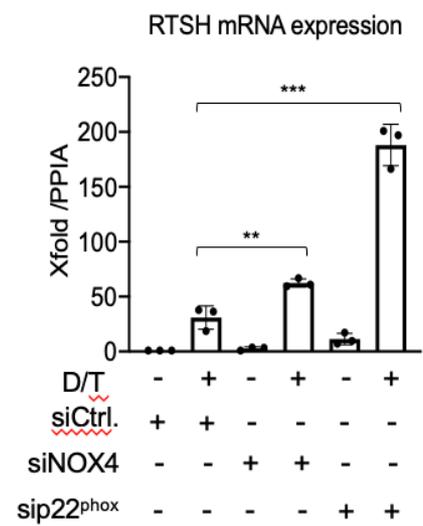


Figure 18: MAPK pathway inhibition and knockdown of NOX4 and p22phox synergize to induce NIS and TSHR mRNA expressions. B) QRT-PCR analysis of NIS mRNA levels in BCPAP cells transfected with siRNA control or siRNA NOX4 or siRNA p22phox and 24h later, treated in the presence or in the absence of Dabrafenib plus trametinib combination for additional 48h. C) QRT-PCR analysis of TSHR mRNA levels in BCPAP cells transfected with siRNA control or siRNA NOX4 or siRNA p22phox and 24h later, treated in the presence or in the absence of Dabrafenib plus trametinib combination for additional 48h. Values are mean \pm SE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$. (n=3)

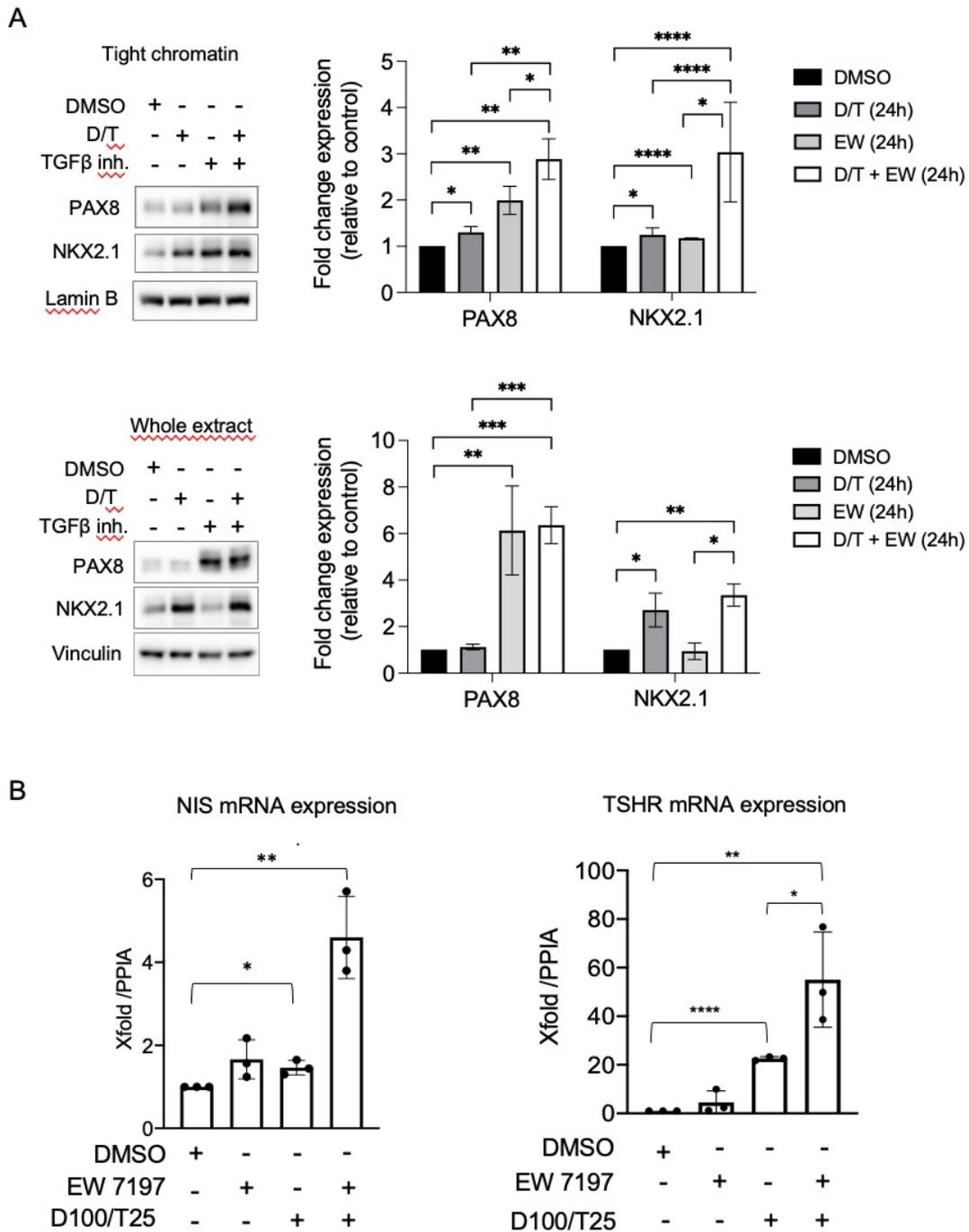


Figure 19: Co-inhibition of SMAD and MAPK signaling promotes PAX8 and NKX2.1 recruitment to chromatin. A) Western-blot analysis of PAX8 and NKX2.1 protein expressions in tight chromatin fraction and whole extract of BCPAP cells treated or not with Dabrafenib plus trametinib combination in the presence or in the absence of TGF-beta inhibitor (TEW) for 48h. Densitometric quantification of protein levels normalized to loading control and presented as fold change compared with vehicle-treated cells. B) QRT-PCR analysis of NIS and TSHR mRNA levels in BCPAP cells treated or not with Dabrafenib plus trametinib combination in the presence or in the absence of TGF-beta inhibitor (TEW) for 48h. Densitometry quantification of protein levels normalized to Lamin B or Vinculin levels and presented as fold change compared with control cells. Values are mean \pm SE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$. (n=3)

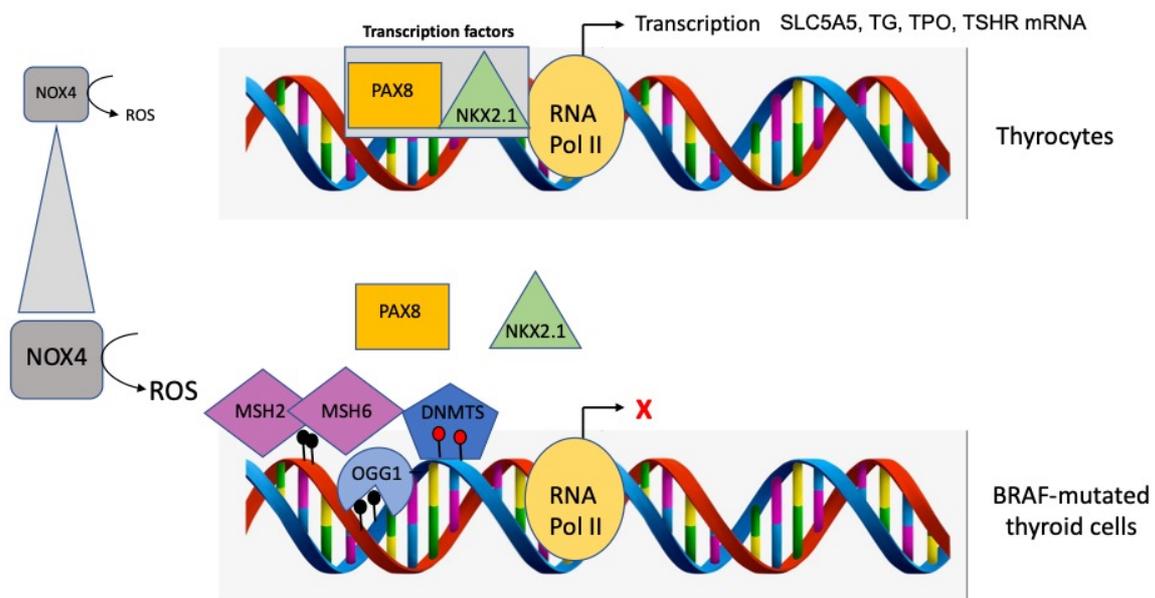


Figure 20: Model proposed for the mechanism. NADPH oxidase NOX4, which is expressed in the nuclear membrane, generates specific and repetitive oxidative DNA damage, promoting longer retention of epigenetic modifiers, such as DNMT1, at sites of DNA damage via the interaction with DNA repair proteins including OGG1, MSH2 and MSH6. All thus contribute to stably prevent the transcription of genes involved in thyroid differentiation from interfering with the repair process.

Données supplémentaires



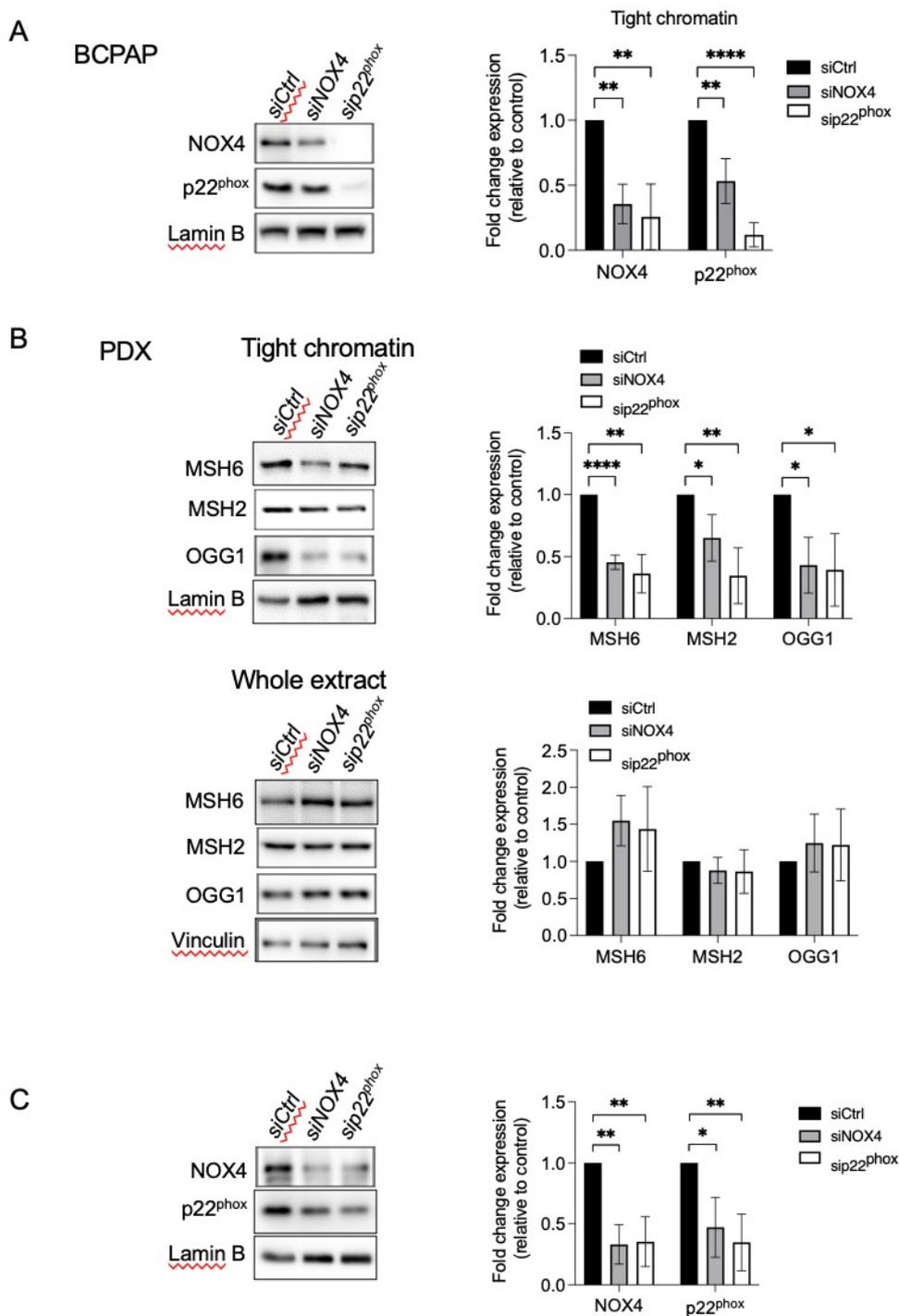


Figure S1 : Knockdown of NOX4 or p22^{phox} reduces the recruitment of OGG1, MSH2 and MSH6 to chromatin in BRAF-mutated thyroid cells. A) Western blot analysis of NOX4 and p22^{phox} protein expression levels in whole extract 72h after knocking down of NOX4 or p22^{phox} by RNA interference in BCPAP cells. B) Western blot analysis of MSH6, MSH2, OGG1, protein expression levels in Tight chromatin fraction and whole extract 72h after knocking down of NOX4 or p22^{phox} by RNA interference in PDX cells. C) Western blot analysis of NOX4 and p22^{phox} protein expression levels in whole extract 72h after knocking down of NOX4 or p22^{phox} by RNA interference in PDX cells. Densitometric quantification of protein levels normalized to loading control levels and presented as fold change compared with siRNA control-transduced cells. Values are mean \pm SE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$. (n=3)

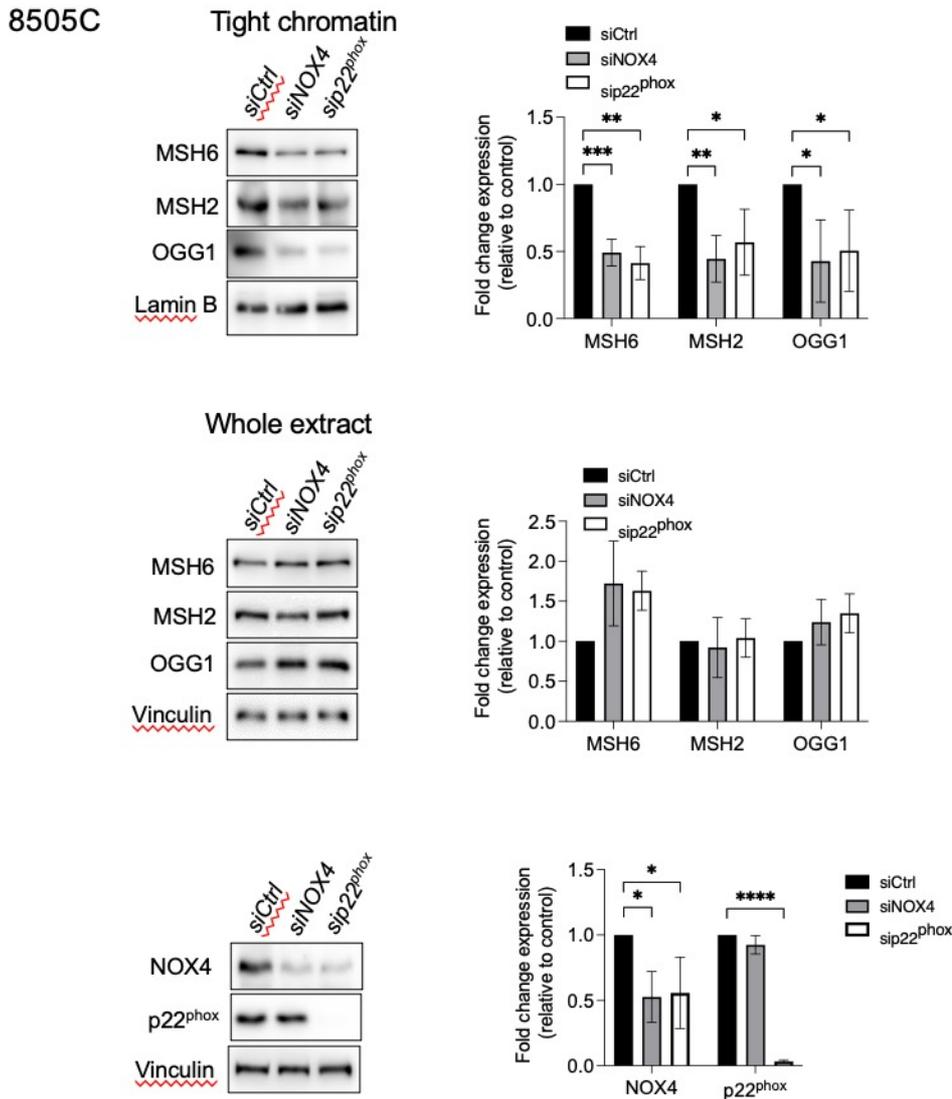
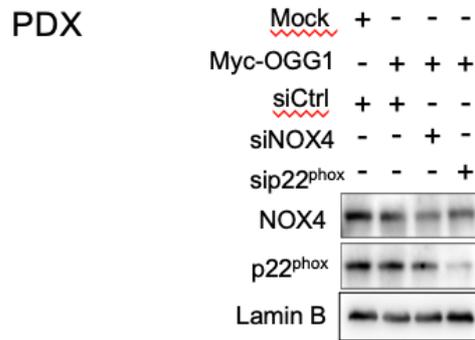


Figure S2: Knockdown of NOX4 or p22^{phox} reduces the recruitment of OGG1, MSH2 and MSH6 to chromatin in BRAF-mutated thyroid cells. A) Western blot analysis of MSH6, MSH2, OGG1, protein expression levels in Tight chromatin fraction and whole extract 72h after knocking down of NOX4 or p22^{phox} by RNA interference in 8505C cells. B) Western blot analysis of NOX4 and p22^{phox} protein expression levels in whole extract 72h after knocking down of NOX4 or p22^{phox} by RNA interference in 8505C cells. Densitometric quantification of protein levels normalized to loading control levels and presented as fold change compared with siRNA control-transduced cells. Values are mean \pm SE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$. (n=3)

A



B

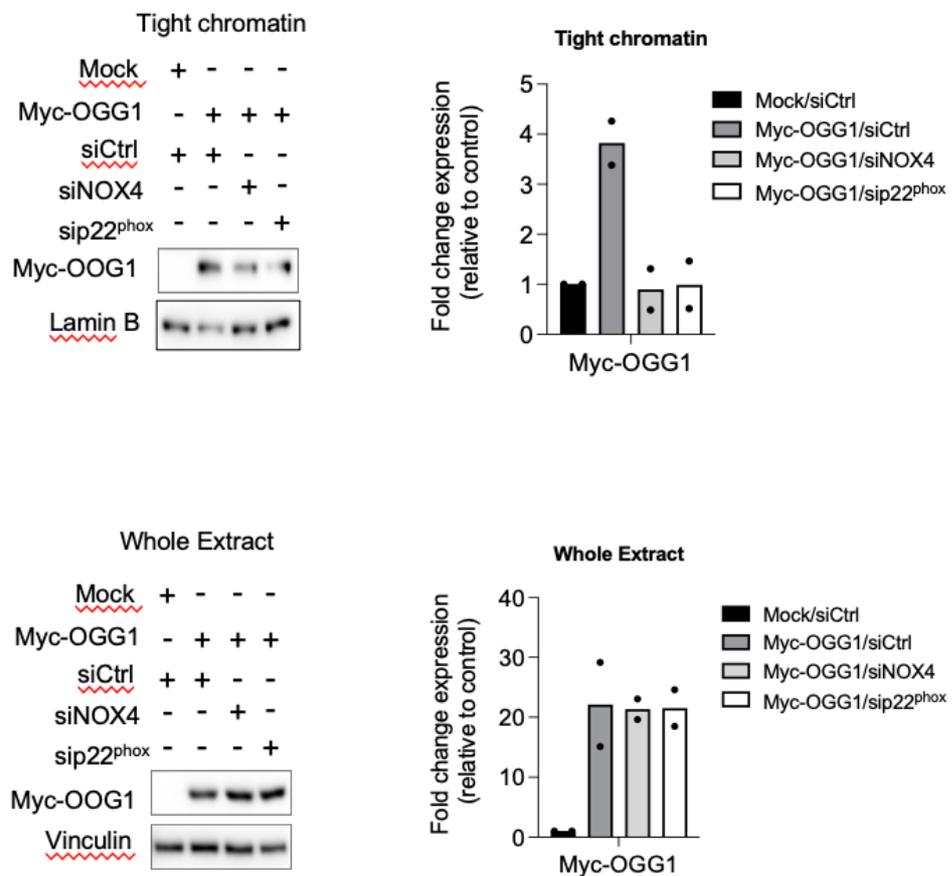


Figure S3: Knockdown of NOX4 or $p22^{phox}$ reduces the recruitment of OGG1 to chromatin in PDX cells. A) PDX cells were transiently transfected with empty vector (Mock) or c-Myc-tagged OGG1 (Myc-OGG1) plasmids in the presence of siRNA control or siRNA NOX4 for 72h and Myc-OGG1, NOX4 and $p22^{phox}$ protein expressions were analysed in tight chromatin fraction and whole extract. Densitometry quantification of protein levels normalized to Lamin B or Vinculin levels and presented as fold change compared with control cells (n=2).

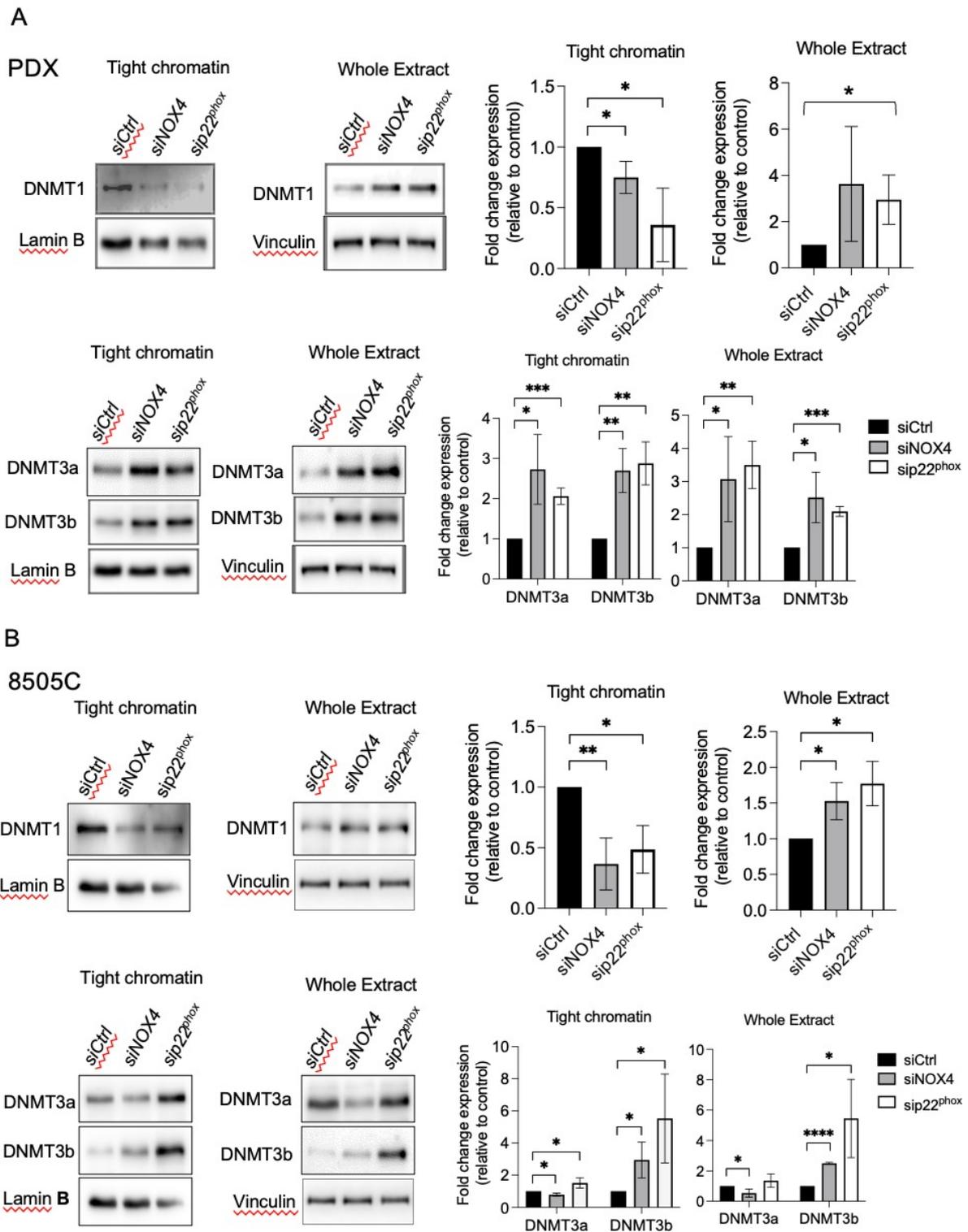


Figure S4: Knockdown of NOX4 or p22^{pnox} reduces the recruitment of DNMT1 to chromatin. A) Western blot analysis of DNMT1, DNMT3a and DNMT3b protein expression in Tight chromatin fraction and whole extract 72h after knocking down of NOX4 or p22^{pnox} by RNA interference in PDX cells. B) Western blot analysis of DNMT1, DNMT3a and DNMT3b protein expression levels in Tight chromatin fraction and whole extract 72h after knocking down of NOX4 or p22^{pnox} by RNA interference in 8505C cells. Densitometry quantification of protein levels normalized to Lamin B or Vinculin levels and presented as fold change compared with siRNA control-transduced cells. Values are mean \pm SE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$. (n=3).

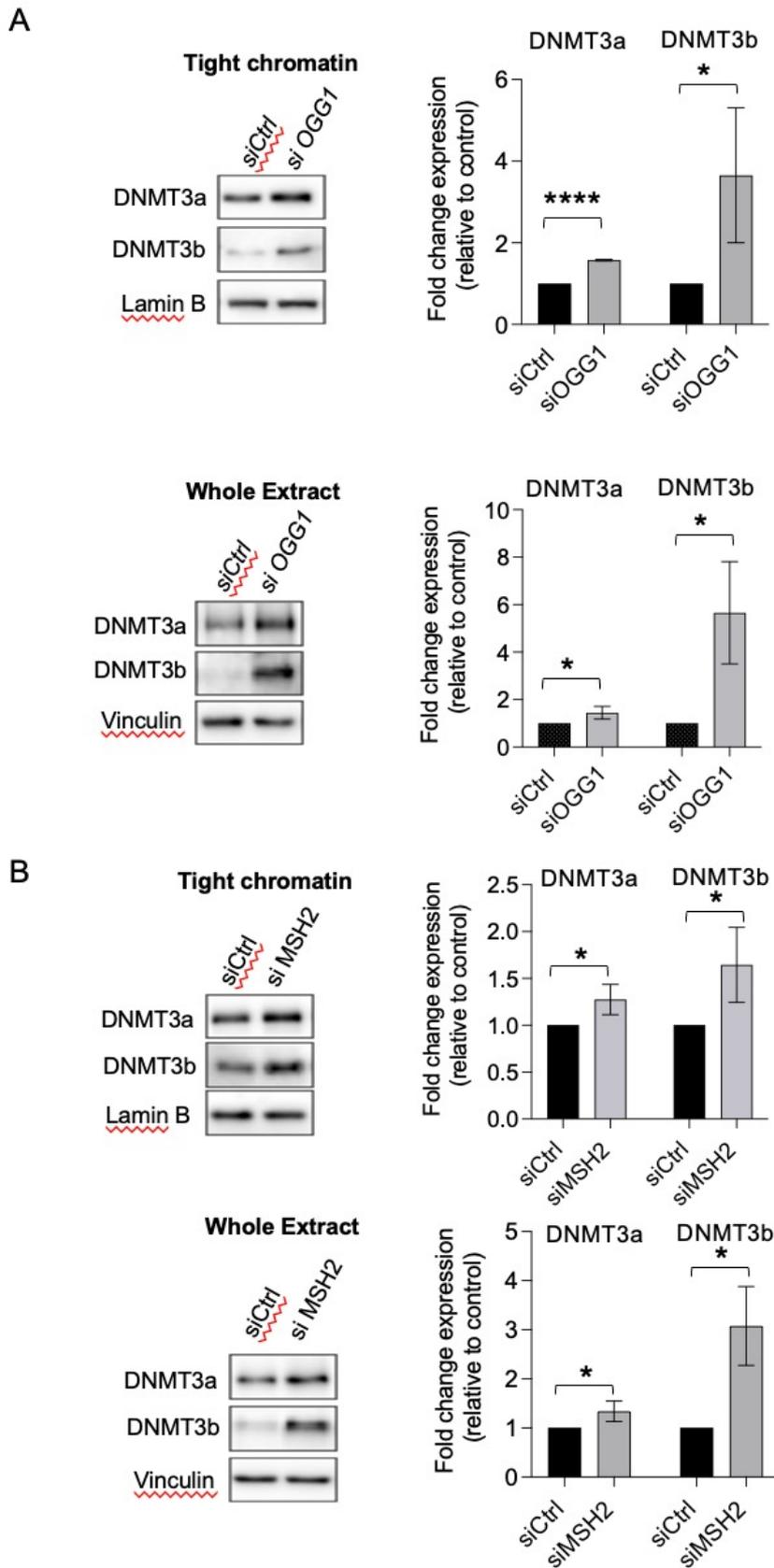


Figure S5: Knockdown of OGG1 or MSH2 increases recruitment to chromatin and level of expression of DNMT3a and DNMT3b. A) Western blot analysis of DNMT3a and DNMT3b protein expression in Tight chromatin fraction and whole extract 72h after knocking down of OGG1 by RNA interference in BCPAP cells. B) Western blot analysis of DNMT3a and DNMT3b protein expression in Tight chromatin fraction and whole extract 48h after knocking down of MSH2 by RNA interference in BCPAP cells. Densitometry quantification of protein levels normalized to Lamin B or Vinculin levels and presented as fold change compared with siRNA control-transduced cells. Values are mean \pm SE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$. (n=3).

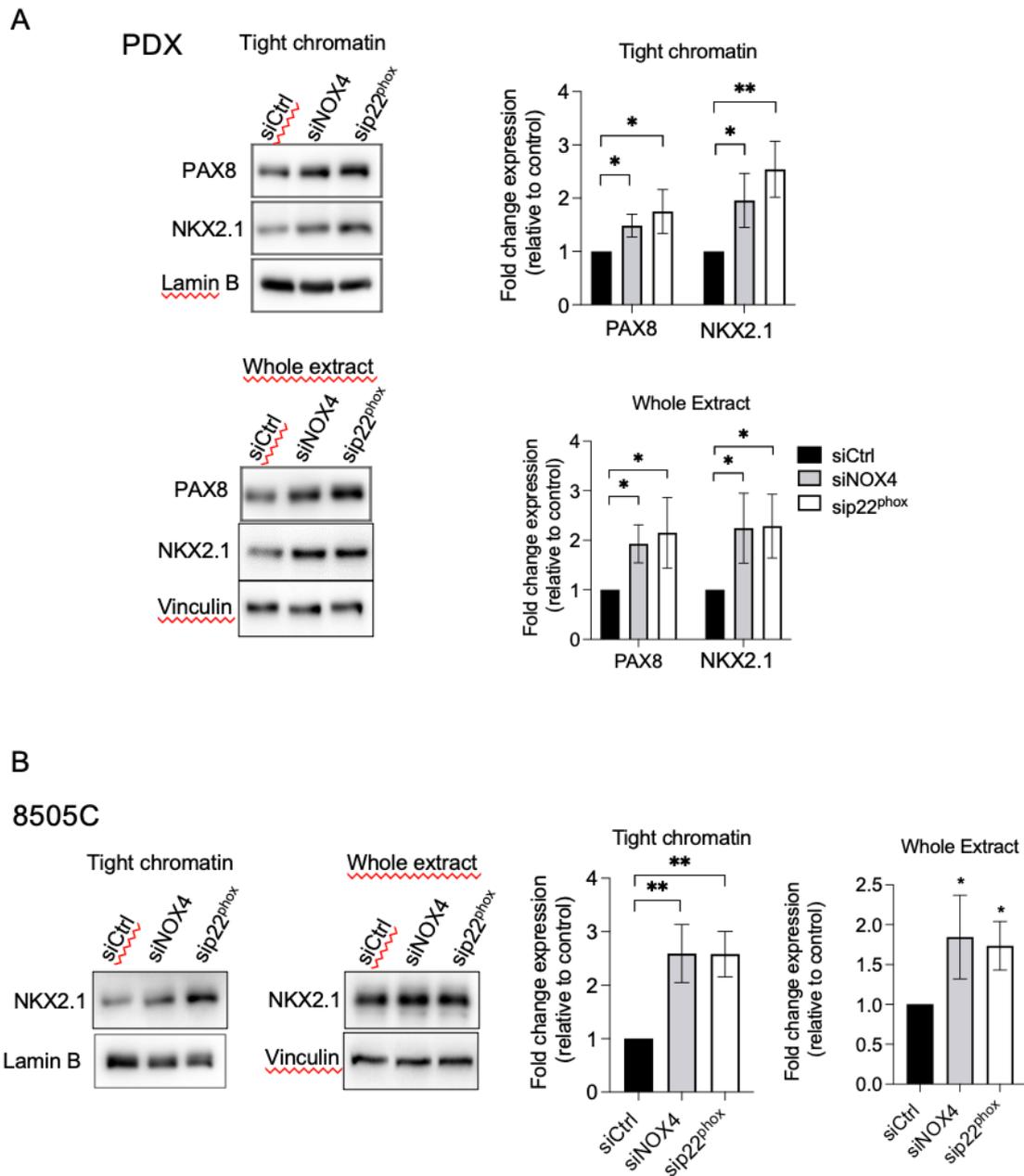


Figure S6: NOX4 inhibits recruitment of PAX8 and NKX2.1 to chromatin. A) Western blot analysis of PAX8 and NKX2.1 protein expressions in Tight chromatin fraction and whole extract 72h after knocking down of NOX4 or p22^{phox} by RNA interference in PDX cells. B) Western blot analysis of NKX2.1 protein expressions in Tight chromatin fraction and whole extract 72h after knocking down of NOX4 or p22^{phox} by RNA interference in 8505C cells. Densitometry quantification of protein levels normalized to Lamin B or Vinculin levels and presented as fold change compared with control cells. Values are mean \pm SE. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$. (n=3).

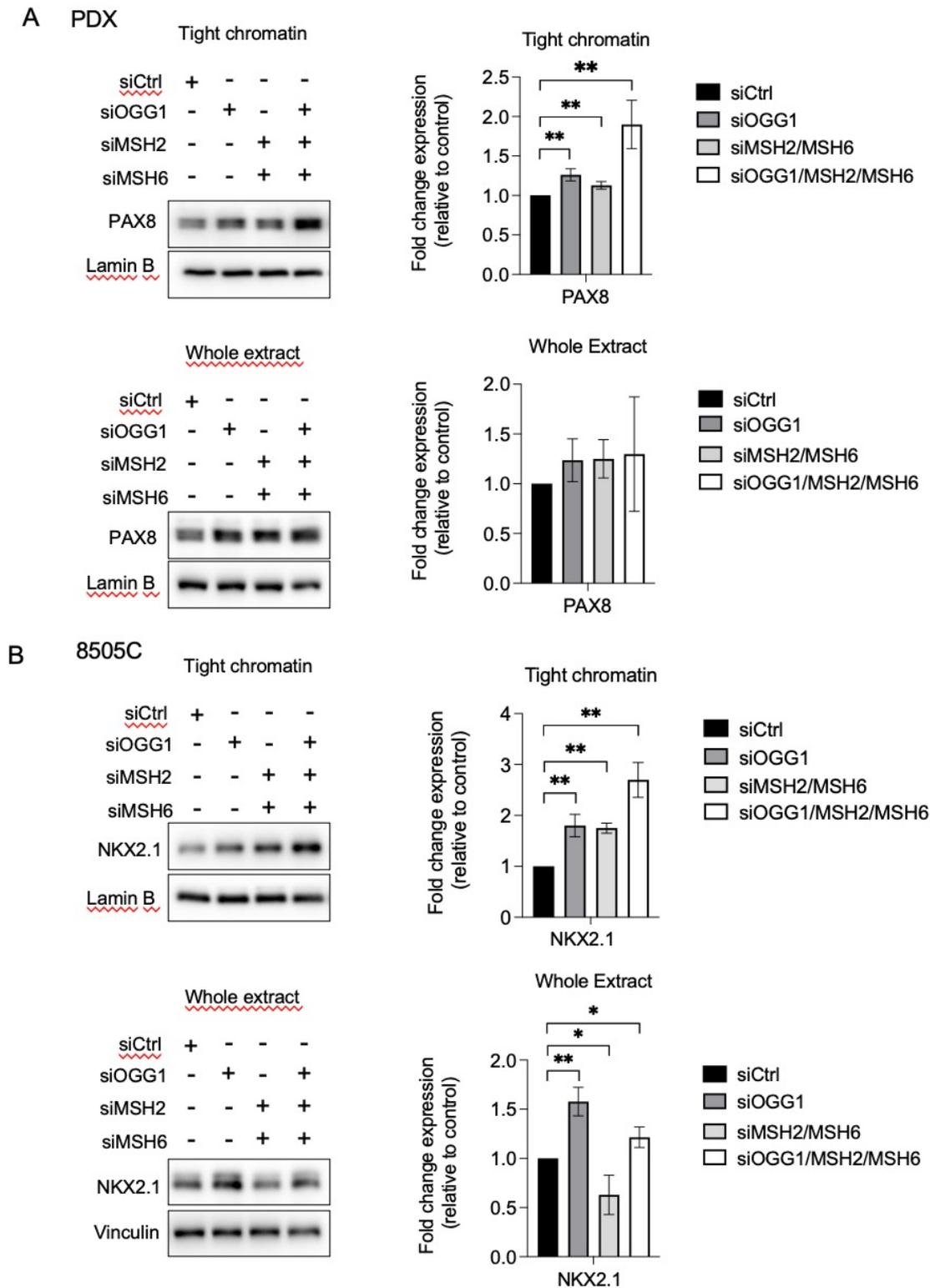


Figure S7: OGG1, MSH2 and MSH6 inhibit recruitment of PAX8 and NKX2.1 to chromatin. A) Western blot analysis of PAX8 protein expression in Tight chromatin fraction and whole extract 72h after knocking down of OGG1 or MSH2 and MSH6 by RNA interference in PDX cells. B) Western blot analysis of NKX2.1 protein expression in tight chromatin fraction and whole extract 72h after knocking down of OGG1 or MSH2 and MSH6 by RNA interference in 8505C cells. Densitometry quantification of protein levels normalized to Lamin B or Vinculin levels and presented as fold change compared with control cells. Values are mean \pm SE. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$. (n=3).

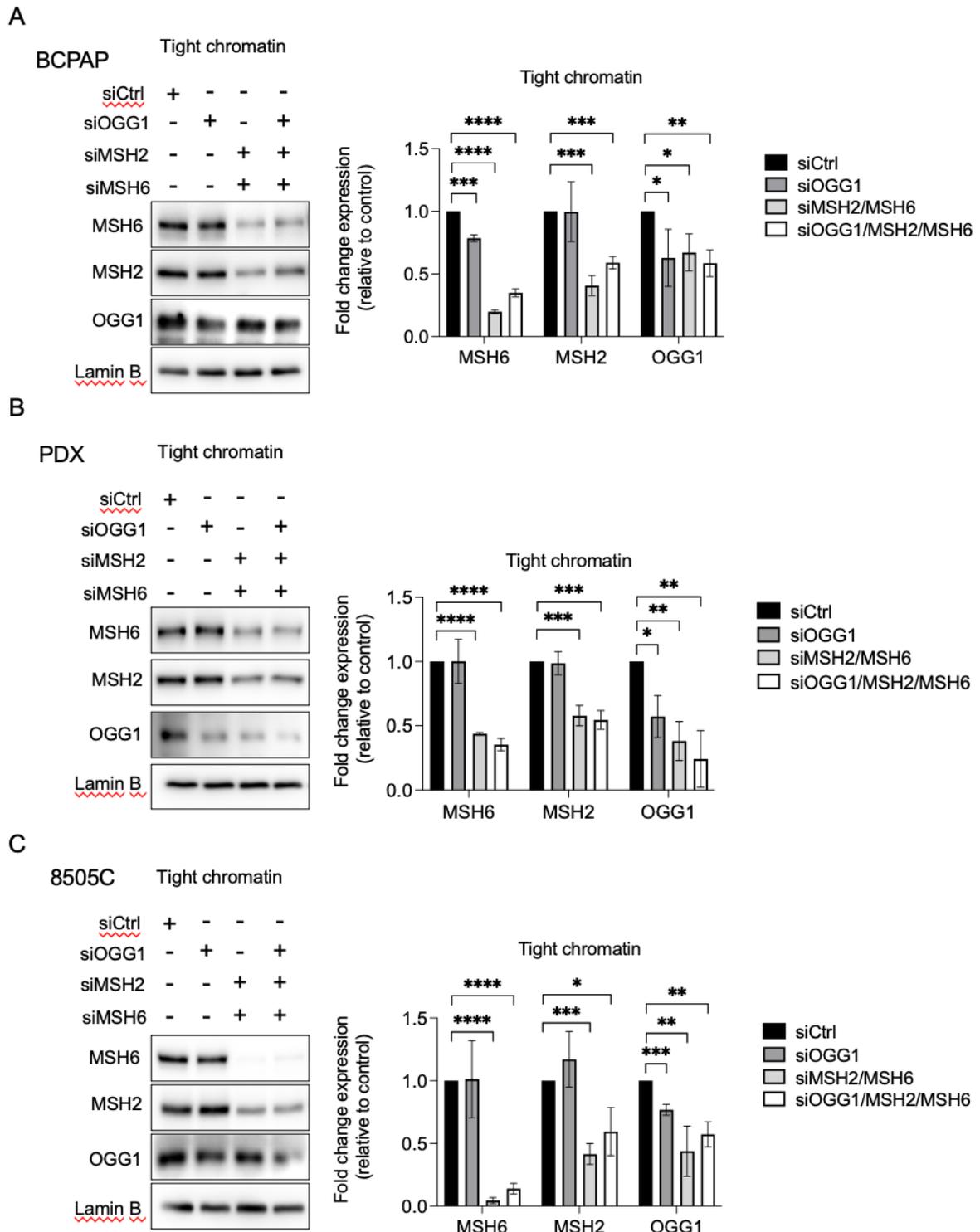


Figure S8: siRNA knockdown validation of OGG1, MSH2 and MSH6 analysed in tight chromatin fraction of BRAF-mutated thyroid cells. A) Western blot analysis of OGG1, MSH2 and MSH6 protein expressions in tight chromatin fraction 72h after knocking down of OGG1, MSH2 and MSH6 in BCPAP cells. B) Western blot analysis of OGG1, MSH2 and MSH6 protein expressions in tight chromatin fraction 72h after knocking down of OGG1, MSH2 and MSH6 in PDX cells. C) Western blot analysis of OGG1, MSH2 and MSH6 protein expressions in tight chromatin fraction 72h after knocking down of OGG1, MSH2 and MSH6 in 8505C cells. Densitometry quantification of protein levels normalized to Lamin B levels and presented as fold change compared with control cells. Values are mean \pm SE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$. (n=3).

8505C

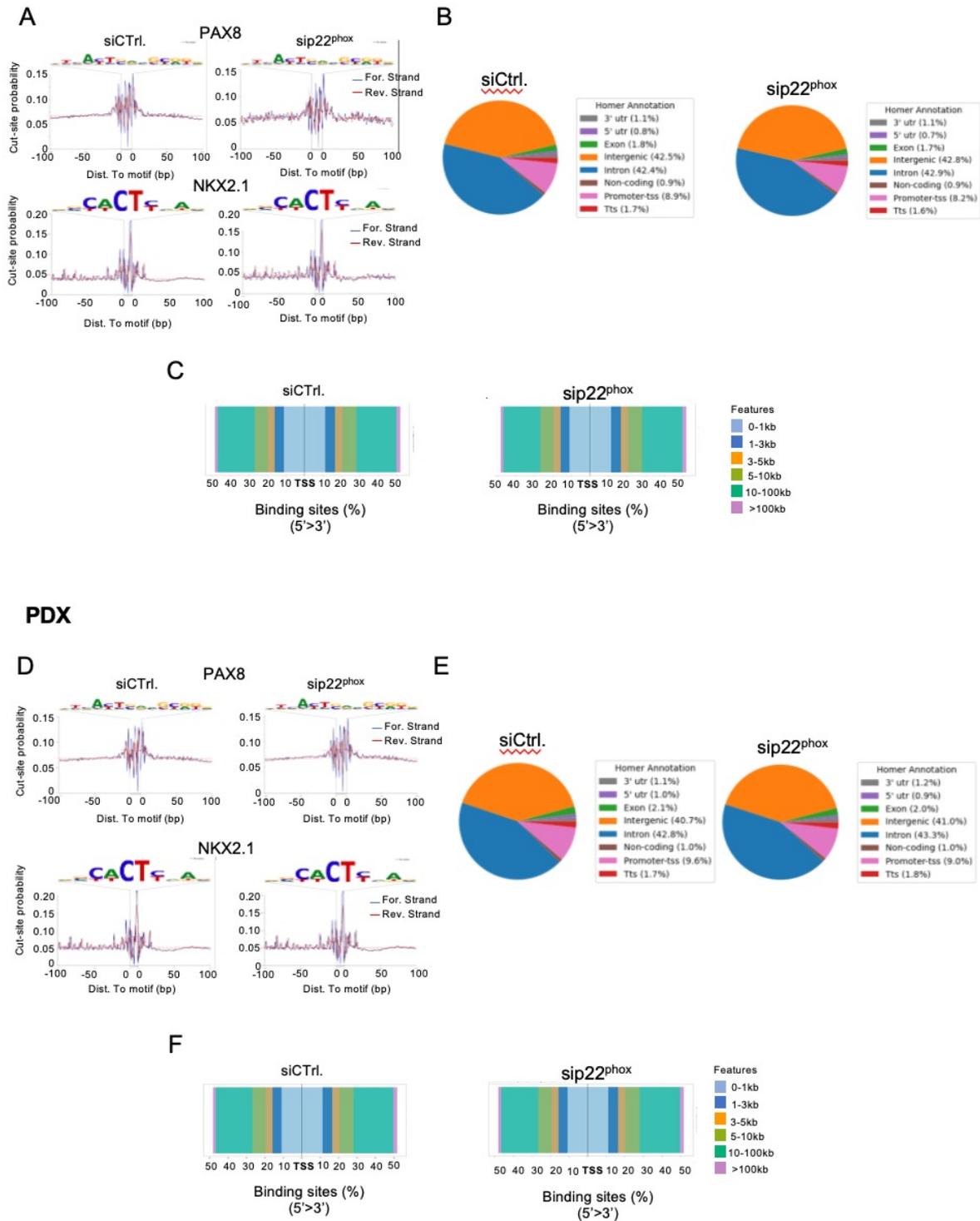


Figure S9: ATAC-seq analysis of 8505C and PDX cells deleted or not for p22phox. A) ATAC-seq footprint at the PAX8 and NKX2.1 full sites. Cut sites probability, insertions per site are normalized to have the same average depth of insertions ± 100 bp away from motif center. The DNA sequences of the bottom are the motif of PAX8 and NKX2.1, respectively. B) Genomic distribution of ATAC-seq peaks in BCPAP cells transduced for 72h with siRNA control and siRNA p22phox. C) Distribution of transcription factor-binding loci relative to TSS.

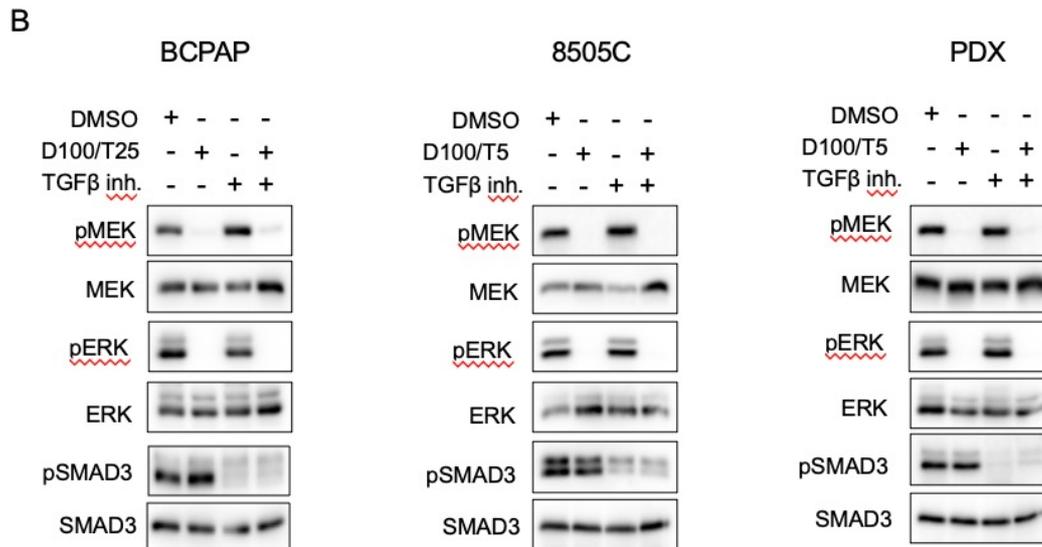
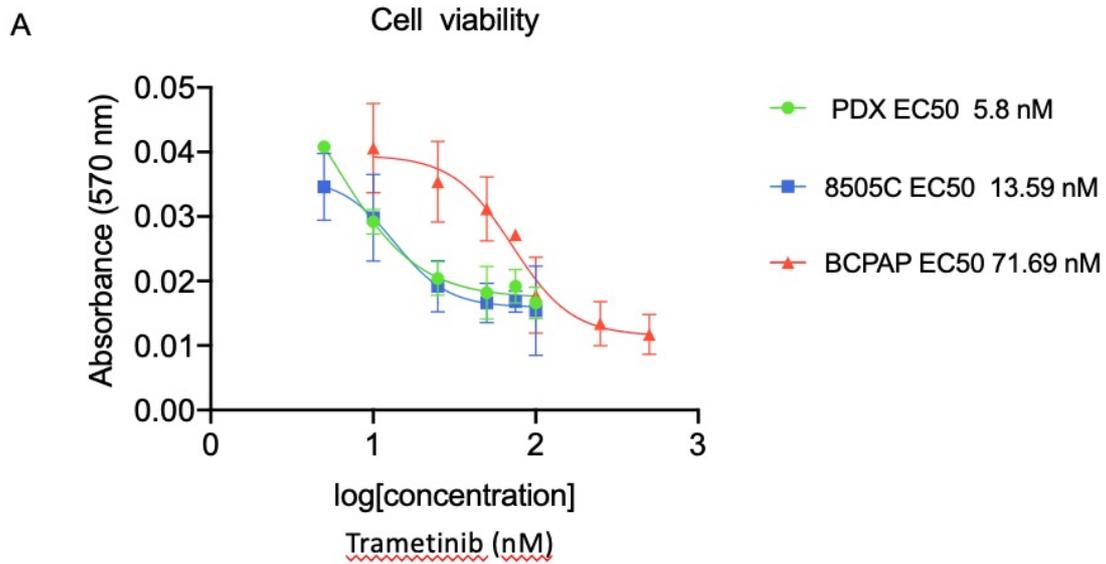


Figure S10: Validation of Dabrafenib and Trametinib concentrations efficient for inhibition of MAPK signalling pathway in BRAF-mutated thyroid cells. A) Dose response curve of BCPAP, 8505C and PDX cells in Trametinib. B) BRAF-mutated thyroid cells were treated with Dabrafenib (100 nM) plus Trametinib (25 nM or 5 nM) with or without TGF-beta receptor inhibitor (TEW 1 μ M) for 4 h and analysed by western-blot for expression of pMEK, MEK, pERK, ERK, pSMAD3 and SMAD3.

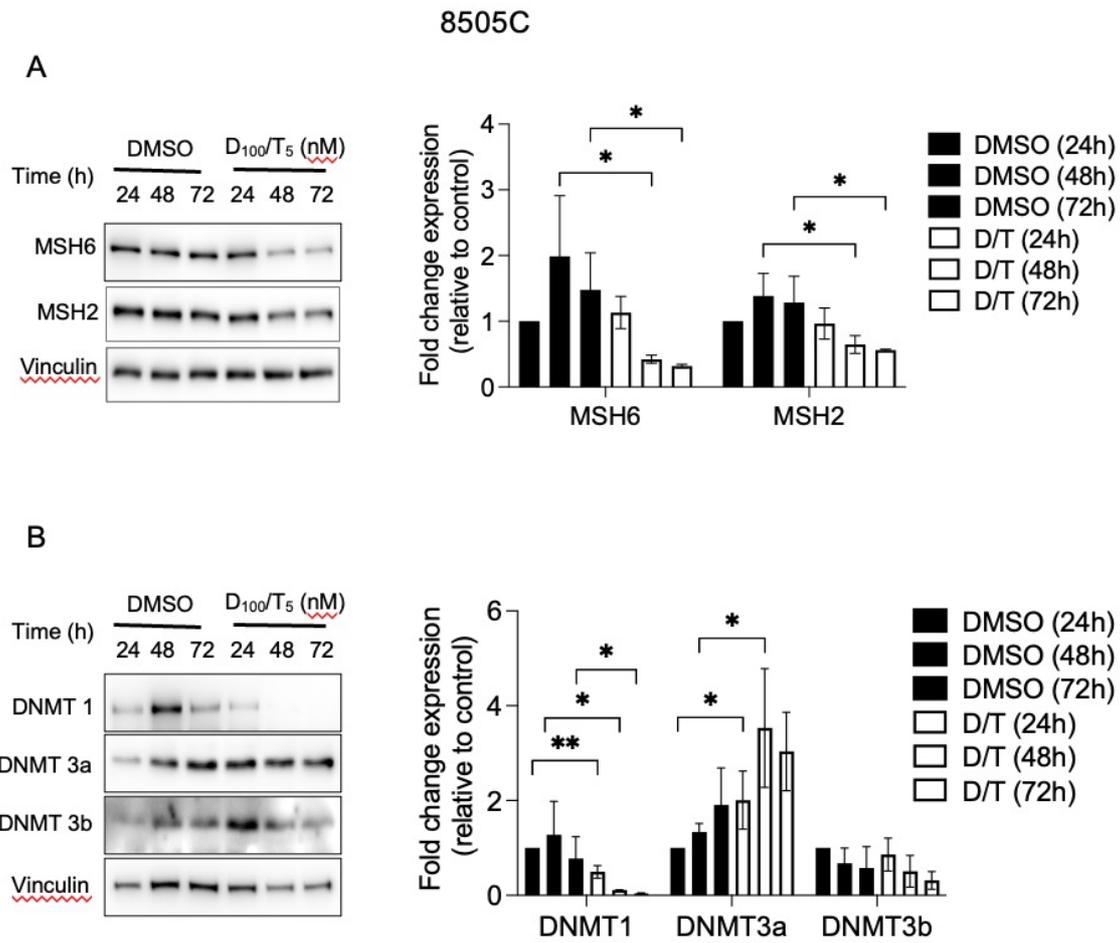


Figure S11: Dabrafenib plus Trametinib combination inhibits MMR and DNMT1 protein expressions in BRAF-mutated thyroid cells. Immunoblot detection of MSH2, MSH6, DNMT1, DNMT3a and DNMT3b in 8505C cells after treatment by the combination Dabrafenib plus Trametinib. Densitometric quantification of protein levels normalized to vinculin levels and presented as fold change compared with vehicle-treated cells. Student t-test is realized by comparing combination versus DMSO for each corresponding time of kinetic. Values are mean±SE. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ (n=3)

8505C

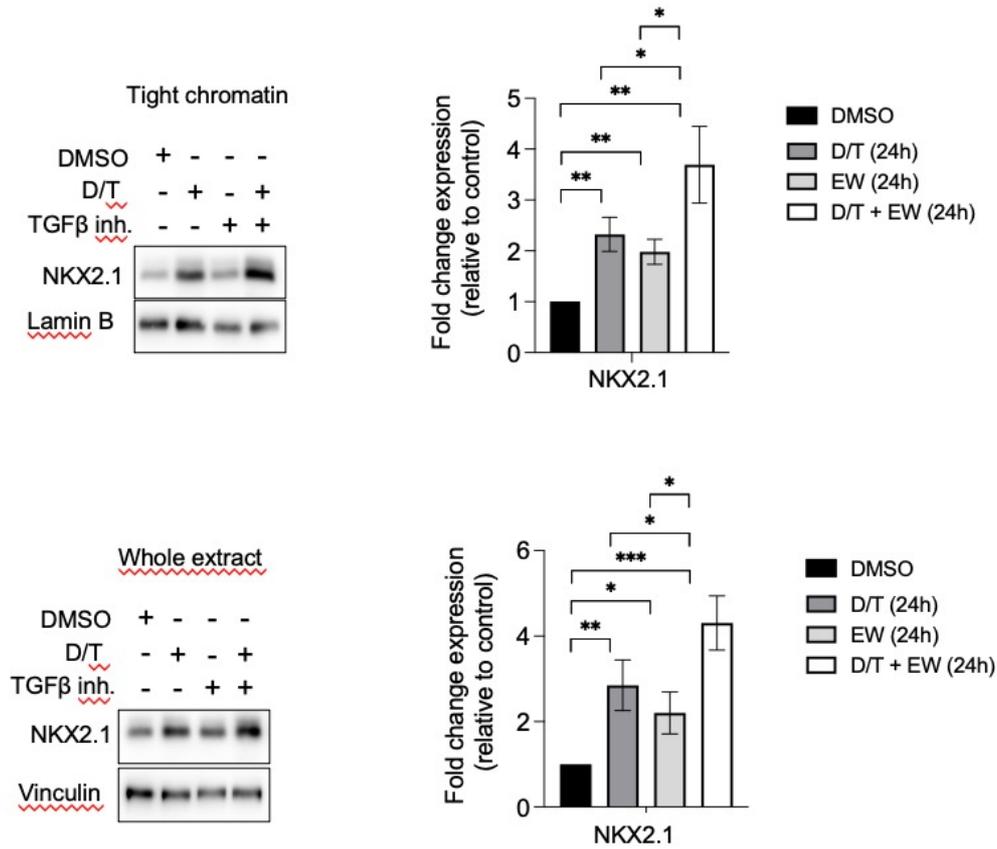


Figure S12: Co-inhibition of SMAD and MAPK signalling promotes NKX2.1 recruitment to chromatin. Western-blot analysis of NKX2.1 protein expressions in tight chromatin fraction and whole extract of 8505C cells treated or not with Dabrafenib plus trametinib combination in the presence or in the absence of TGF-beta inhibitor (TEW) for 24h. Densitometric quantification of protein levels normalized to loading control and presented as fold change compared with vehicle-treated cells.

Discussion et Perspectives



NOX4 : isoforme pro-tumorale ?

Nos résultats ont identifié un nouveau mécanisme moléculaire impliquant la NADPH oxydase 4 (NOX4) dans le processus de dédifférenciation thyroïdienne via un processus épigénétique. Plusieurs localisations subcellulaires de NOX4 ont été décrites dans la littérature avec une production de ROS locale impliquée dans divers processus physiologiques. Ici, nous montrons que NOX4, exprimée à la membrane nucléaire des cellules tumorales thyroïdiennes porteuses de la mutation BRAF^{V600E}, induit des dommages oxydatifs (8-oxoG) à l'ADN par l'H₂O₂ qu'elle produit. L'inhibition de son expression par ARN interférence conduit à une diminution significative des 8-oxoGs. De manière intéressante, une localisation cytosolique de NOX4 a également été observée dans nos modèles cellulaires (données non montrées). Plusieurs isoformes de NOX4 issues d'un épissage alternatif ont été décrites dans différents types cellulaires. Ces isoformes présentent une distribution subcellulaire différente associée à différents mécanismes de signalisation redox. Certaines de ces isoformes sont impliquées dans des processus pathologiques [264-266]. La régulation de l'épissage alternatif, la fonction et le mode de régulation de l'expression des isoformes NOX4 restent à ce jour méconnus. Selon nos observations, il n'est pas exclu qu'il y ait plusieurs isoformes de NOX4 dans les cellules thyroïdiennes mutées BRAF^{V600E} et qu'une ou plusieurs de ces isoformes soient pro-tumorales. L'identification des éventuelles isoformes NOX4 et leur implication dans le processus de cancérogenèse thyroïdienne restent à être étudiées. L'analyse de NOX4 dans les fractions nucléaires des cellules étudiées montre que cette dernière est augmentée dans toutes les lignées cellulaires arborant la mutation BRAF^{V600E} avec une expression plus importante dans les lignées faiblement différenciées comme la lignée PDX563. A l'inverse, le niveau de NOX4 est apparu faible dans les fractions cytosoliques de ces lignées (données non montrées). Ceci suggère que le niveau d'expression de NOX4 augmenterait dans le compartiment nucléaire au cours du processus de dédifférenciation et pourrait être ainsi à l'origine de la progression tumorale. Bien que NOX4 ait une activité de production d'H₂O₂ constitutive liée au niveau d'expression de son messager, de plus en plus de données émergent faisant état de la modulation de son activité par des modifications post-traductionnelles ou par des interactions avec d'autres protéines [270-277, 401]. Il n'est pas exclu que la localisation nucléaire de NOX4 dans ces conditions tumorales soit associée à des modifications post-traductionnelles et/ou des interactions protéiques. Cet aspect mérite d'être approfondie.

8-oxoG : marque épigénétique apposée par NOX4 dans les cellules cancéreuses thyroïdiennes mutées BRAF

Nos résultats ont révélé la contribution des dommages oxydatifs au processus de dédifférenciation thyroïdienne. La lésion oxydative 8-oxoG apparaît ici être une marque épigénétique impliquée dans la modulation réversible de l'expression de gènes de la différenciation thyroïdienne en empêchant le recrutement des deux facteurs de transcription NKX2.1 et PAX8, essentiels à la différenciation. De manière intéressante, l'analyse de la distribution de la 8-oxoG dans le génome de cellules rénales de rat a montré une certaine hétérogénéité dans la répartition de cette base oxydée. Elle est majoritairement retrouvée dans les déserts géniques. L'hétérochromatine en général, constitue une région de faible expression génique et est généralement retrouvée en région périphérique du noyau [402]. Ainsi une corrélation entre la distribution de la 8-oxoG à la région périnucléaire et les domaines associés à la lamina, maillage fibrillaire bordant l'enveloppe nucléaire, a été observée, suggérant que la localisation des régions génomiques gouverne leur susceptibilité aux dommages oxydatifs dans le noyau. Par conséquent, la présence de 8-oxoG au niveau de l'hétérochromatine indique une proximité avec les facteurs oxydants présents au niveau de l'enveloppe nucléaire [403, 404]. Les données concernant la distribution de la 8-oxoG dans l'euchromatine sont plus rares. Néanmoins, quelques études montrent une distribution de la 8-oxoG dans les régions à forte concentration en dinucléotides CG comme les promoteurs. La présence de cette lésion dans ces régions est décrite comme étant associée à une répression transcriptionnelle [377, 405]. Nos données ont confirmé que la distribution de la 8-oxoG dans le génome humain n'est pas uniforme. Nous avons montré que les régions intergéniques et introniques sont les régions les plus enrichies en 8-oxoGs induites par les ROS générées par NOX4 dans les CPTs mutés BRAF^{V600E}. Les introns et les régions intergéniques sont appelées 'régions non codantes' mais possèdent un rôle dans la régulation de l'expression génique. Les miRNAs, par exemple, contrôlant l'expression de gènes, peuvent être formés à partir de régions introniques. L'expression de ces ARN non codants est souvent dérégulée dans des conditions de stress oxydatif et leur régulation se fait via des mécanismes épigénétiques. Les expressions de miRNAs intervenant dans le processus de différenciation ont été trouvées modifiés dans les CPTs et corrélés au potentiel agressif de ces tumeurs [216]. Des études supplémentaires sont nécessaires afin de mieux caractériser le rôle potentiel des 8-oxoGs dans la régulation des miRNAs. De manière intéressante, nous avons aussi trouvé de la 8-oxoG dans les séquences codantes des gènes de la différenciation thyroïdienne. Sa présence est supprimée dans ces zones

géniques après déplétion en NOX4. Enfin, l'analyse histologique de plusieurs tissus de CPTs avec un co-immunomarquage de NOX4 et 8-oxoG met en évidence une colocalisation entre les dommages oxydatifs situés en périphérie du noyau et NOX4 (données non montrées).

Protéines de la réparation de l'ADN (OGG1, MSH2, MSH6) : bloqueurs de la transcription génique dans les cellules cancéreuses thyroïdiennes mutées BRAF ?

La réparation de la 8-oxoG produite par les ROS générées par NOX4 dans les cellules thyroïdiennes fait intervenir deux systèmes de réparation des dommages à l'ADN : la voie de réparation par excision de base (BER) et le système de réparation des mésappariements (MMR). Les protéines impliquées dans ces systèmes de réparation, telles qu'OGG1, MSH2, MSH6 sont les premières à être recrutées aux sites des dommages oxydatifs. D'une manière générale, les CPTs ayant la mutation BRAF^{V600E} présentent un faible taux de mutations. Comparée aux tumeurs bénignes, les tumeurs malignes thyroïdiennes présentent un niveau d'expression des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN plus élevé suggérant une activation fonctionnelle [406]. Cela pourrait donc expliquer le faible taux de mutation retrouvés dans les CPTs. De manière intéressante, MSH6 a été trouvé muté dans des cancers anaplasiques de la thyroïde, qui sont des tumeurs indifférenciées et très agressives, où le niveau d'hyper-mutabilité est élevé [419, 420]. Les protéines MMR ont été majoritairement caractérisées dans les cancers du côlon où, plusieurs mutations de type « perte de fonction » ont été identifiées et associées à la mise en place d'instabilités génétiques [407]. Le rôle des protéines MMR dans la carcinogenèse thyroïdienne et la progression tumorale doit être approfondi.

MSH2 et MSH6 sont des protéines dont l'expression est contrôlée par le facteur de transcription E2F permettant la progression du cycle cellulaire. Nous avons montré que l'oncogène BRAF^{V600E} qui contrôle la prolifération des cellules [408] contrôle l'expression de ces protéines de manière dépendante de ERK. Des investigations supplémentaires doivent permettre de mieux caractériser le rôle de BRAF^{V600E} dans le contrôle de l'expression de MSH2/MSH6. A l'inverse des protéines MMR, une faible expression d'OGG1 a été retrouvée dans les CPTs mutés BRAF^{V600E} (données non montrées). Il existe quasiment aucune étude portant sur d'éventuelles modifications génétiques et épigénétiques affectant le gène OGG1 dans les CPTs, à l'exception d'une qui montre une hyperméthylation d'OGG1 dans un nombre infime de CPTs [409]. Ainsi, une dérégulation de l'expression d'OGG1 dans un contexte d'accumulation de dommages oxydatifs pourrait favoriser l'installation d'une instabilité génétique et conduire à la progression tumorale. Pour combler l'absence ou l'inactivation d'OGG1, il existe d'autres

ADN glycosylases impliquées dans la voie du BER, telles que NEIL 1 et 2, qui participent également au retrait des bases oxydées [412]. Mais ces enzymes ont été très peu décrites dans les cancers de la thyroïde et notre étude montre qu'OGG1 et les protéines MMR contribuent à elles seules à bloquer le recrutement de PAX8 et NKX2.1 à la chromatine. L'expression et l'activité d'OGG1 sont régulées de manière redox [342, 363]. Nous observons une diminution de l'expression d'OGG1 dans les fractions chromatiniennes des cellules BCPAP comparée à celle des thyrocytes primaires. Dans un contexte tumoral, où les ROS sont augmentées, on ne peut pas exclure, qu'une inactivation d'OGG1 puisse affecter sa capacité de liaison à l'ADN dans ces cellules. Dans ce cas, il pourrait y avoir un phénomène de compensation par une augmentation de l'expression des protéines MMR.

De manière générale, l'implication de manière préférentielle d'un système de réparation ou d'un autre aux différents sites de dommages oxydatifs dépend de la localisation de ceux-ci au sein du génome. Le système MMR est par exemple connue pour intervenir dans la réparation des clusters de dommages oxydatifs dans les régions riches en îlots CpG comme les régions promotrices [410]. L'implication préférentielle d'OGG1 dans la réparation de dommages oxydatifs dans les régions ouvertes de la chromatine a aussi été montrée [411]. Dans notre étude, nous démontrons une coopération entre OGG1, MSH2, MSH6 et les modificateurs épigénétiques comme DNMT1 dans la répression des gènes SLC5A5 et TSHR. Ces acteurs des voies de réparation des dommages oxydatifs de l'ADN contribuent ainsi à la mise en place de systèmes de « silençage » impliqués dans la répression de gènes de la différenciation thyroïdienne. Dans la littérature scientifique, une autre étude a montré une interaction entre une ADN glycosylase de la voie BER et la sous-unité MSH6 de l'hétérodimère MSH2/MSH6, induite par la présence de bases oxydées [353]. Le rôle des différents systèmes de réparation dans la prise en charge des dommages oxydatifs, leur éventuelle compensation ainsi que leur coopération dans la régulation génique reste à être exploré en détail.

La composante inflammatoire est un aspect important de la progression tumorale. Les cellules cancéreuses sécrètent de multiples facteurs qui influencent l'environnement tumoral dans le but de créer des conditions propices au développement. Dans les CPTs avancés, une forte densité de macrophages TAM (Tumor-associated macrophages) a été observée, positivement corrélée à l'invasion tumorale. Le recrutement et les modifications phénotypiques de ce type cellulaire sont basés sur la sécrétion de protéines pro-inflammatoires par les cellules cancéreuses [413]. Récemment, de nouvelles études sur l'implication d'OGG1 dans l'activation transcriptionnelle de gènes ont été publiées. En effet, les séquences régulatrices des gènes codant pour les

protéines de l'inflammation sont souvent riches en dinucléotides CG, certains d'entre eux abritent des motifs de repliement G-quadruplex, sensibles aux ROS. Dans des conditions de stress oxydatif, la liaison d'OGG1, enzymatiquement inactivée aux promoteurs de certains gènes pro-inflammatoires conduit à l'assemblage de la machinerie transcriptionnelle [360]. En effet, dans ces conditions, OGG1 entraîne des changements de conformation de la chromatine permettant une meilleure reconnaissance des motifs de liaison à l'ADN par les facteurs de transcription tels que NF- κ B. Ainsi, il n'est pas exclu qu'OGG1 participe également à l'activation de gènes impliqués dans l'inflammation dans les cancers de la thyroïde. A partir des cellules tumorales thyroïdiennes mutées BRAF^{V600E} nous pourrions réaliser un RNA-seq après délétion d'OGG1 et identifier les gènes réprimés ou activés par cette dernière.

La méthylation de l'ADN est un processus qui est altéré dans un grand nombre de cancers dont les cancers de la thyroïde. Les CPTs mutés BRAF^{V600E} sont des cancers hypo-méthylés de manière générale, cependant ils présentent une hyper-méthylation au niveau de certains gènes, en particulier, ceux impliqués dans la différenciation et dans l'organification de l'iode [216, 414]. Les enzymes responsables de ce type de modification épigénétique sont au nombre de trois, mais dans notre étude, nous montrons que seule DNMT1 est impliquée dans le processus de dédifférenciation. De manière importante, nous révélons que NOX4 joue un rôle majeur dans le recrutement de DNMT1 à la chromatine à travers le recrutement des protéines de la réparation de l'ADN, OGG1 et MMRs, l'ensemble conduisant à la répression du gène codant le transporteur de l'iode. Le MeDIP sequencing montre que les ROS générés par NOX4 sont impliqués dans le processus de méthylation des CPTs mutés BRAF^{V600E} puisque la délétion de cette enzyme altère de manière significative le profil de méthylation. Les cytosines méthylées sont majoritairement retrouvées dans les régions intergéniques et introniques. Or, il se trouve que ces régions sont également majoritairement impactées par les dommages oxydatifs dans les mêmes cellules. Les expériences de délétion de DNMT1 ont permis de mettre en évidence un phénomène de compensation avec l'augmentation de l'expression et du recrutement des deux autres DNMTs : DNMTa et DNMT3b à la chromatine. Alors que l'analyse des données du TCGA montre une corrélation inverse entre le niveau d'expression de DNMT1 et le score de différenciation thyroïdien, une corrélation positive entre l'expression de DNMT3b et le score de différenciation thyroïdien, a été révélée. Ce résultat est nouveau. A notre connaissance, il y a très peu d'étude concernant le rôle de DNMT3b dans la différenciation thyroïdienne. Dans les cellules souches pluripotentes chez la souris, une transfection de DNMT3b a favorisé le processus de différenciation via la méthylation des marqueurs de pluripotence [415]. Le fait

que la délétion de NOX4, favorise l'expression et le recrutement de la DNMT3b suggère que celle-ci pourrait être impliquée dans le processus de différenciation thyroïdienne. Ceci mérite d'être approfondi.

En plus de DNMT1 aux sites de dommages oxydatifs, la présence d'autres acteurs épigénétiques n'est pas à exclure. De récentes études ont montré qu'OGG1 recrute CHD4 (Chromodomain helicase DNA-binding protein 4), une ATPase du complexe de remodelage NuRD (nucleosome remodeling and deacetylase), aux sites de dommages oxydatifs à l'ADN. Dans la littérature, NuRD est principalement décrit comme un complexe répressif. Une fois recrutée, CHD4 recrute à son tour plusieurs acteurs qui coopèrent dans la répression transcriptionnelle. Parmi, ces acteurs, on retrouve les DNMTs, et les modificateurs d'histones [360]. Une surexpression de CHD4 a été observée dans les CPTs, corrélée à l'agressivité tumorale [418]. Dans une publication en préparation, notre équipe montre que les ROS générées par NOX4 favorisent également le recrutement de CHD4 aux sites de dommages oxydatifs via une interaction avec les protéines de la réparation. Une coopération entre CHD4 et DNMT1 dans la répression transcriptionnelle du NIS est aussi observée. D'autres investigations sont en cours afin d'approfondir les mécanismes d'implication de CHD4 dans le processus de dédifférenciation thyroïdienne.

Stratégie thérapeutique envisagée : inhibition conjointe des signalisations MAPK et TGF- β

Une stratégie thérapeutique basée sur la re-différenciation thyroïdienne conduisant à la réexpression du NIS et des gènes de l'organification de l'iode, permettant de déboucher sur un traitement par l'iode 131, reste aujourd'hui une des meilleures options thérapeutiques pour les patients ayant un CPT muté BRAF^{V600E} localement avancé ou métastatique. BRAF^{V600E} est un puissant activateur de la signalisation MAPK, l'inhibition de cette dernière a conduit dans des modèles pré-cliniques à la réexpression des gènes de l'organification de l'iode [245-249]. Cependant, en clinique des résultats plus hétérogènes ont été obtenus faisant apparaître le fait que soit la voie n'est pas suffisamment inhibée ou que son inhibition seule n'est pas suffisante. Afin d'obtenir une inhibition efficace de la voie MAPK deux inhibiteurs : le Dabrafenib et le Trametinib, ciblant respectivement BRAF^{V600E} et MEK, ont été utilisés lors d'essais cliniques de phase 2. L'essai intitulé MERAIODE réalisé à Gustave Roussy montre une réponse partielle à 6 mois (Leboulleux S, Cao CD, Zerdoud S, Attard M, Bournaud C, Benisvy D, et al. MERAIODE: A Redifferentiation Phase II Trial With Trametinib and Dabrafenib Followed by Radioactive Iodine Administration for Metastatic Radioactive Iodine Refractory Differentiated

Thyroid Cancer Patients With a BRAFV600E Mutation (NCT 03244956). *Journal of the Endocrine Society*. 2021 May 1;5 (Supplement_1): A876). Ainsi, d'autres voies associées à la voie MAPK peuvent influencer la re-différenciation et conduire à de nouvelles approches pharmacologiques susceptible d'améliorer l'entrée et la résidence de l'iode radioactif et donc l'efficacité de la radiothérapie métabolique. D'un point de vue mécanistique, notre étude révèle que le traitement des cellules cancéreuses mutées BRAF^{V600E} avec la combinaison Dabrafenib/Trametinib inhibe l'expression des protéines MMR et DNMT1, expliquant ainsi une des raisons de l'efficacité de ce traitement dans la réinduction du NIS. En revanche, de manière surprenante, nous avons observé une régulation positive d'OGG1 par ce traitement, associée à une diminution de γ H2AX, un marqueur des dommages à l'ADN. Ces résultats suggèrent qu'OGG1 pourrait être impliquée dans des mécanismes de résistance aux agents thérapeutiques en permettant la réparation de dommages à l'ADN et donc la survie cellulaire. Ces données restent à approfondir.

La signalisation du TGF- β joue un rôle clé dans la progression tumorale des CPTs mutés BRAF^{V600E}. BRAF^{V600E} contrôle l'expression de NOX4 via la sécrétion et l'activation autocrine de la signalisation TGF- β [232]. Pour la première fois, nous montrons que l'inhibition de NOX4 ou de son partenaire fonctionnel, la p22phox combinée à l'inhibition de la voie MAPK potentialise le recrutement à la chromatine des facteurs de transcription NKX2.1 et PAX8. Cela, a conduit à la réexpression du NIS et de TSHR au niveau transcriptionnel. La TSH est l'hormone qui contrôle la fonction thyroïdienne, par conséquent, la réactivation de l'expression de son récepteur indique que les cellules cancéreuses redeviennent sensibles à la TSH. De manière importante, la co-inhibition des signalisations MAPK et TGF- β reproduit ces effets. Au-delà de NOX4, le TGF- β contrôle également l'expression d'OGG1 (donnée non montrée). Par conséquent un inhibiteur du TGF- β en diminuant OGG1 non seulement contribue à la réactivation du gène SLC5A5 mais également à l'inhibition d'un mécanisme de résistance potentielle.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats a permis de démontrer l'importance de la voie du TGF- β dans le processus de dédifférenciation des CPTs mutés BRAF^{V600E}. NOX4 dont l'expression est contrôlée par la signalisation du TGF- β , produit des dommages oxydatifs à l'ADN qui sont des marques épigénétiques. Des modificateurs épigénétiques sont alors recrutés aux sites de ces dommages oxydatifs via une interaction avec les protéines de la réparation, empêchant ainsi la liaison des deux facteurs de transcription NKX2.1 et PAX8, essentiels à la différenciation. Par conséquent, l'inhibition de la voie du TGF- β , avec celle de la voie MAPK

s'avère être une option thérapeutique prometteuse pour soigner les patients ayant un CPT muté BRAF devenu réfractaire à l'iode radioactif.

Bibliographie



- [1] Davis PJ, Davis FB. Nongenomic actions of thyroid hormone. *Thyroid*. 1996 Oct;6(5):497-504.
- [2] Yen, P. M. (2001). "Physiological and molecular basis of thyroid hormone action." *Physiol Rev*. 2001 Jul;81(3):1097-142.
- [3] J A Magner and al. Thyroid-stimulating hormone: structure and function. *Adv Exp Med Biol*. 1989;261:27-103.
- [4] Mariusz W Szkudlinski and al. Thyroid-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone receptor structure-function relationships. *Physiol Rev*. 2002 Apr;82(2):473-502.
- [5] Angela M Inzerillo and al. Calcitonin: physiological actions and clinical applications. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2004 Jul;17(7):931-40.
- [6] Inzerillo, Angela M.; Zaidi, Mone; Huang, Christopher L.-H. (2002). Calcitonin: The Other Thyroid Hormone. *Thyroid*, 12(9), 791–798.
- [7] Zaidi, Mone and al (1990). The Calcitonin Gene Peptides: Biology and Clinical Relevance. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 28(2), 109–174.
- [8] D Inoue and al. Calcitonin-dependent down-regulation of the mouse C1a calcitonin receptor in cells of the osteoclast lineage involves a transcriptional mechanism. *Endocrinology*. 1999 Mar;140(3):1060-8.
- [9] D M Findlay. Regulation of cell growth mediated by the calcitonin receptor. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2006 May 30;52(3):3-8.
- [10] Girish V Shah and al. Calcitonin promotes in vivo metastasis of prostate cancer cells by altering cell signaling, adhesion, and inflammatory pathways. *Endocr Relat Cancer*. 2008 Dec;15(4):953-64.
- [11] Carla Portulano and al. The Na⁺/I⁻ Symporter (NIS): Mechanism and Medical Impact. *Endocr Rev*. 2014 Feb; 35(1): 106–149.
- [12] Dai G, Levy O, Carrasco N. Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature*. 1996;379:458–460.
- [13] O Levy and al. N-linked glycosylation of the thyroid Na⁺/I⁻ symporter (NIS). Implications for its secondary structure model. *J Biol Chem*. 1998 Aug 28;273(35):22657-63.
- [14] Dohán O and al. The Na⁺/I symporter (NIS) mediates electroneutral active transport of the environmental pollutant perchlorate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:20250–20255.
- [15] Viktoriya Paroder and al. The iodide-transport-defect-causing mutation R124H: a δ-amino group at position 124 is critical for maturation and trafficking of the Na⁺/I⁻ symporter. *J Cell Sci*. 2013 Aug 1; 126(15): 3305–3313.
- [16] P A Smanik and al. Expression, exon-intron organization, and chromosome mapping of the human sodium iodide symporter. *Endocrinology*. 1997 Aug;138(8):3555-8.
- [17] C Spitzweg and al. Analysis of human sodium iodide symporter gene expression in extrathyroidal tissues and cloning of its complementary deoxyribonucleic acids from salivary gland, mammary gland, and gastric mucosa. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998 May;83(5):1746-51.

- [18] U H Tazebay and al. The mammary gland iodide transporter is expressed during lactation and in breast cancer. *Nat Med.* 2000 Aug;6(8):871-8.
- [19] Garcilaso Riesco-Eizaguirre and al. The complex regulation of NIS expression and activity in thyroid and extrathyroidal tissues. *Endocr Relat Cancer.* 2021 Sep 3;28(10):T141-T165.
- [20] Orsolya Dohán and al. The sodium/iodide Symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance. *Endocr Rev.* 2003 Feb;24(1):48-77.
- [21] X Cai and al. Mechanisms of regulating NIS transport to the cell membrane and redifferentiation therapy in thyroid cancer. *Clin Transl Oncol.* 2021 Dec;23(12):2403-2414.
- [22] Chung T and al. Glycosylation of sodium/iodide symporter (NIS) regulates its membrane translocation and radioiodine uptake. *PLoS One.* 2015;10(11):e0142984.
- [23] Douangson D Vadysirisack and al. Identification of in vivo phosphorylation sites and their functional significance in the sodium iodide symporter. *J Biol Chem.* 2007 Dec 21;282(51):36820-8.
- [24] C Riedel, O Levy, N Carrasco. Post-transcriptional regulation of the sodium/iodide symporter by thyrotropin. *J Biol Chem.* 2001 Jun 15;276(24):21458-63.
- [25] Kaminsky SM and al. Na⁺-I⁻ symport activity is present in membrane vesicles from thyrotropin-deprived non-I⁻-transporting cultured thyroid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:3789–3793.
- [26] Wolff J, Chaikoff IL. Plasma inorganic iodide as a homeostatic regulator of thyroid function. *J Biol Chem.* 1948;174:555–564.
- [27] Eng PHK and al. (1999) Escape from the acute Wolff-Chaikoff effect is associated with a decrease in thyroid sodium/iodide symporter messenger ribonucleic acid and protein. *Endocrinology* 140:3404–3410.
- [28] Grollman EF, Smolar A, Ommaya A, Tombaccini D, Santisteban P 1986 Iodine suppression of iodide uptake in FRTL-5 thyroid cells. *Endocrinology* 118:2477–2482.
- [29] Dugrillon A 1996 Iodolactones and iodoaldehydes-mediators of iodine in thyroid autoregulation. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 104:41–45.
- [30] Arriagada AA and al. 2015 Excess iodide induces an acute inhibition of the sodium/iodide symporter in thyroid male rat cells by increasing reactive oxygen species. *Endocrinology* 156 1540–1551.
- [31] Furlanetto TW and al. 1999 Estradiol increases proliferation and down-regulates the sodium/iodide symporter gene in FRTL-5 cells. *Endocrinology* 140:5705–5711.
- [32] James Ryan and al. The Sodium Iodide Symporter (NIS) and Potential Regulators in Normal, Benign and Malignant Human Breast Tissue. *PLoS One.* 2011; 6(1): e16023.
- [33] Ajjan RA and al. 1998 The sodium iodide symporter gene and its regulation by cytokines found in autoimmunity. *J Endocrinol* 158:351–358.
- [34] C Spitzweg, W Joba, J C Morris, A E Heufelder. Regulation of sodium iodide symporter gene expression in FRTL-5 rat thyroid cells. *Thyroid.* 1999 Aug;9(8):821-30.
- [35] P M Schumm-Draeger. Sodium/iodide symporter (NIS) and cytokines. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2001;109(1):32-4.

- [36] A E Pekary, J M Hershman. Tumor necrosis factor, ceramide, transforming growth factor-beta1, and aging reduce Na⁺/I⁻ symporter messenger ribonucleic acid levels in FRTL-5 cells. *Endocrinology*. 1998 Feb;139(2):703-12.
- [37] A E Pekary and al. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) inhibit the expression and activity of Na⁺/K⁽⁺⁾-ATPase in FRTL-5 rat thyroid cells. *J Interferon Cytokine Res*. 1997 Apr;17(4):185-95.
- [38] A K Rasmussen and al. Influence of tumour necrosis factor-alpha, tumour necrosis factor-beta and interferon-gamma, separately and added together with interleukin-1 beta, on the function of cultured human thyroid cells. *J Endocrinol*. 1994 Nov;143(2):359-65.
- [39] Costamagna E and al. 2004 The functional interaction between the paired domain transcription factor Pax8 and Smad3 is involved in transforming growth factor-β repression of the sodium/iodide symporter gene. *Journal of Biological Chemistry* 279 3439–3446.
- [40] Xue Yu and al. Changes of sodium iodide symporter regulated by IGF-I and TGF-β1 in mammary gland cells from lactating mice at different iodine levels. *Biol Trace Elem Res*. 2012 Apr;146(1):73-8.
- [41] García B & Santisteban P 2002 PI3K is involved in the IGF-I inhibition of TSH-induced sodium/iodide symporter gene expression. *Molecular Endocrinology* 16 342–352.
- [42] Sarah J Morgan and al. Thyrotropin and Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor Crosstalk Upregulates Sodium-Iodide Symporter Expression in Primary Cultures of Human Thyrocytes. *Thyroid*. 2016 Dec;26(12):1794-1803.
- [43] Bruno Di Jeso, Peter Arvan. Thyroglobulin From Molecular and Cellular Biology to Clinical Endocrinology. *Endocr Rev*. 2016 Feb;37(1):2-36.
- [44] Malthiéry, Yves and al (1989). Thyroglobulin structure and function: recent advances. *Biochimie*, 71(2), 195–209.
- [45] Bruno Di Jeso and al. Folding of thyroglobulin in the calnexin/calreticulin pathway and its alteration by loss of Ca²⁺ from the endoplasmic reticulum. *Biochem J*. 2003 Mar 1;370(Pt 2):449-58.
- [46] Cintia E Citterio and al. De novo triiodothyronine formation from thyrocytes activated by thyroid-stimulating hormone. *J Biol Chem*. 2017 Sep 15;292(37):15434-15444.
- [47] L E Ericson. Exocytosis and endocytosis in the thyroid follicle cell. *Mol Cell Endocrinol*. 1981 Apr;22(1):1-24.
- [48] Yvonne Groemping and al. Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase. *Cell*. 2003 May 2;113(3):343-55.
- [49] De Deken X and al. Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J Biol Chem* 275: 23227–23233, 2000.
- [50] Vigone MC and al. Persistent mild hypothyroidism associated with novel sequence variants of the DUOX2 gene in two siblings. *Hum Mutat* 26: 395, 2005.
- [51] Andrew C. Little and al. Paradoxical roles of dual oxidases in cancer biology. *Free Radic Biol Med*. 2017 Sep; 110: 117–132.

- [52] Louise Poncelet and al. The Dual Oxidase Duox2 stabilized with DuoxA2 in an enzymatic complex at the surface of the cell produces extracellular H₂O₂ able to induce DNA damage in an inducible cellular model. *Exp Cell Res*. 2019 Nov 1;384(1):111620.
- [53] Dantong Wang. Identification of a novel partner of duox: EFP1, a thioredoxin-related protein. *J Biol Chem*. 2005 Jan 28;280(4):3096-103.
- [54] Lancelot Marique and al. The expression of dual oxidase, thyroid peroxidase, and caveolin-1 differs according to the type of immune response (TH1/TH2) involved in thyroid autoimmune disorders. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014 May;99(5):1722-32.
- [55] R Elisei and al. Demonstration of the existence of the alternatively spliced form of thyroid peroxidase in normal thyroid. *J Clin Endocrinol Metab*. 1991 Mar;72(3):700-2.
- [56] Ameziane-El-Hassani R and al. Dual oxidase-2 has an intrinsic Ca²⁺-dependent H₂O₂-generating activity. *J Biol Chem* 280: 30046–30054, 2005.
- [57] Takehiko Ueyama and al. The extracellular A-loop of dual oxidases affects the specificity of reactive oxygen species release. *J Biol Chem*. 2015 Mar 6;290(10):6495-506.
- [58] Shiguo Liu and al. Identification of Two Missense Mutations in DUOX1 (p.R1307Q) and DUOXA1 (p.R56W) That Can Cause Congenital Hypothyroidism Through Impairing H₂O₂ Generation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019; 10: 526.
- [59] Zehra Aycan and al. Digenic DUOX1 and DUOX2 Mutations in Cases With Congenital Hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017 Sep 1;102(9):3085-3090.
- [60] Radia Forteza and al. Regulated hydrogen peroxide production by Duox in human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005 May;32(5):462-9.
- [61] Horst Fischer. Mechanisms and function of DUOX in epithelia of the lung. *Antioxid Redox Signal*. 2009 Oct;11(10):2453-65.
- [62] Caroline Coelho de Faria and Rodrigo Soares Fortunato. The role of dual oxidases in physiology and cancer. *Genet Mol Biol*. 2020; 43(1 Suppl 1): e20190096.
- [63] Donkó A and al. Urothelial cells produce hydrogen peroxide through the activation of Duox1. *Free Radic Biol Med*. 2010 Dec 15;49(12):2040-8.
- [64] Harper RW and al. Differential regulation of dual NADPH oxidases/peroxidases, Duox1 and Duox2, by Th1 and Th2 cytokines in respiratory tract epithelium. *FEBS Lett* 579: 4911–4917, 2005.
- [65] B Caillou and al. Expression of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (ThoX, LNOX, Duox) genes and proteins in human thyroid tissues. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Jul;86(7):3351-8.
- [66] Sabrina Rigutto and al. Activation of dual oxidases Duox1 and Duox2: differential regulation mediated by camp-dependent protein kinase and protein kinase C-dependent phosphorylation. *J Biol Chem*. 2009 Mar 13;284(11):6725-34.
- [67] Rabii Ameziane El Hassani and al. Oxidative stress in thyroid carcinomas: biological and clinical significance. *Endocr Relat Cancer*. 2019 Mar 1;26(3):R131-R143.
- [68] Rabii Ameziane-El-Hassani, Martin Schlumberger, Corinne Dupuy. NADPH oxidases: new actors in thyroid cancer? *Nat Rev Endocrinol*. 2016 Aug;12(8):485-94.

- [69] Rabii Ameziane-El-Hassani and al. NADPH oxidase DUOX1 promotes long-term persistence of oxidative stress after an exposure to irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Apr 21;112(16):5051-6.
- [70] Karen Bedard, Karl-Heinz Krause. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2007 Jan;87(1):245-313.
- [71] Thomas Hill, Robert H Rice. DUOX expression in human keratinocytes and bronchial epithelial cells: Influence of vanadate. *Toxicol In Vitro*. 2018 Feb;46:257-264.
- [72] El Hassani RA and al. Dual oxidase2 is expressed all along the digestive tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288: G933–G942, 2005.
- [73] Can-Liang Lu and al. NADPH oxidase DUOX1 and DUOX2 but not NOX4 are independent predictors in hepatocellular carcinoma after hepatectomy. *Tumour Biol*. 2011 Dec;32(6):1173-82.
- [74] Angela Lee Linderholm and al. All-trans retinoic acid mediates DUOX2 expression and function in respiratory tract epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2010 Aug;299(2):L215-21.
- [75] Houssam Raad and al. Thyroid hydrogen peroxide production is enhanced by the Th2 cytokines, IL-4 and IL-13, through increased expression of the dual oxidase 2 and its maturation factor DUOXA2. *Free Radic Biol Med*. 2013 Mar;56:216-25.
- [76] Juan F Burgueño and al. Epithelial TLR4 Signaling Activates DUOX2 to Induce Microbiota-Driven Tumorigenesis. *Gastroenterology*. 2021 Feb;160(3):797-808.e6.
- [77] Morand S and al. Identification of a truncated dual oxidase 2 (DUOX2) messenger ribonucleic acid (mRNA) in two rat thyroid cell lines. Insulin and forskolin regulation of DUOX2 mRNA levels in FRTL-5 cells and porcine thyrocytes. *Endocrinology* 144: 567–574, 2003.
- [78] Aya Yoshihara and al. Regulation of dual oxidase expression and H₂O₂ production by thyroglobulin. *Thyroid*. 2012 Oct;22(10):1054-62.
- [79] Stanislas Morand and al. Effect of iodide on nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activity and Duox2 protein expression in isolated porcine thyroid follicles. *Endocrinology*. 2003 Apr;144(4):1241-8.
- [80] Valérie Le Fourn and al. Endoproteolytic cleavage of human thyroperoxidase: role of the propeptide in the protein folding process. *J Biol Chem*. 2005 Feb 11;280(6):4568-77.
- [81] Marlena Godlewska and al. A redundant role of human thyroid peroxidase propeptide for cellular, enzymatic, and immunological activity. *Thyroid*. 2014 Feb;24(2):371-82.
- [82]] R.S. Fortunato and al. Functional consequences of dual oxidase-thyroperoxidase interaction at the plasma membrane, *J Clin Endocrinol Metab*, 95 (2010) 5403-5411.
- [83] Yu-De Chu, Chau-Ting Yeh. The Molecular Function and Clinical Role of Thyroid Stimulating Hormone Receptor in Cancer Cells. *Cells*. 2020 Jul 20;9(7):1730.
- [84] Marlena Godlewska, Paul J Banga. Thyroid peroxidase as a dual active site enzyme: Focus on biosynthesis, hormonogenesis and thyroid disorders of autoimmunity and cancer. *Biochimie*. 2019 May;160:34-45.

- [85] Francesca Cianfarani and al. TSH receptor and thyroid-specific gene expression in human skin. *J Invest Dermatol.* 2010 Jan;130(1):93-101.
- [86] Marlena Godlewska and al. Biochemical properties of thyroid peroxidase (TPO) expressed in human breast and mammary-derived cell lines. *PLoS One.* 2018 Mar 7;13(3):e0193624.
- [87] Norihito Moniwa and al. A case of membranous nephropathy secondary to asymptomatic Graves' disease. *CEN Case Rep.* 2022 Aug;11(3):309-313.
- [88] C Spitzweg, W Joba, A E Heufelder. Expression of thyroid-related genes in human thymus. *Thyroid.* 1999 Feb;9(2):133-41.
- [89] Eleonore Fröhlich, Richard Wahl. Thyroid Autoimmunity: Role of Anti-thyroid Antibodies in Thyroid and Extra-Thyroidal Diseases. *Front Immunol.* 2017 May 9;8:521.
- [90] Oi Fah Lai and al. Detection of thyroid peroxidase mRNA and protein in orbital tissue. *Eur J Endocrinol.* 2006 Aug;155(2):213-8.
- [91] H Sumimoto and al. Assembly and activation of the phagocyte NADPH oxidase. Specific interaction of the N-terminal Src homology 3 domain of p47phox with p22phox is required for activation of the NADPH oxidase. *J Biol Chem.* 1996 Sep 6;271(36):22152-8.
- [92] Dirk Roos. Chronic Granulomatous Disease. *Methods Mol Biol.* 2019:1982:531-542.
- [93] L E Ericson. Exocytosis and endocytosis in the thyroid follicle cell. *Mol Cell Endocrinol.* 1981 Apr;22(1):1-24.
- [94] F Fouchier, P Bastiani, J Dang. Intralysosomal hydrolysis of thyroglobulin: specific and cAMP-mediated activation by TSH. *Mol Cell Endocrinol.* 1987 Jan;49(1):25-31.
- [95] M Marinò, R T McCluskey. Role of thyroglobulin endocytic pathways in the control of thyroid hormone release. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000 Nov;279(5):C1295-306.
- [96] C Tepel, D Brömme, V Herzog, K Brix. Cathepsin K in thyroid epithelial cells: sequence, localization and possible function in extracellular proteolysis of thyroglobulin. *J Cell Sci.* 2000 Dec;113 Pt 24:4487-98.
- [97] I.D. Phillips, E.G. Black, M.C. Sheppard, et al., Thyrotrophin, forskolin and ionomycin increase cathepsin B mRNA concentrations in rat thyroid cells in culture, *J. Mol. Endocrinol.* 2 (1989) 207e212.
- [98] T. Metaye and al. Expression, localization, and thyrotropin regulation of cathepsin D in human thyroid tissues, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82 (1997) 3383e3388.
- [99] A.D. Dunn, H.E. Crutchfield, J.T. Dunn, Thyroglobulin processing by thyroidal proteases. Major sites of cleavage by cathepsins B, D, and L, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 20198e20204.
- [100] Oda K and al. Follicular thyroglobulin induces cathepsin H expression and activity in thyrocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017 Jan 29;483(1):541-546.
- [101] C Tepel, D Brömme, V Herzog, K Brix. Cathepsin K in thyroid epithelial cells: sequence, localization and possible function in extracellular proteolysis of thyroglobulin. *J Cell Sci.* 2000 Dec;113 Pt 24:4487-98.
- [102] Dejan Suban and al. Cathepsin C and plasma glutamate carboxypeptidase secreted from Fischer rat thyroid cells liberate thyroxine from the N-terminus of thyroglobulin. *Biochimie.* 2012 Mar;94(3):719-26.

- [103] Silvia Jordans and al. Monitoring compartment-specific substrate cleavage by cathepsins B, K, L, and S at physiological pH and redox conditions. *BMC Biochem.* 2009 Sep 22;10:23.
- [104] Železnik TZ and al. Aspartic cathepsin D degrades the cytosolic cysteine cathepsin inhibitor stefin B in the cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Sep 18;465(2):213-7.
- [105] Alaa Al-Hashimi and al. Procathepsin V Is Secreted in a TSH Regulated Manner from Human Thyroid Epithelial Cells and Is Accessible to an Activity-Based Probe. *Int J Mol Sci.* 2020 Nov 30;21(23):9140.
- [106] P Santisteban, L Lamas. The effect of varying iodine content on the proteolytic activity of rat thyroid lysosomes. *Acta Endocrinol (Copenh).* 1981 Dec;98(4):556-63.
- [107] Starling, J. R., & Hopps, B. A. (1980). Effect of excess iodine on thyroid and liver lysosomal enzymes. *Journal of Surgical Research*, 28(1), 57–64.
- [108] Sédami Ghidehou and al. Iodotyrosine dehalogenase 1 (DEHAL1) is a transmembrane protein involved in the recycling of iodide close to the thyroglobulin iodination site. *FASEB J.* 2004 Oct;18(13):1574-6.
- [109] Kostopoulou E, Miliordos K, Spiliotis B. Genetics of primary congenital hypothyroidism- a review. *Hormones (Athens).* 2021 Jun;20(2):225-236.
- [110] Yoshihara A and al. Inhibitory effects of methimazole and propylthiouracil on iodotyrosine deiodinase 1 in thyrocytes. *Endocr J.* 2019 Apr 25;66(4):349-357.
- [111] Ghidehou S and al. Cloning and characterization of a novel isoform of iodotyrosine dehalogenase 1 (DEHAL1) DEHAL1C from human thyroid: comparisons with DEHAL1 and DEHAL1B. *Thyroid.* 2006 Aug;16(8):715-24.
- [112] Stefan Groeneweg and al. Insights Into the Mechanism of MCT8 Oligomerization. *J Endocr Soc.* 2020 Jun 18;4(8):bvaa080.
- [113] Zwanziger D and al. The long N-terminus of the human monocarboxylate transporter 8 is a target of ubiquitin-dependent proteasomal degradation which regulates protein expression and oligomerization capacity. *Mol Cell Endocrinol.* 2016 Oct 15;434:278-87.
- [114] Julia Badziong and al. Differential regulation of monocarboxylate transporter 8 expression in thyroid cancer and hyperthyroidism. *Eur J Endocrinol.* 2017 Sep;177(3):243-250.
- [115] E C L de Souza and al. MCT8 is Downregulated by Short Time Iodine Overload in the Thyroid Gland of Rats. *Horm Metab Res.* 2015 Nov;47(12):910-5.
- [116] Zhimei Hu and al. Iodine deficiency up-regulates monocarboxylate transporter 8 expression of mouse thyroid gland. *Chin Med J (Engl).* 2014;127(23):4071-6.
- [117] Romy Kursawe, Ralf Paschke. Modulation of TSHR signaling by posttranslational modifications. *Trends Endocrinol Metab.* 2007 Jul;18(5):199-207.
- [118] Metaye, T. et al. (2002) Expression and activity of G protein-coupled receptor kinases in differentiated thyroid carcinoma. *J. Clin.Endocrinol. Metab.* 87, 3279–3286.
- [119] Surya P Singh and al. Upon thyrotropin binding the thyrotropin receptor is internalized and localized to endosome. *Endocrinology.* 2004 Feb;145(2):1003-10.
- [120] G R Williams. Extrathyroidal expression of TSH receptor. *Ann Endocrinol (Paris).* 2011 Apr;72(2):68-73.

- [121] Inês Henriques Vieira, Dírcea Rodrigues, Isabel Paiva. The Mysterious Universe of the TSH Receptor. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022 Jul 12;13:944715.
- [122] M Ben Abdelkhalek and al. TSH control of PKA catalytic subunit activity in thyroid cell cultures. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Dec 9;266(1):15-8.
- [123] E Laurent and al. Dual activation by thyrotropin of the phospholipase C and cyclic AMP cascades in human thyroid. *Mol Cell Endocrinol*. 1987 Aug;52(3):273-8.
- [124] Kristofer J. Haushalter and al. Phosphorylation of protein kinase A (PKA) regulatory subunit RI α by protein kinase G (PKG) primes PKA for catalytic activity in cells. *J Biol Chem*. 2018 Mar 23; 293(12): 4411–4421.
- [125] P I Woloshin and al. 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-regulated enhancer binding (CREB) activity is required for normal growth and differentiated phenotype in the FRTL5 thyroid follicular cell line. *Mol Endocrinol*. 1992 Oct;6(10):1725-33.
- [126] L Q Nguyen and al. A dominant negative CREB (cAMP response element-binding protein) isoform inhibits thyrocyte growth, thyroid-specific gene expression, differentiation, and function. *Mol Endocrinol*. 2000 Sep;14(9):1448-61.
- [127] M Ohno and al. The paired-domain transcription factor Pax8 binds to the upstream enhancer of the rat sodium/iodide symporter gene and participates in both thyroid-specific and cyclic-AMP-dependent transcription. *Mol Cell Biol*. 1999 Mar;19(3):2051-60.
- [128] G Damante, R Di Lauro. Thyroid-specific gene expression. *Biochim Biophys Acta*. 1994 Aug 2;1218(3):255-66.
- [129] Jukka Kero and al. Thyrocyte-specific Gq/G11 deficiency impairs thyroid function and prevents goiter development. *J Clin Invest*. 2007 Sep 4; 117(9): 2399–2407.
- [130] B Saunier and al. Stimulation of mitogen-activated protein kinase by thyrotropin in primary cultured human thyroid follicles. *J Biol Chem*. 1995 Feb 24;270(8):3693-7.
- [131] Custodia García-Jiménez, Pilar Santisteban. TSH signalling and cancer. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2007 Jul;51(5):654-71.
- [132] M Pomerance and al. Thyroid-stimulating hormone and cyclic AMP activate p38 mitogen-activated protein kinase cascade. Involvement of protein kinase A, rac1, and reactive oxygen species. *J Biol Chem*. 2000 Dec 22;275(51):40539-46.
- [133] M J Miller and al. Differential effects of protein kinase A on Ras effector pathways. *Mol Cell Biol*. 1998 Jul;18(7):3718-26.
- [134] Yukiko Yano and al. Growth suppression of thyroid cancer cells by adenylyclase activator. *Oncol Rep*. 2007 Aug;18(2):441-5.
- [135] L A Cass, J L Meinkoth. Differential effects of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate on p70 ribosomal S6 kinase. *Endocrinology*. 1998 Apr;139(4):1991-8.
- [136] T Hatada and al. Protein kinase C activity in human thyroid carcinoma and adenoma. *Cancer*. 1992 Dec 15;70(12):2918-22.
- [137] Klaartje van Engelen and al. The Ambiguous Role of NKX2-5 Mutations in Thyroid Dysgenesis. *PLoS One*. 2012; 7(12): e52685.

- [138] Ricardo Cortez Cardoso Penha and al. NKX2.5 is expressed in papillary thyroid carcinomas and regulates differentiation in thyroid cells. *BMC Cancer*. 2018; 18: 498.
- [139] Dentice M and al. Missense mutation in the transcription factor NKX2-5: a novel molecular event in the pathogenesis of thyroid dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Apr;91(4):1428-33.
- [140] Fernández, L. P and al. (2014). Thyroid transcription factors in development, differentiation and disease. *Nature Reviews Endocrinology*, 11(1), 29–42.
- [141] Nina Dathan and al. Distribution of the *titf2/foxe1* gene product is consistent with an important role in the development of foregut endoderm, palate, and hair. *Dev Dyn*. 2002 Aug;224(4):450-6.
- [142] Perrone, L and al. (2000). The Thyroid Transcription Factor 2 (TTF-2) Is a Promoter-Specific DNA-Binding Independent Transcriptional Repressor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 275(1), 203–208.
- [143] Lara P Fernández and al. New insights into FoxE1 functions: identification of direct FoxE1 targets in thyroid cells. *PLoS One*. 2013 May 13;8(5):e62849.
- [144] Jesús Morillo-Bernal and al. FOXE1 regulates migration and invasion in thyroid cancer cells and targets ZEB1. *Endocr Relat Cancer*. 2020 Mar;27(3):137-151.
- [145] Lian Guan and al. Thyroid Transcription Factor-1: Structure, Expression, Function and Its Relationship with Disease. *Biomed Res Int*. 2021 Sep 28:2021:9957209.
- [146] de Cristofaro T, Mascia A, Pappalardo A, D'Andrea B, Nitsch L, Zannini M. Pax8 protein stability is controlled by sumoylation. *J Mol Endocrinol*. 2009 Jan;42(1):35-46.
- [147] Héctor M Targovnik, Karen G Scheps, Carina M Rivolta. Defects in protein folding in congenital hypothyroidism. *Mol Cell Endocrinol*. 2020 Feb 5:501:110638.
- [148] Cari M. Kitahara and Arthur B. Schneider and al. Cancer Progress and Priorities : Epidemiology of Thyroid Cancer *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2022 Jul 1; 31(7): 1284–1297.
- [149] Ron E, Lubin JH, Shore RE and al. Thyroid cancer after exposure to external radiation : a pooled analysis of seven studies. *Radiat Res* 1995;141:259-77.
- [150] Nadia Haddy and al. Thyroid adenomas and carcinomas following radiotherapy for a hemangioma during infancy. *Radiother Oncol*. 2009 Nov;93(2):377-82.
- [151] Eva Lorenz and al. Radiotherapy for childhood cancer and subsequent thyroid cancer risk: a systematic review. *Eur J Epidemiol*. 2018 Dec;33(12):1139-1162.
- [152] Maria Laura Iglesias and al. Radiation exposure and thyroid cancer: a review. *Arch Endocrinol Metab*. 2017 Mar-Apr;61(2):180-187.
- [153] Kesminienne A, Cardis E and al. Épidémiologie de l'après-Tchernobyl. *Bull Cancer* 2007;94(5):423-30.
- [154] Schlumberger M and al. Thyroid cancer following exposure to ionising radiation. *Cancer Radiother* 2011;15(5):394-9.
- [155] Barbara Jarzab and al. Differentiated thyroid cancer in children and adults: same or distinct disease? *Hormones (Athens)*. 2007 Jul-Sep;6(3):200-9.

- [156] Faggiano A and al, 2004 Age-dependent variation of follicular size and expression of iodine transporters in human thyroid tissue. *J Nucl Med* 45: 232-237.
- [157] Kesminienne A, Cardis E and al. Épidémiologie de l'après-Tchernobyl. *Bull Cancer* 2007;94(5):423-30.
- [158] Kirsten B Moysich and al. Chernobyl-related ionising radiation exposure and cancer risk: an epidemiological review. *Lancet Oncol.*2002May;3(5):269-79.
- [159] Luigino Dal Maso and al. Risk factors for thyroid cancer : an epidemiological review focused on nutritional factors. *Cancer Causes Control* (2009) 20:75–86.
- [160] Tatjana Bogović Crnčić and al. Risk Factors for Thyroid Cancer: What Do We Know So Far? *Acta Clin Croat.* 2020 Jun;59(Suppl 1):66-72.
- [161] Gabriella Pellegriti and al. Worldwide increasing incidence of thyroid cancer: update on epidemiology and risk factors. *J Cancer Epidemiol.* 2013;2013:965212.
- [162] Luigino Dal Maso and al (2009). Risk factors for thyroid cancer: an epidemiological review focused on nutritional factors. , 20(1), 75–86.
- [163] H R Harach and al. Thyroid carcinoma and thyroiditis in an endemic goitre region before and after iodine prophylaxis. *Acta Endocrinol (Copenh).* 1985 Jan;108(1):55-60.
- [164] F Pacini, M G Castagna, C Cipri, M Schlumberger and al. Medullary thyroid carcinoma. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 2010 Aug;22(6):475-85.
- [165] Ammar, Sabine A.; Alobuia, Wilson M.; Kebebew, Electron (2020). An update on familial nonmedullary thyroid cancer. *Endocrine*.
- [166] Sitong Zhao and al. Association of obesity with the clinicopathological features of thyroid cancer in a large, operative population. *Medicine (Baltimore).* 2019 Dec; 98(50): e18213.
- [167] Min Jung Bae and al. High prevalence of papillary thyroid cancer in Korean women with insulin resistance. *Head & Neck,* 38(1), 66–71.
- [168] Zeng Q and al 2007 Oestrogen mediates the growth of human thyroid carcinoma cells via an oestrogen receptor-ERK pathway. *Cell Proliferation* 40 921–935.
- [169] Derwahl, M; Nicula, D. (2014). Estrogen and its role in thyroid cancer. *Endocrine Related Cancer,* 21(5), T273–T283.
- [170] Chen, George and al. (2008). Regulation of Cell Growth by Estrogen Signaling and Potential Targets in Thyroid Cancer. *Current Cancer Drug Targets,* 8(5), 367–377.
- [171] Erina Kansakar and al. Expression of estrogen receptor, progesterone receptor, and vascular endothelial growth factor-A in thyroid cancer. *Am Surg.* 2009 Sep;75(9):785-9; discussion 789.
- [172] D Manole and al. Estrogen promotes growth of human thyroid tumor cells by different molecular mechanisms. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Mar;86(3):1072-7.
- [173] Ameet Kamat and al. Estrogen-mediated angiogenesis in thyroid tumor microenvironment is mediated through VEGF signaling pathways. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2011 Nov;137(11):1146-53.
- [174] Fortunato, R. S and al (2014). Sexual dimorphism and thyroid dysfunction: a matter of oxidative stress? *Journal of Endocrinology,* 221(2), R31–R40.

- [175] Leux C, Guénel P. Facteurs de risque des cancers et nodules thyroïdiens : effets des polluants chimiques. *RESP* 2010 ;58 :359—67.
- [176] Schlumberger M. Cancer papillaire et folliculaire de la thyroïde. *Ann Endocrinol* 2007;68:120-8.
- [177] Pacini F and al. European Thyroid Cancer Taskforce. European consensus for the management of patients with differentiated thyroid carcinoma of the follicular epithelium. *Eur J Endocrinol* 2006;154(6):87-803.
- [178] Tazebay UH and al 2000 The mammary gland iodide transporter is expressed during lactation and in breast cancer. *Nat Med* 6:871–878.
- [179] Corinne Renier and al. Breast cancer brain metastases express the sodium iodide symporter. *J Neurooncol.* 2010 Feb;96(3):331-6.
- [180] Kogai T and al 2000 Retinoic acid induces sodium/iodide symporter gene expression and radioiodide uptake in the MCF-7 breast cancer cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:8519–8524.
- [181] Spitzweg C and al 1999 Prostate-specific antigen (PSA) promoter-driven androgen-inducible expression of sodium iodide symporter in prostate cancer cell lines. *Cancer Res* 59:2136–2141.
- [182] Spitzweg C and al 2001 In vivo sodium iodide symporter gene therapy of prostate cancer. *Gene Ther* 8:1524–1531.
- [183] Spitzweg C and al 2000 Treatment of prostate cancer by radioiodine therapy after tissue-specific expression of the sodium iodide symporter. *Cancer Res* 15:6526–6530.
- [184] Christine Spitzweg, John C Morris. The sodium iodide symporter: its pathophysiological and therapeutic implications. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2002 Nov;57(5):559-74.
- [185] Irene L Wapnir and al. The Na⁺/I⁻ symporter mediates iodide uptake in breast cancer metastases and can be selectively down-regulated in the thyroid. *Clin Cancer Res.* 2004 Jul 1;10(13):4294-302.
- [186] Min Fu and al. Mechanisms of Sodium/Iodide Symporter-Mediated Mammary Gland Iodine Compensation during Lactation. *Nutrients.* 2022 Aug 31;14(17):3592.
- [187] Sun, X. S and al (2013). Place de la radiothérapie externe dans les cancers de la thyroïde. *Cancer/Radiothérapie*, 17(3), 233–243.
- [188] Qu'est-ce qu'une thérapie ciblée ? Collection Guides patients Cancer info, INCa, Janvier 2015.
- [189] Diprajan Laha and al. New Therapies for Advanced Thyroid Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020; 11: 82.
- [190] Alain PUISIEUX. Rôle de la transition épithélio-mésenchymateuse au cours de la progression tumorale. *Bull. Acad. Natle Méd.*, 2009, 193, no 9, 2017-2034, séance du 1er décembre 2009.
- [191] N A Gloushankova, I Y Zhitnyak, S N Rubtsova. Role of Epithelial-Mesenchymal Transition in Tumor Progression. *Biochemistry (Mosc)*. 2018 Dec;83(12):1469-1476.

- [192] Fanyan Meng and al. The rejuvenated scenario of epithelial-mesenchymal transition (EMT) and cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2012 Dec;31(3-4):455-67.
- [193] Carlos F. Ibáñez. Structure and Physiology of the RET Receptor Tyrosine Kinase. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013 Feb; 5(2): a009134.
- [194] Masahide Takahashi. RET receptor signaling: Function in development, metabolic disease, and cancer. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2022;98(3):112-125.
- [195] Ewa Chmielik and al. Heterogeneity of Thyroid Cancer. *Pathobiology.* 2018;85(1-2):117-129.
- [196] Accardo G and al. Genetics of medullary thyroid cancer: An overview. *Int J Surg.* 2017 May;41 Suppl 1:S2-S6.
- [197] Qu N and al. Genomic and Transcriptomic Characterization of Sporadic Medullary Thyroid Carcinoma. *Thyroid.* 2020 Jul;30(7):1025-1036.
- [198] Dralle H and al. Follicular cell-derived thyroid cancer. *Nat Rev Dis Primers.* 2015 Dec 10;1:15077.
- [199] Julie Bolin. Thyroid Follicular Epithelial Cell-Derived Cancer: New Approaches and Treatment Strategies. *J Nucl Med Technol.* 2021 Sep;49(3):199-208.
- [200] Seung-Hyun Jung and al. Mutational burdens and evolutionary ages of thyroid follicular adenoma are comparable to those of follicular carcinoma. *Oncotarget.* 2016 Oct 25;7(43):69638-69648.
- [201] Seong-Keun Yoo and al. Comprehensive Analysis of the Transcriptional and Mutational Landscape of Follicular and Papillary Thyroid Cancers. *PLoS Genet.* 2016 Aug 5;12(8):e1006239.
- [202] Bogna Grygiel-Górniak. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications – a review. *Nutr J.* 2014; 13: 17.
- [203] Norman L. Eberhardt and al. The Role of the PAX8/PPAR γ Fusion Oncogene in the Pathogenesis of Follicular Thyroid Cancer. *Mol Cell Endocrinol.* 2010 May 28; 321(1): 50–56.
- [204] Ali S Alzahrani and al. Clinical case seminar: metastatic follicular thyroid carcinoma arising from congenital goiter as a result of a novel splice donor site mutation in the thyroglobulin gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Mar;91(3):740-6.
- [205] Sann Y Mon and al. Cancer risk and clinicopathological characteristics of thyroid nodules harboring thyroid-stimulating hormone receptor gene mutations. *Diagn Cytopathol.* 2018 May;46(5):369-377.
- [206] Yun Yu and al. Deleterious Mutations in the TPO Gene Associated with Familial Thyroid Follicular Cell Carcinoma in Dutch German Longhaired Pointers. *Genes (Basel).* 2021 Jun 29;12(7):997.
- [207] Cipollini M and al. TPO genetic variants and risk of differentiated thyroid carcinoma in two European populations. *Int J Cancer.* 2013 Dec 15;133(12):2843-51.
- [208] Chertok Shacham E and al. Minimally invasive follicular thyroid carcinoma developed in dyshormonogenetic multinodular goiter due to thyroid peroxidase gene mutation. *Thyroid.* 2012 May;22(5):542-6.

- [209] Kinga Hińcza, Artur Kowalik, Aldona Kowalska. Current Knowledge of Germline Genetic Risk Factors for the Development of Non-Medullary Thyroid Cancer. *Genes (Basel)*. 2019 Jun 26;10(7):482.
- [210] R Camargo and al. Aggressive metastatic follicular thyroid carcinoma with anaplastic transformation arising from a long-standing goiter in a patient with Pendred's syndrome. *Thyroid*. 2001 Oct;11(10):981-8.
- [211] Christy M Caudill and al. Dose-dependent generation of RET/PTC in human thyroid cells after in vitro exposure to gamma-radiation: a model of carcinogenic chromosomal rearrangement induced by ionizing radiation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Apr;90(4):2364-9.
- [212] Ciampi, R., & Nikiforov, Y. E. (2007). RET/PTC Rearrangements and BRAF Mutations in Thyroid Tumorigenesis. *Endocrinology*, 148(3), 936–941.
- [213] Nikiforov, Y. E., & Nikiforova, M. N. (2011). Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. *Nature Reviews Endocrinology*, 7(10), 569–580.
- [214] Pekova B and al. NTRK Fusion Genes in Thyroid Carcinomas: Clinicopathological Characteristics and Their Impacts on Prognosis. *Cancers (Basel)*. 2021 Apr; 13(8): 1932.
- [215] Nicla Borrelli and al. Characterization of Activating Mutations of the MEK1 Gene in Papillary Thyroid Carcinomas. *Thyroid*. 2019 Sep;29(9):1279-1285.
- [216] Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated Genomic Characterization of Papillary Thyroid Carcinoma. *Cell*. 2014 Oct 23; 159(3): 676–690.
- [217] Yi Fang and al. The Profile of Genetic Mutations in Papillary Thyroid Cancer Detected by Whole Exome Sequencing. *Cell Physiol Biochem*. 2018;50(1):169-178.
- [218] Michael Mond and al. Somatic Mutations of FOXE1 in Papillary Thyroid Cancer. *Thyroid*. 2015 Aug;25(8):904-10.
- [219] Morrison D.K., Cutler R.E. The complexity of Raf-1 regulation. *Curr. Opin. Cell Biol*. 1997;9:174–179.
- [220] Mingzhen Zhang and al. The mechanism of Raf activation through dimerization. *Chem Sci*. 2021 Dec 8; 12(47): 15609–15619.
- [221] Daniel A Ritt and al. Impact of feedback phosphorylation and Raf heterodimerization on normal and mutant B-Raf signaling. *Mol Cell Biol*. 2010 Feb;30(3):806-19.
- [222] David E Durrant and Deborah K Morrison. Targeting the Raf kinases in human cancer: the Raf dimer dilemma. *Br J Cancer*. 2018 Jan; 118(1): 3–8.
- [223] Anna Kucharska and al. Regulation of the inducible nuclear dual-specificity phosphatase DUSP5 by ERK MAPK. *Cell Signal*. 2009 Dec;21(12):1794-805.
- [224] Muhammad Khairi Ahmad and al. Dual-specificity phosphatase 6 (DUSP6): a review of its molecular characteristics and clinical relevance in cancer. *Cancer Biol Med*. 2018 Feb; 15(1): 14–28.
- [225] Marchetti S and al. Extracellular signal-regulated kinases phosphorylate mitogen-activated protein kinase phosphatase 3/DUSP6 at serines 159 and 197, two sites critical for its proteasomal degradation. *Mol Cell Biol*. 2005;25(2):854–64.

- [226] Buffet C and al. DUSP5 and DUSP6, two ERK specific phosphatases, are markers of a higher MAPK signaling activation in BRAF mutated thyroid cancers. *PLoS One*. 2017 Sep 14;12(9):e0184861.
- [227] Ryan C Maloney and al. The mechanism of activation of monomeric B-Raf V600E. *Comput Struct Biotechnol J*. 2021 Jun 4;19:3349-3363.
- [228] Matthew Holderfield and al. Targeting RAF kinases for cancer therapy: BRAF mutated melanoma and beyond. *Nat Rev Cancer*. 2014 Jul; 14(7): 455–467.
- [229] Jimin Yuan and al. The dimer-dependent catalytic activity of RAF family kinases is revealed through characterizing their oncogenic mutants. *Oncogene*. 2018 Oct;37(43):5719-5734.
- [230] Carla Espadinha and al. Expression of iodine metabolism genes in human thyroid tissues: evidence for age and BRAFV600E mutation dependency. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009 Apr;70(4):629-35.
- [231] Garcilaso Riesco-Eizaguirre and al. The BRAFV600E oncogene induces transforming growth factor beta secretion leading to sodium iodide symporter repression and increased malignancy in thyroid cancer. *Cancer Res*. 2009 Nov 1;69(21):8317-25.
- [232] Azouzi N and al. NADPH Oxidase NOX4 Is a Critical Mediator of BRAFV600E-Induced Downregulation of the Sodium/Iodide Symporter in Papillary Thyroid Carcinomas. *Antioxid Redox Signal*. 2017 May 20;26(15):864-877.
- [233] Luckett KA and al. Co-inhibition of SMAD and MAPK signaling enhances 124I uptake in BRAF-mutant thyroid cancers. *Endocr Relat Cancer*. 2021 May 18;28(6):391-402.
- [234] Jeffrey A Knauf and al. Progression of BRAF-induced thyroid cancer is associated with epithelial-mesenchymal transition requiring concomitant MAP kinase and TGF β signaling. *Oncogene*. 2011 Jul 14; 30(28): 3153–3162.
- [235] Xueke Shi and al. TGF- β signaling in the tumor metabolic microenvironment and targeted therapies. *J Hematol Oncol*. 2022 Sep 17;15(1):135.
- [236] Charles B Trelford, Lina Dagnino, Gianni M Di Guglielmo. Transforming growth factor- β in tumour development. *Front Mol Biosci*. 2022 Oct 4;9:991612.
- [237] Keiji Miyazawa and Kohei Miyazono. Regulation of TGF- β Family Signaling by Inhibitory Smads. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017 Mar; 9(3): a022095.
- [238] Inga Kolleyer and al. Subcellular distribution of the sodium iodide symporter in benign and malignant thyroid tissues. *Thyroid*. 2012 May;22(5):529-35.
- [239] David G. McFadden and Peter M. Sadow. Genetics, Diagnosis, and Management of Hürthle Cell Thyroid Neoplasms. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021; 12: 696386.
- [240] Wemeau JL., Do Cao C. Cancers anaplasiques de la thyroïde. *Encyclopédie Orphanet*. Avril 2008.
- [241] Iñigo Landa, Maria E Cabanillas. Genomic alterations in thyroid cancer: biological and clinical insights. *Nat Rev Endocrinol*. 2023 Dec 4.
- [242] Mohamed Rizwan Haroon Al Rasheed, Bin Xu. Molecular Alterations in Thyroid Carcinoma. *Surg Pathol Clin*. 2019 Dec;12(4):921-930.

- [243] Ho AL and al. Selumetinib-enhanced radioiodine uptake in advanced thyroid cancer. *N Engl J Med.* 2013 Feb 14;368(7):623-32.
- [244] Dingxie Liu and al. Suppression of BRAF/MEK/MAP kinase pathway restores expression of iodide-metabolizing genes in thyroid cells expressing the V600E BRAF mutant. *Clin Cancer Res.* 2007 Feb 15;13(4):1341-9.
- [245] Vivek Subbiah and al. Dabrafenib and Trametinib Treatment in Patients With Locally Advanced or Metastatic BRAF V600-Mutant Anaplastic Thyroid Cancer. *J Clin Oncol.* 2018 Jan 1;36(1):7-13.
- [246] V Subbiah and al. Dabrafenib plus trametinib in patients with BRAF V600E-mutant anaplastic thyroid cancer: updated analysis from the phase II ROAR basket study. *Ann Oncol.* 2022 Apr;33(4):406-415.
- [247] Leboulleux S and al. A Phase II Redifferentiation Trial with Dabrafenib-Trametinib and 131I in Metastatic Radioactive Iodine Refractory BRAF p.V600E-Mutated Differentiated Thyroid Cancer. *Clin Cancer Res.* 2023 Jul 5;29(13):2401-2409.
- [248] Camille Buffet and al. Redifferentiation of radioiodine-refractory thyroid cancers. *Endocr Relat Cancer.* 2020 May;27(5):R113-R132.
- [249] Livia Lamartina and al. Redifferentiation-facilitated radioiodine therapy in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2021 Sep 3;28(10):T179-T191.
- [250] Marie-Claude Hofmann and al. Molecular mechanisms of resistance to kinase inhibitors and redifferentiation in thyroid cancers. *Endocr Relat Cancer.* 2022 Sep 14;29(11):R173-R190.
- [251] Lasolle H and al. Dual targeting of MAPK and PI3K pathways unlocks redifferentiation of Braf-mutated thyroid cancer organoids. *Oncogene.* 2023 Nov 20.
- [252] Cinzia Puppini and al. Transcriptional regulation of human sodium/iodide symporter gene: a role for redox factor-1. *Endocrinology.* 2004 Mar;145(3):1290-3.
- [253] Suzana G Leoni and al. Selenium Increases Thyroid-Stimulating Hormone-Induced Sodium/Iodide Symporter Expression Through Thioredoxin/Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1-Dependent Regulation of Paired Box 8 Binding Activity. *Antioxid Redox Signal.* 2016 May 20;24(15):855-66.
- [254] Leoni S.G., Kimura E.T., Santisteban P., De la Vieja A. Regulation of thyroid oxidative state by thioredoxin reductase has a crucial role in thyroid responses to iodide excess. *Mol. Endocrinol.* 2011;25:1924–1935.
- [255] H Sauer and al. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem.* 2001;11(4):173-86.
- [256] Gerd P Bienert and al. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *J Biol Chem.* 2007 Jan 12;282(2):1183-92.
- [257] Joël Pincemail and al. Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme* 16 (2002) 233–239.
- [258] Moloney, J. N., & Cotter, T. G. (2018). ROS signalling in the biology of cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 80, 50–64.
- [259] J. Maier and al. DNA damage and spontaneous mutagenesis in the thyroid gland of rats and mice, *Endocrinology* 147 (2006) 3391–3397.

- [260] Marina Muzza and al. Oxidative Stress Correlates with More Aggressive Features in Thyroid Cancer. *Cancers (Basel)*. 2022 Nov 28;14(23):5857.
- [261] Alessio Metere and al. A possible role for selenoprotein glutathione peroxidase (GPx1) and thioredoxin reductases (TrxR1) in thyroid cancer: our experience in thyroid surgery. *Cancer Cell Int*. 2018 Jan 15:18:7.
- [262] Nishida S and al. Manganese superoxide dismutase content and localization in human thyroid tumours *J Pathol*. 1993;169:341–5.
- [263] D Russo and al. Proteomic analysis of human thyroid cell lines reveals reduced nuclear localization of Mn-SOD in poorly differentiated thyroid cancer cells. *J Endocrinol Invest*. 2005 Feb;28(2):137-44.
- [264] Anilkumar N and al. A 28-kDa splice variant of NADPH oxidase-4 is nuclear-localized and involved in redox signaling in vascular cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013 Apr;33(4):e104-12.
- [265] Parag Goyal and al. Identification of novel Nox4 splice variants with impact on ROS levels in A549 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Apr 1;329(1):32-9.
- [266] Varga ZV and al. Alternative Splicing of NOX4 in the Failing Human Heart. *Front Physiol*. 2017 Nov 22:8:935.
- [267] Ina Takac and al. The E-loop is involved in hydrogen peroxide formation by the NADPH oxidase Nox4. *J Biol Chem*. 2011 Apr 15;286(15):13304-13.
- [268] Kendra D Martyn and al. Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. *Cell Signal*. 2006 Jan;18(1):69-82.
- [269] Kim-Kristin Prior and al. CRISPR/Cas9-mediated knockout of p22phox leads to loss of Nox1 and Nox4, but not Nox5 activity. *Redox Biol*. 2016 Oct;9:287-295.
- [270] Matsushima S and al. Tyrosine kinase FYN negatively regulates NOX4 in cardiac remodeling. *J Clin Invest*. 2016 Sep 1;126(9):3403-16.
- [271] Yu B and al. CYLD Deubiquitinates Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase 4 Contributing to Adventitial Remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017 Sep;37(9):1698-1709.
- [272] Palumbo S and al. Dysregulated Nox4 ubiquitination contributes to redox imbalance and age-related severity of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2017 Mar 1;312(3):L297-L308.
- [273] Prior KK and al. The Endoplasmic Reticulum Chaperone Calnexin Is a NADPH Oxidase NOX4 Interacting Protein. *J Biol Chem*. 2016 Mar 25;291(13):7045-59.
- [274] Lyle AN and al. Poldip2, a novel regulator of Nox4 and cytoskeletal integrity in vascular smooth muscle cell. *Circ Res*. 2009 Jul 31;105(3):249-59.
- [275] Mariano Janiszewski and al. Regulation of NAD(P)H oxidase by associated protein disulfide isomerase in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 2005 Dec 9;280(49):40813-9.
- [276] Desai LP and al. Negative regulation of NADPH oxidase 4 by hydrogen peroxide-inducible clone 5 (Hic-5) protein. *J Biol Chem*. 2014; 26:18270-8.

- [277] Hye Sun Park and al. Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF-kappa B. *J Immunol.* 2004 Sep 15;173(6):3589-93.
- [278] Nguyen MV and al. Quinone compounds regulate the level of ROS production by the NADPH oxidase Nox4. *Biochem Pharmacol.* 2013;85:1644-54.
- [279] Lula L Hilenski and al. Distinct subcellular localizations of Nox1 and Nox4 in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 Apr;24(4):677-83.
- [280] Clempus RE and al. Nox4 is required for maintenance of the differentiated vascular smooth muscle cell phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Jan;27(1):42-8.
- [281] Kai Chen and al. Regulation of ROS signal transduction by NADPH oxidase 4 localization. *J Cell Biol.* 2008 Jun 30;181(7):1129-39.
- [282] Karthigayan Shanmugasundaram and al. NOX4 functions as a mitochondrial energetic sensor coupling cancer metabolic reprogramming to drug resistance. *Nat Commun.* 2017 Oct 19;8(1):997.
- [283] Junya Kuroda and al. The superoxide-producing NAD(P)H oxidase Nox4 in the nucleus of human vascular endothelial cells. *Genes Cells.* 2005 Dec;10(12):1139-51.
- [284] Pendyala S, Natarajan V. Redox regulation of Nox proteins. *Respir Physiol Neurobiol.* 2010 Dec 31;174(3):265-71.
- [285] Weyemi U and al. Intracellular expression of reactive oxygen species-generating NADPH oxidase NOX4 in normal and cancer thyroid tissues. *Endocr. Relat. Cancer.* 2010;17:27–37.
- [286] Ping Tang and al. NADPH oxidase NOX4 is a glycolytic regulator through mROS-HIF1 α axis in thyroid carcinomas. *Sci Rep.* 2018; 8: 15897.
- [287] Tang P and al. Targeting NOX4 disrupts the resistance of papillary thyroid carcinoma to chemotherapeutic drugs and lenvatinib. *Cell Death Discov.* 2022;8:177.
- [288] Oglio R and al. Participation of NADPH 4 oxidase in thyroid regulation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2019;480:65–73.
- [289] B A Diebold, G M Bokoch. Molecular basis for Rac2 regulation of phagocyte NADPH oxidase. *Nat Immunol.* 2001 Mar;2(3):211-5.
- [290] D S Regier and al. A phosphatidic acid-activated protein kinase and conventional protein kinase C isoforms phosphorylate p22(phox), an NADPH oxidase component. *J Biol Chem.* 1999 Dec 17;274(51):36601-8.
- [291] J E Benna and al. Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p67(phox) during human neutrophil activation. Regulation by protein kinase C-dependent and independent pathways. *J Biol Chem.* 1997 Jul 4;272(27):17204-8.
- [292] R C Garcia and A W Segal. Phosphorylation of the subunits of cytochrome b-245 upon triggering of the respiratory burst of human neutrophils and macrophages. *Biochem J.* 1988 Jun 15; 252(3): 901–904.
- [293] Raad H and al. Regulation of the phagocyte NADPH oxidase activity: phosphorylation of gp91phox/NOX2 by protein kinase C enhances its diaphorase activity and binding to Rac2, p67phox, and p47phox. *FASEB J.* 2009; 23: 1011-1022.

- [294] Beaumel S and al. Down-regulation of NOX2 activity in phagocytes mediated by ATM-kinase dependent phosphorylation. *Free Radic Biol Med.* 2017; 113: 1-15.
- [295] Lewis EM and al. Phosphorylation of p22phox on threonine 147 enhances NADPH oxidase activity by promoting p47phox binding. *J Biol Chem.* 2010; 285: 2959-2967.
- [296] Dang PM and al. The NADPH oxidase cytosolic component p67phox is constitutively phosphorylated in human neutrophils: Regulation by a protein tyrosine kinase, MEK1/2 and phosphatases 1/2A. *Biochem Pharmacol.* 2011; 82: 1145-1152.
- [297] Bouin AP and al. p40(phox) is phosphorylated on threonine 154 and serine 315 during activation of the phagocyte NADPH oxidase. Implication of a protein kinase C-type kinase in the phosphorylation process. *J Biol Chem.* 1998; 273: 30097-30103.
- [298] Sahra A. Belambri and al. NADPH oxidase activation in neutrophils: Role of the phosphorylation of its subunits. *Eur J Clin Invest.* 2018 Nov;48 Suppl 2:e12951.
- [299] Botond Bánfi and al. Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1. *J Biol Chem.* 2003 Feb 7;278(6):3510-3.
- [300] Takeya R and al. Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *J Biol Chem.* 2015 Mar 6;290(10):6003.
- [301] Rashmi K Ambasta and al. Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase. *J Biol Chem.* 2004 Oct 29;279(44):45935-41.
- [302] Guangjie Cheng and al. Nox1-dependent reactive oxygen generation is regulated by Rac1. *J Biol Chem.* 2006 Jun 30;281(26):17718-26.
- [303] Kei Miyano and al. Direct involvement of the small GTPase Rac in activation of the superoxide-producing NADPH oxidase Nox1. *J Biol Chem.* 2006 Aug 4;281(31):21857-21868.
- [304] Streeter J and al. Phosphorylation of Nox1 regulates association with NoxA1 activation domain. *Circ Res.* 2014 Nov 7;115(11):911-8.
- [305] Yolande Kroviarski and al. Phosphorylation of NADPH oxidase activator 1 (NOXA1) on serine 282 by MAP kinases and on serine 172 by protein kinase C and protein kinase A prevents NOX1 hyperactivation. *FASEB J.* 2010 Jun;24(6):2077-92.
- [306] Asataro Yamamoto and al. Phosphorylation of Nox1 at threonine 341 regulates its interaction with NoxA1 and the superoxide-producing activity of Nox1. *FEBS J.* 2013 Oct;280(20):5145-59.
- [307] Jun-Sub Kim and al. Regulation of Nox1 activity via protein kinase A-mediated phosphorylation of NoxA1 and 14-3-3 binding. *J Biol Chem.* 2007 Nov 30;282(48):34787-800.
- [308] Kei Miyano, Hideki Sumimoto. N-Linked glycosylation of the superoxide-producing NADPH oxidase Nox1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 Jan 17;443(3):1060-5.
- [309] Jiaoli Hu and al. SUMO1/UBC9-decreased Nox1 activity inhibits reactive oxygen species generation and apoptosis in diabetic retinopathy. *Mol Med Rep.* 2018 Jan; 17(1): 1690–1698.
- [310] Pandey D and al. SUMO1 negatively regulates reactive oxygen species production from NADPH oxidases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011 Jul;31(7):1634-42.

- [311] Davide Gianni and al. Direct interaction between Tks proteins and the N-terminal proline-rich region (PRR) of NoxA1 mediates Nox1-dependent ROS generation. *Eur J Cell Biol.* 2011 Feb-Mar;90(2-3):164-71.
- [312] Gimenez M and al. Redox Activation of Nox1 (NADPH Oxidase 1) Involves an Intermolecular Disulfide Bond Between Protein Disulfide Isomerase and p47phox in Vascular Smooth Muscle Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019 Feb;39(2):224-236.
- [313] Francisco R M Laurindo and al. Nox NADPH oxidases and the endoplasmic reticulum. *Antioxid Redox Signal.* 2014 Jun 10;20(17):2755-75.
- [314] Francis J Miller Jr and al. A differential role for endocytosis in receptor-mediated activation of Nox1. *Antioxid Redox Signal.* 2010 Mar 1;12(5):583-93.
- [315] Banfi B and al. NOX3: a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear. *J Biol Chem* 279: 46065–46072, 2004.
- [316] G Cheng, Z Cao and al. Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene.* 2001 May 16;269(1-2):131-40.
- [317] Yoko Nakano and al. Critical roles for p22phox in the structural maturation and subcellular targeting of Nox3. *Biochem J.* 2007 Apr 1;403(1):97-108.
- [318] Noriko Ueno and al. The NADPH oxidase Nox3 constitutively produces superoxide in a p22phox-dependent manner: its regulation by oxidase organizers and activators. *J Biol Chem.* 2005 Jun 17;280(24):23328-39.
- [319] Takehiko Ueyama and al. Involvement of Rac1 in activation of multicomponent Nox1- and Nox3-based NADPH oxidases. *Mol Cell Biol.* 2006 Mar;26(6):2160-74.
- [320] Guangjie Cheng and al. Nox3 regulation by NOXO1, p47phox, and p67phox. *J Biol Chem.* 2004 Aug 13;279(33):34250-5.
- [321] Botond Bánfi and al. Mechanism of Ca²⁺ activation of the NADPH oxidase 5 (NOX5). *J Biol Chem.* 2004 Apr 30;279(18):18583-91.
- [322] Fabiana Tirone, Jos A Cox. NADPH oxidase 5 (NOX5) interacts with and is regulated by calmodulin. *FEBS Lett.* 2007 Mar 20;581(6):1202-8.
- [323] Fabiana Tirone and al. Identification of the binding site for the regulatory calcium-binding domain in the catalytic domain of NOX5. *Biochemistry.* 2010 Feb 2;49(4):761-71.
- [324] Feng Chen and al. Regulation of NADPH Oxidase 5 by Protein Kinase C Isoforms. *PLoS One.* 2014; 9(2): e88405.
- [325] David J R Fulton. The Molecular Regulation and Functional Roles of NOX5. *Methods Mol Biol.* 2019;1982:353-375.
- [326] Pandey D and al (2012) Expression and functional significance of NADPH oxidase 5 (Nox5) and its splice variants in human blood vessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302(10):H1919–H1928.
- [327] Takuya Kiyohara and al. Differential cell surface recruitment of the superoxide-producing NADPH oxidases Nox1, Nox2 and Nox5: The role of the small GTPase Sar1. *Genes Cells.* 2018 Jun;23(6):480-493.

- [328] Annelise Vermot and al. NADPH Oxidases (NOX): An Overview from Discovery, Molecular Mechanisms to Physiology and Pathology. *Antioxidants* (Basel). 2021 Jun; 10(6): 890.
- [329] Jin Qian and al. Nitric Oxide reduces NADPH oxidase 5 (Nox5) activity by reversible S-nitrosylation. *Free Radic Biol Med*. 2012 May 1; 52(9): 1806–1819.
- [330] Rhian M. Touyz and al. NOX5: Molecular biology and pathophysiology. *Exp Physiol*. 2019 May 1; 104(5): 605–616.
- [331] Irina Yu Petrushanko and al. Oxidation of Ca²⁺-Binding Domain of NADPH Oxidase 5 (NOX5): Toward Understanding the Mechanism of Inactivation of NOX5 by ROS. *PLoS One*. 2016 Jul 8;11(7):e0158726.
- [332] Tsukasa Kawahara and al. Nox5 forms a functional oligomer mediated by self-association of its dehydrogenase domain. *Biochemistry*. 2011 Mar 29;50(12):2013-25.
- [333] Feng Chen and al. Caveolin-1 is a Negative Regulator of NADPH Oxidase-Derived Reactive Oxygen Species. *Free Radic Biol Med*. 2014 Aug; 73: 201–213.
- [334] Lena Serrander and al. NOX5 is expressed at the plasma membrane and generates superoxide in response to protein kinase C activation. *Biochimie*. 2007 Sep;89(9):1159-67.
- [335] Rachida S BelAiba and al. NOX5 variants are functionally active in endothelial cells. *Free Radic Biol Med*. 2007 Feb 15;42(4):446-59.
- [336] Xiaoying Fu and al. cAMP-response element-binding protein mediates acid-induced NADPH oxidase NOX5-S expression in Barrett esophageal adenocarcinoma cells. *J Biol Chem*. 2006 Jul 21;281(29):20368-82.
- [337] B Bánfi and al. A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J Biol Chem*. 2001 Oct 5;276(40):37594-601.
- [338] Jorge G García and al. Structure, regulation, and physiological functions of NADPH oxidase 5 (NOX5). *J Physiol Biochem*. 2023 May;79(2):383-395.
- [339] Marzaioli V and al. NOX5 and p22phox are 2 novel regulators of human monocytic differentiation into dendritic cells. *Blood*. 2017 Oct 12;130(15):1734-1745.
- [340] Ralf P Brandes and al. Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. *Free Radic Biol Med*. 2014 Nov;76:208-26.
- [341] Anna R Poetsch. The genomics of oxidative DNA damage, repair, and resulting mutagenesis. *Comput Struct Biotechnol J*. 2020 Jan 7;18:207-219.
- [342] Anne Bravard and al. Redox regulation of human OGG1 activity in response to cellular oxidative stress. *Mol Cell Biol*. 2006 Oct;26(20):7430-6.
- [343] Santos LS and al. Polymorphisms in base excision repair genes and thyroid cancer risk. *Oncol Rep*. 2012 Nov;28(5):1859-68.
- [344] Karger S and al. Distinct pattern of oxidative DNA damage and DNA repair in follicular thyroid tumours. *J Mol Endocrinol*. 2012 Mar 29;48(3):193-202.
- [345] Zing Hong Eng and al. Changes in antioxidant status and DNA repair capacity are corroborated with molecular alterations in malignant thyroid tissue of patients with papillary thyroid cancer. *Front Mol Biosci*. 2023 Aug 24;10:1237548.

- [346] Ameziane-El-Hassani R and al. 2010 Role of H₂O₂ in RET/PTC1 chromosomal rearrangement produced by ionizing radiation in human thyroid cells. *Cancer Research* 70 4123–4132.
- [347] Hu S and al 2014 Disparity expression of gammaH2AX in papillary thyroid cancer and nodular goiter. *Clinical Laboratory* 60 2031–2037.
- [348] Gemma Bridge and al. DNA Mismatch Repair and Oxidative DNA Damage: Implications for Cancer Biology and Treatment. *Cancers (Basel)*. 2014 Sep; 6(3): 1597–1614.
- [349] Christmann, M., Tomicic, M. T., Roos, W. P., & Kaina, B. (2003). Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology*, 193(1-2), 3–34.
- [350] Alicia P Hayes and al. Reciprocal regulation of nuclear import of the yeast MutSalpha DNA mismatch repair proteins Msh2 and Msh6. *DNA Repair (Amst)*. 2009 Jun 4;8(6):739-51.
- [351] Markus Christmann and al. Phosphorylation of mismatch repair proteins MSH2 and MSH6 affecting MutSalpha mismatch-binding activity. *Nucleic Acids Res*. 2002 May 1;30(9):1959-66.
- [352] Mazurek A., Berardini M., Fishel R. Activation of human MutS homologs by 8-oxoguanine DNA damage. *J. Biol. Chem*. 2002;277:8260–8266.
- [353] Gu Y and al. Human MutY homolog, a DNA glycosylase involved in base excision repair, physically and functionally interacts with mismatch repair proteins human MutS homolog 2/human MutS homolog 6. *J. Biol. Chem*. 2002;277:11135–11142.
- [354] Luís S Santos and al. Mismatch repair single nucleotide polymorphisms and thyroid cancer susceptibility. *Oncol Lett*. 2018 May;15(5):6715-6726.
- [355] Lutz BS and al. Imbalance in DNA repair machinery is associated with BRAFV600E mutation and tumor aggressiveness in papillary thyroid carcinoma. *Mol Cell Endocrinol*. 2018 Sep 5;472:140-148.
- [356] J. Allgayer and al. Widespread transcriptional gene inactivation initiated by a repair intermediate of 8-oxoguanine. *Nucleic Acids Res*, 44 (2016), pp. 7267-7280.
- [357] Aaron M Fleming and al. 8-Oxo-7,8-dihydroguanine in the Context of a Gene Promoter G-Quadruplex Is an On-Off Switch for Transcription. *ACS Chem Biol*. 2017 Sep 15;12(9):2417-2426.
- [358] Bogdan I Fedeles. G-quadruplex-forming promoter sequences enable transcriptional activation in response to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Mar 14;114(11):2788-2790.
- [359] Aaron M Fleming and al. Oxidative DNA damage is epigenetic by regulating gene transcription via base excision repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Mar 7;114(10):2604-2609.
- [360] Ruoxi Wang and al. The roles of base excision repair enzyme OGG1 in gene expression. *Cell Mol Life Sci*. 2018; 75(20): 3741–3750.
- [361] Ning Ding and al. Mismatch repair proteins recruit DNA methyltransferase 1 to sites of oxidative DNA damage. *J Mol Cell Biol*. 2016 Jun;8(3):244-54.

- [362] Bhupendra Singh and al. Antioxidant-mediated up-regulation of OGG1 via NRF2 induction is associated with inhibition of oxidative DNA damage in estrogen-induced breast cancer. *BMC Cancer*. 2013 May 22;13:253.
- [363] Biswas, S., & Rao, C. M. (2018). Epigenetic tools (The Writers, The Readers and The Erasers) and their implications in cancer therapy. *European Journal of Pharmacology*.
- [364] Zongjing Zhang and al. Histone deacetylation of NIS promoter underlies BRAF V600E-promoted NIS silencing in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2014 Jan 30;21(2):161-73.
- [365] Nan X and al. Transcriptional repression by the methyl- CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 1998; 393: 386–9.
- [366] Jones PL and al, Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 1998; 19: 187–91.
- [367] François Fuks. DNA methyltransferases: from chromatin remodeling to cancer. *Med Sci (Paris)*. 2003 Apr;19(4):477-80.
- [368] Cartron, P.-F., Pacaud, R., & Salbert, G. (2015). Méthylation/déméthylation de l'ADN et expression du génome. *Revue Francophone Des Laboratoires*, 2015(473), 37–48.
- [369] Lisa D Moore and al. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*. 2013 Jan;38(1):23-38.
- [370] Yong Won Choi and al. B-RafV600E inhibits sodium iodide symporter expression via regulation of DNA methyltransferase 1. *Exp Mol Med*. 2014 Nov 7;46(11):e120.
- [371] Kinyas Kartal and al. Methylation status of TSHr in well-differentiated thyroid cancer by using cytologic material. *BMC Cancer*. 2015 Oct 30;15:824.
- [372] Khan MS and al. Epigenetic silencing of TSHR gene in thyroid cancer patients in relation to their BRAF V600E mutation status. *Endocrine*. 2014 Nov;47(2):449-55.
- [373] Mingzhao Xing and al. Hypermethylation of the Pendred syndrome gene SLC26A4 is an early event in thyroid tumorigenesis. *Cancer Res*. 2003 May 1;63(9):2312-5.
- [374] Sheikholeslami S and al. The Epigenetic Modification of SLC5A8 in Papillary Thyroid Carcinoma and its Effects on Clinic-Pathological Features. *Iran J Public Health*. 2022 Mar;51(3):634-642.
- [375] Ky Sha and Laurie A Boyer. The chromatin signature of pluripotent cells. In: *StemBook* [Internet]. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute; 2008. 2009 May 31.
- [376] Olivia Morrison, Jitendra Thakur. Molecular Complexes at Euchromatin, Heterochromatin and Centromeric Chromatin. *Int J Mol Sci*. 2021 Jun 28;22(13):6922.
- [377] Heather M O'Hagan , Wei Wang, Subhojit Sen, Christina Destefano Shields, Stella S Lee, Yang W Zhang, Eriko G Clements, Yi Cai, Leander Van Neste, Hariharan Easwaran, Robert A Casero, Cynthia L Sears, Stephen B Baylin. Oxidative damage targets complexes containing DNA methyltransferases, SIRT1, and polycomb members to promoter CpG Islands. *Cancer Cell* 2011 20(5):606-19.
- [378] Dickinson BC, Tang Y, Chang Z, Chang CJ. A nuclear-localized fluorescent hydrogen peroxide probe for monitoring sirtuin-mediated oxidative stress responses in vivo. *Chem Biol*. 2011 18(8):943-8.

- [379] Amente S, Di Palo G, Scala G, Castrignanò T, Gorini F, Coccozza S, Moresano A, Pucci P, Ma B, Stepanov I, Lania L, Pelicci PG, Dellino GI, Majello B. Genome-wide mapping of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine reveals accumulation of oxidatively-generated damage at DNA replication origins within transcribed long genes of mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 2019 47(1):221-236.
- [380] Chen, Shifu, et al. "fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor." *Bioinformatics* 34.17 (2018): i884-i890.
- [381] Tarasov, Artem, et al. "Sambamba: fast processing of NGS alignment formats." *Bioinformatics* 31.12 (2015): 2032-2034.
- [382] Hahm, Ja Young, et al. "8-Oxoguanine: From oxidative damage to epigenetic and epitranscriptional modification." *Experimental & Molecular Medicine* 54.10 (2022): 1626-1642.
- [383] Danecek, Petr, et al. "Twelve years of SAMtools and BCFtools." *Gigascience* 10.2 (2021): giab008.
- [384] McKenna, Aaron, et al. "The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data." *Genome research* 20.9 (2010): 1297-1303.
- [385] Gaspar, John M. "Improved peak-calling with MACS2." *BioRxiv* (2018): 496521.
- [386] Robinson, Mark D., Davis J. McCarthy, and Gordon K. Smyth. "edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data." *bioinformatics* 26.1 (2010): 139-140.
- [387] Lun, Aaron TL, and Gordon K. Smyth. "csaw: a Bioconductor package for differential binding analysis of ChIP-seq data using sliding windows." *Nucleic acids research* 44.5 (2016): e45.
- [388] Lienhard, Matthias, et al. "MEDIPS: genome-wide differential coverage analysis of sequencing data derived from DNA enrichment experiments." *Bioinformatics* 30.2 (2014): 284-286.
- [389] Andrews, S. Fastqc. "A quality control tool for high throughput sequence data. Augen, J.(2004). *Bioinformatics in the post-genomic era: Genome, transcriptome, proteome, and information-based medicine.*" (2010).
- [390] Wingett, Steven W., and Simon Andrews. "FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control." *F1000Research* 7 (2018).
- [391] Ramírez, Fidel, et al. "deepTools: a flexible platform for exploring deep-sequencing data." *Nucleic acids research* 42.W1 (2014): W187-W191.
- [392] Buenrostro, Jason D., et al. "Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position." *Nature methods* 10.12 (2013): 1213-1218.
- [393] Ou, Jianhong, et al. "ATACseqQC: a Bioconductor package for post-alignment quality assessment of ATAC-seq data." *BMC genomics* 19 (2018): 1-13.
- [394] Heinz S, Benner C, Spann N, Bertolino E et al. Simple Combinations of Lineage-Determining Transcription Factors Prime cis-Regulatory Elements Required for Macrophage and B Cell Identities. *Mol Cell* 2010 May 28;38(4):576-589. PMID: 20513432

- [395] Yu, Guangchuang, Li-Gen Wang, and Qing-Yu He. "ChIPseeker: an R/Bioconductor package for ChIP peak annotation, comparison and visualization." *Bioinformatics* 31.14 (2015): 2382-2383.
- [396] Zlatanou A, Despras E, Braz-Petta T, et al (2011). The hMsh2-hMsh6 complex acts in concert with monoubiquitinated PCNA and Pol η in response to oxidative DNA damage in human cells. *Mol Cell*. 43:649-62.
- [397] DeWeese T.L., Shipman J.M., Larrier N.A. et al. (1998). Mouse embryonic stem cells carrying one or two defective Msh2 alleles respond abnormally to oxidative stress inflicted by low-level radiation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95, 11915–11920.
- [398] Rhee I, Bachman KE, Park BH, et al. DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature* 2002; 416 : 552–6.
- [399] Xi Xia Man, Qi Li, Baogang Wang, He Zhang, Songling Zhang and Ziyi Li. DNMT3A and DNMT3B in Breast Tumorigenesis and Potential Therapy. *Front Cell Dev Biol*. 2022; 10: 916725.
- [400] Kuroda J, Nakagawa K, Yamasaki T, et al. The superoxide-producing NAD(P)H oxidase Nox4 in the nucleus of human vascular endothelial cells. *Genes to Cells*. 2005;10(12):1139–1151.
- [401] Urbain Weyemi, Corinne Dupuy. The emerging role of ROS-generating NADPH oxidase NOX4 in DNA-damage responses. *Mutat Res*. 2012 Oct-Dec;751(2):77-81.
- [402] Sahana Holla, Jothy Dhakshnamoorthy, H. Diego Folco, Vanivilasini Balachandran, Hua Xiao, Ling-ling Sun, David Wheeler, Martin Zofall and Shiv I. S. Grewal. Positioning heterochromatin at the nuclear periphery suppresses histone turnover to promote epigenetic inheritance. *Cell*. 2020 Jan 9; 180(1): 150–164.e15.
- [403] Minako Yoshihara, Li Jiang, Shinya Akatsuka, Mikita Suyama and Shinya Toyokuni. Genome-wide Profiling of 8-Oxoguanine Reveals Its Association with Spatial Positioning in Nucleus. *DNA Res*. 2014 Dec; 21(6): 603–612.
- [404] Shinya Akatsuka and al. Contrasting genome-wide distribution of 8-hydroxyguanine and acrolein-modified adenine during oxidative stress-induced renal carcinogenesis. *Am J Pathol*. 2006 Oct;169(4):1328-42.
- [405] Yun Ding, Aaron M. Fleming, and Cynthia J. Burrows. Sequencing the mouse genome for the oxidatively modified base 8-oxo-7,8-dihydroguanine by OG-Seq. *J Am Chem Soc*. 2017 Feb 22; 139(7): 2569–2572.
- [406] Evren B, Yilmaz S, Karadag N et al (2021) DNA repair proteins may differentiate papillary thyroid cancer from chronic lymphocytic thyroiditis and nodular colloid goiter *Sci Rep* 11:9932.
- [407] Maria C Olave, Rondell P Graham. Mismatch repair deficiency: The what, how and why it is important. *Genes Chromosomes Cancer*. 2022 Jun;61(6):314-321.
- [408] Wei Zhang, Hui Tu Liu. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res*. 2002 Mar;12(1):9-18.
- [409] Haixia Guan and al. Hypermethylation of the DNA mismatch repair gene hMLH1 and its association with lymph node metastasis and T1799A BRAF mutation in patients with papillary thyroid cancer. *Cancer*. 2008 Jul 15;113(2):247-55.

- [410] Zlatanou A, Despras E, Braz-Petta T, et al (2011). The hMsh2-hMsh6 complex acts in concert with monoubiquitinated PCNA and Pol η in response to oxidative DNA damage in human cells. *Mol Cell*. 43:649-62.
- [411] Amouroux R, Campalans A, Epe B, Radicella JP. Oxidative stress triggers the preferential assembly of base excision repair complexes on open chromatin regions. *Nucleic Acids Res*. 2010 38(9):2878-90.
- [412] Bishoy M F Hanna, Maurice Michel, Thomas Helleday, Oliver Mortusewicz. NEIL1 and NEIL2 Are Recruited as Potential Backup for OGG1 upon OGG1 Depletion or Inhibition by TH5487. *Int J Mol Sci*. 2021 Apr 27;22(9):4542.
- [413] Wei Qing and al. Density of Tumor-Associated Macrophages Correlates with Lymph Node Metastasis in Papillary Thyroid Carcinoma. *Thyroid*. 2012 Sep; 22(9): 905–910.
- [414] Zafon C, Gil J, Pérez-González B, Jordà M. DNA methylation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2019 26(7):R415-R439.
- [415] Umehara, Y. , Hanaoka, K. and Watanabe, D. (2013) Distinct functions of Dnmt3a and Dnmt3b de novo DNA methyltransferases in ES cell proliferation and differentiation. *Stem Cell Discovery*, 3, 127-132.
- [416] Knauf JA, Sartor MA, Medvedovic M, Lundsmith E, Ryder M, Salzano M, Nikiforov YE, Giordano TJ, Ghossein RA, and Fagin JA. Progression of BRAF-induced thyroid cancer is associated with epithelial-mesenchymal transition re- quiring concomitant MAP kinase and TGFbeta signaling. *Oncogene* 30: 3153–3162, 2011.
- [417] F Kambe, Y Nomura, T Okamoto, H Seo Redox regulation of thyroid-transcription factors, Pax-8 and TTF-1, is involved in their increased DNA-binding activities by thyrotropin in rat thyroid FRTL-5 cells *Mol Endocrinol* 1996 Jul;10(7):801-12.
- [418] Poyil Pratheeshkumar and al. CHD4 Predicts Aggressiveness in PTC Patients and Promotes Cancer Stemness and EMT in PTC Cells. *Int J Mol Sci*. 2021 Jan 6;22(2):504.
- [419] Maria Linda Rocha, Kurt Werner Schmid, Piotr Czapiewski. The prevalence of DNA microsatellite instability in anaplastic thyroid carcinoma - systematic review and discussion of current therapeutic options. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2021;25(3):213-223.
- [420] Qiao PP, Tian KS, Han LT, Ma B, Shen CK, Zhao RY, Zhang Y, Wei WJ, Chen XP. Correlation of mismatch repair deficiency with clinicopathological features and programmed death-ligand 1 expression in thyroid carcinoma. *Endocrine*. 2022 Jun;76(3):660-670.
- [421] Frisone Daniele and al. A BRAF new world. *Crit Rev Oncol Hematol*.2020 Aug;152:103008.

Annexe



Article 2



The NADPH oxidase NOX4 is involved in the oxidative DNA damage-induced increase in affinity of CHD4 for chromatin in BRAF-mutated thyroid cancer cells.

Salma Fenniche^{1,2,3,4}, Marylin Harinquet^{1,2,3}, Mickaëlle Radom^{1,2,3}, Caroline Coelho de Faria^{1,2,3}, Mira Saleh^{1,2,3}, Abir Al Ghuzlan^{1,2,3,5}, Mohamed-Amine Bani⁵, Livia Lamartina⁶, Rabii Ameziane El Hassani⁴ and Corinne Dupuy^{1,2,3*}

Authors' Affiliations

¹ Université Paris-Saclay, F-91400 Orsay, France;

² UMR 9019 CNRS F-94805 Villejuif, France;

³ Gustave Roussy, F-94805 Villejuif, France;

⁴ Laboratoire de Biologie des Pathologies Humaines "BioPatH", Université Mohammed V de Rabat, Faculté des Sciences, BP1014 Rabat, 10001, Morocco;

⁵ Cancer Medical Pathology and Biology Department, Gustave Roussy, F-94805 Villejuif, France;

⁶ Cancer Medicine Department, Gustave Roussy, F-94805 Villejuif, France;

*correspondence: corinne.dupuy@gustaveroussy.fr

KEYWORDS: CHD4, NOX4, DNA damage, NIS, thyroid cancer

Abstract

Context: CHD4 ATPase is a component of the NURD remodeling complex that is involved in gene repression. Its dysregulation has been shown in various cancer types and recently, it was shown to be overexpressed in papillary differentiated cancers (PTC) and to be associated with aggressive clinico-pathological parameters and worse outcome. BRAF^{V600E} mutation is expressed in 45% to 60% of PTC and is associated with tumors aggressiveness and with loss or low expression level of *SLC5A5* gene encoding NIS, which mediates the uptake of iodine. This transporter is a key component in metabolic radiotherapy using iodine-131 for treating thyroid cancer.

Aims: CHD4 was found to recruit repressive chromatin proteins to oxidative DNA damage and help to maintain transcriptional silencing of genes. We previously showed that BRAF^{V600E} controls NOX4 expression and that NOX4-derived ROS contribute to repression of *SLC5A5* at the transcriptional level. As NOX4 may induce DNA damage we wondered whether there is a link between CHD4 and NOX4 in transcriptional silencing of *SLC5A5* in BRAF-mutated thyroid cancer cells.

Results: We reveal that, in addition to NOX4, the TGF- β regulates CHD4 by a Smad3-dependent pathway and that CHD4, recruited by the DNA repairs proteins OGG1 and MSH6 to chromatin as a result of DNA damage produced by NOX4-derived ROS, cooperates with DNA methyl transferases in the repression of *SLC5A5* gene.

Introduction

CHD4 (Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4) is a component of the NuRD (Nucleosome Remodeling and Deacetylation) complex, which acts as a chromatin remodeler. CHD4 plays a key role by conferring ATPase activity on the complex [1]. Its dysregulation has been shown in various cancer types including breast [2], lung [3], colorectal cancer [4]. The NuRD complex is often described as a transcription repressor and CHD4 is essential for transcriptional repression [5].

Most of differentiated thyroid cancers (DTC) are papillary differentiated cancers (PTC) (80% of patients) which are characterized in particular by the presence of the BRAF^{V600E} mutation in 45% to 60% of cases. This mutation is associated with tumors aggressiveness and with a low expression level of the genes involved in iodide metabolism, such as SLC5A5 encoding the iodide transporter NIS, and a low tumor differentiation score [6]. Radioiodine therapy is used to treat thyroid cancer and is based on the ability of thyroid cells to uptake and concentrate iodide. Dedifferentiation is related to a decrease or even a loss of the expression thyroid specific genes including SLC5A5. The absence or loss of radioactive iodine (RAI) uptake in thyroid cancer cells is a major challenge for the treatment of patients with DTC. The prognostic significance of CHD4 in a large cohort of Middle Eastern PTC patients has been investigated [7]. CHD4 overexpression was observed in more than 40% of PTCs and was associated with aggressive clinico-pathological parameters and worse outcome. CHD4 have been implicated in several biological functions in cancer cells, such as cell differentiation, cell cycle regulation and DNA damage repair [8]. It was shown to regulate cell growth, cancer stemness and epithelial-mesenchymal transition (EMT) in PTC cell lines [7]. In the context of oxidative DNA damage, it was found to have a key role for participating in maintaining epigenetic gene silencing by recruiting DNA methyl transferases (DNMTs) to chromatin, thus contributing to tumorigenesis, in particular, by maintaining hypermethylation-associated transcriptional silencing of tumor suppressor genes [4]. Several studies have now clearly show that ROS play an integral role in carcinogenesis and the development of various hallmarks of cancer by inducing DNA damage and deregulated signaling. In cells, NADPH oxidases (NOXs/DUOXs), which are membrane-bound complexes, are totally devoted to the production of ROS [9]. The thyroid expresses three of them: DUOX2 whose role is to provide H₂O₂ necessary for TPO as well as DUOX1 and NOX4 whose roles in this tissue are still unknown [9]. We previously showed that BRAF^{V600E} controls NOX4 expression and that NOX4-derived ROS contribute to repression of SLC5A5 at the transcriptional level [10]. The reversibility of the repression suggested that NOX4 is involved in an epigenetic mechanism. As CHD4 induces recruitment of DNMTs to chromatin during oxidative damage and NOX4 may induce DNA damage we wondered whether there is a link between CHD4 and NOX4 in transcriptional silencing of SLC5A5 in BRAF-mutated thyroid cancer cells. In this study we show that TGF-beta, produced by the BRAF-mutated thyroid cancer cells, regulates CHD4 at the protein level by a Smad3-dependent pathway and that CHD4, recruited by the DNA repair proteins OGG1 and MSH6 to chromatin as a result of DNA damage produced by NOX4-derived ROS, cooperates with DNMTs in the repression of *SLC5A5* gene.

Material and Methods

Cell Culture and reagents:

BCPAP and 8505C cells lines harboring the BRAF^{V600E} mutation were cultured respectively in Dulbecco's Modified Eagle Medium 1X (DMEM) and RPMI 1640 mediums (Gibco) supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS) and 1% of antibiotics: penicillin/streptomycin (100 mg/ml; Gibco). Patient-derived xenograft (PDX) cell line harboring the BRAF^{V600E} mutation was cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM F-12) (Gibco) supplemented with 10% of FBS and 1% of antibiotics: penicillin/streptomycin (100 mg/ml; Gibco). Primary human thyroid cells were collected at the Gustave Roussy Institute according to ethical standards after having obtained the consent of all patients. They were cultured as previously described [11]. Briefly, the thyroid tissue was collected in DMEM F-12 medium containing 1% Penicillin/Streptomycin (100 mg/ml; gibco), then washed twice with PBS buffer (Phosphate Buffered Saline) with Calcium (Ca²⁺) and Magnesium (Mg²⁺). The thyroid tissue was then minced in PBS buffer into small fragments using a scalpel. The tissue fragments were digested with digestion buffer containing collagenase I (100.5 U/ml) (Invitrogen), Dispase II (2.35 U/ml) (Roche Applied Science) and glucose (prepared at 10 mg/ml in PBS) at 37 °C for 30 min with stirring. The digested tissue was filtered through a 70 µm filter and collected in a Falcon containing 10 ml of DMEM F-12 and 5 ml of FBS. The cells were then centrifuged at 300 g for 5 min. Finally, the cells were resuspended and cultured in DMEM-F12 medium supplemented with 5% FBS, 1% of antibiotics Penicillin/Streptomycin (100 mg/ml; Gibco) and three hormones: 1 mU/l bovine TSH (Sigma-Aldrich); 6 µg/ml human transferrin (Roche Applied Science) and IGF1 10 nM, at 37°C in 5% of CO₂.

Inhibitor of TGF-β1 receptor (SB431542 -Calbiochem; Vactosertib EW-7197), inhibitor of Smad3 phosphorylation (SIS3 –Sigma-Aldrich), and H₂O₂ (Sigma-Aldrich) were added in the culture medium as indicated in the legend of figures.

Transfection of small interfering RNAs:

Cells were transfected four hours after seeding with siRNA control (Thermofisher) and specific human siRNA against CHD4 (silencer select siRNA, Thermofisher), NOX4 (silencer select siRNA, Thermofisher), p22^{phox} (on target-plus siRNA pool, Horizon Perkin Elmer company), OGG1 (silencer select siRNA, Thermoscientific Thermofisher), MSH2 (Stealth Select RNAiTM, Thermoscientific) and MSH6 (Eurogentec, Target sequences is 5'-CCCUGGCAAACAGAUUAAA-3'), using INTERFERIN transfection reagent according to the manufacturer's protocol (Ozyme-Polyplus).

Real Time qRT-PCR:

Total RNA from cell samples were purified with the Nucleospin RNA II kit (Machery Nagel). RNA yield was determined on a spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA). 1 µg of DNase-treated RNA was reverse-transcribed using Maxima reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific) and oligodT in a total reaction volume of 20 µl of PCR buffer according to the manufacturer's protocol for 60 min at 55°C. Quantitative PCR (qPCR) was performed on an ABI 7500 system (Applied Biosystems) using Taqman gene expression assays (Thermo Fisher Scientific).

Chromatin fractionation:

The tight chromatin fractionation protocol was adapted with slight modifications from Xia et al [4]. Briefly, cell pellets were suspended in buffer A (10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.34 M sucrose, 10 % glycerol, 1mM DTT, 1 x protease and phosphatase inhibitor cocktail. Triton X-100 was then added to the cell suspension to reach a final concentration of 0.1%. and incubated for 5 min on ice before to be centrifuged for 4 min at 1300 x g, 4°C. The supernatant that is enriched in cytoplasm soluble proteins was discarded and the nuclei pellet was washed with buffer A, then resuspended in buffer B (3 mM EDTA, 0.2 mM EGTA, DTT 1 mM, 1 x protease and phosphatase inhibitor cocktail) and incubated 10 min on ice. The nuclei suspension was centrifuged for 4 min at 1700 x g, 4°C. The supernatant was discarded and the pellet, corresponding to the chromatin fraction, was washed in buffer B and centrifuged for 1 min at 10,000 g, 4°C. The chromatin fraction was next washed with buffer C (50 mM Tris/HCl pH 8, NaCl 0.45 M, IGEPAL 0.05 %, 1 x protease and phosphatase inhibitor cocktail to solubilize proteins weekly bound to chromatin and centrifuged for 1 min at 10,000 g, 4°C. The remaining pellet was lysed in TEX buffer (100 mM Tris-HCl pH 7.0 containing 2.5% (wt/vol) SDS, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 4 M urea, and a mixture of phosphatase and protease inhibitors (Calbiochem) using Qiashredder (Qiagen) and referred as tight chromatin. Whole cell extracts were prepared from 1/10 of the pellet collected after treatment before beginning the tight chromatin isolation. Vinculin and LaminB immunoblotting serve as cytoplasmic and nuclear controls, respectively.

Protein extraction and western blotting

Cell extracts were solubilized in lysis buffer (100 mM Tris/HCl pH 7, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 4 M urea, 2.5% SDS) containing 0.1mM PMSF, protease, and phosphatase inhibitors (1X) (Roche Applied Science). The samples were then sonicated for 30s. Protein samples (20 to 40µg) supplemented with dithiothreitol DTT 10X (Sigma-Aldrich) and glycerol/LDS 4X were denatured for 5 min at 95°C, subjected to SDS-PAGE using Gel of 6% and/or 8% Tris-glycine polyacrylamide and electrotransferred to 0.2 µm Protran nitrocellulose sheets (Amersham). Non-specific sites were blocked by incubation in TBST-1X with 5% of milk for 1h. The membrane was then incubated with a primary antibody that specifically binds to the target protein anti-CHD4 (1:1000, ab181370 ABCAM), anti-NOX4 (1:2000, ab109225 ABCAM), anti-p22^{phox} (1:1000, sc-130551 santa Cruz), anti-Lamin B (1:10000, ab 133741 ABCAM) and anti-vinculin (1:10000, ab18058 ABCAM). After removing the unbound primary antibody by washing with TBST-1X, the membranes were incubated with a goat anti-mouse (1:10000, Dako PO 447) or goat anti-rabbit (1:10000, southern biotech 4010-05) secondary antibody conjugated to HRP for 1 hour. Membranes were washed again 3 times with TBS-T and the proteins were visualized by enhanced chemiluminescence.

Results and Discussion

CHD4 is increased in BRAF-mutated papillary thyroid carcinoma

From the Cancer Genome Atlas (TCGA) [12], we compared CHD4 mRNA expression in both BRAF-wild type PTC and BRAF-mutated PTC (Fig. 1A). CHD4 was significantly increased in PTCs harboring BRAF mutation. This result is in agreement with what was previously found with a cohort of Middle Eastern PTC patients [7]. Thyroid samples from TCGA were ranked by BRAFV600E-RAS score (BRS), with BRAFV600E-like and RAS-like samples having negative (-1 to 0) and positive (0 to 1) scores, respectively. High level of CHD4 mRNA expression was mainly associated with BRAF-mutated tumors (Fig. 1B). Accordingly, CHD4 protein was found to be well expressed in two BRAF^{V600E} thyroid cancer cell lines (BCPAP and Patient-Derived cell line (PDX)) in comparison with human primary thyrocytes (Fig. 1C). In addition, an inverse and highly significant correlation was found between CHD4 expression and the Thyroid Differentiation Score (Fig. 1D) suggesting that CHD4 may play a role in the thyroid dedifferentiation process.

CHD4 is regulated by TGF- β

Figure 1E shows that CHD4 protein expression increases with time in culture in two BRAF-mutated thyroid cancer cell lines (BCPAP and 8505C). TGF- β is overexpressed in thyroid malignancies [13, 14], and is a potent pro-oncogenic and pro-metastatic factor. It was first shown to play a major role as a local modulator of thyroid by inhibiting both growth and differentiation in several species [15-17]. It can be a potent repressor of the expression of thyroid specific functional genes, such as SLC5A5 (NIS), thyroglobulin (TG) and Thyroperoxydase (TPO) [18-20]. BRAF^{V600E} expression induces the production of functional TGF- β , which leads to TGF- β -driven autocrine loop that mediates at least in part, the effect of the oncoprotein, in particular the decreased expression of NIS [21], and the promotion of cell migration, invasiveness and EMT [22]. We previously showed that BRAF^{V600E} controls TGF- β secretion, which is involved in NOX4 up-regulation in BCPAP and 8505C cells [10]. Since CHD4 was found to be involved in EMT in PTC cell lines we wondered whether CHD4 may be regulated by the TGF- β pathway. As shown in figure 2A, TGF- β induced expression of the CHD4 protein in a dose-dependent manner in three BRAF-mutated thyroid cancer cell lines. We previously showed that NOX4 is regulated at the transcriptional level by BRAF^{V600E} in a the TGF- β -Smad3-dependent pathway in PTC cell lines [10]. We then evaluated by real-time quantitative polymerase chain reaction (QPCR) and compared the changes in the levels of CHD4 and NOX4 mRNAs in BCPAP cells. While as expected the expression of NOX4 mRNAs increased with the dose of TGF- β , no change in CHD4 mRNAs was observed in this condition (Fig. 2B). Interestingly, this result was reproduced in PDX cells (Fig. 2C). This led us to analyze the dose-response effect of TGF- β on CHD4 mRNA expression in human primary thyrocytes (Fig. 3). As observed with tumoral cells, CHD4 expression was increased by TGF- β only at the protein level and this effect was inhibited by SB 431542 and SIS3, specific inhibitors of TGF- β receptor and of TGF- β 1-dependent Smad3 phosphorylation, respectively (Fig. 3B). The two inhibitors inhibited also the expression of CHD4 protein in BCPAP and in PDX cells (Fig. 4A and 4B). Although they well inhibited NOX4 mRNA expression in BCPAP cells they had no or low induction effect on CHD4 mRNA expression (Fig. 4C-4F). Taken together, these results show that TGF- β regulates mainly CHD4 at the protein level. TGF- β may act at different levels. It can inhibit CHD4 protein degradation through the ubiquitin-proteasome pathway by promoting an interaction of CHD4 with another protein. So, an interaction of CHD4 with the

histone variant H2A.Z that promotes the stability of CHD4 has been previously identified [23]. TGF- β can increase the level of CHD4 protein by increasing translation of the encoding mRNA. For example, It has been shown that TGF- β mediates upregulation of translation by inhibiting an RNA-binding protein [24]. To our knowledge it is the first time that CHD4 was shown to be regulated by TGF- β at the protein level. Further experiments are now needed to determine the exact mechanism involved in this regulation.

Recruitment of CHD4 to chromatin is dependent on NOX4-derived ROS.

Treatment of human colon adenocarcinoma SW480 cells with 2 mM H₂O₂ for 30 min led to recruitment of CHD4 to chromatin [4]. This finding prompts us to assess the recruitment of CHD4 to chromatin after treatment of BCPAP cells for 1 hour with increasing concentrations of H₂O₂. The figure 5A shows that the tightness of binding of CHD4 to chromatin increases in function of H₂O₂ concentration with, however, an inhibition of the recruitment for a concentration greater than 500 μ M. Thus, the affinity of CHD4 for the chromatin is dependent on the concentration of H₂O₂. No change in the total levels of CHD4 was observed in these conditions. We previously showed that NOX4 is well expressed in the nuclear environment of BRAF-mutated tumors [25] as well as of BRAF mutated-thyroid cancer cell lines [10]. We first analyzed the effect of deletion of NOX4 or its functional partner p22^{phox} on the levels of both total and phosphorylated histone H2AX (Ser139), a reliable marker of DNA damage (Fig. 5B). The result shows that NOX4 or p22^{phox} knockdown drastically decreases DNA damage in BCPAP cells indicating that this NADPH oxidase promotes DNA damage. We then evaluated the knockdown of NOX4 and p22^{phox} on the recruitment of CHD4 to chromatin (Fig. 5C). The tightness of binding to chromatin for CHD4 was significantly altered in these conditions without any change in its total cellular level. Thus, we demonstrate for the first time that DNA damage-induced increase in affinity of CHD4 for chromatin is dependent of NOX4.

ROS can promote epigenetic changes. 8 oxoguanine (8-oxo-G) is the most abundant of base damage during oxidative stress. Increased 8 oxoG is associated with carcinogenesis and can be repaired by Base Exision Repair (BER) including OGG1 protein [26]. As CHD4 was previously shown to be recruited by OGG1 for oxidative damage to interact with 8oxodG [4], we evaluated the knockdown of OGG1 on the binding of CHD4 to chromatin in BCPAP cells. The knockdown of OGG1 reduced significantly the level of CHD4 in tight chromatin fraction (Fig. 6A). In contrast, there was an increase in the total protein level in this condition, which was associated with an increase at the mRNA level (Fig. 6C). The oxidative DNA damage can also be repaired by the non-canonical Mismatch repair (MMR). MMR proteins MSH2 and MSH6 play important role in repairing clustered oxidative damage found in GC-rich regions of the genome including promoter CpG island [27]. MSH6 is the DNA lesion-binding partner of the heterodimer. It also contains the nuclear localization sequences required to shuttle the MMR protein complex into the nucleus [28]. We next analyzed the knockdown of MSH6 on the binding of CHD4 to chromatin (Fig. 6B). Interestingly, decrease of MSH6 protein expression led to a decrease of the level of CHD4 in tight chromatin fraction without any change in both total protein and mRNA levels. Taken together, our data show that NOX4-derived oxidative DNA damage increase the affinity of CHD4 for chromatin through the recruitment of DNA repair proteins.

CHD4 cooperates with DNMTs to maintain silencing of SLC5A5 gene.

It has been shown that CHD4 induces recruitment of DNMTs to chromatin during oxidative damage and helps maintain DNA hypermethylation-associated transcriptional silencing of

colorectal tumor suppressor genes, revealing that CHD4 has oncogenic functions through epigenetic regulation [4]. DNA methylation is altered in thyroid cancer. Aberrant hypermethylation of the promoter region of genes, such as *SLC5A5* (NIS), has been demonstrated in thyroid tumors including BRAF-mutated tumors [29]. However, DNMTs inhibitors such as 5-azacitidine (Decitabine or DAC) in human thyroid cancer cell lines has shown contradictory effect on NIS mRNA reinduction [30]. We wondered whether CHD4 could functionally cooperate with DNMTs to induce reactivation of *SLC5A5*. The results presented in figure 7 show that knockdown of CHD4 potentiates the effect of Decitabine on reactivation of *SLC5A5* in BRAF-mutated thyroid cancer cell lines. Knockdown of CHD4 has alone no effect. The western-blot analysis highlights that decitabine by itself has no effect on affinity of CHD4 for the chromatin as well as on the level of CHD4 in the nuclear fraction. Collectively, these data demonstrate that CHD4 cooperates with DNMTs to maintain the silencing of *SLC5A5*. Beyond the NIS and more generally, it would be now opportune to analyze the role of CHD4 on the transcription program of BRAF-mutated thyroid cancer cells. The NuRD complex is believed to act as a transcription repressor, but some research indicated that it can also promote gene transcription globally [31]. Thus, CHD4/NuRD complex may also have an impact on tumor immune microenvironment by regulating immunosuppressive cytokines expressions, which mediate tumor progression. A relationship between the increased density of tumor-associated macrophages (TAMs), that are recruited by cytokine expression from tumor cells, and decreased survival was reported in thyroid cancer patients [32].

In addition to DNA methylation, histone deacetylation promotes repression of gene expression. HDACs play a key role in thyroid cancer [33]. Although the promoter region of NIS is regulated by histone acetylation, the use of HDAC inhibitors to restore NIS activity has shown mitigate results in different thyroid cell lines. For example, it has been observed that cell lines with mutations in BRAF and HRAS respond worse to treatments with HDAC inhibitors [34]. In addition to CHD4, the NuRD complex contains also HDAC1/2 subunits. So, it cannot be excluded that HDAC inhibitors also target NuRD function. Therefore, combination treatment of HDAC inhibitors with Decitabine may be more appropriate to lead to a significant increase in NIS expression in BRAF-mutated thyroid cancer cells.

Mutations of subunits of the SWI/SNF (switch/sucrose nonfermentable) chromatin remodeling complexes occur commonly in cancers of different lineages, including advanced thyroid cancers. A recent study discovered that SWI/SNF complexes are central to the maintenance of differentiated function in thyroid cancers, and their loss confers radioiodine refractoriness and resistance to MAPK inhibitor-based redifferentiation therapies [35]. Interestingly, it has been shown that NuRD drives SWI/SNF eviction in oral cancer cells [36]. Based on this finding, it would be informative to analyze whether NuRD and SWI/SNF compete for chromatin access in thyroid cancer cells, in particular at the level of genes involved in thyroid differentiation.

CHD4 can also play important NuRD-independent role in DNA damage response, cell cycle progression, signal transduction and overall genome maintenance [37]. At this level of the study, it is not clear whether CHD4 functions as a part of NuRD or independently of NuRD. Further experiments are necessary to clarify this point.

In conclusion our study show that oxidative DNA damage produced by NOX4 lead to the recruitment of DNA repair proteins, such as OGG1 and MSH6 proteins, which increase the affinity of CHD4 for the chromatin. The cooperation between CHD4 and the DNMTs contributes to maintain the silencing of *SLC5A5* gene encoding NIS. This is modeled in Figure 8. As NOX4, CHD4 is also a key effector of TGF- β , which play a major role in BRAF^{V600E}-induced

thyroid tumors by inhibiting NIS expression. The translational implication of this findings should be explored in future clinical trials by using combination of drugs targeting the MAPK pathway and the TGF- β pathway.

Acknowledgments:

This work was performed thanks to Gustave Roussy's core facilities.

Conflict of interest statement : Authors declare that no competing financial interests exist.

Funding statement: Corinne Dupuy received financial support from Electricité de France (EDF), from GEFLUC and from Institut National Du Cancer (INCA) PLBIO22-187.

Salma Fenniche was the recipient of a fellowship PHC Volubilis/Toukbal, Mickaëlle Radom and Mira Saleh were the recipient of a doctoral fellowship from the French Ministry of Research and technology (MRT) and Caroline Coelho de Faria was the recipient of a fellowship from ANR. Marylin Harinquet, Abir Al Ghuzlan, Mohamed-Amine Bani, Livia Lamartina and Rabii Ameziane El Hassani have nothing to declare.

References

- 1- Y Xue , J Wong, G T Moreno, M K Young, J Côté, W Wang. NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities *Mol Cell*. 1998 2(6):851-61.
- 2- Luo CW, Wu CC, Chang SJ, Chang TM, Chen TY, Chai CY, Chang CL, Hou MF, Pan MR. CHD4-mediated loss of E-cadherin determines metastatic ability in triple-negative breast cancer cells. *Exp Cell Res*. 2018 363(1):65-72.
- 3- Nuo Xu , Fanglei Liu , Shengdi Wu , Maosong Ye, Haiyan Ge, Meiling Zhang, Yuanlin Song, Lin Tong, Jian Zhou, Chunxue Bai CHD4 mediates proliferation and migration of non-small cell lung cancer via the RhoA/ROCK pathway by regulating PHF5A *BMC Cancer* 2020 20(1):262.
- 4- Xia L, Huang W, Bellani M, Seidman MM, Wu K, Fan D, Nie Y, Cai Y, Zhang YW, Yu LR, Li H, Zahnow CA, Xie W, Chiu Yen RW, Rassool FV, Baylin SB. CHD4 Has Oncogenic Functions in Initiating and Maintaining Epigenetic Suppression of Multiple Tumor Suppressor Genes. *Cancer Cell*. 2017 31(5):653-668.e7.
- 5- Arends T, Dege C, Bortnick A, Danhorn T, Knapp JR, Jia H, Harmacek L, Fleenor CJ, Straign D, Walton K, Leach SM, Feeney AJ, Murre C, O'Connor BP, Hagman JR. CHD4 is essential for transcriptional repression and lineage progression in B lymphopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 116(22):10927-10936.
- 6- Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocr Rev* 2007 28: 742-62.
- 7- Pratheeshkumar P, Siraj AK, Divya SP, Parvathareddy SK, Alobaisi K, Al-Sobhi SS, Al-Dayel F, Al-Kuraya KS. CHD4 Predicts Aggressiveness in PTC Patients and Promotes Cancer Stemness and EMT in PTC Cells. *Int J Mol Sci*. 2021 22(2):504.
- 8- Larsen DH, Poinsignon C, Gudjonsson T, Dinant C, Payne MR, Hari FJ, Rendtlew Danielsen JM, Menard P, Sand JC, Stucki M, Lukas C, Bartek J, Andersen JS, Lukas J. The chromatin-remodeling factor CHD4 coordinates signaling and repair after DNA damage. *J Cell Biol*. 2010 190(5):731-40.
- 9- Ameziane-El-Hassani R, Schlumberger M, Dupuy C. (2016) NADPH oxidases: new actors in thyroid cancer? *Nat Rev Endocrinol*. 12: 485-94.
- 10- Azouzi N, Cailloux J, Cazarin JM, Knauf JA, et al (2016) NADPH Oxidase NOX4 Is a Critical Mediator of BRAFV600E-Induced Downregulation of the Sodium/Iodide Symporter in Papillary Thyroid Carcinomas. *Antioxid Redox Signal*. 26
- 11- Ameziane-El-Hassani R, Talbot M, de Souza Dos Santos MC, Al Ghuzlan A, Hartl D, Bidart JM, De Deken X, Miot F, Diallo I, de Vathaire F, Schlumberger M, and Dupuy C. NADPH oxidase DUOX1 promotes long-term persistence of oxidative stress after an exposure to irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015 112: 5051–5056.
- 12- Cancer Genome Atlas Research Network (2014). Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell* 159:676-690.
- 13- Matoba H, Sugano S, Yamaguchi N, and Miyachi Y. Expression of transforming growth factor-beta1 and transforming growth factor-beta Type-II receptor mRNA in papillarythyroid carcinoma. *Horm Metab Res* 1998 30: 624–628.
- 14- Vasko V, Espinosa AV, Scouten W, He H, Auer H, Liya- narachchi S, Larin A, Savchenko V, Francis GL, de la Chapelle A, Saji M, and Ringel MD. Gene expression and functional evidence of epithelial-to-mesenchymal transition in papillary thyroid carcinoma invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 104: 2803–2808.

- 15- Grubeck-Loebenstien B, Buchan G, Sadeghi R, Kissoner-ghis M, Londei M, Turner M, Pirich K, Roka R, Niederle B, Kassal H, Waldhäusl W, and Feldmann M. Transforming growth factor beta regulates thyroid growth. Role in the pathogenesis of nontoxic goiter. *J Clin Invest* 1989 83: 764–770.
- 16- Taton M, Lamy F, Roger PP, and Dumont JE. General inhibition by transforming growth factor beta 1 of thyro- tropin and cAMP responses in human thyroid cells in primary culture. *Mol Cell Endocrinol* 1993 95: 13–21.
- 17- Tsushima T, Arai M, Saji M, Ohba Y, Murakami H, Oh- mura E, Sato K, and Shizume K. Effects of transforming growth factor-beta on deoxyribonucleic acid synthesis and iodine metabolism in porcine thyroid cells in culture. *Endocrinology* 1988 123: 1187 1194.
- 18- Costamagna E, Garcia B, and Santisteban P. The functional interaction between the paired domain transcription factor Pax8 and Smad3 is involved in transforming growth factor- beta repression of the sodium/iodide symporter gene. *J Biol Chem* 2004 279:3439–3446.
- 19- Kawaguchi A, Ikeda M, Endo T, Kogai T, Miyazaki A, and Onaya T. Transforming growth factor-beta1 suppresses thyrotropin-induced Na⁺/I⁻ symporter messenger RNA and protein levels in FRTL-5 rat thyroid cells. *Thyroid* 1997 7: 789– 794.
- 20- Nicolussi A, D’Inzeo S, Santulli M, Colletta G, and Coppa A. TGF-beta control of rat thyroid follicular cells differentiation. *Mol Cell Endocrinol* 2003 207: 1–11.
- 21- Riesco-Eizaguirre G, Rodriguez I, De la Vieja A, Costa- magna E, Carrasco N, Nistal M, and Santisteban P. The BRAFV600E oncogene induces transforming growth factor beta secretion leading to sodium iodide symporter repression and increased malignancy in thyroid cancer. *Cancer Res* 2009 69: 8317–8325.
- 22- Knauf JA, Sartor MA, Medvedovic M, Lundsmith E, Ryder M, Salzano M, Nikiforov YE, Giordano TJ, Ghossein RA, and Fagin JA. Progression of BRAF-induced thyroid cancer is associated with epithelial-mesenchymal transition re- quiring concomitant MAP kinase and TGFbeta signaling. *Oncogene* 2011 30: 3153–3162.
- 23- Zhao H, Han Z, Liu X, Gu J, Tang F, Wei G, Jin Y. The chromatin remodeler Chd4 maintains embryonic stem cell identity by controlling pluripotency- and differentiation-associated genes. *J Biol Chem*. 2017 292(20):8507-8519
- 24- Chen W, Pilling D, Gomer RH. The mRNA-binding protein DDX3 mediates TGF-β1 upregulation of translation and promotes pulmonary fibrosis. *JCI Insight*. 2023 8(7):e167566.
- 25- Fenniche S, Oukabli M, Oubaddou Y, Chahdi H, Damiri A, Alghuzlan A, Laraqui A, Dakka N, Bakri Y, Dupuy C, Ameziane El Hassani R. A Comparative Analysis of NOX4 Protein Expression in Malignant and Non-Malignant Thyroid Tumors. *Curr Issues Mol Biol*. 2023 45(7):5811-5823.
- 26- Rosenquist TA, Zharkov DO, Grollman AP. Cloning and characterization of a mammalian 8-oxoguanine DNA glycosylase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 94(14):7429-34.
- 27- Zlatanou A, Despras E, Braz-Petta T, et al (2011). The hMsh2-hMsh6 complex acts in concert with monoubiquitinated PCNA and Pol η in response to oxidative DNA damage in human cells. *Mol Cell*. 43:649-62
- 28- Michael A Edelbrock, Saravanan Kaliyaperumal, Kandace J Williams Structural, molecular and cellular functions of MSH2 and MSH6 during DNA mismatch repair, damage signaling and other noncanonical activities. *Mutat Res* 2013 743-744:53-66.

- 29- Choi YW, Kim HJ, Kim YH, Park SH, et al (2014). B-RafV600E inhibits sodium iodide symporter expression via regulation of DNA methyltransferase 1. *Exp Mol Med.* 46: e120
- 30- Zafon C, Gil J, Pérez-González B, Jordà M. DNA methylation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2019 Jul;26(7):R415-R439.
- 31- Basta J, Rauchman M. The nucleosome remodeling and deacetylase complex in development and disease. *Transl Res.* 2015 Jan;165(1):36-47.
- 32- Ryder M, Ghossein RA, Ricarte-Filho JC, Knauf JA, Fagin JA. Increased density of tumor-associated macrophages is associated with decreased survival in advanced thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2008 15(4):1069-74.
- 33- Diego Russo, Cosimo Durante, Stefania Bulotta, Cinzia Puppini, Efsio Puxeddu, Sebastiano Filetti, Giuseppe Damante Targeting histone deacetylase in thyroid cancer *Expert Opin Ther Targets* 2013 17(2):179-93.
- 34- Riesco-Eizaguirre G, Santisteban P, De la Vieja A. The complex regulation of NIS expression and activity in thyroid and extrathyroidal tissues. *Endocr Relat Cancer.* 2021 28(10):T141-T165
- 35- Saqcena M, Leandro-Garcia LJ, Maag JLV, Tchekmedyian V, Krishnamoorthy GP, Tamarapu PP, Tiedje V, Reuter V, Knauf JA, de Stanchina E, Xu B, Liao XH, Refetoff S, Ghossein R, Chi P, Ho AL, Koche RP, Fagin JA. SWI/SNF Complex Mutations Promote Thyroid Tumor Progression and Insensitivity to Redifferentiation Therapies. *Cancer Discov.* 2021 11(5):1158-1175.
- 36- Mohd-Sarip A, Teeuwssen M, Bot AG, De Herdt MJ, Willems SM, Baatenburg de Jong RJ, Looijenga LHJ, Zatreanu D, Bezstarosti K, van Riet J, Oole E, van Ijcken WFJ, van de Werken HJG, Demmers JA, Fodde R, Verrijzer CP. DOC1-Dependent Recruitment of NURD Reveals Antagonism with SWI/SNF during Epithelial-Mesenchymal Transition in Oral Cancer Cells. *Cell Rep.* 2017 20(1):61-75.
- 37- Jing Zhang, David J H Shih, Shiaw-Yih Lin The Tale of CHD4 in DNA Damage Response and Chemotherapeutic Response *J Cancer Res Cell Ther* 2019 3(1):052.

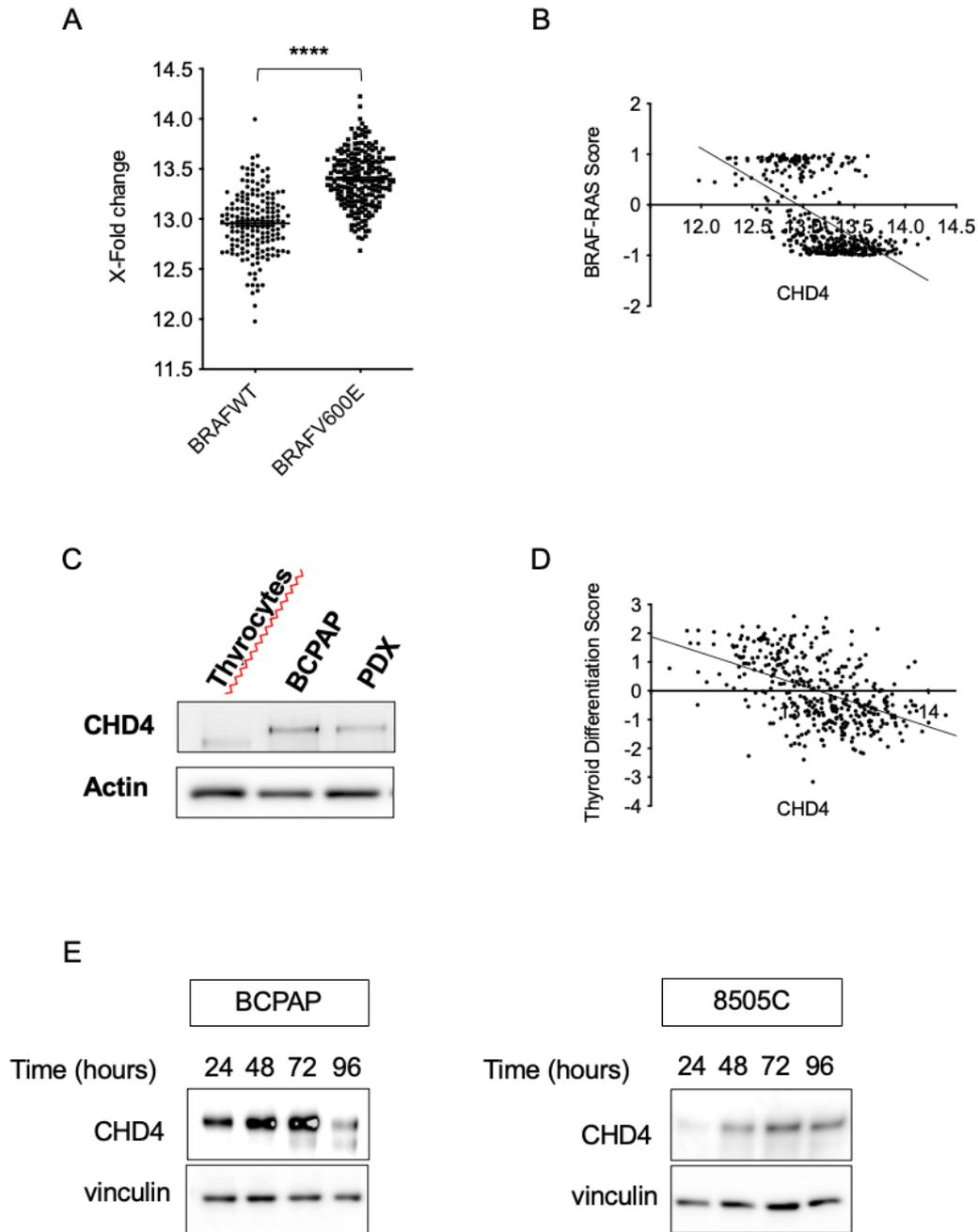


Figure 1: CHD4 is increased in BRAF-mutated PTC. A) Correlation analysis between CHD4 mRNA and BRAF^{V600E} mutation in 390 PTCs (170 BRAFWT and 220 BRAF^{V600E} PTCs). B) Correlative analysis between BRAF-RAS score and CHD4 mRNA in 390 PTCs. C) CHD4 protein was analysed by Western-blot as described in Material and Methods. Vinculin was used as loading control. D) Correlative analysis between CHD4 and Thyroid Differentiation Score in 390 PTCs. E) Time-dependent induction of CHD4 protein analysed by western-blot. Vinculin was used as loading control.

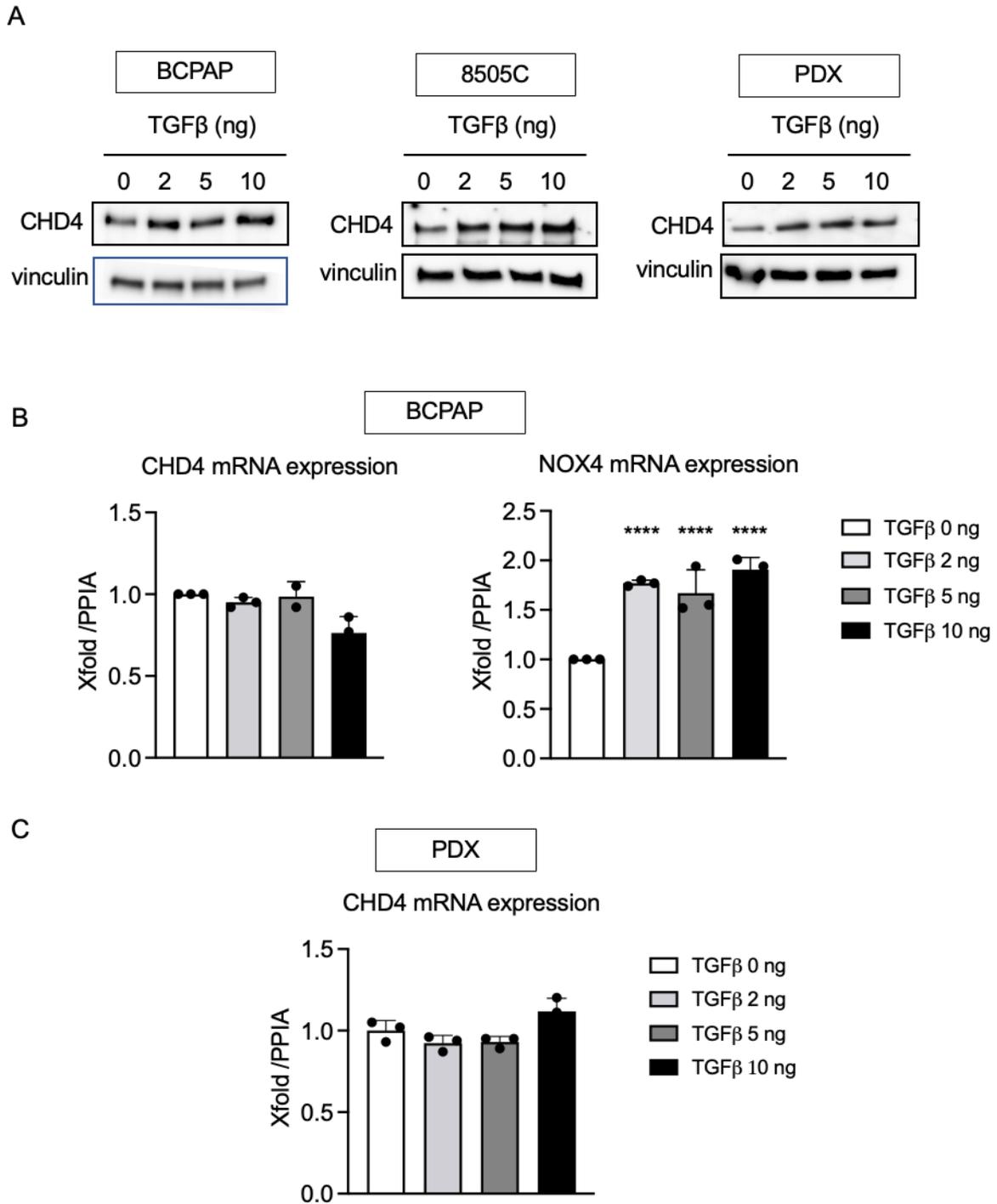


Figure 2: CHD4 is regulated by TGF- β in BRAF-mutated PTC cell lines . A) Dose-dependent stimulation of CHD4 protein expression in BRAF-mutated PTC cell lines treated with TGF- β for 48h. B) CHD4 and NOX4 mRNA were quantified by real-time quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) in BCPAP cells treated with increased concentration of TGF- β for 24h. C) CHD4 mRNA was quantified by real-time quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) in PDX cells treated with increased concentration of TGF- β for 24h.

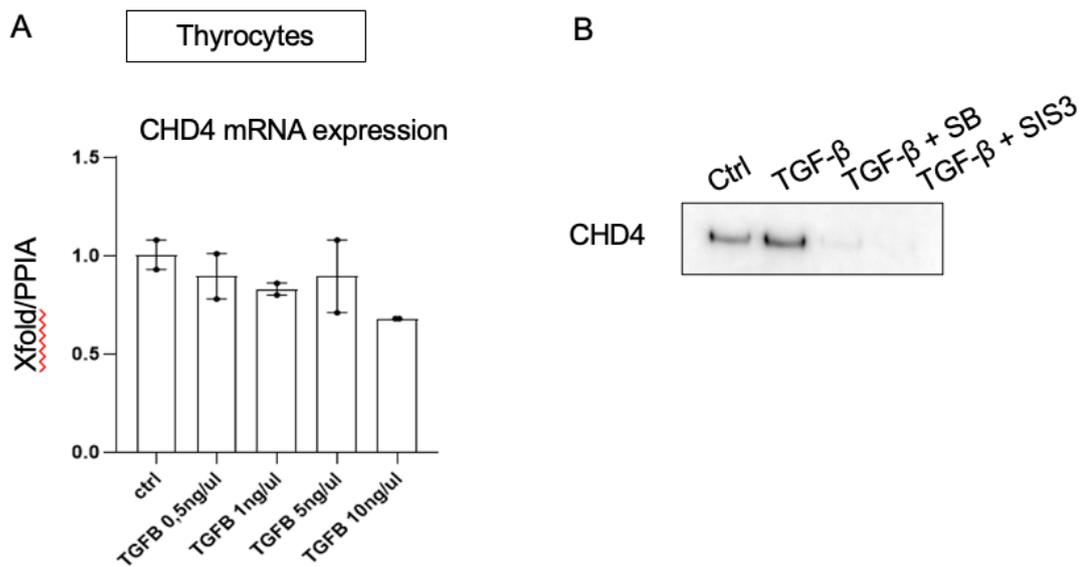


Figure 3: CHD4 is regulated by TGF- β in primary human thyrocytes. A) Dose-dependent gene expression of CHD4 by RT-qPCR in human thyrocytes treated with TGF- β for 24h. B) Immunoblot detection of CHD4 protein in human thyrocytes after treatment by TGF- β for 48h in the absence or in the presence of pharmacological inhibitors of TGF- β pathway.

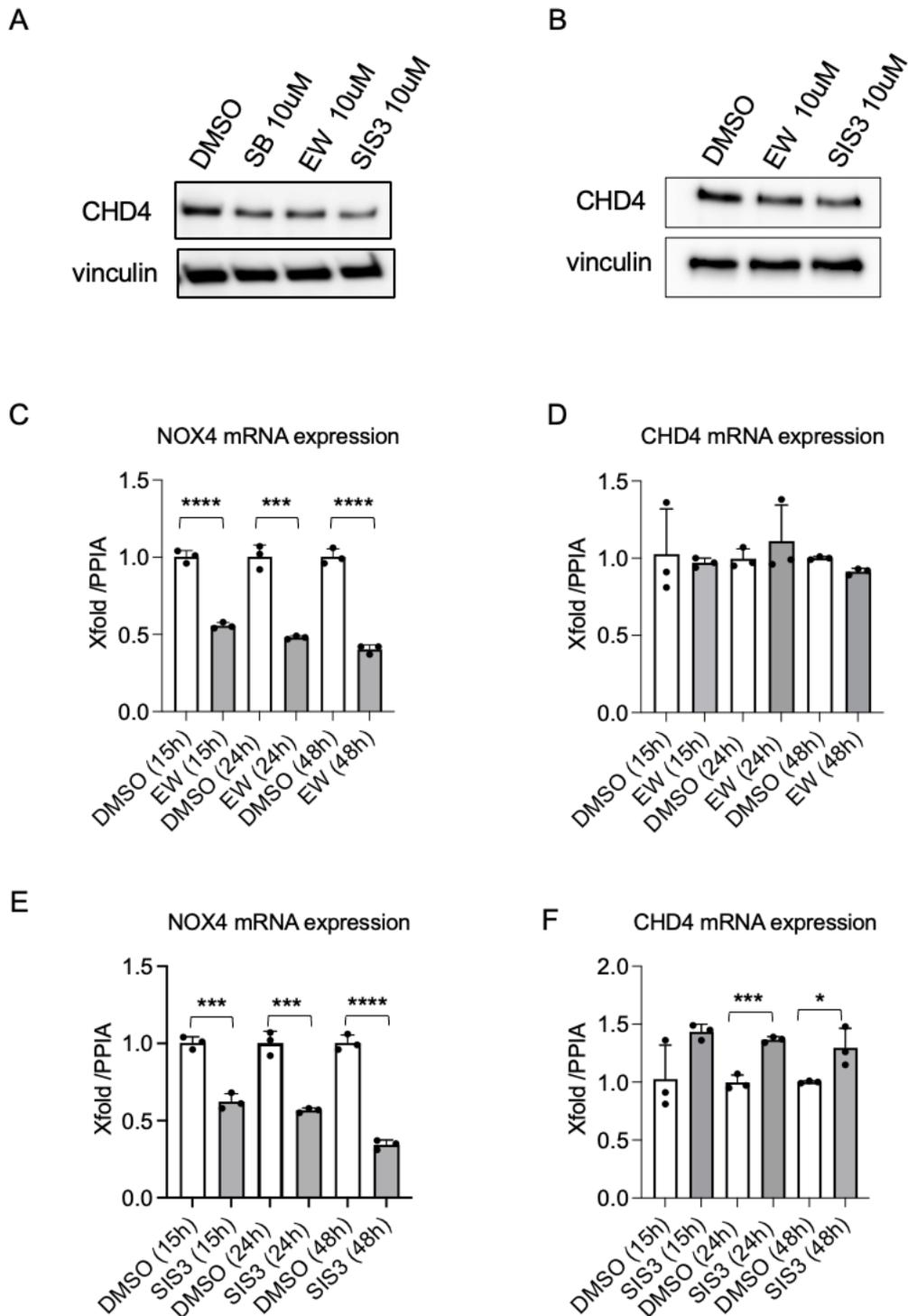


Figure 4: CHD4 protein expression is inhibited by inhibitors of the TGF- β pathway. A-B) Immunoblot detection of CHD4 protein in BCPAP (A) and in PDX (B) cells after pharmacological inhibition of TGF- β pathway by SB431542 (10 μ M) or by TEW-7197 (10 μ M) or by SIS3 (10 μ M). Vinculin was used as loading control. C-D) CHD4 and NOX4 mRNA were quantified by real-time quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) in BCPAP cells treated or not with TEW-7197 at different times. E-F) CHD4 and NOX4 mRNA were quantified by qRT-PCR in BCPAP cells treated or not with SIS3 at different times.

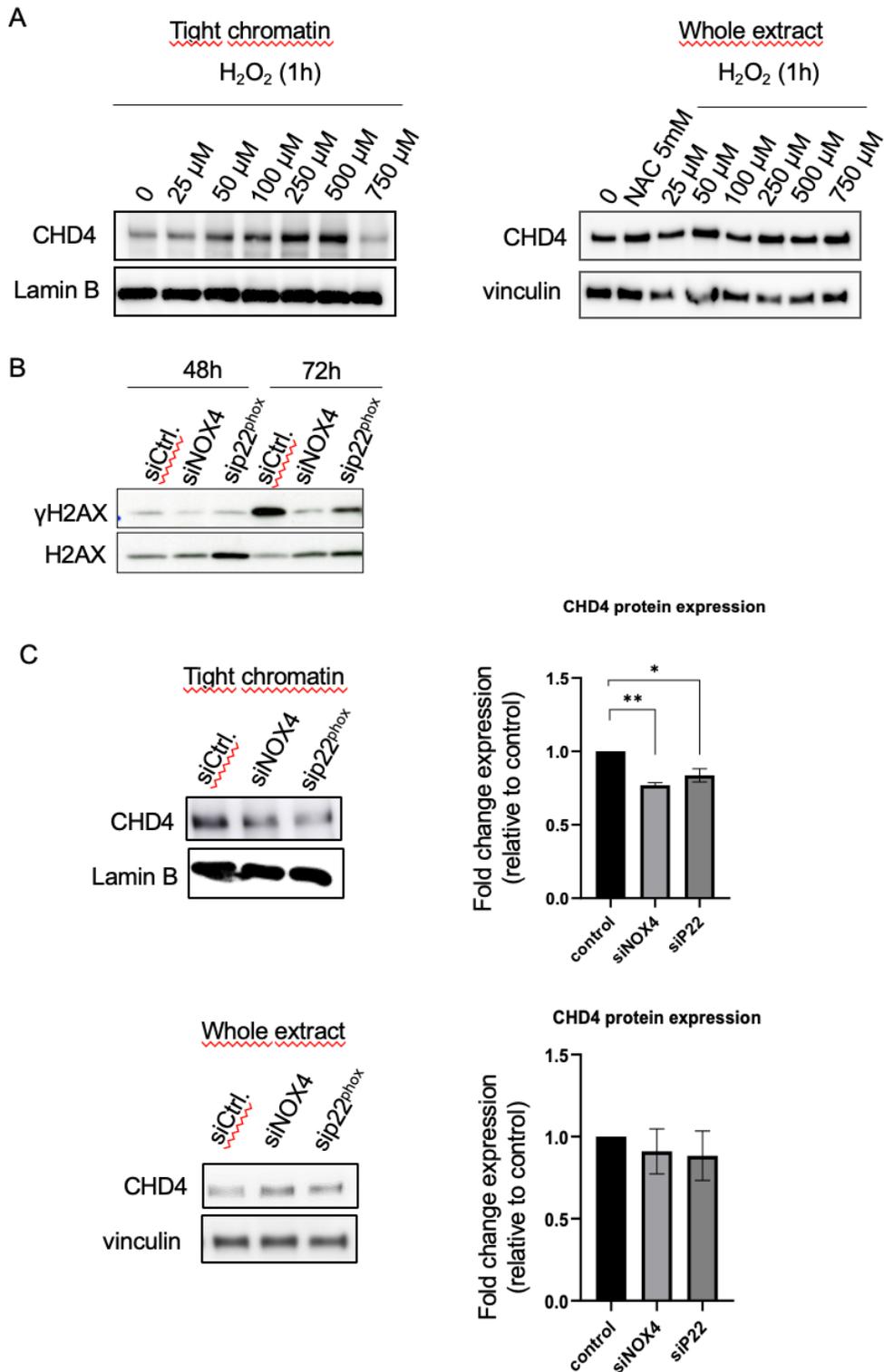


Figure 5: Recruitment of CHD4 to chromatin is dependent of NOX4-derived ROS. A) Immunoblot detection of CHD4 protein levels in tight chromatin fraction and whole extract prepared from BCPAP cells treated by increased concentration of H₂O₂ for 1 hour. Lamin B and Vinculin were used as loading control. B) Western-blot analysis of γH2AX and H2AX protein expression levels in whole extract 48h and 72h after knocking down of NOX4 and p22^{phox}. C) Western-blot analysis of CHD4 protein expression levels in tight chromatin fraction and whole extract 72h after after knocking down of NOX4 and p22^{phox}.

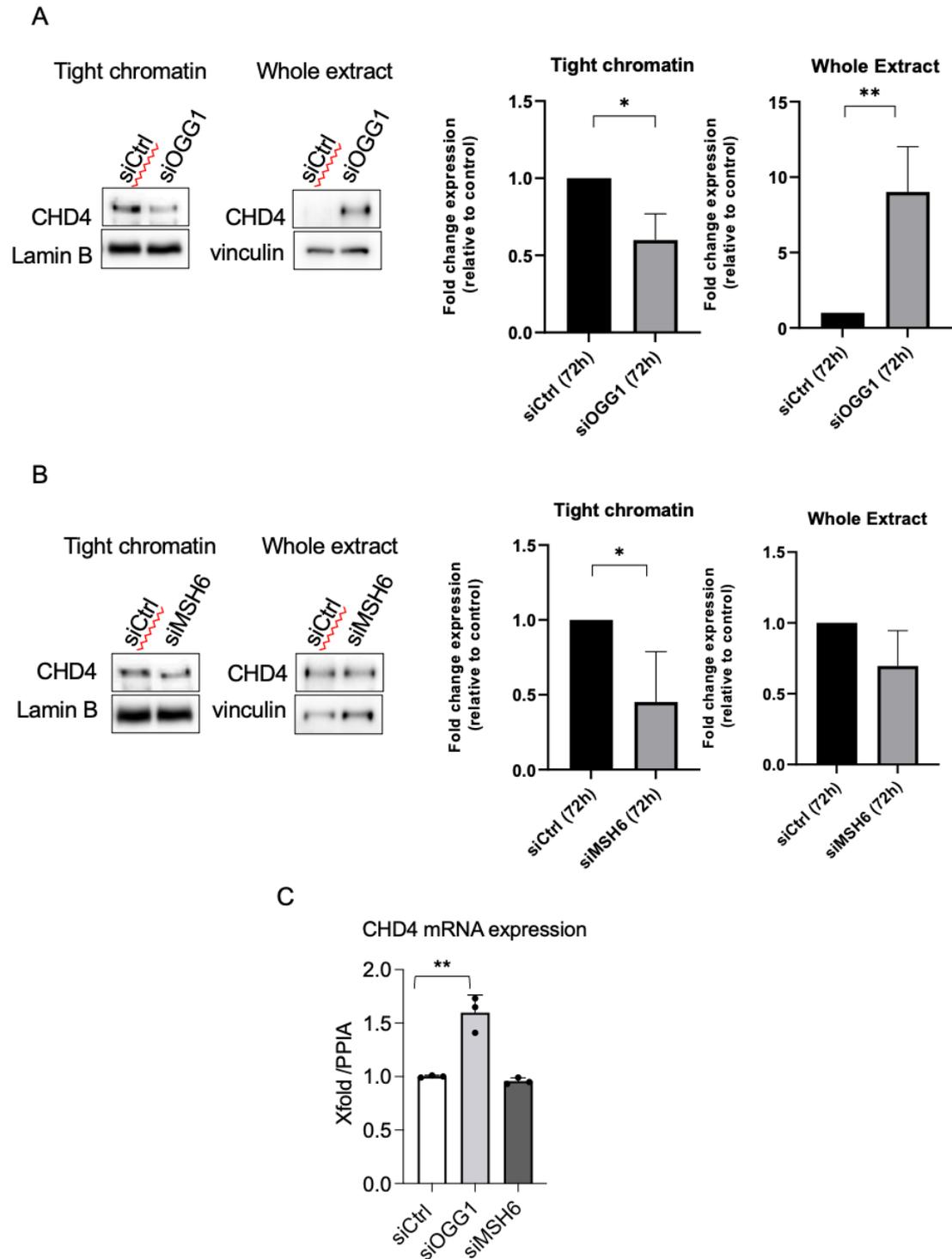


Figure 6: Recruitment of CHD4 to chromatin is dependent of DNA repair proteins. A) Western-blot analysis of CHD4 protein expression levels in tight chromatin fraction and whole extract 72h after knocking down of OGG1. Lamin B and Vinculin were used as loading control. B) Western-blot analysis of CHD4 protein expression levels in tight chromatin fraction and whole extract 72h after knocking down of MSH6. C) RT-qPCR analysis of CHD4 mRNA expression in BCPAP cells 24h after knocking down of OGG1 and MSH6.

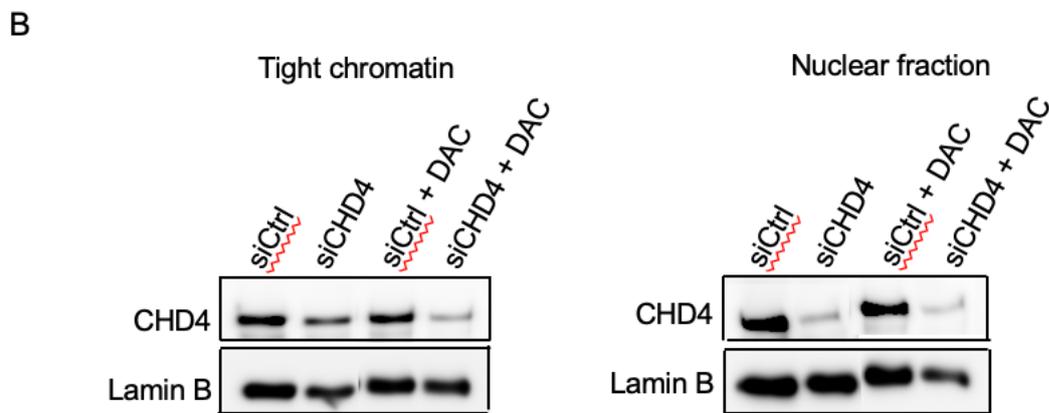
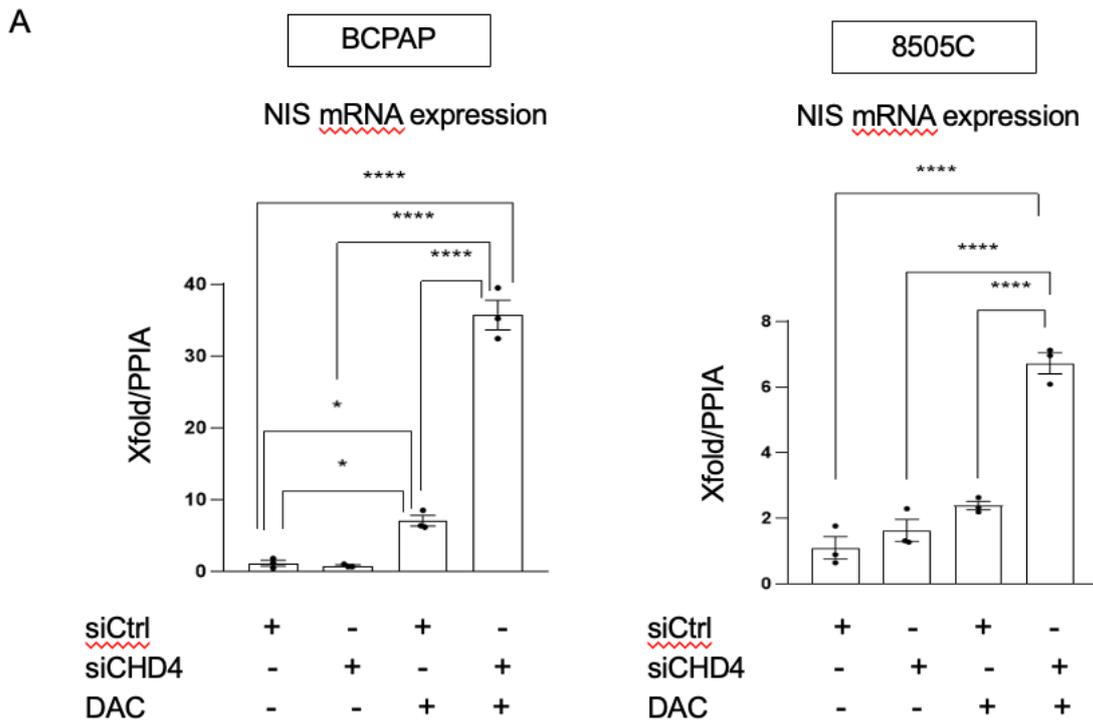


Figure 7: CHD4 cooperates with DNMTs to maintain silencing of SLC5A5 gene. A) NIS mRNA were quantified by real-time quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) in BCPAP and 8505C cells 72h after knocking down or not of CHD4. DAC (1 μ M) was added in the cell culture medium 24h before to recover the cells. B) Western-blot analysis of CHD4 protein expression levels in tight chromatin and nuclear fractions of BCPAP cells treated in same conditions of A).

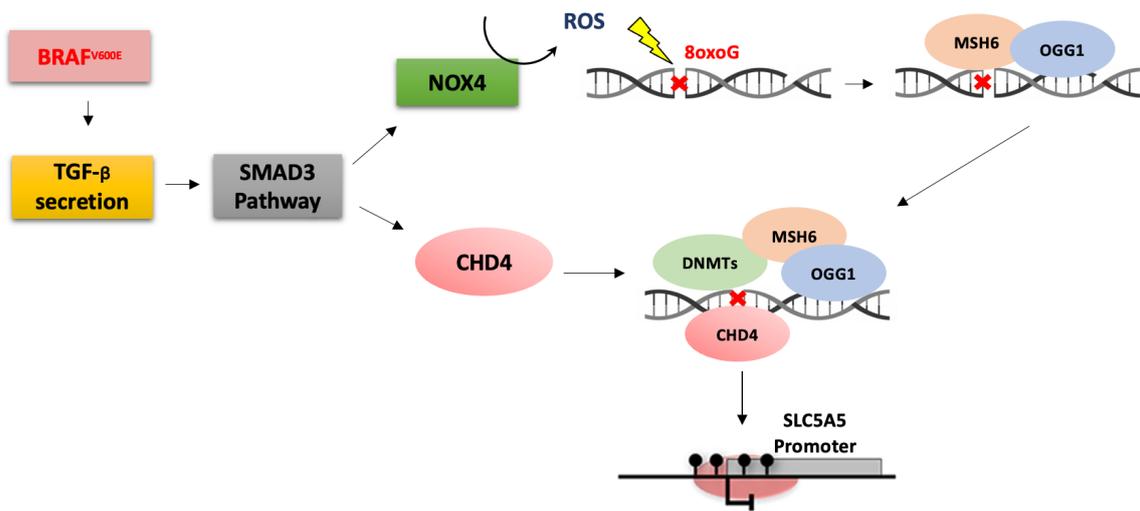


Figure 8: Graphical abstract. BRAF^{V600E} regulates TGF-β secretion, which activates the Smad3-dependent signaling pathway. This pathway controls the expression of both NOX4 and CHD4 proteins. By producing ROS, NOX4 induces oxidative DNA damage that promote the recruitment of DNA repair proteins, such as OGG1 and MSH6, to the chromatin, increasing the affinity of CHD4 for the chromatin. The cooperation between CHD4 and DNMTs contributes to maintain the silencing of SLC5A5 gene encoding NIS.