



Rôle de la NADPH OXYDASE NOX4 dans la régulation de l'expression et de l'activité de CHD4 dans les tumeurs thyroïdiennes porteuses de la mutation BRAFV600E

Salma Fenniche

► To cite this version:

Salma Fenniche. Rôle de la NADPH OXYDASE NOX4 dans la régulation de l'expression et de l'activité de CHD4 dans les tumeurs thyroïdiennes porteuses de la mutation BRAFV600E. Cancer. Université Paris-Saclay; Université Mohammed V (Rabat ; 1957-..), 2024. Français. <NNT : 2024UPASL022>. <tel-04992343>

HAL Id: tel-04992343

<https://theses.hal.science/tel-04992343v1>

Submitted on 15 Mar 2025

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.



HAL Authorization

Rôle de la NADPH OXYDASE NOX4 dans la régulation de l'expression et de l'activité de CHD4 dans les tumeurs thyroïdiennes porteuses de la mutation BRAF^{V600E}

Role of NADPH OXIDASE NOX4 in the regulation of CHD4 expression and activity in thyroid tumors harboring the BRAF^{V600E} mutation

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay et de l'université Mohammed V de Rabat

École doctorale n° 568 : signalisations et réseaux intégratifs en biologie (Biosigne)

Spécialité de doctorat : Biologie moléculaire et cellulaire

Graduate School : Sciences de la vie et santé. Référent : Faculté de médecine

Thèse préparée dans les unités de recherche : **Intégrité du génome et Cancers** (université Paris-Saclay, Institut Gustave Roussy, CNRS) et **Laboratoire de biologie des pathologies humaines** (Faculté des Sciences de Rabat), sous la direction de **Corinne Dupuy**, Directrice De Recherche CNRS et de **Rabii Ameziane El Hassani**, Professeur à la FSR et le co-encadrement de **Youssef Bakri**, Professeur à la FSR.

Thèse soutenue à Rabat, le 15 Avril 2024 par

Salma FENNICHE

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Nadia Dakka PES, Université Mohammed V, FSR, Rabat, Maroc	Présidente
Hasnae Guerrouj PES, Université Mohammed V, FMP, Rabat, Maroc	Rapporteur/Examinatrice
Xavier De Deken , PH, IRIBHM, Faculté de médecine, Campus Erasme, Bruxelles, Belgique	Rapporteur/Examineur
Mohamed Eddouks PES, Université Moulay Ismail, FST, Errachidia, Maroc	Rapporteur/Examineur
Said Aoufouchi CR, INSERM, UMR 9019 CNRS, Université Paris Saclay, Gustave Roussy, Villejuif, France	Examineur
My-Chan Dang Pham DR, INSERM, Centre de recherche sur l'inflammation, Hôpital Bichat, Paris, France	Examinatrice
Mohamed Oukabli PES, Université Mohammed V, FMP, Rabat, Maroc	Examineur

Titre : Rôle de la NADPH OXYDASE NOX4 dans la régulation de l'expression et de l'activité de CHD4 dans les tumeurs thyroïdiens porteurs de la mutation BRAF^{V600E}

Mots clés : Cancer papillaire de la thyroïde (PTC), Natrium Iodide Symporter (NIS), l'oncogène BRAF^{V600E}, NADPH oxydase 4 (NOX4), espèces réactives de l'oxygène (ERO), Chromodomain Helicase DNA binding 4 (CHD4).

Résumé : La radiothérapie métabolique à l'iode radioactif est la pierre angulaire du traitement des métastases à distance des cancers différenciés de la thyroïde. Cette thérapie est basée sur l'expression à la membrane basale des thyrocytes du transporteur de l'iode appelé NIS pour « Natrium Iodide Symporter ». La mutation BRAF^{V600E} est présente dans 45 à 60 % des cancers papillaires de la thyroïde qui représentent 80% des cancers thyroïdiens. La présence de cette mutation est associée aux tumeurs thyroïdiennes les plus agressives avec un faible niveau ou une absence d'expression du NIS. La perte de la captation d'iode radioactif se traduit par la résistance à la radiothérapie métabolique constituant un enjeu majeur pour le traitement des patients atteints de ce cancer. L'une des approches pour le traitement des patients réfractaires à la radiothérapie métabolique consiste à augmenter l'absorption de l'iode.

Au niveau transcriptionnel, notre équipe a déjà montré, à travers une analyse comparative qui porte sur environ 500 PTCs de la base de données TCGA, que NOX4 est fortement exprimée dans les PTCs-BRAF^{V600E} comparativement aux PTCs-BRAF^{wt}. Néanmoins, au niveau protéique, aucun lien n'a été établie entre la mutation BRAF^{V600E} et NOX4 dans les tumeurs malignes et non malignes (BRAF^{V600E}/BRAF^{wt}). Dans mon projet de thèse, nous illustrons pour la première fois une corrélation positive entre la présence de la mutation BRAF^{V600E} et la surexpression de la protéine NOX4 dans les tissus tumoraux PTCs. La surexpression de NOX4 est associée au caractère agressif des tumeurs. De plus, nous avons montré que 60% des C-PTCs infiltrant

surexpriment NOX4 indépendamment du statut mutationnel de BRAF, ce qui suggère que NOX4 pourrait être considérée comme un co-marqueur potentiel de l'agressivité des PTCs. De manière intéressante la protéine NOX4 était également surexprimée dans les maladies thyroïdiennes non malignes (les Basedow, goitres et hyperplasies) avec différentes localisations subcellulaires, suggérant un rôle de NOX4 dans la progression vers la malignité thyroïdienne.

Par ailleurs, sur le plan mécanistique, notre équipe a précédemment montré que BRAF^{V600E} contrôle l'expression de NOX4 sous l'effet de TGF- β /SMAD3 et que les ERO dérivées de NOX4 contribuent à la répression du NIS. L'inhibition de NOX4 favorise la réactivation du NIS. Cette réversibilité suggère une contribution à un mécanisme épigénétique. CHD4, une sous-unité du complexe du remodelage NuRD, joue un rôle important dans la répression des gènes. Elle est fortement exprimée dans les PTCs dans lequel elle est associée à un mauvais pronostic. Dans cette étude, nous avons montré que la voie TGF- β /SMAD3 régule l'expression de la protéine CHD4. Cette dernière coopère avec les DNMTs dans la répression du NIS dans plusieurs lignées thyroïdiennes tumorales mutées pour BRAF^{V600E}. Par ailleurs, nous montrons que CHD4 répond aux dommages oxydatifs à l'ADN induites par les ERO dérivés de NOX4. En effet, l'inhibition de NOX4 ou de son partenaire fonctionnel p22^{phox}, induit une diminution du recrutement de CHD4 à la chromatine. Ce recrutement est dépendant d'OGG1 et MSH6, deux protéines impliquées dans la réparation des dommages oxydatifs à l'ADN. Cette étude identifie CHD4 en tant que nouvelle cible thérapeutique dans les tumeurs thyroïdiennes réfractaires à la radiothérapie métabolique.

Title : Role of NADPH oxidase NOX4 in regulating the expression and the activity of CHD4 in BRAF^{V600E} mutated thyroid cancer cells

Keywords : Papillary thyroid cancer (PTC), Natrium Iodide Symporter (NIS), BRAF^{V600E} oncogene, NADPH oxidase 4 (NOX4), Reactive oxygen species (ROS), Chromodomain Helicase DNA binding 4 (CHD4)

Abstract: Metabolic radiotherapy with radioiodine is the cornerstone of the treatment of distant metastases of differentiated thyroid cancers. This therapy depends on the expression at the basal membrane of thyrocytes of the Natrium Iodide Symporter 'NIS'. BRAF^{V600E} mutation is present in 45 to 60% of papillary thyroid carcinomas, which represent 80% of thyroid cancers. The presence of this mutation is associated with the most aggressive thyroid tumors with low levels or absence of NIS expression. The loss of radioactive iodine uptake translates into resistance to metabolic radiotherapy, constituting a major issue for the treatment of patients with this cancer. One approach for treating patients refractory to metabolic radiotherapy is to increase iodine uptake.

At the transcriptional level, our team has already shown, through a comparative analysis concerning approximately 500 PTCs from the TCGA database, that NOX4 was strongly expressed in PTCs-BRAF^{V600E} compared to PTCs-BRAF^{wt}. However, at the protein level, no link has been established between the BRAF^{V600E} mutation and NOX4 in malignant and non-malignant tumors (BRAF^{V600E}/BRAF^{wt}). In my thesis project, we illustrate for the first time a positive correlation between the presence of BRAF^{V600E} mutation and the overexpression of NOX4 protein in PTC tumor tissues. The overexpression of NOX4 was associated with an aggressive nature of tumors. Furthermore, we showed that 60% of infiltrating C-PTCs overexpress NOX4 independently of BRAF

mutational status, suggesting that NOX4 could be considered as a potential co-marker of PTC aggressiveness. Interestingly, NOX4 protein was also overexpressed in non-malignant thyroid diseases (Basedow, goiters, and hyperplasias), with different subcellular localizations, suggesting a role for NOX4 in progression to thyroid malignancy.

Furthermore, on a mechanistic level, our team has previously shown that BRAF^{V600E} controls the expression of NOX4 under the effect of TGF- β /SMAD3 and that NOX4-derived ROS contribute to the repression of NIS. Inhibition of NOX4 promotes reactivation of the NIS. This reversibility suggests a contribution to an epigenetic mechanism. CHD4, a subunit of the NuRD remodeling complex, plays an essential role in gene repression. It was found to be strongly expressed in PTCs, in which it was associated with a poor prognosis. In this study, we showed that the TGF- β /SMAD3 pathway regulates the expression of CHD4 protein. The latter cooperates with DNMTs in repressing NIS in several thyroid tumor cells lines mutated for BRAF^{V600E}. Furthermore, we showed that CHD4 responds to oxidative DNA damage induced by NOX4-derived ROS. Indeed, inhibition of NOX4 or its functional partner p22^{phox} reduces the recruitment of CHD4 to chromatin. This recruitment depends on OGG1 and MSH6, two proteins involved in oxidative DNA damage repair. This study identifies CHD4 as a new therapeutic candidate in radioiodine-refractory thyroid cancers.

Dédicace

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut...

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude,

L'amour, le respect, la reconnaissance...

Aussi, c'est tout simplement que



Je dédie cette

Mémoire....



A mon cher père

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices consentis pour mon instruction et mon bien être. J'espère réaliser ce jour un de vos rêves et être digne de votre nom et votre confiance.

Que dieu, tout puissant, vous garde, vous procure santé, bonheur et longue vie pour que vous demeurez le flambeau illuminant mon chemin... ✍

A ma chère mère

Aucune parole ne peut être dite pour exprimer mon amour et mon attachement envers vous. En ce jour j'espère réaliser un de vos rêves, sachant que tout ce que je pourrais faire ou dire ne pourrait égaler ce que vous avez donné et fait pour moi.

Puisse Dieu, tout puissant, vous combler de santé, de bonheur et vous procurer longue vie afin que je puisse vous combler à mon tour... ✍

A mes frères, Souhail et Oussama

Des mots ne pourront jamais exprimer la profondeur de mon amour et mon affection. Vous avez toujours été là pour moi, à partager les moments les plus difficiles, mais aussi les plus joyeux.

Je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que Dieu, le tout puissant, vous protège et vous garde... ✍

A mon cher Mustapha et tous mes amis avec lesquelles j'ai passé des moments inoubliables.

A Toutes les personnes que j'aime et qui m'aiment

Remerciements

Ce manuscrit est le fruit d'un travail qui s'intègre sous le cadre d'un projet de thèse intitulé « Rôle de la NADPH OXYDASE NOX4 dans la régulation de l'expression et de l'activité de CHD4 dans les tumeurs thyroïdiennes porteuses de la mutation BRAF^{V600E} ». Le travail a été réalisé dans le cadre d'une convention de cotutelle entre l'Université Paris Saclay et l'Université Mohammed V de Rabat pour l'obtention d'un diplôme de doctorat en biologie moléculaire et cellulaire et pathologies. Le projet scientifique a été réalisé au sein du laboratoire d'anatomie pathologique de l'HMIMV de Rabat, au laboratoire de Biologie des Pathologies humaines au sein de la faculté des sciences de Rabat et à l'unité de recherche UMR9019 CNRS à l'institut Gustave Roussy de France.

J'exprime ma profonde gratitude à Mme. **Nadia DAKKA**, directrice du **laboratoire de biologie des pathologies humaines de la faculté de sciences de Rabat**, pour m'avoir permis d'accéder au laboratoire et de réaliser mes travaux de thèse dans des conditions optimales. J'exprime également ma profonde gratitude à Mme. **Patricia KANNOUCHE** directrice de **l'unité de recherche UM9019 CNRS, France**, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et pour ses encouragements. Je remercie M. **Mohammed OUKABLI**, chef du **service d'anatomopathologie de l'HMIMV de Rabat**, pour sa généreuse collaboration et son soutien.

Je tiens à remercier chaleureusement mes deux directeurs de thèse :

Mme. **Corinne DUPUY**, ma directrice de thèse à l'Université Paris Saclay et directrice de recherche à l'Unité de recherche UMR9019 CNRS à l'institut Gustave Roussy, Villejuif, France, d'avoir accepté de m'encadrer, merci de m'avoir guidé tout au long de la réalisation de ce travail, merci pour votre aide scientifique, votre accompagnement, votre disponibilité et vos conseils.

Et M. **Rabii AMEZIANE EL HASSANI**, mon directeur de thèse à l'université Mohammed V de Rabat et Professeur habilité à la faculté des sciences, Université Mohammed V de Rabat, pour son encadrement instructif, sa disponibilité, ses encouragements tout au long des années de ma thèse et surtout pour la confiance qu'il m'a accordée. Je suis extrêmement sensible à ses qualités humaines, à son professionnalisme, à sa rigueur et à son ouverture d'esprit.

Un grand merci à mon co-encadrant M. **Youssef BAKRI**, professeur de l'enseignement supérieur à la faculté des sciences, Université Mohammed V de Rabat, pour m'avoir encadré, pour votre temps, votre orientation et votre soutien. Vos qualités scientifiques et humaines,

vosre sympathie ont contribué énormément à la réussite de ce travail. Veuillez trouver ici, cher professeur, l'expression de mes sincères remerciements.

J'exprime mon profond respect et ma haute considération envers **Pr. Nadia DAKKA**, d'avoir accepté la présidence du jury de ce travail et je vous remercie de la confiance que vous avez bien voulu témoigner.

Je suis reconnaissante à Mme. **Hasnae GUERROUJ**, professeur de l'enseignement supérieur à la faculté de médecine et de pharmacie, Université Mohammed V de Rabat. Vous m'avez fait un grand honneur d'accepter être rapporteur de cette thèse et je vous remercie de la confiance que vous avez bien voulu témoigner. Veuillez accepter Madame mon profond respect et ma haute considération

Je tiens à remercier M. **Xavier De Deken**, professeur Habilité, IRIBHM, Faculté de médecine, Campus Erasme, Bruxelles, Belgique, pour la gentillesse avec laquelle vous avez bien voulu accepter être rapporteur de cette thèse et d'examiner mon travail. Veuillez accepter Monsieur mes sincères remerciements.

Je remercie également M. **Mohamed EDDOUKS**, professeur de l'enseignement supérieur à l'université Moulay Ismail, FST d'Errachidia, d'avoir accepté être membre de jury et pour sa volonté de fournir un rapport sur ma thèse. Veuillez accepter Monsieur mon profond respect et ma haute considération.

J'exprime ma profonde gratitude à M. **Said AOUFFOUCI**, chargé de recherche à l'unité de recherche UMR9019 CNRS à l'institut Gustave Roussy, Villejuif, Université Paris Saclay, France. Je vous remercie chaleureusement pour votre accompagnement, votre disponibilité et votre partage scientifique durant mes séjours en France. Je suis extrêmement touché par vos qualités humaines et professionnelles. Vous m'avez fait un grand honneur d'être examinateur de ce travail.

Je tiens à remercier Mme. **My-Chan Dang Pham**, directrice de recherche, INSERM, Centre de recherche sur l'inflammation, Hôpital Bichat, Paris, France. Vous m'avez fait un grand honneur d'accepter être examinatrice de ce travail et je vous remercie de la confiance que vous avez bien voulu témoigner. Veuillez accepter Madame mon profond respect.

Un grand merci à M. **Mohammed OUKABLI**, professeur de l'enseignement supérieur à l'université Mohammed V de Rabat, d'avoir accepté examiner ce travail. Votre partage scientifique et votre collaboration ont enrichi ce travail et contribué grandement à sa réussite. Permettez-moi, de vous exprimer ma profonde reconnaissance.

Je remercie également tous les membres de l'équipe de l'unité de recherche UM9019 à l'IGR en particulier l'équipe de **Dr Filippo ROSSELLI** et **Pr Said AOUAFOUCHI**, pour leurs accompagnements, leurs aides et leurs partage scientifique.

Je tiens à remercier particulièrement mes chères collègues et amies membres de l'équipe de Dr Corinne DUPUY : **Marylin HARINQUET, Mickaëlle RADOM, Caroline COELHO DE FARIA, Tania et Mira SALEH**, avec qui j'ai partagé des moments et des souvenirs inoubliables. Merci pour votre sympathie et votre soutien. Grâce à vous je ne me suis pas sentie étrangère.

Je n'oublie pas de remercier mes chères amies et collègues membres d'équipe du laboratoire de biologie des pathologies humaines : **Fatima-Ezzahra OUBAQUI** et **Fatima BEN ALI** pour leur soutien et sympathie.

Un remerciement particulier à mon cher ami et collègue **Dr. Yassire OUBADDOU**. Son soutien, son accompagnement, ses encouragements et ses conseils précieux ont eu un grand impact sur le bon déroulement et la réussite de mon travail.

Préambule

I. Production Scientifique :

Articles scientifiques internationaux inclus dans ce Doctorat :

1. **Fenniche, S.**, Oubaddou, Y., Bakri, Y., Dupuy, C., Ameziane El Hassani, R. Methods for detection of mitochondrial reactive oxygen species in senescent cells. *Methods in Cell biology*, 2024;181:33-41.
2. **Fenniche, S.**, Oukabli, M., Oubaddou, Y., Chahdi, H., Damiri, A., Alghuzlan, A., Laraqui, A., Dakka, N., Bakri, Y., Dupuy, C., and 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), pp. 5811–5823.
3. **Fenniche, S.**, Harinquet, M., Radom, M., Coelho de Faria, C., Saleh, M., Al Ghuzlan, A., Bani, M.A., Lamartina, L., Ameziane El Hassani, R., and Dupuy, C. 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. (In preparation).
4. **Fenniche, S.**, Oukabli, M., Oubaddou, Y., Chahdi, H., Damiri, A., Alghuzlan, A., Laraqui, A., Dakka, N., Bakri, Y., Dupuy, C., and Ameziane El Hassani, R. CHD4 and NOX4 expression in thyroid tumor tissues (In preparation).

Articles scientifiques internationaux non inclus dans ce Doctorat :

- Oubaddou, Y., Oukabli, M., **Fenniche, S.**, Elktaibi, A., Elochi, M. R., Al Bouzidi, A., Qmichou, Z., Dakka, N., Diori, C., Richter, A., Bakri, Y., and Ameziane El Hassani, R. BRCA1 Promoter Hypermethylation in Malignant Breast Tumors and in the Histologically Normal Adjacent Tissues to the Tumors: Exploring Its Potential as a Biomarker and Its Clinical Significance in a Translational Approach. *Genes*, 2023, vol. 14, no 9, p. 1680.

Communications orales incluses dans ce Doctorat :

- **Fenniche, S.**, Harinquet, M., Radom, M., Coelho de Faria, C., Saleh, M., Al Ghuzlan, A., Bani, M.A., Lamartina, L., Ameziane El Hassani, R., and Dupuy, C. Role of NADPH oxidase NOX4 in regulating the expression and the activity of CHD4 in BRAF^{V600E} mutated thyroid cancer cells. Club oxidase; 11-13 October 2021, Grenoble, France.
- **Fenniche, S.** ; Oukabli, M. ; Oubaddou, Y. ; Chahdi, H. ; Damiri, A. ; Alghuzlan, A. ; Laraqui, A. ; Dakka, N. ; Bakri, Y. ; Dupuy, C. ; et al. A Comparative Analysis of

NOX4 Protein Expression in Malignant and Non-Malignant Thyroid Tumors. Journées doctorales, CEDoc de la FSR, 20Mai 2023, Rabat, Maroc.

Communications affichées incluses dans ce Doctorat :

- **Fenniche, S.**, Harinquet, M., Radom, M., Coelho de Faria, C., Saleh, M., Al Ghuzlan, A., Bani, M.A., Lamartina, L., Ameziane El Hassani, R., and Dupuy, C. Role of NADPH oxidase NOX4 in regulating the expression and the activity of CHD4 in BRAF^{V600E} mutated thyroid cancer cells. Club oxidase; 11-13 October 2021, Grenoble, France.
- **Fenniche, S.**, Harinquet, M., Radom, M., Coelho de Faria, C., Saleh, M., Al Ghuzlan, A., Bani, M.A., Lamartina, L., Ameziane El Hassani, R., and Dupuy, C. Role of NADPH oxidase NOX4 in regulating the expression and the activity of CHD4 in BRAF^{V600E} mutated thyroid cancer cells. Journée de l'école doctorale Biosigne, Université Paris-Saclay, 21Avril 2023, Faculté de Médecine, Kremlin Bicêtre, France.

Communications affichées non incluses dans ce Doctorat :

- Oubaddou, Y., Oukabli, M., **Fenniche, S.**, Elktaibi, A., Elochi, M. R., Al Bouzidi, A., Qmichou, Z., Dakka, N., Diori, C., Richter, A., Bakri, Y., and Ameziane El Hassani, R. BRCA1 Promoter Hypermethylation in Malignant Breast Tumors and in the Histologically Normal Adjacent Tissues to the Tumors: Exploring Its Potential as a Biomarker and Its Clinical Significance in a Translational Approach. 13^{ième} CLUB OXYDASE, 4^{ième} journées du GDR-CNRS, NADPH Oxydase-Stress Oxydant, 15-17 Novembre 2023, Université Paris Saclay, Institut de Chimie Physique, Orsay, France.

II. Bourses, financements et distinctions scientifiques :

1. Programme du partenariat Hubert Curien Toubkal N TBK/20/113 NCAMPUS : 43586YA (France /Maroc) : Mes séjours scientifiques en France (2020 -2022).
2. Institut de Recherche sur le Cancer (IRC), Maroc. www.irc.ma ; Projet : 767/AamP2019.
3. Bourse d'excellence du CRNST, Maroc, édition 2020.
4. Institut National du Cancer (INCA), France : Mon séjour en France (2023)

Liste des figures

Figure 1: Anatomie de la glande thyroïde.....	2
Figure 2: Coupe histologique montrant la structure du follicule.	3
Figure 3: Structure du transporteur du sodium/iodure NIS humain.	5
Figure 4: Formation et structure des hormones thyroïdiennes.....	7
Figure 5: Le mécanisme de la biosynthèse des hormones thyroïdiennes.	9
Figure 6: Régulation de la synthèse thyroïdienne par l'axe hypothalamo-hypophysaire.....	11
Figure 7: Nombre estimé de nouveaux cas en 2020 dans le monde.	15
Figure 8: Nombre estimé de nouveaux cas en 2020 au Maroc.	16
Figure 9: Nombre estimé de nouveaux cas en 2020 en France	17
Figure 10: Images microscopique des PTCs.....	19
Figure 11: Aspects microscopiques de trois types de cancer thyroïdien folliculaire après coloration Hématoxine et Eosine (HE) au grossissement x20.....	21
Figure 12: Représentation schématique de la structure de BRAF..	25
Figure 13: Schéma récapitulatif des principaux altérations génétiques impliqués dans les cancers différenciés la thyroïde.....	28
Figure 14: Voie de signalisation du TGF- β	31
Figure 15: Mécanismes cellulaires de la génération et de l'élimination des ERO.	34
Figure 16: La famille des NADPH oxydatives.....	36
Figure 17: Schéma représentatif de la structure de DUOX1 et 2 avec leurs facteurs de maturation DUOX A1/A2.....	38
Figure 18: La dualité des espèces réactives de l'oxygène.	39
Figure 19: Mécanisme de réparation par excision de base (BER).....	41
Figure 20: Mécanisme de réparation par la voie Mismatch repair (MMR).....	45
Figure 21: Schéma représentatif de la structure de NOX4.	47
Figure 22: Représentation schématique des composants du complexe NuRD.....	51
Figure 23: Représentation schématique de la structure des protéines de famille CHD humaine	52
Figure 24: Les étapes principales de l'analyse mutationnel de l'oncogène BRAF ^{V600E} dans des tissus FFPE.....	62

Figure 25: Scores d'intensité de coloration immunohistochimique pour NOX4 et CHD4 dans le tissu thyroïdien.....	63
Figure 26: Schéma récapitulatif 1.....	122
Figure 27 : Schéma récapitulatif 2.....	123

Liste des Tableaux

Tableau 1: Distribution tissulaire et rôles physiopathologiques des NADPH Oxidases NOX / DUOX	37
--	----

Liste des abréviations

5'dRP	: 5'-deoxyribose phosphate
8-oxo-dG	: 8-oxo-2'-désoxyguanosine
ADN	: Acide désoxyribonucléique
AMH	: <i>Anti mullerian hormone</i>
AMPc	: Adénosine monophosphate cyclique
AGPI	: Acides gras poly-insaturés
AQP	: Aquaporines
ARNm	: Acide ribonucléique messenger
AP	: <i>Apurinic/apyrimidinic</i>
ATC	: <i>Anaplastic thyroid cancer</i>
BER	: <i>Base excision repair</i>
CaMK	: <i>Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase</i>
CHD	: <i>Chromodomain helicase binding DNA</i>
CDK	: <i>Cyclin-dependent kinase</i>
ClC5	: <i>Chloride channel-5</i>
COX	: Cyclooxygenase
C-PTC	: <i>Classical form of papillary thyroid carcinoma</i>
CR	: <i>Conserved Region</i>
CRD	: <i>Cysteine Rich Domain</i>
DAC	: Decitabine
DAG	: Diacylglycérol
DAPK	: <i>Death-Associated Protein Kinase</i>
DEHAL1	: Iodotyrosine dehalogenase 1
DSB	: <i>Double strand break</i>
dGTP	: Désoxyguanosine triphosphate
DBD	: DNA-Binding Domain
DIT	: Diodotyrosine
DNMT	: <i>DNA methyltransferase</i>
DTC	: <i>Differentiated thyroid cancers</i>
dRPase	: <i>DNA deoxyribophosphodiesterase</i>
DUOX	: <i>Dual Oxidase</i>
DUOXA1	: <i>DUOX Activator 1</i>

DUOXA2	: <i>DUOX Activator 2</i>
EGF	: <i>Epidermal growth factor</i>
E-loop	: <i>Extracytosolic loop</i>
eNOS	: <i>Endothelial nitric oxide synthase</i>
EMT	: <i>Epithelial-mesenchymal transition</i>
ERK	: <i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
ERO	: <i>Espèces réactives de l'oxygène</i>
ETC	: <i>Electron transport chain</i>
EXO1	: <i>Exonuclease 1</i>
FAD	: <i>Flavine adénine dinucléotide</i>
FEN1	: <i>Flap endonuclease 1</i>
FFPE	: <i>Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded</i>
FGF-2	: <i>Fibroblast growth factor-2</i>
FNAC	: <i>Fine-needle aspiration cytology</i>
Foxe1	: <i>Forkhead box protein E1</i>
F-PTC	: <i>Follicular variant of papillary thyroid carcinoma</i>
FSR	: <i>Faculté des Sciences Rabat</i>
FTC	: <i>Follicular thyroid carcinoma</i>
GDF	: <i>Growth differentiation factor</i>
GPx	: <i>Glutathion peroxydase</i>
H₂O₂	: <i>Peroxyde d'hydrogène</i>
HDAC	: <i>Histone désacétylase</i>
HMIMV	: <i>Hôpital Militaire d'instruction Mohammed V</i>
hMLH	: <i>Human MutL homolog</i>
hMSH	: <i>Human MutS homolog</i>
HT	: <i>Hormones thyroïdiennes</i>
HOCl	: <i>Acide hypochlorique</i>
IARC	: <i>International Agency for Research on Cancer</i>
IYD1	: <i>Iodotyrosine déshalogénase1</i>
LBD	: <i>Ligand Binding Domain</i>
LLC	: <i>Large latent complex</i>
MAPK	: <i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MBD	: <i>Methyl-CpG-binding domain</i>

MCT8	: <i>Monocarboxylate transporter 8</i>
MIT	: Mono-iodotyrosine
MMR	: <i>Mismatch repair</i>
MTA	: <i>Metastasis-associated</i>
NAT	: <i>Normal adjacent tissue</i>
NADPH	: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NIS	: <i>Natrium Iodide Symporter</i>
NKx2-1	: <i>NK2 homeobox 1</i>
NOX	: NADHP oxydase
NOXA1	: <i>NOX Activator 1</i>
NOXo1	: <i>NOX Organizer 1</i>
NURD	: <i>Nucleosome remodeling and deacetylase complex</i>
O2• -	: Anion superoxyde
OGG1	: 8-oxoguanine glycosylase 1
OH• -	: Anion hydroxyle
ONOO	: Thiorédoxine
OSI	: <i>Oxidative stress index</i>
PARP	: Poly (ADP-ribose) polymérase
PAX8	: <i>Paired box protein 8</i>
PCNA	: <i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PDGF	: <i>Platelet-derived growth factor</i>
PDS	: <i>Pendred syndrome</i>
PDTC	: <i>Poorly differentiated thyroid carcinoma</i>
Phox	: <i>Phagocyte Oxidase</i>
PI3K	: Phosphoinositide 3-kinase
PIP2	: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PK	: Protéine kinase
PLC	: Phospholipase C
Pol	: <i>Polymerase</i>
Poldip2	: <i>Polymerase DNA-directed delta-interacting protein 2</i>
PPAR	: <i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PRDX	: <i>Peroxiredoxins</i>
PTC	: <i>Papillary thyroid carcinoma</i>

PTPs	: <i>Protein tyrosine phosphatases</i>
RAS	: <i>Rous Avian sarcoma</i>
RBBP	: <i>Retinoblastoma binding protein</i>
RBD	: <i>RAS-binding domain</i>
SLC	: <i>Small latent complex</i>
SLC5A5	: <i>Solute Carrier Family 5 Member 5</i>
SMAD	: <i>Similar to the ‘mothers against decapentaplegic’MAD</i>
SOD	: <i>Superoxyde dismutase</i>
SSB	: <i>Single-stranded DNA</i>
T₃	: <i>Triiodothyronine</i>
T₄	: <i>Thyroxine</i>
TAS	: <i>Total Antioxidant Status</i>
TBG	: <i>Thyroxine Binding Globulin</i>
TBPA	: <i>Thyroxin Binding Prealbumine</i>
Tg	: <i>Thyroglobuline</i>
TGF-β	: <i>Transforming Growth Factor β</i>
TGF-βRI	: <i>Transforming Growth Factor β receptor I</i>
TGF-βRII	: <i>Transforming Growth Factor β receptor II</i>
TGF-βRIII	: <i>Transforming Growth Factor β receptor III</i>
TIMP3	: <i>Tissue inhibitors of metalloproteinase</i>
TMS	: <i>Transmembrane segments</i>
TNF	: <i>Tumor necrosis factor α</i>
TTR	: <i>Transthyréline</i>
TOS	: <i>Total oxidant status</i>
TPO	: <i>Thyroperoxydase</i>
TRH	: <i>Thyrotropin-releasing hormone</i>
Trx	: <i>Thioredoxine reductases</i>
TRα	: <i>Thyroid hormone Receptor α</i>
TRβ	: <i>Thyroid hormone Receptor β</i>
TSH	: <i>Thyroid-stimulating hormone</i>
TSHR	: <i>Thyroid-stimulating hormone receptor</i>
TTF1	: <i>Thyroid transcription factor-1</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

VEGFR : *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*
XRCC1 : *X-ray repair cross-complementation group*

Table des matières

Résumé	i
Abstract	ii
Dédicace.....	iii
Remerciements.....	v
Préambule.....	viii
Liste des figures	x
Liste des tableaux.....	xii
Liste des abréviations.....	xiii
Introduction bibliographique	1
I. Rappel anatomique et physiologique.....	2
1. Anatomie de la thyroïde.....	2
2. Biosynthèse des hormones thyroïdiennes	4
2.1. Les acteurs de l'hormono-synthèse thyroïdienne	4
2.1.1. NIS (Natrium-Iodide Symporter).....	4
2.1.2. Thyroglobuline (Tg)	5
2.1.3. La thyroperoxydase (TPO).....	6
2.1.4. La NADPH oxydase thyroïdienne 'DUOX2'	7
2.2. La synthèse des hormones thyroïdiennes	8
2.3. Sécrétion et transport des hormones thyroïdiennes	9
2.4. La régulation de l'hormonogénèse thyroïdienne.....	10
2.5. Le rôle des hormones thyroïdiennes	11
3. Les pathologies thyroïdiennes.....	12
3.1. Le goître.....	12
3.2. L'hyperthyroïdie	12
3.3. L'hypothyroïdie	13
3.4. Les cancers thyroïdiens	14
II. Carcinome thyroïdien	14
1. Epidémiologie	14
2. Classification histologique des cancers thyroïdiens d'origine folliculaire	17
2.1. Carcinome papillaire de la thyroïde.....	17
2.2. Carcinome folliculaire de la thyroïde	19
2.3. Carcinome anaplasique de la thyroïde.....	22

3. Les mécanismes moléculaires impliqués dans la tumorigenèse des cancers thyroïdiens d'origine folliculaire.....	22
3.1. Altérations génétiques de la voie MAPK	22
3.1.1. Les réarrangements chromosomiques.....	22
3.1.2. Les mutations de gène <i>RAS</i>	24
3.1.3. Les mutations de gène <i>BRAF</i>	25
3.2. Autres anomalies moléculaires	27
3.3. Implication de la voie de signalisation TGF- β /SMAD.....	28
3.3.1. La signalisation TGF- β /SMAD	28
3.3.2. Régulation de la fonction thyroïdienne par le TGF- β	31
4. Reclassification des PTCs.....	32
III. Stress oxydatif et instabilité génétique et épigénétique	33
1. L'équilibre Redox	33
2. Les NADPH oxydases	34
3. La dualité des ERO	38
4. Les effets délétères des ERO	39
5. Stress oxydatif et les carcinomes thyroïdiens	40
6. Les mécanismes de réparation des dommages oxydatifs.....	40
6.1. La réparation par excision de base (BER)	40
6.1.1. OGG1.....	42
6.1.2. La réparation par la voie BER et cancer de la thyroïde	42
6.2. La réparation par la voie Mismatch Repair (MMR).....	44
6.2.1. MSH2/MSH6.....	45
6.2.2. la réparation par la voie MMR et cancer de la thyroïde	45
7. La NADPH oxydase 4 et le cancer de la thyroïde	46
7.1. Le système générateur de ROS : NOX4/p22 ^{phox}	46
7.1.1. L'expression et régulation de NOX4	46
7.1.2. Partenaire fonctionnel de NOX4 : la protéine p22 ^{phox}	47
7.2. NOX4 et cancer de la thyroïde	47
IV. Modifications épigénétiques et cancer de la thyroïde	48
1. La régulation épigénétique de l'expression de NIS	48
2. Le complexe de remodelage de la chromatine 'NURD'	50
3. La famille CHD.....	51
4. CHD4 et cancer de la thyroïde.....	52

4.1.	Structure et régulation de CHD4	52
4.2.	Rôle de CHD4 dans la réponse aux dommages à l'ADN.....	53
4.3.	Implication de CHD4 dans le développement du cancer de la thyroïde	54
V.	Diagnostic et traitement des cancers de la thyroïde	55
1.	Diagnostic des cancers de la thyroïde	55
2.	Les stratégies thérapeutiques des cancers de la thyroïde d'origine folliculaire.....	56
3.	La radiorésistance thyroïdienne	57
	Objectifs du travail.....	59
	Matériels et méthodes.....	60
	Résultats.....	67
	Article I : A Comparative Analysis of NOX4 Protein Expression in Malignant and Non-Malignant Thyroid Tumors.....	68
	Article II: Role of NADPH oxidase NOX4 in regulating the expression and the activity of CHD4 in BRAF ^{V600E} mutated thyroid cancer cells.....	82
	Article III: CHD4 and NOX4 expression in thyroid tumor tissues	106
	Discussion générale	117
	Conclusions et perspectives	122
	Références bibliographiques	125

Introduction bibliographique

I. Rappel anatomique et physiologique

1. Anatomie de la thyroïde

La glande thyroïde est une glande médiane située à la face antéro-inférieure du cou (Tramalloni, J et al., 2013). En vue antérieure, la glande thyroïde se présente sous forme de H majuscule ou de papillon, constituée de deux lobes latéraux verticaux, réunis par une portion mince et large, appelée isthme duquel se détache inconstamment un lobe intermédiaire ou pyramide de Lalouette (Figure 1) (Ryndak-Swiercz, A., 2010). En vue postérieure, la glande thyroïdienne est fortement adhérente à la trachée par l'intermédiaire des ligaments médians, isthmiques et latéraux de GRUBER (Figure 1) (Tramalloni, J et al., 2013), et à l'arrière des lobes latéraux, entre les deux couches de la capsule se trouve les quatre glandes parathyroïdes inférieures et supérieures, deux de chaque côté (Benvenga, S et al., 2018). Chaque lobe mesure environ 4 cm de long, 2 cm de large et 2 à 3 cm d'épaisseur. L'isthme mesure environ 2 cm de largeur, 2 cm de hauteur et 2 à 6 mm d'épaisseur. La glande thyroïde primitive apparaît pour la première fois au cours de la quatrième semaine de gestation dans le plancher du pharynx primitif et devient fonctionnelle à partir de la 11^{ème} semaine du développement embryonnaire (Ryndak-Swiercz A., 2010). Son poids normal chez l'adulte est d'environ 15 à 20 g (Benvenga, S et al., 2018).

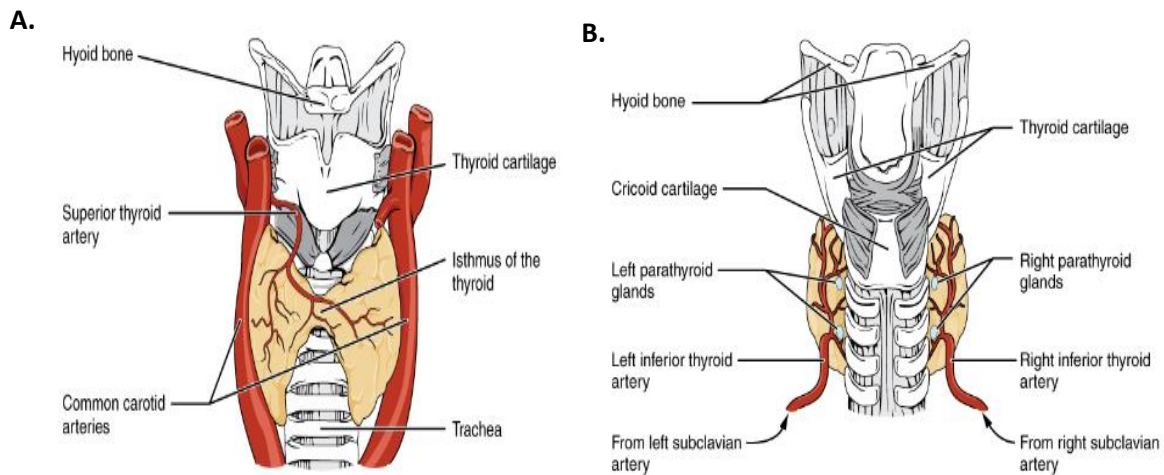


Figure 1: Anatomie de la glande thyroïde. (A) : vue antérieure, (B) : vue postérieure (Gordon-Betts, J et al., 2013).

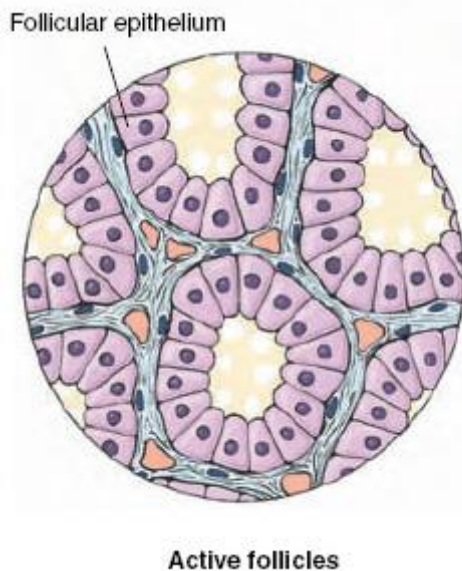
Histologiquement, la thyroïde est entourée d'une fine capsule de tissu conjonctif qui pénètre dans la substance des lobes pour subdiviser la glande en unités lobulaires irrégulières. Chaque lobule contient un groupe de follicules, qui constituent les unités structurales et fonctionnelles de la glande thyroïde, et chaque follicule contient deux types cellulaires :

♦ **Les cellules folliculaires** appelées aussi cellules vésiculaires ou thyrocytes : représentent 99 % du contingent cellulaire thyroïdien, et sont responsables de la synthèse des

hormones thyroïdiennes et de la thyroglobuline. Il s'agit de cellules polarisées qui reposent sur une lame basale et s'organisent en un épithélium unistratifié qui forme une sphère dite follicule dont la taille varie de 30 à 500 μm de diamètre (Arrangoiz, R et al., 2018). Dans la lumière centrale du follicule se trouve la colloïde, substance amorphe, jaunâtre plus ou moins abondante, constituant un lieu de synthèse et de stockage des hormones thyroïdiennes. Le pôle apical des thyrocytes est en contact avec la colloïde, tandis que le pôle basolatéral est en contact avec les capillaires (Figure 2). L'aspect des thyrocytes est variable en fonction de leur état d'activité (Ryndak-Swiercz, A., 2010). Au repos, les follicules sont de grandes tailles, la colloïde est abondante et les cellules folliculaires sont faiblement cuboïdes ou squameuses. À l'inverse, en cas d'hyperactivité, les follicules sont petits, la colloïde se raréfie et se colore moins vivement et les cellules sont cuboïdes à colonnaires.

♦ **Les cellules para folliculaires ou cellules C** représentent environ moins de 1 % de la glande thyroïdienne, leur fonction principale est la synthèse, le stockage et la sécrétion de la calcitonine, hormone intervenant dans l'homéostasie calcique. Ces cellules appartiennent au système neuroendocrine, dérivant de cellules de la crête neurale (Swaroop Das, S et al., 2017) et se trouvent en contact avec la lame basale du follicule, d'où leur appellation de cellules parafolliculaires (Ryndak-Swiercz, A., 2010).

A.



B.

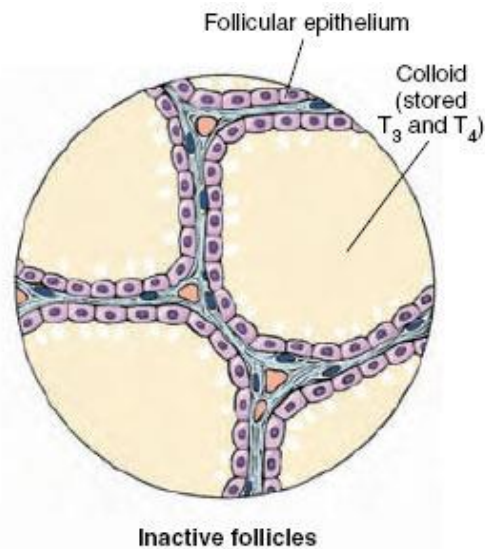


Figure 2: Coupe histologique montrant la structure du follicule. [A] Structure de follicules thyroïdiens à l'état actif avec des cavités colloïdales étroites et des thyrocytes en activité. [B] Structure de follicules thyroïdiens à l'état inactif avec de grandes cavités colloïdales et des thyrocytes en repos (Ganong, W. F., 1995).

2. Biosynthèse des hormones thyroïdiennes

2.1. Les acteurs de l'hormono-synthèse thyroïdienne

La synthèse des hormones thyroïdiennes est réalisée par l'intervention de plusieurs enzymes du côté apicale et basal des thyrocytes organisés en follicule.

2.1.1. NIS (Sodium-Iodide Symporter)

NIS est une glycoprotéine transmembranaire, localisée à la membrane plasmique basale des thyrocytes. Elle est codée par le gène *SLC5A5*, qui est localisé sur le chromosome 19 p12-13.2 et contient 15 exons interrompus par 14 introns. Le cadre de lecture ouvert comporte 1929 nucléotides codant pour une glycoprotéine de 643 acides aminés (Smanik, P.A et al., 1996 ; Smanik, P.A et al 1997) dont la forme précurseur a une masse moléculaire d'environ 56 kDa, tandis que la forme mature a environ 87 kDa dans les cellules thyroïdiennes (Levy, O et al., 1998). Cette glycoprotéine est caractérisée par 13 domaines transmembranaires (TMS), une extrémité amino-terminale extracellulaire et une extrémité carboxyle intracellulaire avec trois sites de glycosylation N-liés (Asparagine-glycosylation) en position 225, 485 et 497 (Figure 3) (Dai, G et al., 1996 ; Levy, O et al., 1998). La protéine membranaire est généralement produite dans le réticulum endoplasmique, puis se déplace vers la membrane cellulaire à travers l'appareil de Golgi. La glycosylation joue un rôle important dans la trans-localisation du NIS vers la membrane plasmique et dans sa maturation fonctionnelle (Chung, T et al., 2015). NIS possède également, différents sites potentiels de phosphorylation ciblés par plusieurs kinases, y compris, la glycogène synthase kinase 3, Les kinases dépendantes des cyclines (CDKs I et II), et les protéines kinases (PKA) A et C (PKC). La phosphorylation module l'activité du NIS, sa stabilité et sa trans-localisation vers la membrane plasmique (Chung, T et al., 2015).

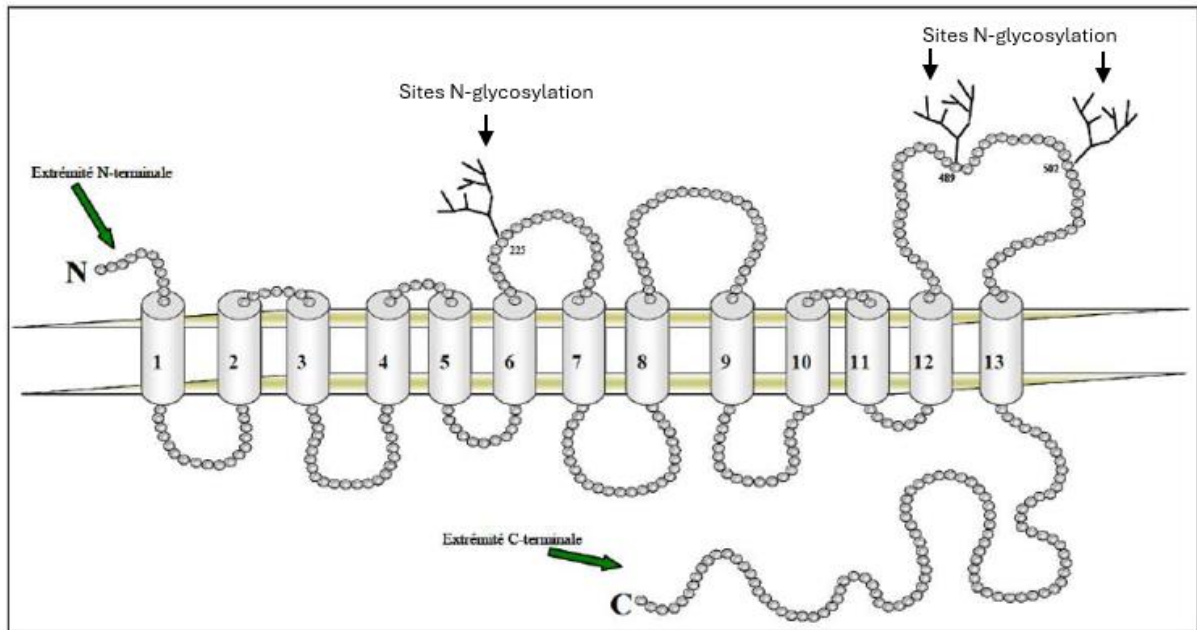


Figure 3: Structure du transporteur du sodium/iodure NIS humain. La figure présente la structure secondaire du NIS formée de 13 domaines transmembranaires avec les trois sites de N-glycosylation. Les flèches vertes indiquent les extrémités intra ou extracellulaire (Huc, S., 2007).

NIS intervient dans le transport actif de l'iodure du sang dans les cellules folliculaires. Ce transport se produit via le gradient de sodium généré par la pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$, transportant un ion iodure (I^-) contre son gradient électrochimique avec deux ions sodium (Na^+) le long de leur gradient transmembranaire (Carrasco, N., 1993), comme première étape cruciale de la biosynthèse des hormones thyroïdiennes. Le transport d'iodure médié par le NIS est inhibé par l'inhibiteur ouabaïne $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$, et par l'intermédiaire des inhibiteurs compétitifs ; le thiocyanate (SCN^-) et le perchlorate (ClO_4^-), qui entrent en compétition avec l'iodure pour le transporteur et diminue ainsi l'accumulation d'iodure (Dohán, O et al., 2003).

L'expression de NIS se retrouve également dans d'autres tissus, tels que les glandes salivaires, le tissu mammaire pendant l'allaitement, les entérocytes intestinaux, les cellules pariétales de l'estomac et les cellules épithéliales des voies respiratoires pulmonaires (Ravera, S., 2017).

2.1.2. Thyroglobuline (Tg)

La thyroglobuline (Tg) est la principale protéine présente dans la colloïde thyroïdienne. Elle joue un rôle central dans la physiologie de la thyroïde où elle constitue la matrice de l'hormono-synthèse thyroïdienne (Kahara, T et al., 2012). La Thyroglobuline est codée par le gène *TG* localisé au niveau du chromosome 8. Il s'agit d'un dimère protéique de 660 kDa avec 60 liaisons disulfures par monomère et 17 sites de glycosylation, qui assurent la stabilité et la solubilité à la protéine (Coscia, Fet al., 2020). Sur environ 30 tyrosines iodées par monomère,

seuls quelques résidus de tyrosine sont capables de synthétiser des hormones thyroïdiennes et sont dits ‘résidus hormonogéniques’ (Citterio cintia, E., 2019). Des résidus hormonogéniques sélectifs conduisent à la formation des hormones thyroïdiennes T_4 et T_3 sur des sites distincts. L’hormonogénèse implique toujours deux résidus iodotyrosines, un donneur qui peut être un di-iodotyrosine (DIT) (destiné à devenir T_4) ou mono- iodotyrosine (MIT) (destiné à devenir T_3) et un accepteur qui doit être un DIT pour générer une hormone thyroïdienne bioactive (Citterio cintia E., 2019). Les autres résidus non hormonogéniques servent au stockage des formes inactives des HT et de l’iode dans la colloïde. La synthèse de la Tg est régulée par la TSH et par divers facteurs de transcription, notamment les facteurs de transcription NKX2.1 (TTF1), FOXE1 (TTF2) et le PAX8 (Arrangoiz, R et al., 2018).

2.1.3. La thyroperoxydase (TPO)

Le gène qui code pour la TPO est localisé sur le chromosome 2 en position 25 et contient 17 exons et 16 introns (Fayadat, L et al 1998). L’épissage alternatif fournit plusieurs transcrits dont le principal ARNm exprimé dans les thyrocytes est la TPO 1 codant pour une protéine de 933 acides aminés (Godlewska, M et al., 2019). Elle appartient à la famille des peroxydases contenant un hème (Fayadat, L et al., 1998). La TPO est formée d’un court domaine transmembranaire, une région C-terminale intracellulaire et un grand domaine extra-cytoplasmique orienté vers la colloïde, avec un site catalytique et cinq sites potentiels de N-glycosylation (Asn129, Asn307, Asn342, Asn369, et Asn478) (Fayadat, L et al 1998). Elle subit plusieurs modifications post-traductionnelles telles que, la glycosylation, l’incorporation d’hème et la formation des dimères. Ces modifications sont essentielles pour son trafic intracellulaire, sa maturation et son activité enzymatique (Godlewska, M et al., 2019).

En présence de peroxyde d’hydrogène (H_2O_2), la thyroperoxydase ou TPO catalyse à la fois l’iodation des résidus tyrosine de la Tg pour former la moniodotyrosine (MIT) et la diiodotyrosine (DIT) et le couplage des MIT et DIT pour former les hormones thyroïdiennes T_3 et T_4 (Godlewska, M et Banga P.J., 2019). En effet, le peroxyde d’hydrogène ‘ H_2O_2 ’ généré par la DUOX2, oxyde l’hème de la TPO formé de la porphine et de fer ferrique (Fe^{3+}), entraînant la perte de deux électrons et induisant à la formation du ‘composé I’ très instable contenant un hème oxoferryl [$Fe^{IV}=O, Po^{\circ+}$] (Carvalho, D. P et al., 2017). Le composé I peut être réduit en TPO native par l’acquisition de deux électrons retirés de l’iodure, conduisant à la formation d’iode très réactive qui se lie aux résidus tyrosyls de la Tg. Le composé I peut également arracher un électron à un iodotyrosine pour former un composé II stable [$Fe^{IV}=O, Po$]. Le composé II peut regagner la forme native de la TPO via l’oxydation d’une seconde iodotyrosine,

favorisant ainsi la réaction de couplage de deux iodotyrosines pour former des iodothyronines (Figure 4) (Carvalho, D. P et al., 2017).

La synthèse de la TPO est régulée par la TSH et par divers facteurs de transcription, notamment les facteurs de transcription TTF1/ /NKX2.1, TTF2/ /FOXE1 et le PAX8 (Godlewska, M et al., 2019).

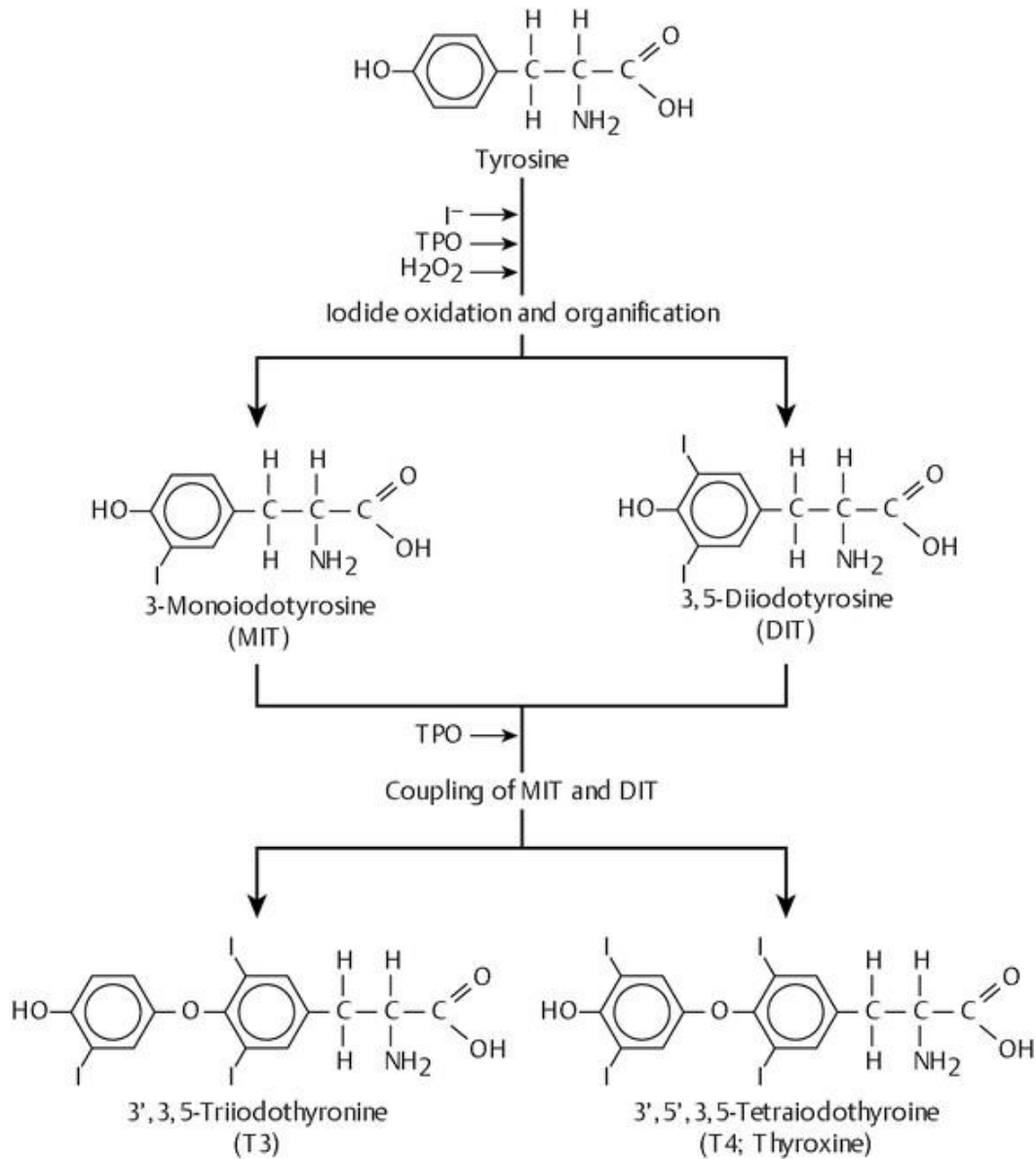


Figure 4: Formation et structure des hormones thyroïdiennes. La TPO catalyse l'iodation des résidus tyrosine pour former la monoiodotyrosine (MIT) et la diiodotyrosine (DIT). Ainsi, qu'elle catalyse la réaction de couplage des MIT et DIT conduisant à la formation des hormones thyroïdiennes notamment, 3',4,5-triiodothyronine (T₃) et 3',5',3,5- Tétraiodothyronine (T₄) (Braunstein, G.D., 2022).

2.1.4. La NADPH oxydase thyroïdienne 'DUOX2'

Le gène qui code pour la DUOX2 est localisé sur le chromosome 15q15.3 et contient 34 exons dont 33 codent pour un ARNm de 6376 nucléotides. La DUOX2 est un polypeptide

de 1 548 acides aminés contenant un peptide signal de 26 acides aminés. La DUOX2 a une double homologie : la partie N-terminale possède une forte homologie avec la TPO et la partie catalytique montre une forte homologie avec la NADPH oxydase des phagocytes 'NOX2'. La DUOX2 appartient à la famille des NADPH oxydases. C'est une enzyme générant l' H_2O_2 de manière dépendante du Ca^{2+} et du nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADPH). La DUOX2 est localisée à la membrane apicale des thyrocytes constituant la principale source de génération de l' H_2O_2 nécessaire à l'organification de l'iodure médiée par la peroxydase thyroïdienne (TPO) (Citterio cintia, E., 2019).

2.2. La synthèse des hormones thyroïdiennes

La synthèse des hormones thyroïdiennes est stimulée par l'interaction de la TSH avec son récepteur (TSHR) (Shahid, M.A et al., 2019). Dans un premier temps, l'iodure (I^-) circulant dans le sang traverse la membrane plasmique basale des thyrocytes via l'activité du symporteur d'iodure de sodium (NIS), puis il passe dans la colloïde, grâce à l'activité de canaux localisés à la membrane apicale tels que la pendrine (PDS), l'anoctamine 1 et le ClC5 (Chloride channel-5) (Silveira, J.C, et al., 2015). En parallèle, la NADPH Oxydase DUOX2 génère de l' H_2O_2 activant directement la thyroperoxydase et cette TPO activée catalyse l'organification de l'iode décrite plus haut (Figure 5) (Shahid, M.A et al., 2019).

Les hormones thyroïdiennes libérées sont des hormones lipophiles, de ce fait, elles sont majoritairement trouvées sous forme liée avec des protéines sériques qui assurent leur transport vers leurs cibles tissulaires. Les protéines sériques comprennent la Thyroxin-Binding Globulin (TBG) qui transportent la majorité des HT (70%), la transthyretine (TTR), la Thyroxin Binding Prealbumine (TBPA) et l'albumine qui transportent moins des HT. Cependant, la fraction libre des HT constitue seulement 0,2% des hormones sécrétées (Shahid, M. A et al., 2018).

2.4. La régulation de l'hormonogénèse thyroïdienne

La synthèse des hormones thyroïdiennes est sous le contrôle de l'axe hypothalamo hypophysaire avec rétroaction négative des hormones thyroïdiennes (Figure 6). L'hormone thyrotrophine (TRH) sécrétée par l'hypothalamus stimule la libération de la thyrostimuline (TSH) par l'hypophyse antérieure (Visser, T.J, 2018). La TSH agit sur la thyroïde en interagissant avec ses récepteurs (R-TSH) couplés à la protéine G. Le R-TSH est localisé au niveau de la membrane basolatérale des thyrocytes. Il a la capacité d'interagir avec les sous types Gs et Gq de la protéine G α , ce qui active à la fois deux voies de signalisation intracellulaires, incluant les cascades cycliques de 3',5'-adénosine monophosphate (AMPC) et de phospholipase C (PLC) (Pereira, S. S et al., 2020 ; Koibuchi, N., 2018). L'activation de l'AMPC par l'intermédiaire de la protéine Gs, induit l'activation de la protéine kinase A (PKA). La PKA activée régule la capture de l'iode et la transcription des gènes impliqués dans la production des hormones thyroïdiennes, notamment, le symporteur d'iodure de sodium (NIS), la thyroglobuline (Tg) et la peroxydase thyroïdienne (TPO), via des mécanismes qui impliquent différents facteurs de transcription tels que TTF1(NKX2-1), TTF2 (FOXE1) et PAX8 (Visser T J, 2018).

Par ailleurs, l'activation de la PLC via la protéine Gq, induit l'hydrolyse de phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) en diacylglycérol (DAG) et en inositol 1,4,5-triphosphate (IP3). L'IP3 entraîne la libération du Ca²⁺ stocké dans le réticulum endoplasmique, qui active à son tour les protéines kinases dépendantes de la calmoduline (CaMK) (Pereira, S. S et al., 2020). Alors que, la DAG active la protéine kinase C (PKC). L'activation de CaMK et de PKC régule l'efflux apical de l'iode et la production de l'H₂O₂ (Visser, T.J, 2018).

La sécrétion de TSH est régulée par un mécanisme de rétrocontrôle négatif médié par les hormones thyroïdiennes. En effet, à des taux élevés, les HT libres se fixent sur leurs récepteurs situés dans les cellules thyrotropes et dans les neurones à TRH de l'hypothalamus

ce qui inhibe la synthèse et la sécrétion de TRH et de TSH (Figure 6) (Alkemade, A et al., 2005).

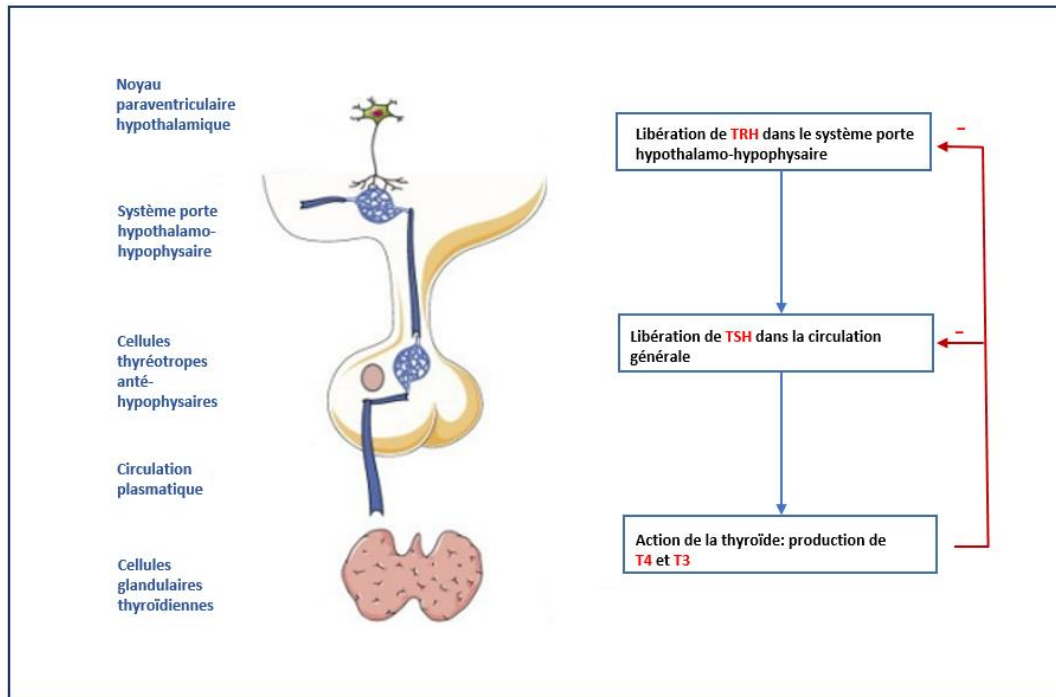


Figure 6: Régulation de la synthèse thyroïdienne par l'axe hypothalamo-hypophysaire. La synthèse des hormones thyroïdiennes est régulée par l'axe hypothalamo-hypophysaire médié par TRH (Thyrotropin-releasing hormone) et TSH (Thyroid-stimulating hormone) avec rétroaction négative des hormones thyroïdiennes T₃: tri-iodotyrosine et T₄: tétra-iodotyrosine.

Un autre élément clé du contrôle de la synthèse des hormones thyroïdiennes est l'iode, dont l'excès d'iodure inorganique plasmatique inhibe sa propre organification, ce qui évite la surproduction des hormones thyroïdiennes. Ce phénomène porte le nom de l'effet 'Wolff-Chaikoff' (Arrangoiz, R et al., 2018).

2.5. Le rôle des hormones thyroïdiennes

Les hormones thyroïdiennes jouent un rôle important dans plusieurs processus, elles sont essentielles à la croissance, au métabolisme, au développement neurologique et à la fonction cardiovasculaire (Mallya, M et al., 2018). Lorsqu'elles atteignent leur site cible, elles se lient à leurs récepteurs thyroïdiens alpha (TR α) et bêta (TR β) (Krashin, E et al., 2019) présents dans de nombreux tissus, notamment le foie, le cœur, le système nerveux central, les os, et le système digestif (Shahid, M.A et al., 2019). Elles ont pour effet d'accroître l'effet des catécholamines, aussi bien que de modifier le métabolisme de base (thermorégulation), ainsi que le métabolisme des glucides, des lipides et des protéines (Mallya, M et al., 2018).

3. Les pathologies thyroïdiennes

3.1. Le goître

Le goître est une augmentation du volume de la thyroïde, secondaire à une adaptation d'hypertrophie de la glande et d'hyperplasie cellulaire (Guitard-Moret, M et al., 2009), stimulée par des facteurs circulants, tels que la TSH et les auto-anticorps. L'hypertrophie peut également être causée par des modifications néoplasiques bénignes ou malignes et une infiltration de cellules inflammatoires ou malignes (Maniakas, A. et al., 2018). Il peut prendre soit l'aspect d'une hypertrophie diffuse, soit d'une hypertrophie localisée, ou bien un aspect mixte. Au début, le goitre se présente sous forme d'hypertrophie diffuse et homogène (Wémeau, J.L., 2010), appelé goitre simple (non toxique), et au cours du temps il peut y avoir le développement d'un ou de plusieurs nodules (non toxique ou toxique), on parle de goitre uni/multinodulaire (Guitard-Moret, M et al., 2009), qui peut être bénin ou malin, présentant une localisation cervicale, mais il peut par la suite développer une localisation intra thoracique et prenant ainsi le nom de goitre plongeant. L'apparition du goitre peut être due à des facteurs nutritionnels principalement une carence en iode, et l'ingestion de substances goitrigènes présentes dans les aliments, les eaux ou le carbonate de lithium, comme il peut être due à des facteurs génétiques et hormonaux (Maniakas, A. et al., 2018). Un goitre peut être associé à une hyperthyroïdie ou une hypothyroïdie et ou à une tumeur thyroïdienne. Le cancer de la thyroïde est détecté dans 10 à 15 % des goitres et jusqu'à 20 % dans les régions endémiques de goitre multinodulaire (Maniakas, A. et al., 2018).

3.2. L'hyperthyroïdie

L'hyperthyroïdie est un syndrome clinique caractérisé par un état d'hypermétabolisme dû à l'augmentation de la thyroxine sérique libre (T_4) et/ou de la triiodothyronine libre (T_3) (LiVolsi, V.A et al., 2018). Dans les zones suffisamment iodées, la cause la plus fréquente d'hyperthyroïdie est la maladie de Basedow (80% des cas) (De Leo, S et al., 2016). Cette maladie auto-immune est caractérisée par la production d'anticorps qui activent le récepteur de la TSH, ce qui entraîne une stimulation de la production de T_4 et de T_3 et un élargissement de la thyroïde (Bahn, R.S et al., 2011). Alors que dans les zones déficientes en iode, le goitre multinodulaire toxique et l'adénome thyroïdien solitaire représentent 50 % de tous les cas d'hyperthyroïdie (De Leo, S et al., 2016). Cependant, d'autres causes sont également impliquées dans l'hyperthyroïdie, tels que, la thyroïdite, l'hyperthyroïdie provoquée par l'iodure ou un médicament, et très rarement, une tumeur hypophysaire sécrétant la TSH (De Leo, S et al., 2016).

3.3. L'hypothyroïdie

L'hypothyroïdie est un état d'hypométabolisme résultant d'une déficience en T_4 et T_3 . Et on distingue :

- L'hypothyroïdie primitive caractérisée par l'incapacité de la thyroïde à produire des quantités adéquates d'hormones thyroïdiennes. Elle est due principalement à une thyroïdite auto-immune chronique (Thyroïdite lymphocytaire chronique ou maladie d'Hashimoto), dans laquelle la thyroïde est détruite par des anticorps ou des lymphocytes qui attaquent la glande (Dubbs, S.B et al., 2013). La carence en iode, le traitement à l'iode radioactif et le traitement chirurgical de l'hyperthyroïdie ou du cancer de la thyroïde, les maladies inflammatoires de la thyroïde et certains médicaments sont également à l'origine de cette cause (Stone, M.B et al., 2003).
- L'hypothyroïdie secondaire ou centrale est due à un déficit en TRH ou d'une altération de la sécrétion de TSH suite à une maladie hypothalamique ou hypophysaire, respectivement (Krishan, P et al., 2011). Elle est caractérisée par un fonctionnement thyroïdien normal.
- L'hypothyroïdie congénitale est détectée à la naissance, et résulte le plus souvent d'une carence en iode ou d'anomalies du développement à n'importe quel niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire-thyroïdien entraînant une dysgénésie thyroïdienne (80%). Cette dysgénésie thyroïdienne est majoritairement sporadique ou non héréditaire (Bowden, S. A et al., 2023). Des mutations au niveau des gènes codant pour les facteurs de différenciation thyroïdienne notamment, *TSHR*, *FOXE1*, *NKX2-1*, *PAX8* et *NKX2-5* sont trouvées impliquées dans la dysgénésie thyroïdienne (Macchia, P. E et al., 1998 ; Grasberger, H et al., 2011; Kostopoulou, E et al., 2021). Une autre cause d'hypothyroïdie congénitale est la dyshormonogénèse due à des mutations notamment au niveau des gènes codant pour des protéines impliquées dans la différenciation thyroïdienne, dans l'organification de l'iodure, la synthèse de la thyroglobuline, le transport de l'iodure et la dés-iodation de l'iodotyrosine, tels que *SLC5A5* (codant le NIS), *TPO*, *DUOX2*, *DUOXA2*, *SLC6A4/PDS*, *Tg* et *DEHAL1* (Grasberger, H et al., 2011; Wang, H et al., 2020; Kostopoulou, E et al., 2021). Cinq mutations du gène codant le NIS ont été identifiés chez des patients présentant une hypothyroïdie congénitale associé à une dyshormonogénèse, y compris deux mutations silencieuses (T221T et T557T), une mutation faux-sens (M435L) et deux polymorphismes (rs200587561 et rs117626343) (Fu, C et al., 2014).

3.4. Les cancers thyroïdiens

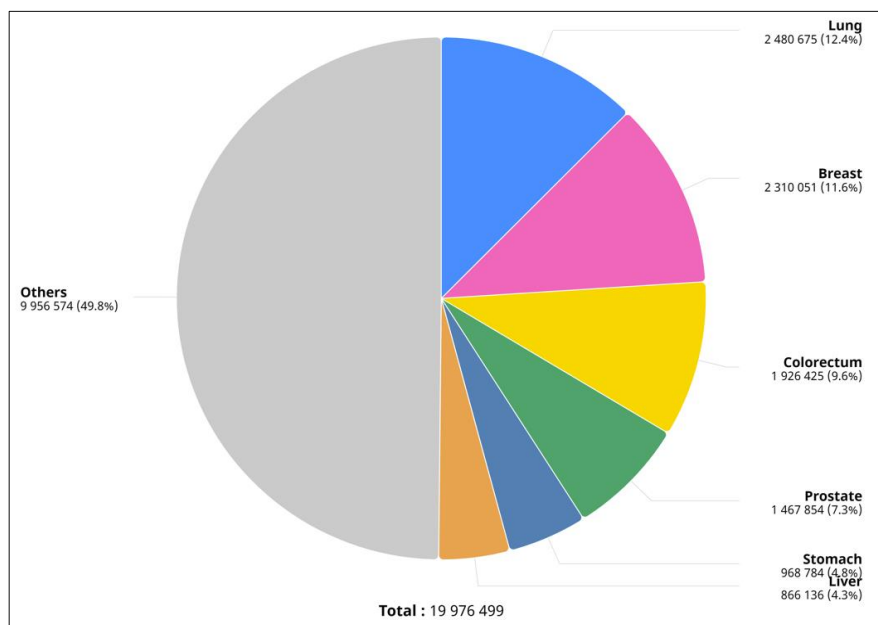
Il existe plusieurs types et sous-types histologiques de cancer de la thyroïde ayant différentes origines, caractéristiques et pronostiques cellulaires (Xing, M., 2013). Ces cancers peuvent provenir soit des cellules thyroïdiennes folliculaires, soit des cellules parafolliculaires. Les tumeurs dérivées des cellules thyroïdiennes folliculaires, notamment le cancer papillaire de la thyroïde (PTC), le cancer folliculaire de la thyroïde (FTC), le cancer thyroïdien peu différencié (PDTC) et le cancer anaplasique de la thyroïde (ATC), représentent la majorité des cancers malins thyroïdiens (> 90%). Le PTC et le FTC sont classés en tant que cancers différenciés de la thyroïde (DTC). Les formes dédifférenciées des PTC sont agressives. Finalement, le cancer médullaire de la thyroïde, dérivé de cellules C parafolliculaires, représente une faible proportion des tumeurs malignes de la thyroïde (Nettore, I et al., 2018).

II. Carcinome thyroïdien

1. Épidémiologie : (pour revue, voir ‘Sung, H et al 2021’)

Actuellement, selon les dernières estimations mondiales de l’incidence et de la mortalité en 2020, le cancer de la thyroïde est le plus fréquent des cancers des glandes endocrines (Figure 7, A) et représente le cinquième cancer chez la femme et le neuvième cancer chez les deux sexes dans le monde en termes d’incidence par rapport aux 36 types de cancers dans 185 pays (le rapport GLOBOCAN 2020 par l’IARC, *The International Agency for Research on Cancer*) (Figure 7, B). Les taux d’incidence les plus élevés se trouvent en Amérique du Nord, en Australie/Nouvelle-Zélande, en Asie de l’Est et en Europe du Sud pour les deux sexes, ainsi qu’en Micronésie/Polynésie et en Amérique du Sud pour les femmes. Cependant, les taux de mortalité par cancer de la thyroïde ont tendance à être beaucoup plus faibles et varient beaucoup moins géographiquement.

A.



B.

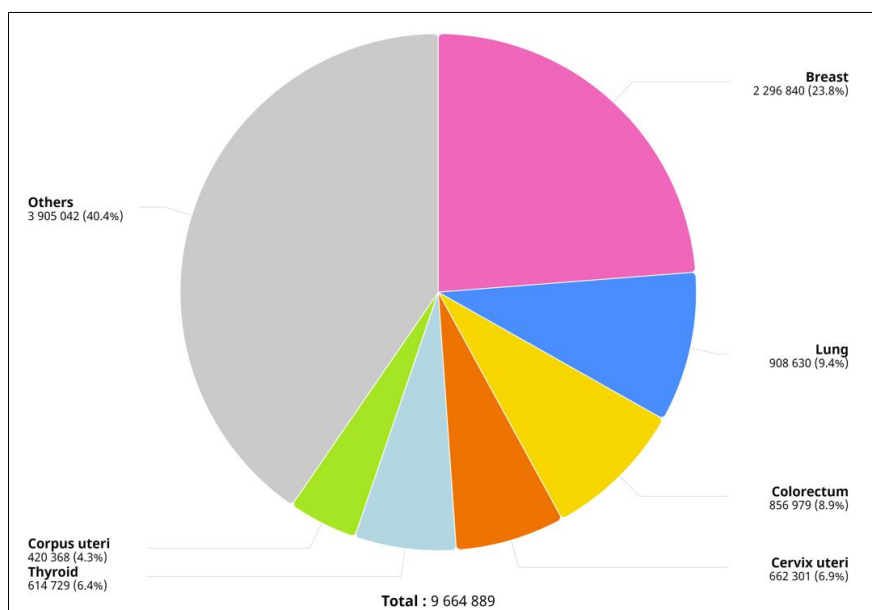
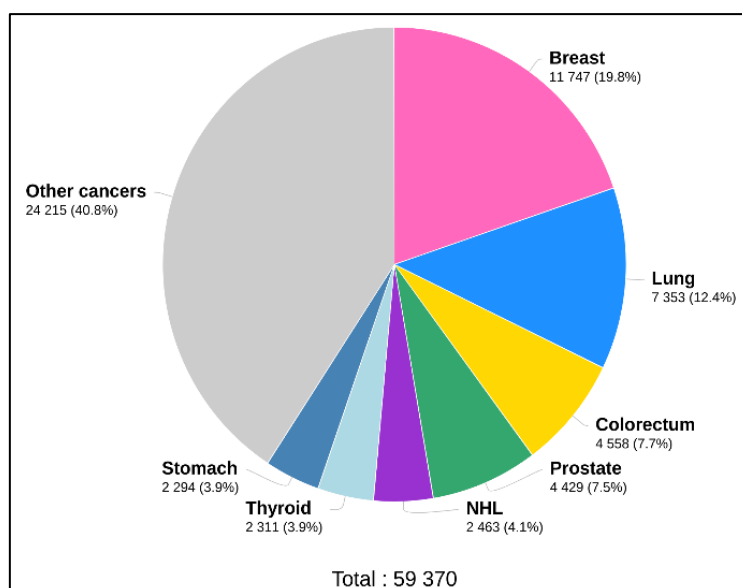


Figure 7: Nombre estimé de nouveaux cas en 2020 dans le monde. **A.** Tous cancers, hommes et femmes, tous âges. **B.** Tous cancers, femmes, tous âges (<https://gco.iarc.fr/>).

Au Maroc, le cancer de la thyroïde représente le sixième cancer en terme d'incidence avec un taux de 2 311 (3,9%) nouveaux cas estimés en 2020 (Figure 8, A), dont 85,7% survenant chez la femme où il est classé au quatrième rang des cancers après le cancer colorectal (Figure 8, B), avec un taux de 1 982 (6,6%) nouveaux cas versus 329 (1,13%) nouveaux cas chez l'homme. Tandis qu'en terme de mortalité, le cancer thyroïdien présente

des taux de mortalité moins importants comparativement aux autres cancers chez les deux sexes dont il représente un taux de 344 décès sur 35 096 décès.

A



B.

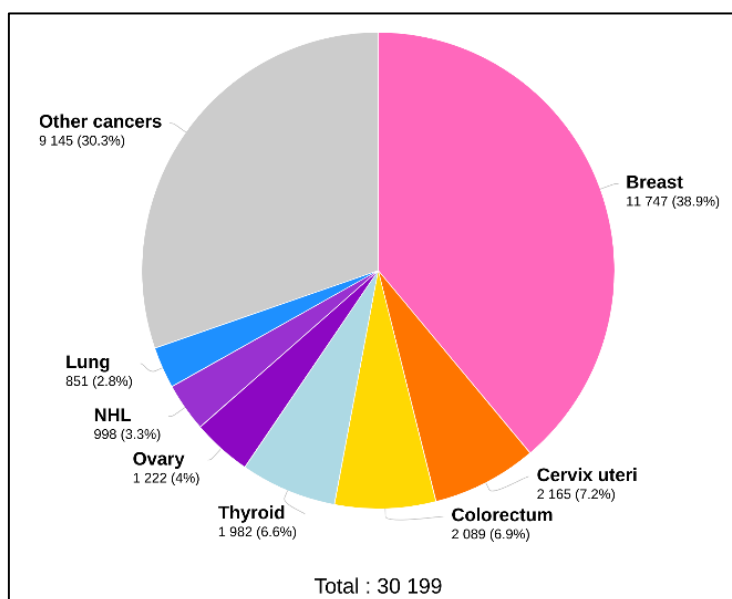


Figure 8: Nombre estimé de nouveaux cas en 2020 au Maroc. **A.** Tous cancers, hommes et femmes, tous âges. **B.** Tous cancers, femmes, tous âges (<https://gco.iarc.fr/>).

En France, le cancer de la thyroïde est le 10^{ème} cancer le plus fréquemment diagnostiqué, représentant près de 13109 nouveaux cas estimés en 2020 (3,1% du total), et le 5^{ème} cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez la femme après le cancer du col de l'utérus (Figure 9). L'incidence du cancer de la thyroïde est environ trois fois plus élevée chez la femme (78,3%) que chez l'homme (21,7%) avec un taux de 10274 (5,4%) nouveaux cas chez la femme versus 2835 (1,2%) nouveaux cas estimés chez l'homme. Alors que la mortalité par

cancer de la thyroïde est très faible par rapport à l'incidence (465 décès sur 184 636 décès) avec beaucoup moins de disparité entre les deux sexes. Cette prédominance peut être liée en partie aux hormones sexuelles féminines notamment, l'œstrogène qui agit probablement comme un promoteur de la croissance tumorale (Suteau, V et al., 2021; Tran, Q. L et al., 2023). Ainsi, les femmes ont une prévalence plus élevée de nodularité thyroïdienne que les hommes. D'autre part, la différence dans l'utilisation des soins de santé peut être une raison majeure pour laquelle le cancer de la thyroïde est plus souvent diagnostiqué chez les femmes que chez les hommes (Suteau, V et al., 2021; Tran, Q. L et al., 2023).

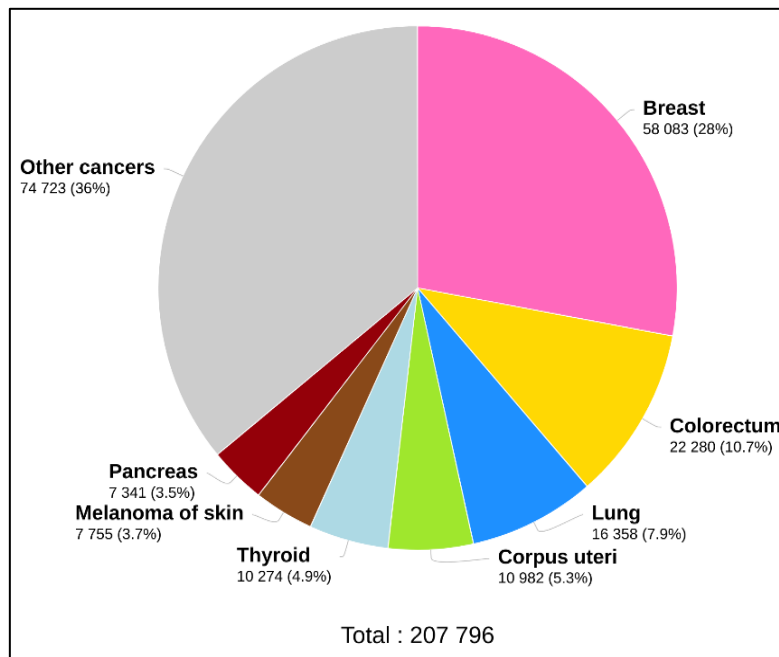


Figure 9: Nombre estimé de nouveaux cas en 2020 en France, tous cancers, femmes, tous âges (<https://gco.iarc.fr/>).

2. Classification histologique des cancers thyroïdiens d'origine folliculaire

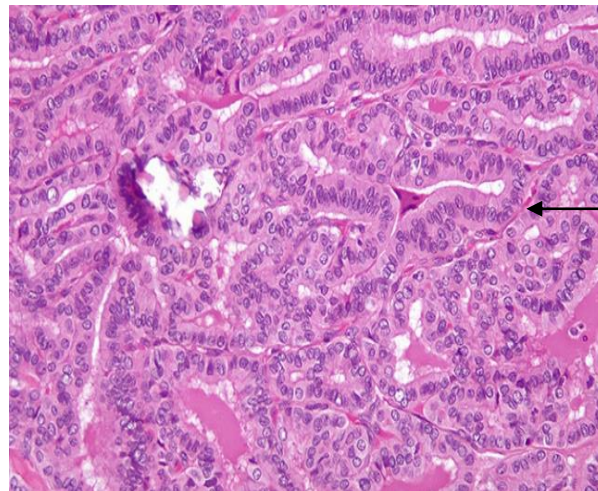
2.1. Carcinome papillaire de la thyroïde

Le carcinome papillaire de la thyroïde (PTC) est la forme prédominante du cancer de la thyroïde, représentant plus de 80% des cancers thyroïdiens. Il s'agit d'une tumeur maligne épithéliale présentant des signes de différenciation des cellules folliculaires. Il peut avoir une structure papillaire et/ou folliculaire tout en préservant un ensemble de caractéristiques nucléaires distinctives, qui comprennent l'élargissement, l'allongement, le chevauchement et la vitrosité du noyau, la clarification de la chromatine, les inclusions cytoplasmiques intranucléaires, le contour nucléaire irrégulier, les membranes nucléaires épaisses, les sillons intranucléaires, ainsi que les nucléoles situés de manière excentrique (Figure 10) (Limaiem, F et al., 2019). Le PTC peut être multifocale, et se présente majoritairement sous forme de nodules blanchâtres infiltrants qui peut envahir le tissu thyroïdien environnant et se propager

jusqu'aux ganglions lymphatiques locorégionaux avec une évolution lente et très peu de métastases à distance.

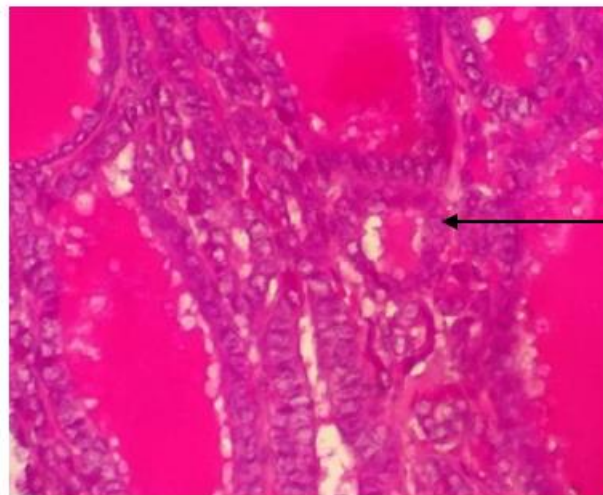
Le cancer papillaire de la thyroïde est environ 3 fois plus élevé chez les femmes que chez les hommes (Limaïem, F et al., 2019). Il peut survenir à tout âge, mais le risque atteint son maximum plus tôt chez les femmes (le plus souvent dans la quarantaine ou la cinquantaine au moment du diagnostic) que chez les hommes (Seib, C. D., and Sosa, J.A., 2018). Généralement, pour un âge de plus de 45 ans, la tumeur peut se trouver à un stade avancé, avec une histologie peu différenciée associée à des invasions extra-thyroïdiennes et vasculaires et des métastases ganglionnaires et à distance. Le PTC comprend plusieurs sous-types (variants) histologiques qui ont en commun des caractéristiques nucléaires spécifiques du PTC (Girardi, F. M et al., 2013 ; Juhlin, C. C et al., 2022). Les variants plus répandus sont la forme classique de PTC (C-PTC) qui représente plus de 50% des PTC et qui est caractérisé par une prédominance de papilles bordées de noyaux (Figure 10). Le variant folliculaire de PTC (F-PTC) qui représente jusqu'à 22% des PTCs, est constituée, quand à lui, de vésicules de tailles variables (Figure 10).

A.



Forme de papille

B.



Forme de follicule

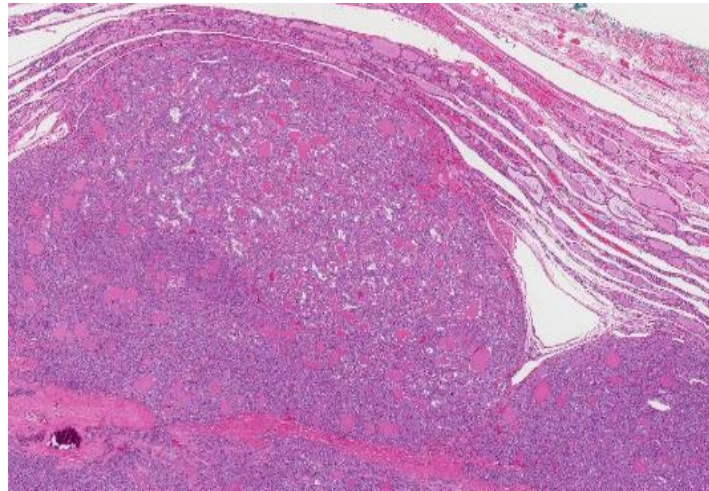
Figure 10: Images microscopiques des PTCs. Cette figure présente la morphologie des deux variants de PTCs. **A.** PTC de forme classique présentant des papilles bordés des noyaux. **B.** PTC de variant folliculaire présentant des vésicules de tailles variables (HMIMV de Rabat).

2.2.Carcinome folliculaire de la thyroïde

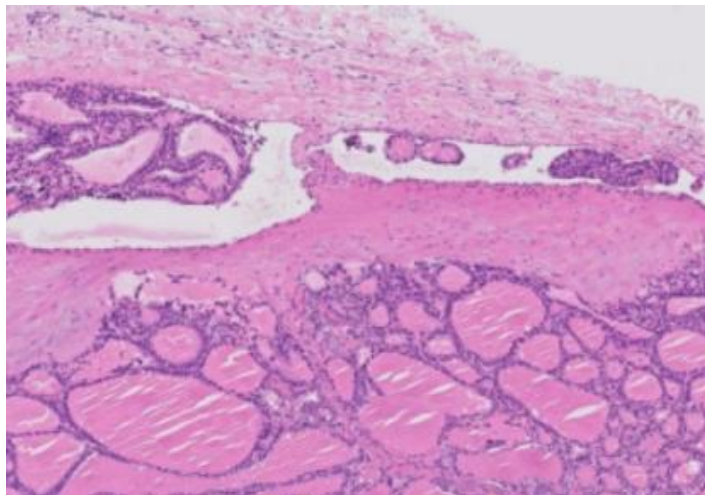
Les cancers folliculaires (FTC) représentent entre 5 à 15% des cancers thyroïdiens. Il s'agit des tumeurs épithéliales malignes différenciées sans les caractéristiques nucléaires papillaires. En fonction du degré d'invasion capsulaire et vasculaire, ces tumeurs sont subdivisées en trois sous-types : les FTCs mini-invasives présentant une invasion capsulaire uniquement, les FTCs angio-invasives encapsulées qui présentent une invasion vasculaire très limitée (moins de 4 vaisseaux atteints) et les FTCs largement invasives qui présentent une invasion étendue dans les vaisseaux sanguins (+ de 4 vaisseaux atteints) et/ou dans les tissus extrathyroïdiens (Figure 11) (Juhlin, C. C et al., 2023). Contrairement aux PTCs, la capacité des FTCs à se propager par voie hématogène peut donner naissance à des métastases à distance qui sont généralement pulmonaires et osseuses (Omar, B et al., 2022). Cependant, les tumeurs

FTCs mini-invasives ont un meilleur pronostic que celles largement invasives qui sont associées à une morbidité et une mortalité importantes. En effet, un mauvais pronostic des FTCs est lié à un âge plus avancé au moment du diagnostic (> 45 ans), une grande taille de la tumeur, au sexe masculin, aux métastases à distance et à la présence des adénopathies (Ríos, A et al., 2015).

A.



B.



C.

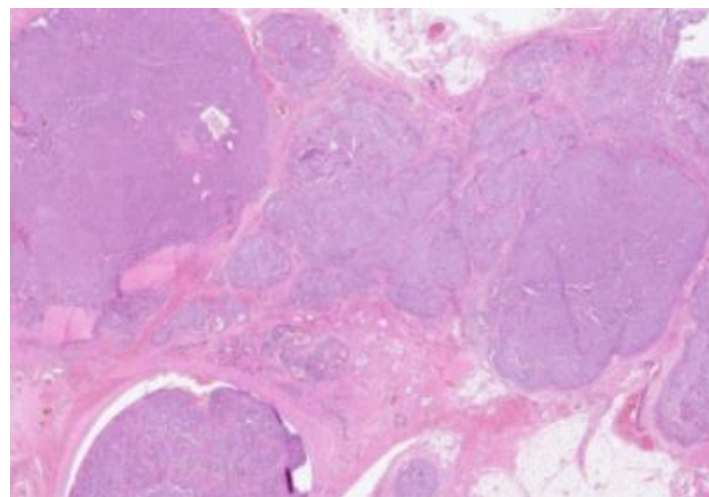


Figure 11: Aspects microscopiques de trois types de cancer thyroïdien folliculaire après coloration Hématoxine et Eosine (HE) au grossissement x20 **A.** FTC mini-invasive avec invasion capsulaire uniquement. **B.** FTC angio-invasive encapsulée avec une invasion vasculaire. **C.** FTC largement invasive. FTC : Follicular thyroid cancer (WHO 2022).

2.3. Carcinome anaplasique de la thyroïde

Les cancers anaplasiques de la thyroïde (ATC) sont des tumeurs malignes indifférenciées, représentant moins de 5% des cancers de la thyroïde (Limaïem, F et al., 2019). Ces tumeurs sont caractérisées par la perte de la structure histologique des cellules thyroïdiennes typiques dont elles conservent seulement quelques propriétés des cellules folliculaires. Les ATCs sont hautement infiltrants, avec une évolution rapide présentant souvent des métastases locorégionaux et extrathyroïdiens notamment au niveau des poumons, des os et du cerveau. Elles surviennent dans plus de 50% des cas à partir de l'évolution des carcinomes différenciés (FTC et PTC) grâce à une reprogrammation complexe de l'expression génique (Gugnoni, M et al., 2023). Les ATCs sont diagnostiqués majoritairement chez des personnes de plus de 60 ans dont 70% des cas sont des femmes. Cependant, la durée moyenne de survie est de cinq à six mois après le diagnostic et moins de 20 % des patients restent en vie un an après le diagnostic. La virulence des ATC réside dans la perte de l'expression du NIS et des gènes métabolisant l'iodure, ce qui induit la résistance à la radiothérapie métabolique rendant ainsi la tumeur radio-résistante.

3. Les mécanismes moléculaires impliqués dans la tumorigenèse des cancers thyroïdiens d'origine folliculaire

La carcinogenèse du cancer de la thyroïde est associée à des réarrangements chromosomiques notamment le réarrangement *RET/PTC* et le réarrangement *PAX8/PPAR γ* ou des mutations ponctuelles de proto-oncogènes tels que RAS ou BRAF, qui ont pour conséquence commune l'activation constitutive de la cascade de protéines kinases activées par des agents mitogènes (MAPK), jouant ainsi un rôle important dans l'initiation et la progression du cancer (Abdullah, M.I et al., 2019).

3.1. Altérations génétiques de la voie MAPK

3.1.1. Les réarrangements chromosomiques

i. Le réarrangement *RET/PTC*

RET (Rearranged during Transfection) est un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase jouant un rôle central dans différents processus physiologiques telles que la prolifération, la différenciation, la survie, la migration et le métabolisme cellulaire (Takahashi, M, 2022). L'interaction du ligand avec le domaine extracellulaire de RET favorise sa dimérisation ou oligomérisation et déclenche la phosphorylation des résidus tyrosine dans son domaine kinase (Abdullah M.I et al., 2019, Bhattarai, C et al., 2022). Une fois phosphorylé,

RET recrute des protéines adaptatrices et déclenchent l'activation des cascades de signalisation intracellulaires telles que RAS/MAPK et/ou PI3K/AKT (Takahashi, M., 2022).

RET n'est pas exprimé dans les thyrocytes et c'est le réarrangement *RET/PTC*, une fusion entre le domaine C-terminale du proto-oncogène RET (domaine à activité Tyrosine Kinase) et la partie N-terminale d'un partenaire de fusion (Younis E., 2017), qui est détecté dans les PTC, souvent avec un historique d'irradiation (Romei, C et al., 2012) . Cette fusion fait que le proto-oncogène RET est mis sous le contrôle transcriptionnel du promoteur du gène partenaire de fusion permettant ainsi une expression constitutive de la protéine chimérique RET/PTC dans les thyrocytes. Ceci conduit à une stimulation constitutive de la cascade de signalisation des MAPK (Abdullah M.I et al., 2019). De plus, ce réarrangement *RET /PTC*, qui peut entraîner la suppression des domaines juxtamembranaires intracellulaires du récepteur, du domaine de liaison au ligand extracellulaire et de la séquence signal, est à l'origine de la relocalisation de la protéine RET/PTC dans le cytosol, empêchant ainsi les interactions avec ses régulateurs négatifs (Abdullah M.I et al., 2019). Il existe différentes formes de réarrangements *RET/PTC* qui varient en fonction des différents partenaires de la fusion génétique (Tang, K.T et al., 2010). Parmi ces réarrangements, les *RET/PTC1* et *RET/PTC3* sont les plus courants, représentant plus de 90% de tous les réarrangements (Abdullah, M.I et al., 2019). Le réarrangement *RET /PTC1* (fusion de *RET* avec le gène *CCDC6 (D10S170)*) est associé aux carcinomes papillaires classiques et aux micro-carcinomes thyroïdiens, tandis que le réarrangement *RET/PTC3* (fusion de *RET* avec le gène *ELE1 (RFG ou ARA70)*) est associé aux tumeurs PTCs plus agressives (Nikiforov, Y. E, 2002).

ii. Le réarrangement *PAX8/PPAR γ*

Il s'agit d'une translocation interchromosomique qui se fait entre les fragments 2q13 et 3p25 (Krol, T. G et al 2000). Cette fusion implique la majeure partie du gène *PAX8*, un gène codant pour un facteur de transcription essentiel au développement et à la différenciation thyroïdienne et le gène *PPAR γ* (peroxisome proliferator-activated receptor), qui code pour un récepteur nucléaire contrôlant la transcription des différents gènes impliqués dans la différenciation, la prolifération et l'apoptose (Raman, P et al., 2014). Le gène néoformé code pour une protéine de fusion appelé PFFP (*PAX8/PPAR fusion protein*) contenant le domaine de liaison à l'ADN et une partie du domaine d'activation C-terminal de *PAX8*, ainsi que les domaines de liaison à l'ADN et au ligand (DBD, LBD) du *PPAR γ* (Krol, T. G et al 2000 ; Eberhardt, N. L et al 2010; Raman, P et al., 2014). Cette protéine de fusion conserve à la fois des propriétés du facteur de transcription *PAX8* et du récepteur *PPAR γ* ce qui lui permet

d'interférer avec les voies de signalisation faisant intervenir PAX8 et PPAR γ . Il a été démontré qu'elle joue un rôle important dans la tumorigenèse thyroïdienne en exerçant d'une part un effet dominant négatif sur l'activité transcriptionnelle de PPAR γ de type sauvage, qui se traduit par l'augmentation de la croissance cellulaire, la viabilité et l'indépendance d'ancrage (Au, A. Y et al., 2006 ; Espadinha, C et al., 2007 ; Lui, W. O et al., 2008), et d'autre part un effet positif en stimulant la transcription d'une variété de gènes de réponse aux facteurs PAX8 et PPAR γ , induisant ainsi une dérégulation des voies de signalisation médiées par ces derniers (Eberhardt, N. L et al 2010). Depuis sa première identification en 2000 par Krol T.G et al., le réarrangement *PAX8/ PPAR γ* s'est avéré associé principalement au cancer folliculaire de la thyroïde. Il est également retrouvé dans les adénomes folliculaires, le variant folliculaire du carcinome papillaire de la thyroïde (PTC) ainsi que très faiblement dans d'autres variants de PTC (Asya, O et al., 2022).

3.1.2. Les mutations de gène *RAS*

Le proto-oncogène *RAS* est une GTPase jouant un rôle important dans la transduction des signaux des récepteurs tyrosine kinase, couplés aux effecteurs des voies des MAPK et de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K-AKT) qui régulent la différenciation, la croissance et la survie cellulaire (Howell, G. M et al., 2013). Les mutations ponctuelles activatrices de *RAS* affectent, le plus souvent, les codons 12, 13 et 61 des 3 gènes *RAS* isoformes (*H-RAS*, *N-RAS* et *K-RAS*) (Lee, M.Y et al., 2017). Les mutations du codon 61 des gènes *H-RAS* et *N-RAS* sont les plus fréquentes dans les cancers thyroïdiens (Abdullah, M.I et al., 2019). Ces mutations agissent en bloquant l'activité GTPase de la protéine *RAS* la rendant constitutivement active, ce qui a pour conséquence une activation constitutive et aberrante des voies de signalisation MAPK et PI3K/AKT (Figure 13) (Nikiforov, Y. E et al., 2011).

Les mutations *RAS* surviennent dans 10% des cancers thyroïdiens, majoritairement dans les cancers folliculaires (40 à 50%). Elles sont trouvées également dans 10 à 20% des cancers papillaires de la thyroïde notamment de forme vésiculaire (Younis E., 2017) et très rarement dans les PTCs classiques (Hsiao, S. J et al., 2019). La présence des mutations *RAS* dans ces tumeurs bien différenciées peut être un élément prédisposant à la dédifférenciation et à la transformation anaplasique, où elles sont retrouvées dans 40 à 50% des ATCs (Nikiforov, Y. E et al., 2011 ; Hsiao, S. J et al., 2019). En plus de leur présence dans les tumeurs malignes, ces mutations sont également détectées dans les adénomes folliculaires, ce qui suggère un rôle dans les étapes précoces et progressives de la tumorigenèse thyroïdienne.

3.1.3. Les mutations de gène *BRAF*

La protéine BRAF est codée par le gène *B-RAF*, situé sur le chromosome 7q34 (Ikawa, S et al., 1988). L'isoforme principale est composée de 18 exons codants couvrant une région de 205601 paires de bases (pb) et codant pour 5 transcrits dont le transcrit principal possède 6459 pb et code pour une protéine de 766 acides aminés. BRAF partage une structure modulaire commune avec les autres isoformes de RAF (A-RAF et C-RAF), possédant trois régions conservées (CR1 et CR2 dans la partie N-terminale, CR3 dans la partie C-terminale) avec des fonctions distinctes (Roskoski Jr, R., 2010). CR1 est composé d'un domaine de liaison RAS (RBD), qui interagit avec la protéine RAS et avec les phospholipides membranaires, ainsi que d'un domaine riche en cystéine (CRD), qui constitue un site secondaire de liaison à la protéine RAS et un site d'auto-inhibition de RAF en interagissant avec le domaine kinase (KD) (Ghosh, S and al., 1994 ; Tran, N.H and al., 2005). CR2, qui contient un domaine riche en sérine/thréonine, sert de site inhibiteur de phosphorylation (pS365) qui participe à la régulation négative de la liaison RAS et de l'activation de RAF en interagissant avec les protéines 14-3-3 (Dhillon, A.S et al., 2002). Enfin, CR3, quant à lui, code le domaine kinase et contient le segment d'activation et les sites régulateurs de phosphorylation se liant aux protéines 14-3-3 (pS729) (Figure 12). De plus, la région CR3 comprend l'interface dimère (DIF), un ensemble hautement conservé de résidus d'acides aminés (motif RKT) essentiels à la dimérisation (Chong, H et al., 2001 ; Lavoie, H et al., 2015) (Figure 12).

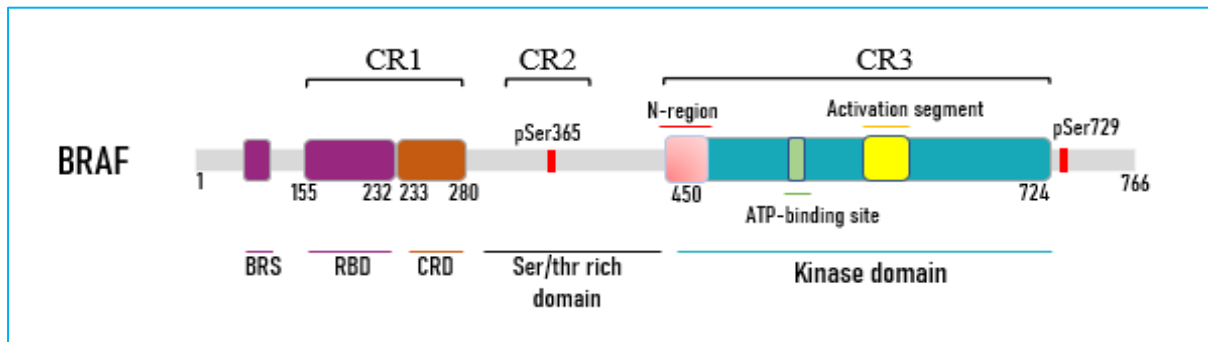


Figure 12: Représentation schématique de la structure de BRAF. La structure de BRAF comporte trois régions conservées (CR1, CR2, CR3) ; CR1 contient un domaine de liaison RAS (RBD) et un domaine riche en cystéine (CRD). CR2 contient un domaine riche en sérine/thréonine et CR3 possède le segment d'activation et le site de liaison à l'ATP. Abbreviations : BRS, BRAF-specific domain; RBD, RAS-binding domain; CRD, cysteine-rich domain.

BRAF est une sérine-thréonine kinase, transloquée à la membrane cellulaire où elle interagit avec la protéine RAS qui l'active. L'activation du site catalytique de BRAF conduit à la phosphorylation/activation des protéines substrats MEK1/2 qui à leur tour activent les protéines ERK1/2 par phosphorylation. ERK activé phosphoryle alors une variété de cibles

protéiques qui assurent diverses activités physiologiques en fonction des besoins cellulaires, notamment, la prolifération, la différenciation et la mort cellulaire programmée. Après un temps de réponse approprié, la forme phosphorylée de ERK (pERK) induit une rétroaction négative qui perturbe les interactions RAS/BRAF et la formation de dimères (BRAF/CRAF) (Lake, D et al., 2016). Ainsi, pERK phosphoryle les protéines responsables de l'activation de RAS et des interactions RAS/BRAF (protéines adaptatrices, facteurs d'échange et protéines activatrices de la GTP hydrolase) (Lake, D et al., 2016). Cependant, ERK déstabilise la formation des dimères par la phosphorylation de BRAF au résidu Thr753 du domaine kinase induisant, par conséquent, une diminution de l'activité kinase de BRAF (Brummer, T et al., 2003 ; Yao, Z et al., 2015).

L'importance de la protéine BRAF en tant que puissant activateur de la voie de la signalisation MAPK a été mise en évidence par la fréquence des mutations BRAF dans différents types de cancers humains tels que le mélanome (27-67%), le cancer de la thyroïde (36-69%), et le cancer colorectal (1 à 17 %), par rapport aux deux autres isoformes du RAF qui sont rarement mutées dans les cancers (Davies, H et al., 2002). Les mutations BRAF ont été subdivisées en deux classes : la première classe correspond à un monomère constitutivement actif, indépendant de RAS avec une activité BRAF kinase élevée impliquant le codon 600 (V600E), la deuxième classe comprend des dimères constitutivement actifs également indépendants de RAS avec une activité BRAF kinase élevée ou intermédiaire impliquant des codons autres que le codon 600 (par exemple : K601E, K601N, K601T, L597Q, L597V, G469A, G469V, G469R, G464V) (Yao, Z et al., 2015 ; Yao, Z et al 2017 ; Lokhandwala, P.M et al., 2019).

Parmi toutes ces mutations, BRAF^{V600E} est la plus fréquente, représentant environ 90 % des mutations BRAF identifiées dans les cancers humains (Agrawal, N et al., 2014; Hong, S et al., 2022). Cette mutation correspond à une transversion de la thymine en adénine à la position nucléotidique 1796 (T1796A) entraînant une substitution de la valine par l'acide glutamique au niveau du résidu d'acide aminé 600 (V600E) (initialement désigné comme V599E), dans le segment d'activation de BRAF dans l'exon 15 (Davies, H et al., 2002). Cette substitution a pour conséquence une activation constitutive de l'oncogène BRAF, qui entraîne ainsi une stimulation constitutive de la voie de signalisation MAPK (Figure 13).

La mutation BRAF^{V600E} est majoritairement identifiée au sein du PTC à cellules hautes (80%) et de forme classique (60%), et moins identifiée dans le PTC de forme vésiculaire (10%) (Younis E., 2017). Elle est également détectée dans 20 à 40 % des ATCs (Nikiforov, Y. E et al., 2011).

Dans le cancer papillaire de la thyroïde, BRAF peut être activé également lorsqu'il est exprimé sous la forme d'une protéine de fusion issue du réarrangement chromosomique AKAP9/BRAF (Ciampi, R et al., 2005 ; Nikiforov, Y. E et al., 2011). Ce réarrangement est une inversion paracentrique du chromosome 7q entraînant une fusion entre la partie codant pour le domaine protéine kinase du gène BRAF et le gène AKAP9. Cette fusion entraîne une activation constitutive de BRAF, indépendante de RAS, avec une stimulation chronique de la voie MAPK (Ciampi, R et al., 2005 ; Nikiforov, Y. E et al., 2011).

3.2. Autres anomalies moléculaires

La protéine p53 codée par le gène *TP53*, est un suppresseur de tumeur impliqué dans la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN qui induit une variété de gènes cibles qui régulent l'arrêt du cycle cellulaire (Malaguarnera, R et al., 2007). La p53 est constituée de trois domaines fonctionnels majeurs : un domaine de transactivation N-terminal (TAD), un domaine d'oligomérisation (OD) C-terminal et un domaine de liaison à l'ADN (DBD). La majorité des mutations p53 se produisent dans le domaine DBD induisant l'inactivation fonctionnelle de p53 (Malaguarnera, R et al., 2007). Ces mutations sont majoritairement retrouvées dans le carcinome anaplasique de la thyroïde (ATC) avec une fréquence de 50 à 80% des cas (Donghi, R et al., 1993 ; Nikiforov, Y. E et al., 2011; Landa, I et al., 2016). Cependant, elles sont moins fréquentes dans les cancers peu différenciés de la thyroïde (PDTC) (10% des cas) et sont rarement détectées dans les cancers différenciés de la thyroïde (0,8% des cas) (Nikiforov, Y. E et al., 2011; Landa, I et al., 2016). La fréquence des mutations p53 dans les ATCs comparativement aux PDTC et aux DTC suggère que ces mutations pourraient être associées au progression des cancers thyroïdiens différenciés vers des cancers peu ou non différenciés.

Cette progression des cancers thyroïdiens implique également l'accumulation de mutations dans d'autres gènes tels que le gène *CTNNB1* (catenin beta 1) codant pour la β -caténine, une protéine jouant un rôle crucial dans l'adhésion cellulaire et la signalisation WNT (Garcia-Rostan, G et al., 2001; Nikiforov, Y. E et al., 2011; Landa, I et al., 2016), les gènes *PIK3CA*, *PTEN* et *AKT1* codant pour des effecteurs de la voie de signalisation PI3K-AKT-mTOR. Les mutations *PIK3CA* sont retrouvées dans 10 à 20 % des cas des ATCs et des PDTCs, tandis que, les mutations *PTEN* et *AKT1* sont détectées dans environ 5 à 15% des ATCs et des PDTCs (Nikiforov, Y. E et al., 2011; Landa, I et al., 2016).

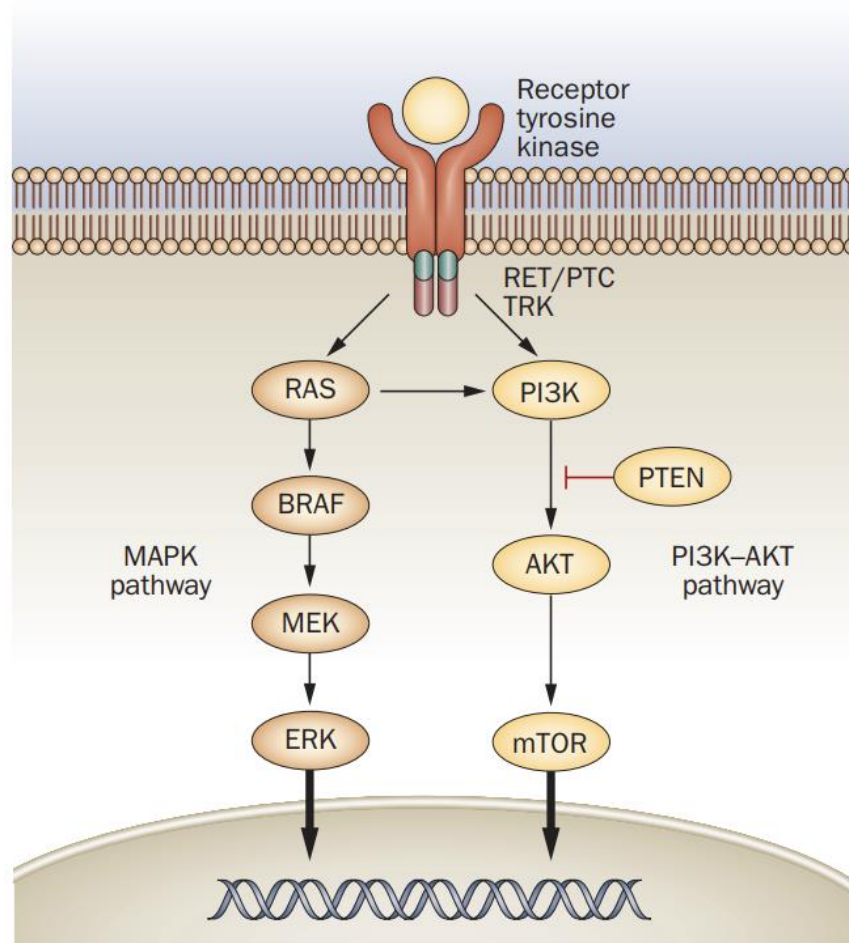


Figure 13 : Schéma récapitulatif des principales altérations génétiques impliquées dans les cancers différenciés la thyroïde. Les voies MAPK et PI3K-AKT sont les principales voies de signalisation impliquées dans la tumorigenèse thyroïdienne. Ces voies de signalisation jouent un rôle crucial dans divers mécanismes cellulaires tels que prolifération, la différenciation et la survie. La stimulation de la voie de signalisation MAPK par des protéines de fusion chimériques TRK et RET/PTC ou par les oncogènes BRAF et RAS mutés constitue un élément déclencheur de la carcinogénèse qui est couramment retrouvé dans les PTCs et certains FTCs. Cependant, les mutations des gènes codant pour les effecteurs de la voie PI3K- AKT tels que PIK3CA, AKT1 et PTEN, sont retrouvées majoritairement dans les FTCs et dans les types de cancer de la thyroïde moins différenciés (Nikiforov, Y. E et al., 2011).

3.3. Implication de la voie de signalisation TGF- β /SMAD

3.3.1. la signalisation TGF- β /SMAD

La famille du TGF- β (Transforming Growth Factor) est une superfamille de cytokines, constituée d'une variété de protéines, comprenant les TGF- β s (TGF- β 1, - β 2 et - β 3), les activines, les inhibines, l'hormone antimüllérienne (AMH), les protéines morphogéniques osseuses (BMP) ainsi que les facteurs de différenciation de croissance (GDF), les facteurs neurotrophiques dérivés des gliaux (GDNF) et nodaux (Poniatowski, Ł. A et al., 2015). La signalisation TGF- β joue un rôle important dans plusieurs processus physiologique telles que la croissance cellulaire, la différenciation, l'apoptose, l'invasion, l'angiogénèse et la réponse

immunitaire. Cependant, une telle dérégulation dans l'une de ces voies de signalisation médiées par ces protéines entraîne de nombreuses pathologies tels que la fibrose et le cancer (Poniatowski, Ł. A et al., 2015).

La protéine TGF- β est un homodimère constitué de deux polypeptides de 12,5 kDa liés par un pont disulfure. Elle est synthétisée dans les cellules en tant qu'un précurseur inactif, associé à un peptide appelé LAP (Latency associated peptide), formant ainsi un petit complexe latent (SLC : small latent complex) (Biernacka, A et al., 2011 ; Syed, V., 2016). Le complexe SLC se lie à la protéine de liaison latente formant ainsi un grand complexe latent dite (LLC : large latent complex). Le LLC est sécrété ensuite dans la matrice extracellulaire où il subira une protéolyse du LAP induisant la libération du TGF- β actif vers ses récepteurs (Biernacka, A et al., 2011 ; Syed, V., 2016).

Trois types de récepteurs TGF- β sont décrits dans la littérature : TGF- β RI, TGF- β RII et TGF- β RIII. Les récepteurs de type I et II sont des récepteurs dimériques à activité sérine/thréonine kinase, alors que le récepteur de type III n'a aucune activité kinase et agit comme un co-récepteur augmentant la liaison des ligands aux récepteurs de type I et II (Tzavlaki, K et al., 2020). Cette liaison initie l'activation de la voie de signalisation intracellulaire via la phosphorylation des protéines SMADS (Similar to the 'mothers against decapentaplegic' MAD). Selon leurs fonctions, les membres de la famille SMAD sont classés en trois groupes : 1) les SMADs régulées par les récepteurs 'Receptor Regulated SMADs : R-SMAD', notamment SMAD 1, 2, 3, 5 et 8, 2), les SMADs commun 'co-mediator SMAD : Co-SMAD' qui comprend un seul membre, SMAD4, et enfin 3) les SMADs inhibitrices 'Antagonistic or inhibitory SMADs : I-SMAD', qui comprennent SMAD 6 et 7 (Tzavlaki, K et al., 2020).

La TGF- β actif se lie dans un premier temps au TGF- β RII, qui phosphoryle les résidus sérine/ thréonine du récepteur TGF- β RI provoquant la formation d'un complexe hétérotétramère composé de TGF- β RI et de TGF- β RII (Syed, V., 2016 ; Tzavlaki, K et al., 2020). L'internalisation de ce complexe est médiée via des voies endocytaires clathrine et radeau lipidique-cavéole (Syed, V., 2016 ; Tzavlaki, K et al., 2020). La voie d'internalisation détermine si le complexe récepteur induira une réponse de signalisation ou une dégradation du récepteur. Dans la voie canonique, les récepteurs s'internalisent via des vésicules recouvertes de clathrine, qui sont dirigés ensuite vers les endosomes précoces. L'association des récepteurs TGF- β avec les protéines adaptatrices, notamment le récepteur SARA, et la forme cytoplasmique de la protéine de leucémie promyélocytaire cPML induit le recrutement des R-SMAD au complexe de récepteur TGF- β activé. Ce complexe des récepteurs activés

phosphoryle les protéines R-SMAD (SMAD2 et SMAD3), qui forment un complexe hétéromère avec SMAD4. Le complexe R-SMAD/SMAD4 se transloque dans le noyau où il régule l'expression de gènes cibles en interagissant notamment avec des facteurs de transcription, des coactivateurs et /ou des corépresseurs, permettant ainsi de contrôler des processus épigénétiques comme le remodelage de la chromatine (Figure14) (Syed, V., 2016 ; Tzavlaki, K et al., 2020). Cette cascade de signalisation est régulée par l'activité inhibitrice de la protéine I-SMAD (SMAD7) qui entraîne l'inactivation des R-SMAD via deux mécanismes. Après l'internalisation du complexe des récepteurs par endocytose médié par un radeau lipidique-cavéolaire, SMAD7 se lie au complexe des récepteurs, ce qui a pour conséquence d'inhiber la phosphorylation de R-SMAD (SMAD2 et SMAD3) et de bloquer ainsi la cascade de signalisation en aval du TGF- β . SMAD7 interagit également avec les E3-ubiquitine ligases, notamment Smurf1 ou 2, avec lesquelles il forme un complexe SMAD7/Smurf qui se déplace vers la membrane plasmique entraînant ainsi la dégradation protéasomale des récepteurs du TGF- β (Figure14) (Syed, V., 2016 ; Tzavlaki, K et al., 2020).

Dans la voie non canonique, le TGF- β peut activer d'autres voies de signalisation indépendantes des SMADs qui impliquent plusieurs kinases telles que RAS-RAF-MEK-ERK, NF κ B, TRAF6, p38/JNK et PI3K, entraînant divers effets biologiques (Figure14) (Syed, V., 2016 ; Tzavlaki, K et al., 2020).

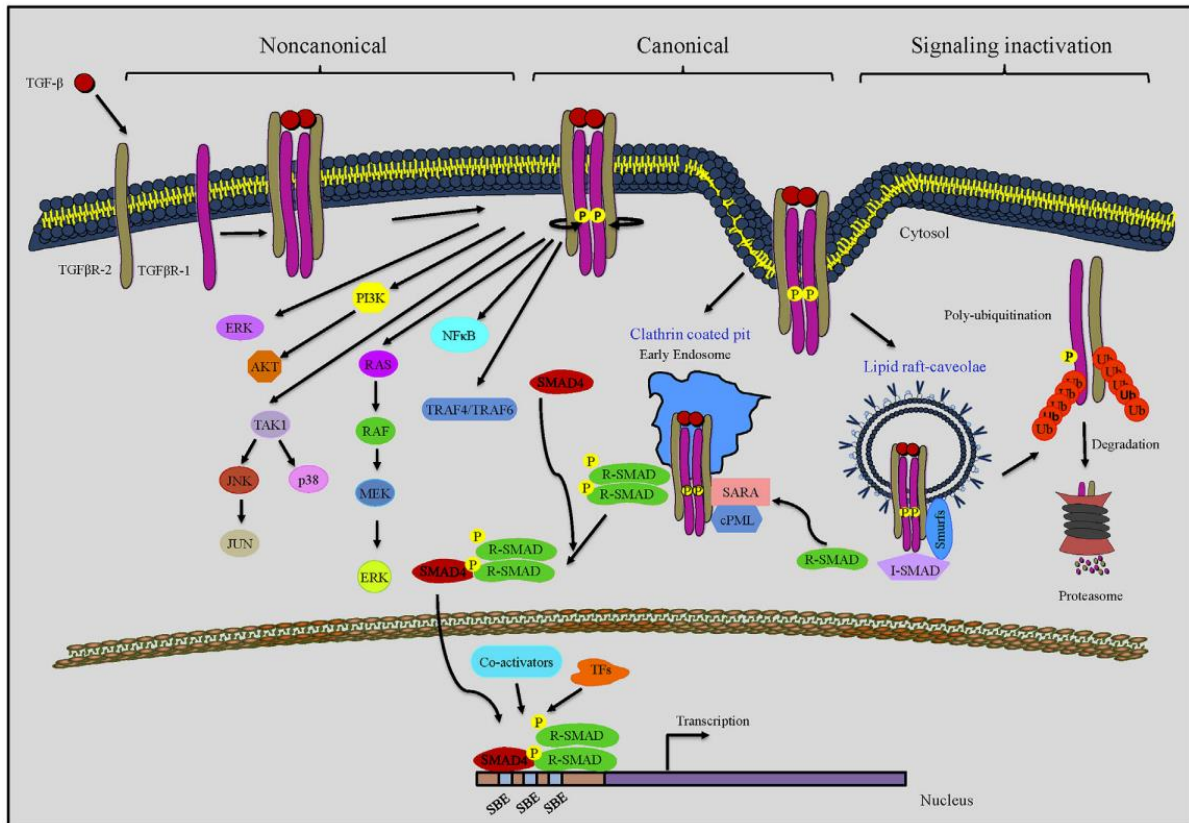


Figure 14: Voie de signalisation du TGF- β . Les étapes de la transduction du signal intracellulaire lors de l'activation de la voie de signalisation TGF- β : le ligand TGF- β actif, une fois lié au récepteur T β RII, entraîne la formation d'un complexe hétéro-tétramérique composé de TGF- β RI et de TGF- β RII. Dans la voie canonique, le complexe des récepteurs s'internalise d'une part via des vésicules recouvertes de clathrine, induisant le recrutement des R-SMAD au complexe des récepteurs et leur phosphorylation par ce dernier. Les R-SMAD phosphorylées forme un complexe hétéromère avec SMAD4 qui se déplace vers le noyau provoquant la régulation de gènes cibles. D'autre part le complexe des récepteurs activé s'internalise par endocytose médiée par un radeau lipidique-cavéole entraînant sa dégradation protéasomale par l'activité inhibitrice de SMAD7 qui recrute les ubiquitines ligases (Smurfs). Dans la voie non canonique, TGF- β peut activer plusieurs voies de signalisation, notamment MAPK, NF κ B, TRAF6, TAK1-p38/JNK et PI3K /AKT qui jouent un rôle primordial dans divers processus physiologiques (Syed, V., 2016).

3.3.2. Régulation de la fonction thyroïdienne par le TGF- β

Le TGF- β est normalement exprimé et sécrété par les thyrocytes, agissant comme un puissant inhibiteur de la croissance des cellules thyroïdiennes. Il a été démontré dans plusieurs espèces que le TGF- β 1 est un important régulateur négatif de l'expression des gènes spécifiques de la thyroïde. Dans les cellules thyroïdiennes de rat 'FRTL-5', le TGF- β 1 inhibe l'expression du NIS, en bloquant la voie de la protéine kinase A (PKA), ce qui entraîne l'inhibition de la captation de l'iode (Kawaguchi, A et al., 1997). Il inhibe également les expressions de la thyroglobuline (Tg) et du récepteur à la TSH (R-TSH). L'effet négatif de TGF β 1 sur l'expression de ces gènes pourrait être dû en partie par l'interaction physique de SMAD3 avec le facteur de transcription PAX8 diminuant ainsi la liaison de PAX8 avec les

séquences d'ADN impliquées dans la régulation du NIS, de la Tg et du R-TSH (Kang, H. C et al., 2001; Costamagna, E et al., 2004). Des effets similaires ont été observés dans les cellules thyroïdiennes porcines où le TGF- β 1 inhibe la formation d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC), l'absorption et le métabolisme de l'iodure, et la libération des hormones thyroïdiennes particulièrement T₄ (Delorme, N et al., 2002). Par ailleurs, le TGF- β 1 module l'organisation du cytosquelette et la distribution des protéines de la matrice extracellulaire en stimulant les expressions des protéines PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1), clusterine et trombospondine-1 dans les deux modèles cellulaires (Claisse, D et al., 2000 ; Wegrowski, Y et al., 1999 ; Garbi, C et al., 1990). Dans les cellules thyroïdiennes humaines, le TGF- β 1 inhibe la formation d'AMPC, l'absorption et l'organisation de l'iode, la sécrétion des hormones ainsi que les expressions de la thyroglobuline (Tg), de la peroxydase thyroïdienne (TPO) et du NIS (Mincione, G. et al., 2011). L'activité inhibitrice du TGF- β 1 ciblant les gènes métabolisant l'iodure, suggère un rôle de TGF- β dans l'autorégulation thyroïdienne.

4. Reclassification des PTCs

Les PTCs constituent un groupe hétérogène de cancers de la thyroïde, et leur diversité moléculaire et histologique constitue un défi majeur pour la prise en charge de ces tumeurs. Dans ce sens-là, une reclassification de ces cancers en sous-types moléculaires a été proposée par une étude qui porte sur une large cohorte de 496 PTCs (Agrawal, N et al., 2014). Cette étude est basée sur l'analyse des altérations somatiques détectées dans les PTCs afin d'identifier les altérations pilotes qui reflètent les caractéristiques des différents sous-types des PTCs. Cette reclassification est basée essentiellement sur les altérations génétiques affectant la voie MAPK, notamment les mutations BRAF^{V600E} et RAS muté (Agrawal, N et al., 2014). Les PTCs-BRAF^{V600E} ne répondent pas au rétrocontrôle négatif médié par ERK sur la protéine RAF, ce qui entraîne une stimulation constitutive de la voie signalisation MAPK. À l'inverse, les tumeurs porteuses de l'oncogène RAS y répondent, ce qui conduit à une stimulation plus faible de la voie de signalisation MAPK. Cette différence dans le niveau d'activation de la voie de signalisation MAPK induit de profondes différences phénotypiques tels que la répression des gènes responsables de l'absorption et du métabolisme de l'iode qui est fortement retrouvée dans les PTCs-BRAF^{V600E} comparativement aux PTCs-RAS mutés (Agrawal, N et al., 2014). Les PTCs sont divisés en deux groupes, PTCs-BRAF^{V600E} like (BVL) et PTCs-RAS like (RL) en se basant sur l'utilisation de deux scores; un score BRAF^{V600E}-RAS (BRS) et un score de différenciation thyroïdienne (TDS) (Agrawal, N et al., 2014). Le score BRAF^{V600E}-RAS (BRS) est élaboré à partir d'une analyse comparative de l'expression de 71 signatures entre les PTCs-

BRAF^{V600E} et celles RAS mutées. Tandis que, le score de différenciation thyroïdienne (TDS), est établi à partir d'une comparaison du niveau d'expression de 16 gènes responsables du métabolisme et de la fonction thyroïdienne. Cette étude a montré que les PTCs RAS like présentent un score de différenciation thyroïdienne (TDS) élevé, indiquant que ces tumeurs maintiennent un état différencié, tandis que les PTCs BRAF^{V600E} -like présentent un score de TDS moins élevé, indiquant que ce sous-type moléculaire est caractérisé par une dédifférenciation plus avancée qui est un signe d'agressivité et de la résistance à la radiothérapie métabolique (Agrawal, N et al., 2014).

III. Stress oxydatif et instabilité génétique et épigénétique

1. L'équilibre Redox

Les ERO sont des molécules dérivées de l'oxygène et peuvent être divisées en deux groupes : les radicaux libres tels que l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) et l'anion hydroxyle ($OH^{\cdot -}$), et les molécules non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le peroxynitrite ($ONOO^{\cdot -}$) (Ameziane El Hassani, R et al., 2016). Parmi ces ERO, Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) constitue une molécule importante, caractérisée par sa stabilité et sa capacité à traverser la membrane cellulaire par diffusion passive et/ou active via les aquaporines (AQP) (Ameziane El Hassani R et al., 2019). L' H_2O_2 peut générer le radical hydroxyl en présence du fer via la réaction de Fenton ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\cdot} + OH^-$) (Halliwell, B., 2006). Le radical hydroxyle ($OH^{\cdot}$) peut se produire également après la radiolyse de l'eau par les radiations ionisantes. Il est hautement réactif et capable d'endommager la plupart des biomolécules biologiques, y compris les acides aminés, les lipides, les sucres et l'ADN.

Ces molécules sont produites de manière endogène en tant que sous-produit naturel du métabolisme cellulaire normal de l'oxygène à travers divers systèmes enzymatiques, y compris la chaîne de transport d'électrons mitochondriale, les xanthine oxydases, la cytochrome P450 réductase, et l'oxyde nitrique synthase (Ameziane El Hassani, R et al., 2016). Elles peuvent également être induites par des sources exogènes telles que les rayons UV, les rayonnements ionisants, le mode de vie, l'alimentation, le stress et le tabagisme (Katerji, M et al., 2019). Les NADPH oxydases sont, quant à elles, des enzymes dont la fonction première est de produire les ERO. Cette fonction peut être altérée par les facteurs endogènes et exogènes que nous venons de citer.

L'équilibre Redox cellulaire est assuré grâce à la présence des différents systèmes antioxydants constitués à la fois des antioxydants enzymatiques tels que la catalase, la superoxyde dismutase « SOD », la glutathion peroxydase « GPx », la glutathion réductase «

GR », les peroxirédoxines « PRDX » et les thioredoxines « Trx », et des antioxydants non enzymatiques tels que l'ascorbate et le glutathion (Figure 15) (Ameziane El Hassani, R et al., 2019). Le maintien de cet équilibre (redox) est fondamental pour le bon fonctionnement des activités physiologiques (Katerji, M et al., 2019). Cependant, un déséquilibre de la balance redox soit par une défaillance des capacités antioxydantes ou par une augmentation des taux de ERO entraîne **un stress oxydatif**. Ce stress oxydatif peut aussi être causé par l'exposition aux radiations ionisantes ou suite à l'activation du système immunitaire en réponse aux infections (Gagné F., 2014 ; De Deken, X et al., 2014).

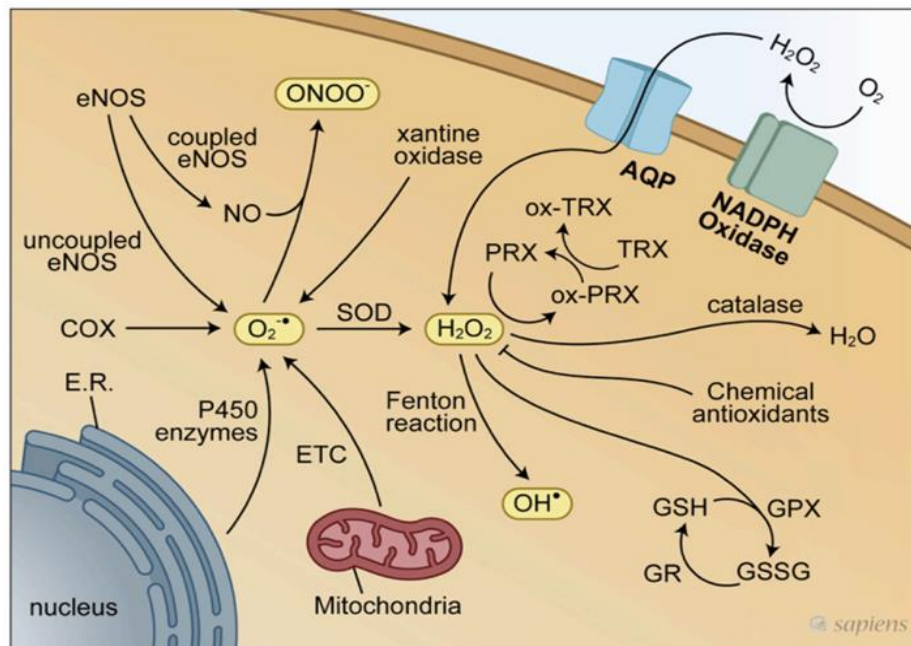


Figure 15 : Mécanismes cellulaires de la génération et de l'élimination des ERO. Représentation schématique de l'homéostasie redox des cellules eucaryotes. Les systèmes enzymatiques générateurs des ERO : eNOS, endothelial nitric oxide synthase ; COX, cyclooxygenase ; ETC, electron transport chain. Antioxydant enzymatic systems : SOD, superoxide dismutase ; GPx, glutathione peroxidases ; TRX, thioredoxine reductases ; PRDX, peroxiredoxins. Les ERO : $O_2^{\bullet -}$, superoxide anion ; $OH^{\bullet}$, hydroxyl radical ; H_2O_2 , hydrogen peroxide ; ONOO, peroxynitrite. Le H_2O_2 extracellulaire peut diffuser à travers des transporteurs membranaires spécifiques tels que les aquaporines (AQP) (Ameziane El Hassani, R et al., 2019).

2. Les NADPH oxydases

Les NADPH oxydases sont des enzymes membranaires qui appartiennent à la famille NOX/DUOX, dont la principale fonction est la synthèse des ERO ($O_2^{\bullet -}$ et H_2O_2) d'une manière étroitement contrôlée. L' $O_2^{\bullet -}$ peut dismuter spontanément ou à l'aide des SODs pour former du peroxyde d'hydrogène. Grâce à cette fonction et à leurs localisations dans divers tissus, les NADPH oxydases régulent diverses fonctions cellulaires importantes, telles que la défense immunitaire, la signalisation cellulaire et la synthèse des hormones thyroïdiennes (Tableau 1) (Ameziane El Hassani, R et al., 2016). Cette famille d'enzymes comprend sept membres, dont

cinq NADPH oxydases (NOX1, NOX2, NOX3, NOX4 et NOX5) et deux DUOX (DUOX1 et DUOX2) (Weyemi, U et al., 2013).

La NOX2 est la première NOX qui a été caractérisée, elle joue un rôle dans la réponse antimicrobienne des neutrophiles en générant le peroxyde d'hydrogène nécessaire à la production de l'acide hypochlorique (HOCl), qui contribue à la destruction des bactéries au sein des phagosomes (El-Benna, J et al., 2016). Tous les membres de la famille NOX ont six domaines transmembranaires contenant les deux régions de liaison à l'hème et une longue extrémité C cytoplasmique contenant les sites de liaison du FAD et du NADPH. En plus de cette structure commune, la NOX5 et les DUOX 1 et 2 possèdent des motifs EF-hands dans leurs domaines cytoplasmiques, permettant une régulation de la production des ERO de manière dépendante du calcium (Figure 16).

Pour créer un complexe NADPH oxydase actif, les NOXs 1 à 4 doivent être liées à une protéine membranaire p22^{phox} (phox= Phagocyte Oxidase). De plus, certaines NOXs requièrent des facteurs cytosoliques pour être actives. C'est le cas notamment de NOX2 qui requiert les protéines cytosoliques p47^{phox}, p67^{phox}, P40^{phox} et la protéine de liaison au Rac GTPase, et de NOX1 qui se lie aux protéines cytosoliques NOXO1 et NOXA1. Le rôle principal de ces sous-unités cytosoliques est d'impacter la structure tridimensionnelle de la NADPH oxydase en rendant les sites de liaisons du NADPH et FAD accessibles (Skonieczna, M et al., 2017).

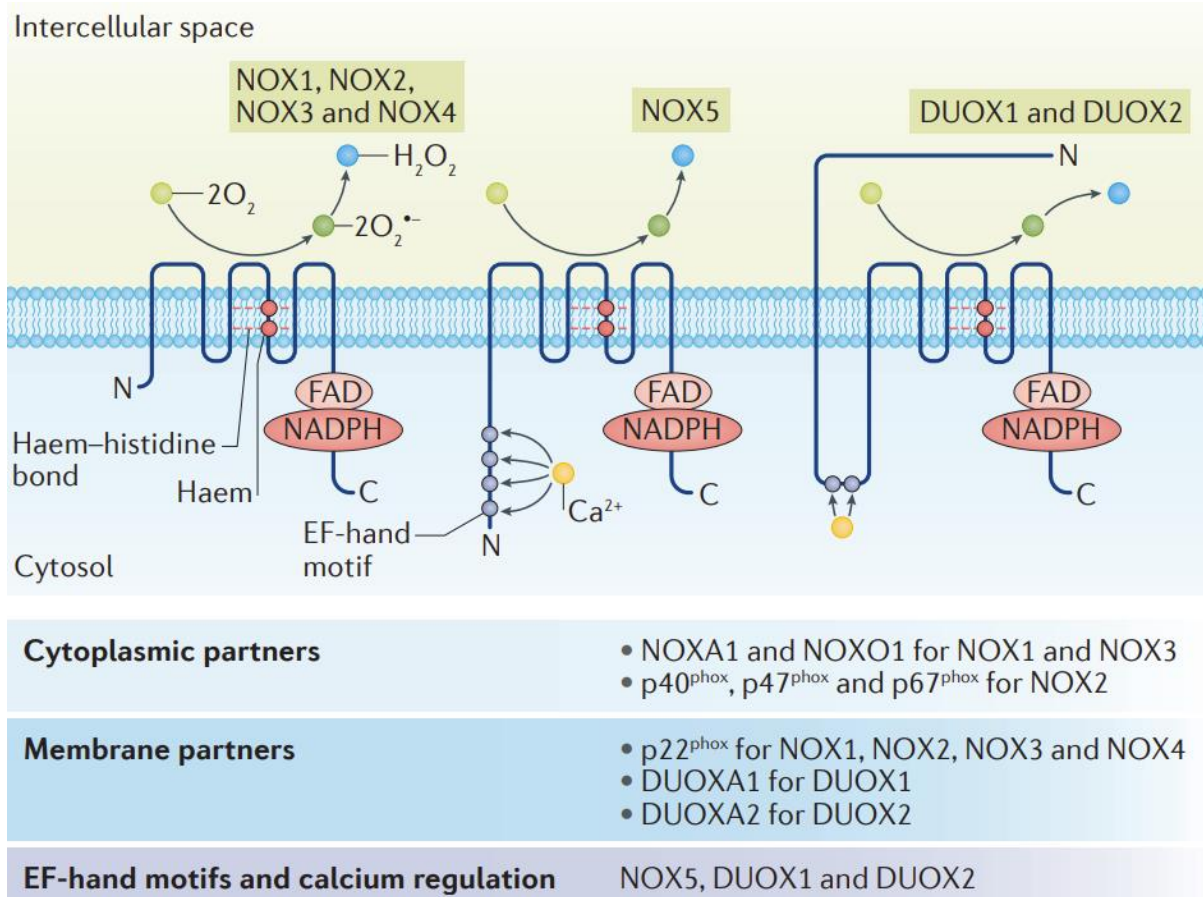


Figure 16 : La famille des NADPH oxydases. La famille des NADPH oxydases (NOX/DUOX) comprend sept membres : NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, la dual oxydase 1 (DUOX1) et la dual oxydase 2 (DUOX2). Ces enzymes oxydent le NADPH cytoplasmique et transfèrent deux électrons via le cofacteur redox (flavine adénine dinucléotide, FAD) et les deux hèmes transmembranaires afin de réduire les niveaux extracellulaires d'oxygène. Les noyaux catalytiques de toutes les NOX présentent une grande homologie, y compris des histidines de liaison de l'hème conservées (lignes rouges en pointillés) dans les troisièmes et cinquièmes domaines transmembranaires des NOXs et dans les quatrièmes et sixièmes domaines transmembranaires des DUOX et une grande homologie dans les sites de liaison FAD / NADPH. Le domaine N-terminal supplémentaire dans DUOX1 et DUOX2 présente également une homologie avec les peroxydases. NOX5 et les DUOXs ont des motifs EF-hand dans leurs domaines cytoplasmiques, qui sont impliqués dans la régulation de leur activité par le calcium. L'activation de certaines NADPH oxydases nécessite une liaison avec leurs partenaires membranaires et cytoplasmiques. Les partenaires cytoplasmiques : p40^{phox} (phox= Phagocyte Oxidase), p47^{phox} et p67^{phox} pour NOX2 et NOXA1(NOX Activator 1) et NOXo1(NOX Organizer 1) pour NOX3. Les partenaires membranaires : p22^{phox} pour NOX1-4 et DUOXA1(DUOX Activator 1) et DUOXA2 (DUOX Activator 2) pour DUOX1 et DUOX2 respectivement (Ameziane El Hassani, R et al., 2016).

Tableau 1 : Distribution tissulaire et rôles physiopathologiques des NADPH Oxydases NOX / DUOX (Ameziane El Hassani R et al., 2016)

NOX	ROS species	Tissue expression	Function	Involvement in human diseases
NOX1	$O_2^{\bullet-}$	Digestive tract, vascular system	Host defence, blood pressure regulation, proliferation of smooth muscle (speculative)	NA
NOX2	$O_2^{\bullet-}$	Phagocytes, vascular system	Host defence (verified), signalling (speculative)	Chronic granulomatous disease
NOX3	$O_2^{\bullet-}$	Inner ear	Otoconia formation (verified)	NA
NOX4	$O_2^{\bullet-}$ H_2O_2	Kidney, thyroid, vascular system, heart, skeletal muscle, fibroblast	Vasoregulation, signalling (speculative)	NA
NOX5	$O_2^{\bullet-}$	Lymph node, testis	Spermatogenesis (speculative)	NA
DUOX1	• Immature*: $O_2^{\bullet-}$ • Mature†: H_2O_2	Thyroid, respiratory tract, digestive tract, salivary glands, skin	Host defence, signalling (speculative)	NA
DUOX2	• Immature*: $O_2^{\bullet-}$ • Mature†: H_2O_2	Thyroid, respiratory tract, digestive tract, salivary glands	Thyroid hormone synthesis (verified), host defence (speculative)	Congenital hypothyroidism

NOX1 est également connue sous le nom ‘mitogene oxidase 1’ car sa première fonction identifiée était la croissance cellulaire. NOX4 est également appelé Renox (renal oxidase) car il a été identifié pour la première fois dans les reins. Les enzymes DUOX sont également appelées Thox (thyroid oxidase), car elles ont été identifiées pour la première fois dans la glande thyroïde. *Immature fait référence aux protéines en l’absence de leur facteur de maturation. † Mature fait référence aux protéines en présence de leur facteur de maturation. DUOX, dual oxidase; H_2O_2 , peroxyde d’hydrogène ; NA, not applicable; NOX, NADPH oxidase; $O_2^{\bullet-}$ anion superoxyde (Ameziane El Hassani, R et al., 2016).

❖ Les NADPH oxydases thyroïdiens

La glande thyroïde exprime trois NADPH oxydases : DUOX1, DUOX2 et NOX4, ainsi que leurs partenaires membranaires DUOXA1, DUOXA2 et p22^{phox} respectivement. DUOX1 et 2 sont fortement exprimées dans les conditions physiologiques de la glande thyroïde, localisées à la membrane apicale des thyrocytes et leur activation dépend de l’élévation des taux de calcium intracellulaire (Dupuy, C et al., 1999 ; De Deken, X et al., 2000 ; Ameziane El Hassani, R et al., 2005 ; Rigutto, S et al ; 2009). La DUOX2 est l’isoenzyme la plus exprimée et constitue la principale source de génération de l’ H_2O_2 nécessaire à la synthèse des hormones thyroïdiennes (Ameziane El Hassani R et al., 2016). Alors que le rôle physiologique de DUOX1 reste encore inconnu. Les deux DUOX présentent une similarité de séquence (Ameziane El Hassani et al., 2016), et contiennent en plus de six domaines transmembranaires de la famille NOX, une région intracellulaire supplémentaire contenant deux motifs (EF-hand) (impliquées dans la dépendance au calcium), précédée d’un septième segment transmembranaire qui se termine par un domaine N terminal extracellulaire possédant une forte homologie avec la peroxydase (De Deken, X et al., 2014). Les facteurs de maturation DUOXA2 et DUOXA1, sont nécessaires pour le transport intracellulaire de DUOX2 et de

DUOX1 à la membrane plasmique et régulent l'activité de ces enzymes (Figure 17) (Grasberger, H., et al., 2006).

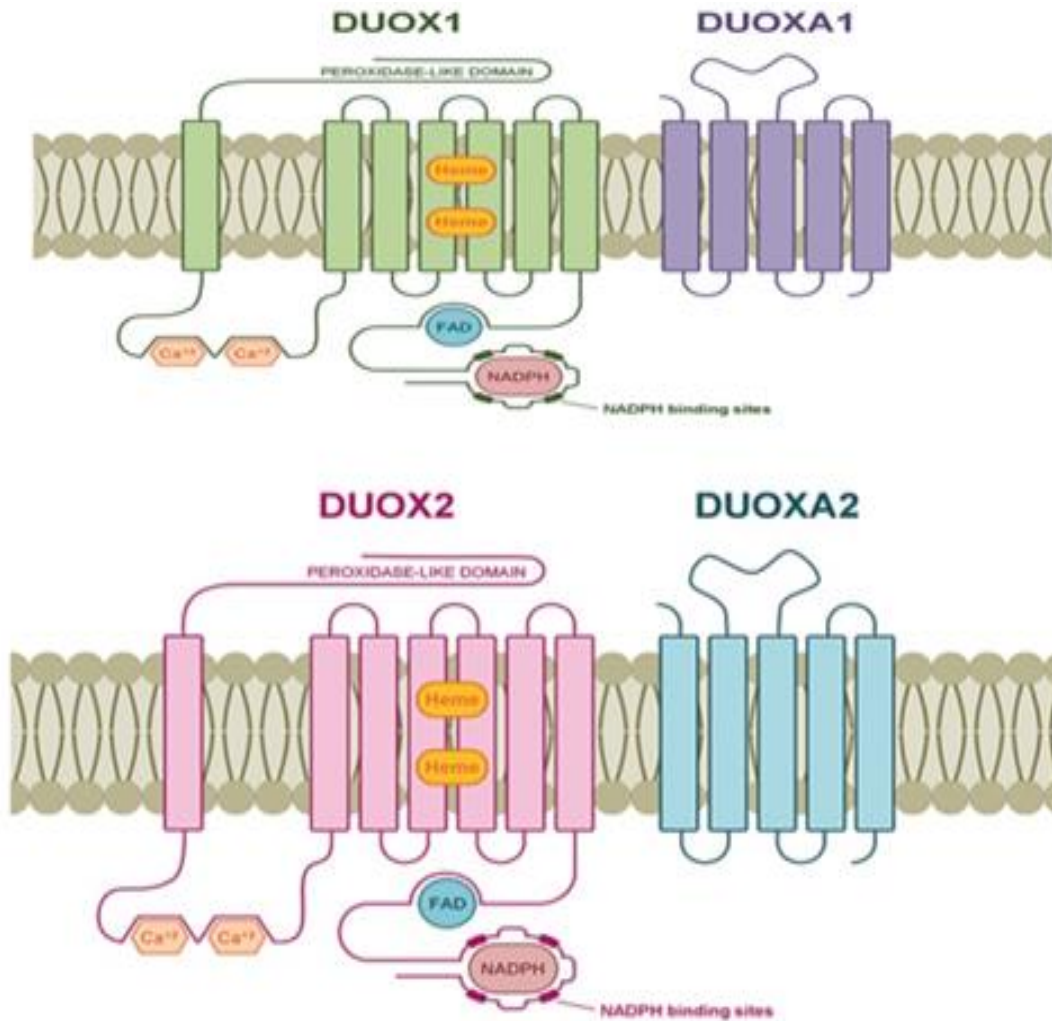


Figure 17: Schéma représentatif de la structure de DUOX1 et 2 avec leurs facteurs de maturation DUOX A1/A2. DUOX 1, Dual Oxidase 1; DUOX2, Dual Oxidase 2; DUOXA1, DUOX Activator 1; DUOXA2, DUOX Activator 2; FAD, flavine adenine dinucleotide (Carvalho, D.P et Dupuy C., 2013).

3. La dualité des ERO

Les ERO sont caractérisées par une double potentialité. A faibles concentrations, elles jouent un rôle important en tant que médiateurs et régulateurs dans les processus de signalisation cellulaire (oxydation réversible), tandis qu'à des concentrations élevées, elles constituent des produits potentiellement toxiques du métabolisme, en inactivant d'importantes molécules cellulaires (oxydation non spécifique et irréversible) (Di Meo, S et al., 2016 ; Migdal, C et al., 2011) (Figure 18).

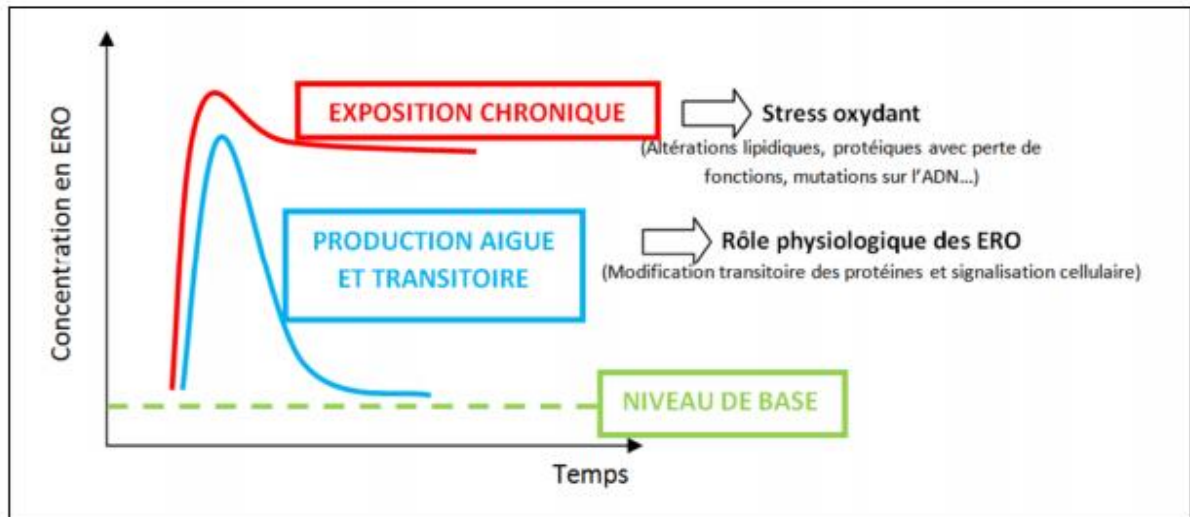


Figure 18: La dualité des espèces réactives de l'oxygène (Delattre, J et al., 2005).

4. Les effets délétères des ERO

En plus de leur participation dans plusieurs fonctions physiologiques, les espèces réactives de l'oxygène, à des concentrations élevées, entraînent un stress oxydatif, dont l'exposition chronique provoque des dommages au niveau de l'ADN, des lipides et des protéines, favorisant ainsi le déclenchement de nombreux processus pathologiques telle que la carcinogenèse (Therond, P., 2006).

- ♦ **Au niveau des protéines :** les ERO entraînent des modifications oxydatives dans la chaîne polypeptidique et les chaînes latérales nucléophiles ou redox sensibles des acides aminés (la cystéine, la tyrosine, et la méthionine). Ces dommages se traduisent par l'apparition des groupements carbonylés, des clivages de chaînes peptidiques et des ponts bi-tyrosine intra et inter-chaînes. La majorité de ces dommages ne sont pas réparables et provoquent ainsi des modifications fonctionnelles importantes telle que l'altération des activités enzymatiques (Therond, P., 2006 ; Halleng, J et al., 2007).

- ♦ **Au niveau des lipides :** Les lipides contenant des acides gras poly-insaturés (AGPI) représentent une cible privilégiée pour l'agression radicalaire. Ces lipides (huiles, graisses, membranes cellulaires, lipoprotéines) sont le siège de la peroxydation lipidique qui peut conduire à une désorganisation membranaire avec des modifications de la fluidité et de la perméabilité, avec pour conséquence l'inactivation d'un certain nombre d'enzymes et de récepteurs membranaires (Halleng, J et al., 2007).

- ♦ **Au niveau de l'ADN :** le stress oxydatif entraîne des modifications oxydatives au niveau des bases puriques et pyrimidiques conduisant à la formation de sites abasiques, de cassures simple brin, de bases désaminées et de bases adduites, ainsi que des modifications au niveau du squelette du désoxyribose (des oses) (Sedelnikova, O.A et al., 2010). Lorsque ces

dommages oxydatifs ne sont pas réparés, le matériel génétique va subir des modifications permanentes conduisant à l'arrêt ou l'induction de la transcription, à l'induction de voies de signalisation, à des erreurs de réplication et à une instabilité génomique, l'ensemble contribuant au déclenchement de la carcinogenèse (Valko, M et al., 2007). La lésion de l'ADN la plus étudiée est la formation de la base oxydante, la 8-oxo-2'-désoxyguanosine (8-oxo-dG), résultant de l'oxydation de la guanine qui est la base la plus sensible à l'oxydation du fait qu'elle possède le potentiel redox le plus bas (Boiteux, S et al., 2017). La 8-oxo-dG contrairement à la guanine, au lieu de s'apparier avec la cytosine, va s'associer avec l'adénine entraînant des mutations au sein de l'ADN, notamment, les transitions GC vers AT et les transversions GC vers TA après deux réplications (Halleng, J et al., 2007).

5. Stress oxydatif et les carcinomes thyroïdiens

Les ERO jouent un rôle crucial dans la synthèse des hormones thyroïdiennes, cependant au cours de cette synthèse, les cellules thyroïdiennes sont physiologiquement exposées à des taux élevés des espèces réactives de l'oxygène, ce qui rend la glande thyroïde l'un des organes les plus vulnérables aux effets délétères du stress oxydatif, favorisant ainsi la carcinogenèse thyroïdienne (Muzza, M et al., 2016). De ce fait, la relation entre le stress oxydatif et le cancer thyroïdien a été établie par des études qui ont montré une augmentation des ERO et une diminution des antioxydants dans le sérum des patients atteints du cancer de la thyroïde comparativement aux patients sains en se basant sur la mesure des paramètres du stress oxydatif notamment, le statut antioxydant total (TAS), le statut oxydant total (TOS), et l'indice de stress oxydant (OSI) (Wang, D et al., 2011). Une augmentation de l'activité génératrice de H_2O_2 indépendante du calcium a été également observée dans les PTCs (principalement ceux qui ont un statut BRAF/ RAS mutés), par rapport aux tissus normaux (Muzza, M et al., 2016). De plus, l'analyse de l'expression des deux molécules antioxydantes dépendantes du sélénium : la glutathion peroxydase (GPx1) et la thiorédoxine réductase (TrxR1) sont retrouvées considérablement réduites dans les tumeurs thyroïdiennes humaines comparativement au tissu thyroïdien normal (Metere, A et al., 2018). Cette dérégulation des antioxydants est associée à une augmentation du niveau de radicaux libres dans le tissu tumoral (Metere, A et al., 2018).

6. Les mécanismes de réparation des dommages oxydatifs

6.1. La réparation par excision de base (BER)

La réparation par excision de base (BER) est l'une des principales voies de réparation des dommages oxydatifs de l'ADN (Christmann, M et al., 2003; Nakabeppu Y., 2014 ; Fayyad, N et al., 2021). Le BER est initié par une ADN glycosylase : OGG1 (8-oxoguanine DNA

glycosylase-1) qui reconnaît et élimine la base oxydée, entraînant l'apparition d'un site apurinique-apyrimidinique (AP).

Ensuite, l'endonuclease APE 1 (endonuclease apurinique/apyrimidinique 1) clive la liaison 5'phosphodiester générant une cassure simple brin avec des terminaisons 3' hydroxyle et 5'deoxyribose-5-phosphate (5'dRP). Cette cassure peut être réparée par deux principales sous-voies avec une cinétique différente, impliquant l'intervention des différents effecteurs. Ces voies sont appelées « short patch-BER » qui répare un seul nucléotide et « long patch-BER » qui répare 2 nucléotides ou plus. Elles agissent en remplaçant le site abasique par l'ajout de nucléotides grâce à l'action des enzymes ADN polymérases telle que l'ADN polymérase β (pol β) et la ligature de coupure via des ADN ligases (Figure 19) (Christmann, M et al., 2003; Nakabeppu, Y., 2014 ; Fayyad, N et al., 2021).

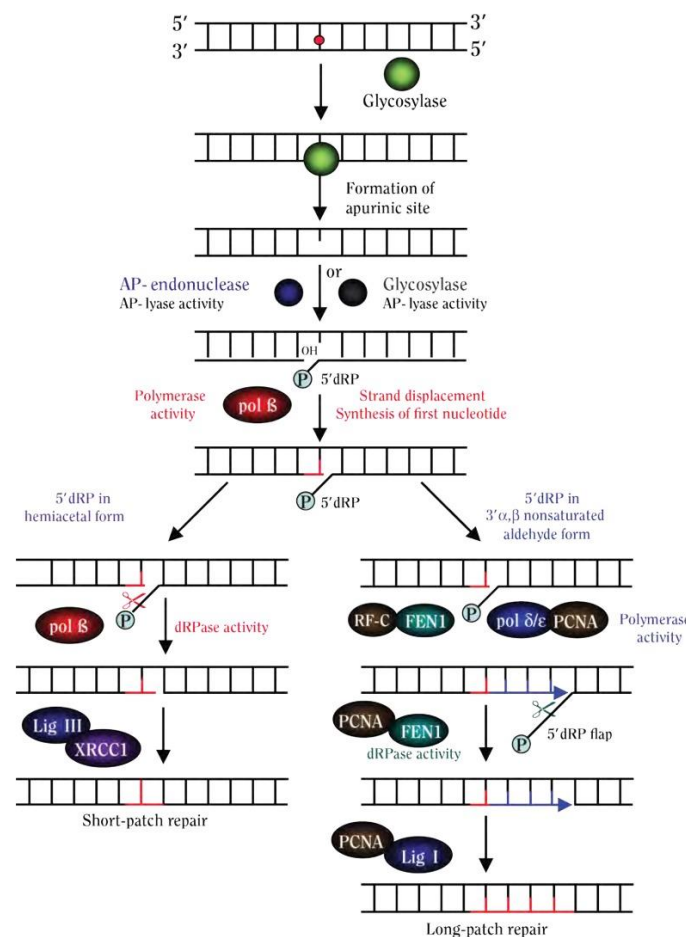


Figure 19 : Mécanisme de réparation par excision de base (BER). BER implique deux sous-voies (Short patch repair and long-patch repair). Les deux impliquent la reconnaissance et l'incision des lésions via des glycosylases et/ou une endonucléase AP, une polymérisation via une activité polymérase et une ligature via des ADN ligases. AP : apurinic/apyrimidinic; 5'dRP : 5'-deoxyribose phosphate; pol : polymérase; OH: hydroxide; Lig : ligase; dRPase : DNA deoxyribophosphodiesterase; P : phosphate; XRCC1 : x-ray repair cross-complementation group 1; FEN1 : flap endonuclease 1; RF-C : replication factor C; PCNA : proliferating cell nuclear antigen (Fayyad, N et al., 2021).

6.1.1. OGG1

C'est une enzyme bifonctionnelle caractérisée par une activité ADN glycosylase, capable de couper la liaison N-glycosylique entre le fragment désoxyribose et la guanine oxydé (G^{ox}) en laissant un site apurinique-apyrimidinique (AP), et une activité AP lyase lui permettant de cliver le phosphodiester 3' du site AP par une β -élimination. Elle est codée par le gène *OGG1* (*8-oxoguanine glycosylase1*), localisé au niveau du chromosome 3p25, caractérisé par sept formes d'ARNm épissées de manière alternative, classées en deux types basés sur leurs derniers exons (type 1 avec l'exons 7 : 1a et 1b ; type 2 avec l'exons 8 : 2a- 2e). Cependant, les types 1a et 2a sont les principaux transcrits d'*OGG1* dans divers tissus humains et codent pour l'OGG1-1a et l'OGG1-2a (Nakabeppu, Y., 2014). La protéine OGG1-1a a un signal de localisation nucléaire à son extrémité C-terminale et se situe donc dans le noyau. Tandis que la protéine OGG1-2a, a une région C-terminale unique composée de deux régions distinctes, une région acide (résidus d'acides aminés Ile345 à Asp381) et une région hydrophobe (les 20 derniers résidus), et se situe exclusivement dans la mitochondrie, bien que les deux partagent le signal de ciblage mitochondrial N-terminal (MTS) (Boiteux, S et Radicella, J.P., 2000).

En plus de son activité glycosylase, OGG1 est impliquée dans la régulation de la transcription génique. En se liant à la 8-oxoG située dans des régions régulatrices des gènes, OGG1 interagit avec les substrats, induisant des changements de conformation dans les séquences d'ADN adjacentes et facilitant l'accès des facteurs de transcription, ou recrutant des modificateurs/remodelateurs de la chromatine vers leurs sites de liaison. En outre, le complexe post-réparation formé entre OGG1 et son 8-oxoG augmente les niveaux de petites GTPases actives et induit des cascades de signalisation en aval pour déclencher des expressions géniques (Wang, R et al., 2018).

6.1.2. La réparation par la voie BER et cancer de la thyroïde

L'activité d'OGG1 peut être régulée par des interactions protéine-protéine, des modifications post-traductionnelles et par l'état redox cellulaire qui réduisent ou améliorent son activité (Ba, X et Boldogh, I., 2018). L'inactivation enzymatique de l'OGG1, sous l'effet du stress oxydatif, peut être considérée comme une cause majeure du cancer, suite à l'accumulation de 8-oxoG, et donc de plusieurs mutations dans l'ADN nucléaire et mitochondrial (Nakabeppu Y., 2014). En effet, 8-oxoG a tendance à se mésapparier avec l'adénine lors de la réplication entraînant l'apparition d'une mutation (Scott, T.L et al., 2014). les transitions GC vers AT et les transversions GC vers TA sont les mutations oxydatives les plus importantes (Wang, D et al., 1998).

Dans ce contexte, il a été démontré que les FTCs présentent des niveaux élevés de 8-oxoG comparativement aux tissus normaux (Young, O et al., 2010 ; Karger, S et al., 2012). Ainsi, Karger, S et ses collaborateurs ont montré une régulation négative de l'expression d'OGG1 dans les FTCs comparativement aux adénomes folliculaires de la thyroïde (FTA) (Karger, S et al., 2012). Cependant, les données sur l'expression d'OGG1 dans les PTCs sont moins claires et semblent controversées. Eng, Z. H et ses collègues montrent une corrélation positive entre l'expression d'OGG1 et les dommages oxydatifs dans les PTCs, cependant la surexpression d'OGG1 n'était pas suffisante pour maintenir l'homéostasie rédox cellulaire (Eng, Z. H et al., 2023). Par ailleurs, l'analyse des données TCGA a montré une corrélation négative entre l'expression d'OGG1 et l'activation de la voie de signalisation MAPK dans les PTCs, ce qui corrobore avec l'implication des dommages dans le processus de dédifférenciation thyroïdienne (Ameziane El Hassani, R et al., 2019).

Généralement la 8-oxo-dG est réparée efficacement par la voie de la réparation par excision de base (BER) initié par le 8-oxoG glycosylase1 (OGG1). Cependant dans certaines circonstances, l'échec de la réparation, conduit à la formation des cassures double brin (DSB) de l'ADN (Ameziane El Hassani, R et al., 2019). Ces cassures induisent une instabilité génétique (Richardson, C., et Jasin, M, 2000) qui peut être à l'origine des réarrangements chromosomiques oncogéniques RET/PTC (Ameziane El Hassani, R et al., 2010 ; Ameziane El Hassani, R et al., 2019). L'origine du stress oxydatif causant les cassures double brin de l'ADN pourrait être exogène (exposition aux radiations ionisantes) ou suite à l'exposition des cellules thyroïdiennes à l'H₂O₂ (Driessens, N et al., 2009 ; Ameziane-El-Hassani, R et al., 2010). Ameziane-El-Hassani, R et ses collègues ont montré que l'exposition des cellules folliculaires à l'H₂O₂ entraîne une augmentation des cassures double brins, qui se traduit par des niveaux élevés de la phosphorylation de l'histone H2AX (γ H2AX) (Ameziane-El-Hassani, R et al., 2010). Cette dernière est une variante de la famille des protéines H2A, phosphorylée en réponse aux DSB de l'ADN et déclenche le recrutement et la localisation des protéines de la réparation de l'ADN (Kuo, L. J et al., 2008). Dans ce sens, des niveaux élevés de la protéine γ H2AX sont détectés dans les PTCs comparativement aux nodules thyroïdiens bénins et aux tissus thyroïdiens normaux (Hu, S et al., 2014).

Par ailleurs, une coopération entre les voies de réparation BER et MMR via une interaction entre les effecteurs de ces deux voies dans la réparation des dommages oxydatifs a été illustré (Nakabeppu, Y., 2014).

6.2. La réparation par la voie Mismatch Repair (MMR)

La voie de réparation Mismatch Repair (MMR) intervient dans la réparation des mésappariements base-base et des boucles des insertions/délétions (Fishel, R., 1998 ; Christmann, M et al., 2003). Les complexes protéiques impliqués dans le fonctionnement du système MMR, sont les familles MutS et MutL. Il existe deux complexes hétérodimères composés d'homologues de MutS (MSH), le complexe MutS α (composé de MSH2 et MSH6) qui joue un rôle clé dans la reconnaissance des mésappariements base-base et le complexe MutS β (composé de MSH2 et MSH3) qui est impliqué dans la détection des insertions et délétions (Fishel, R., 1998 ; Christmann, M et al., 2003). Par ailleurs, plusieurs hétérodimères de MutL (MLH) ont été identifiés notamment, MutL α (composé de MLH1 et PMS2), MutL β (composé de MLH1 et PMS1) et MutL γ (composé de MLH1 et MLH3). Parmi ces complexes, l'hétérodimère MutL α interagit avec MutS pour le recrutement de protéines de réparation (Fishel, R., 1998 ; Christmann, M et al., 2003 ; Bridge, G et al., 2014).

Le processus de reconnaissance des mésappariements est initié par la liaison à la lésion de l'hétérodimère MSH2/MSH6 (MutS α). MutS α subit ensuite un changement conformationnel et recrute le complexe MLH1/PMS2 (MutL α). Ce complexe ternaire (composé de MutS α et MutL α) peut se déplacer dans les deux sens le long de l'ADN. Une fois le complexe détecte une discontinuité de brin, il recrute le complexe PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) et l'exonucléase EXO1 pour dégrader le brin coupé. Le simple brin résultant est stabilisé par la protéine de réplication A (RPA), puis l'espace vide est comblé par l'ADN polymérase δ et l'ADN ligase 1 (Figure 20) (Christmann, M et al., 2003).

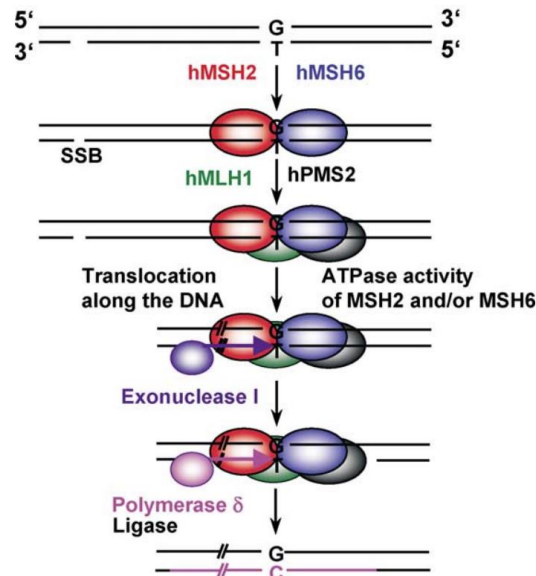


Figure 20: Mécanisme de réparation par la voie Mismatch repair (MMR). MMR est initié par la reconnaissance du mésappariement par l'hétérodimère MSH2/MSH6. La formation de complexe MSH2-MSH6/MLH1-PMS2 déclenche le recrutement des protéines permettant la réparation (Exonucléase I, polymérase delta et ligase). hMLH1: human MutL homolog 1 protein; hMSH2: human MutS homolog 2 protein; hMSH6: human MutS homolog 6 protein; hPMS2 : human postmeiotic segregation increased 2 protein; SSB : single-stranded DNA binding protein (Christmann, M et al., 2003).

6.2.1. MSH2/MSH6

Les gènes codant MSH2/MSH6 sont localisés sur le chromosome 2p22.1 et 2p16 respectivement. Ils sont considérés comme des gènes suppresseurs de tumeurs. MSH2 et MSH6 forment un complexe hétérodimère, dont la présence de l'un est nécessaire à la stabilité de l'autre (Edelbrock, M. A et al., 2013). L'expression de MSH2 et MSH6 est régulée positivement par les facteurs de transcriptions E2F1 et E2F3 (Polager, S et al., 2002 ; Ren, B et al., 2002 ; Edelbrock, M. A et al., 2013). Tandis que la dégradation de MSH2 et MSH6 s'effectue par La voie ubiquitine-protéasome (Lommel, L et al., 2002 ; Edelbrock, M. A et al., 2013). Par ailleurs, le recrutement de MSH2/MSH6 et leur liaison aux sites de dommages peuvent être régulés par des modifications post-traductionnelles telle que la phosphorylation par PKC ζ qui stabilise le complexe en inhibant sa dégradation protéasomique (Hernandez-Pigeon, H et al., 2005).

6.2.2. La réparation par la voie MMR et cancer de la thyroïde

Il a été démontré que la voie de réparation MMR est également impliquée dans la réponse aux dommages oxydatifs. En effet, le complexe hétérodimère MSH2/MSH6 qui possède une activité ATPase, est activé par la détection et la liaison aux mésappariements y compris 8-oxoG avec les autres nucléotides principalement avec l'adénine. Cependant, une défaillance dans la voie MMR favorise l'apparition des mutations durant la replication

(Nakabeppu, Y., 2014). Par ailleurs, dans le cancer de la thyroïde, des polymorphismes, des mutations et des altérations épigénétiques des gènes codant pour les acteurs de réparation MMR ont été associées à l'instabilité génétique et à des caractéristiques clinicopathologiques et pronostiques (Qiao, P. P et al., 2022). D'autre part, l'analyse de la base de données du TCGA, a montré que les protéines MSH2, MSH6 ainsi que l'ADN polymérase (POLH) de la voie MMR sont augmentées dans les PTCs-BRAF^{V600E} (Ameziane El Hassani, R et al., 2019).

7. La NADPH oxydase 4 et le cancer de la thyroïde

7.1. Le système générateur de ROS : NOX4/p22^{phox}

7.1.1. L'expression et régulation de NOX4

La NADPH oxydase 4 est une enzyme codée par le gène *NOX4*, localisé sur le chromosome 11, en position 11q14.2-q21. L'épissage alternatif du gène *NOX4* donne naissance à plusieurs transcrits codant pour différentes protéines fonctionnelles (Goyal, P et al., 2005). *NOX4* est exprimée dans plusieurs organes (Ameziane El Hassani, R et al., 2016). Elle a été identifiée pour la première fois par Geiszt et al., en 2000 dans le rein (Geiszt, M et al., 2000). *NOX4* n'est pas active uniquement à la membrane plasmique. Elle est retrouvée dans les compartiments intracellulaires tels que le réticulum endoplasmique, les mitochondries et le noyau (Bedard, K et Krause, K.H., 2007; Ameziiane El Hassani, R et al., 2016). *NOX4* génère l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et l' H_2O_2 (Figure 21). Sa capacité à générer directement du peroxyde d'hydrogène est due à la présence de modifications au niveau de sa boucle extracytosolique (E-loop) (Figure 21) (Takac, I et al., 2011; Ameziiane El Hassani, R et al., 2016). *NOX4* a une activité enzymatique constitutive qui dépend directement du niveau d'expression de son gène. Il a été montré qu'elle est régulé au niveau transcriptionnel par la TSH. *NOX4* forme un complexe enzymatique actif avec la protéine membranaire p22^{phox} qui la stabilise (Carvalho DP et Dupuy C., 2013). La localisation intracellulaire de *NOX4*-p22^{phox} suggère un rôle dans la signalisation redox intracellulaire, contrairement aux DUOXs qui sont actives à la membrane apicale. En plus de la p22^{phox}, la protéine Poldip2 (polymerase DNA-directed delta-interacting protein 2) et la petite protéine GTPase Rac 1 (substrat 1 de la toxine botulinique C3 liée à RAS) semblent jouer un rôle dans la régulation de *NOX4* (Weyemi, U et al., 2013).

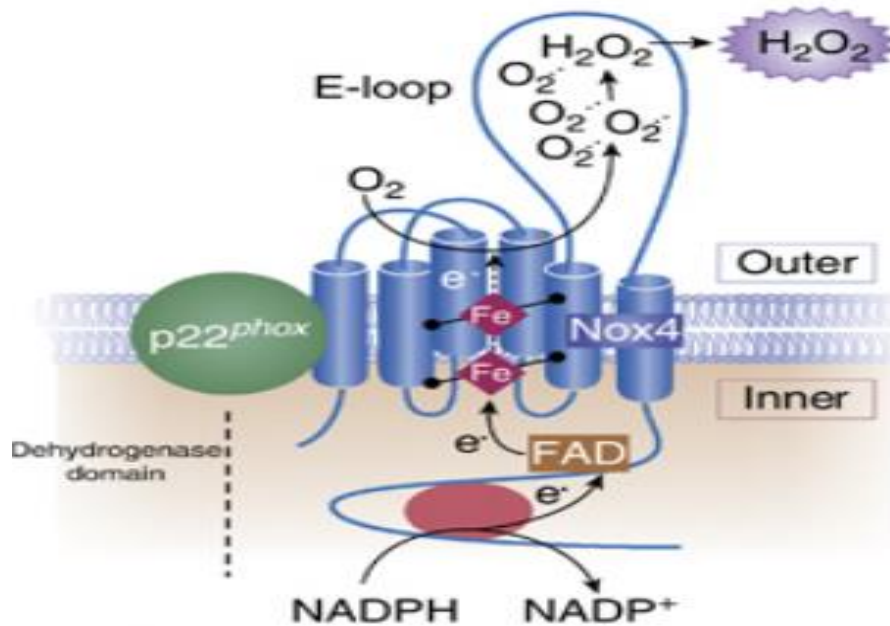


Figure 21: Schéma représentatif de la structure de NOX4. Cette figure présente la topologie de NOX4 et la réaction enzymatique catalysée par l'enzyme. NOX4: NADPH Oxidase 4; phox, Phagocyte Oxidase; E-loop: extracytosolicloop; FAD: flavine adenine dinucléotide (Gorin Y., 2013).

7.1.2. Partenaire fonctionnel de NOX4 : la protéine p22^{phox}

Le gène codant pour la p22^{phox} est localisé sur le chromosome 16 en position 16q24. C'est une protéine membranaire avec une masse moléculaire de 22 kDa. La p22^{phox} forme un hétérodimère stable avec les quatre membres de la famille des protéines NOXs (NOX1, NOX2, NOX3 et NOX4) (Vermot, A et al., 2021). Sa localisation subcellulaire dépend du partenaire fonctionnel avec laquelle elle est co-exprimée (Ambasta, R. K et al., 2004). La p22^{phox} agit comme un support pour le recrutement et la fixation des sous-unités cytosoliques notamment, p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} et les petites GTPases Rac qui sont nécessaires à l'activation de la NOX2 (Vermot, A et al., 2021). Cependant, la p22^{phox} constitue la seule sous-unité requise pour l'activité de NOX4 (Ambasta, R. K et al., 2004).

7.2. NOX4 et cancer de la thyroïde

La NADPH oxydase NOX4 est régulée positivement dans plusieurs types de cancers humains, tels que le mélanome, le cancer rénal, colorectal, de poumons, de pancréas, du sein et de la thyroïde (Gong, S et al., 2022). Elle est impliquée dans divers aspects de la carcinogénèse, notamment la prolifération cellulaire, la migration, l'invasion, la transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT) et la dédifférenciation (Boudreau, H. E et al., 2012 ; Jafari, N et al., 2017 ; Lin, X. L et al., 2017 ; Oglio, R et al., 2019). Concernant les cancers de la thyroïde, l'équipe de Corinne DUPUY a montré une augmentation de l'expression de NOX4 (messenger et protéine) dans les PTCs (Weyemi, U et al., 2010). En utilisant un modèle cellulaire

adéquat, Weyemi U et ses collègues ont montré que l'oncogène H-RasV12 régule positivement l'expression de NOX4 et de son partenaire fonctionnelle p22^{phox} (Weyemi, U et al., 2012). La localisation périnucléaire de NOX4 suggère son implication dans les dommages à l'ADN induites par l'oncogène (Weyemi, U et al., 2012). L'analyse des données TCGA qui porte sur 390 PTCs a montré que le transcrit de NOX4 est positivement régulée par l'oncogène BRAF^{V600E}, (Azouzi et al), l'oncogène le plus fréquent dans les PTCs (Agrawal, N et al., 2014).

L'implication de NOX4 dans la dédifférenciation thyroïdienne est prouvée également dans la lignée cellulaire thyroïdienne de rat 'FRTL-5', où il a été démontré que NOX4 régule négativement les marqueurs de différenciation thyroïdienne, notamment TTF2, TPO et PAX8 (Oglio, R et al., 2019).

Dans le cancer de la thyroïde, la localisation périnucléaire de NOX4 suggère une production des ERO à proximité du compartiment nucléaire ce qui pourrait créer un microenvironnement pro-oxydatif entraînant une régulation redox des effecteurs de la machinerie épigénétique et des facteurs de transcription impliqués dans la régulation du NIS (Weyemi, U et al., 2012). Dans ce sens, Azouzi, N et ses collègues ont montré que les ERO dérivés de NOX4 entraîne la répression de NIS (Azouzi, N et al., 2017). Cependant, l'inhibition de NOX4 re-induit l'expression de NIS, suggérant l'implication d'un mécanisme épigénétique.

IV. Modifications épigénétiques et cancer de la thyroïde

Dans ce chapitre j'aborderai la régulation épigénétique de l'expression de NIS, qui est un acteur clé dans la réponse à la radiothérapie métabolique grâce à sa fonction de captation de l'iode. Dans le cancer de la thyroïde, la répression de NIS par des mécanismes épigénétiques se traduit par la perte de la captation de l'iode et donc la radiorésistance. Je traiterai, en particulier, le rôle la protéine CHD4 en tant que répresseur génique dans la carcinogénèse thyroïdienne.

1. La régulation épigénétique de l'expression de NIS

Les modifications épigénétiques sont des changements héréditaires dans l'expression des gènes qui n'altèrent pas la séquence d'ADN sous-jacente. Ces modifications jouent un rôle crucial dans la régulation des processus physiologiques et pathologiques, tels que la différenciation cellulaire, l'embryogenèse et la progression du cancer (Davalos, V et Esteller, M., 2023). La méthylation de l'ADN, les modifications des histones et les ARN non codants font partie des principales altérations épigénétiques impliquées dans la tumorigénèse

thyroïdienne. La méthylation de l'ADN se produit principalement au niveau des îlots CpG, régions riches en dinucléotides cytosine et guanine, qui représentent 70% des régions régulatrices des gènes humains (Davalos, V et Esteller, M., 2023). Plusieurs études réalisées sur différents types des cancers thyroïdiens ont montré une hyperméthylation des îlots CpG associée aux promoteurs, conduisant à la répression ou à la diminution de l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs et des gènes métabolisant l'iode (Zhang, K et al., 2023).

Il est bien démontré que la répression du gène SLC5A5 codant le NIS dans le cancer de la thyroïde est médié par des mécanismes épigénétiques. Une hyperméthylation des îlots CpG dans le promoteur du NIS a été détectée dans des tissus tumoraux thyroïdiens comparativement aux tissus non tumoraux. Cette hyperméthylation est associée à une diminution de l'expression du NIS et/ou une altération de l'absorption de l'iode (Venkataraman, G. M et al., 1999; Galrao, A. L et al., 2014; Cazarin, J et al., 2022). Par ailleurs, il a été démontré dans les PTCs que la répression du gène SLC5A5 (NIS), via l'hyperméthylation de son promoteur, est associé à des niveaux élevées de l'expression de l'ADN méthyl-transférase 1 (DNMT1) induite par l'oncogène BRAF^{V600E} (Choi, Y. W et al., 2014).

Les modifications des histones par acétylation/ désacétylation sont des événements importants dans la régulation des gènes (Davalos, V et Esteller, M., 2023). L'acétylation des histones par les histones acétyltransférases (HAT) favorise l'expression des gènes, tandis que, la désacétylation des histones facilitée par des histones désacétylases (HDAC) entraîne la répression des gènes (Davalos, V et Esteller, M., 2023). Zhang, Z et ses collègues ont ainsi montré que l'expression de BRAF^{V600E} dans des thyrocytes humains et murins favorise la désacétylation des histones dans le promoteur de NIS conduisant à sa répression (Zhang, Z et al., 2014).

En outre, la répression de NIS dans les cancers thyroïdiens implique également l'intervention d'autres modifications épigénétiques, notamment les microARN (miARN) qui sont des ARN non codants régulant négativement l'expression des gènes soit par dégradation de l'ARNm, soit par l'inhibition de la traduction (Zhang, K et al., 2023). Il a été rapporté qu'un certain nombre des miARN tels que, miR-146b et miR-21 réduisent l'expression du NIS dans les cancers thyroïdiens, soit directement en ciblant la région 3' non traduite (3'UTR) du NIS, soit indirectement via la répression de son principal régulateur, PAX8 (Riesco-Eizaguirre, G et al., 2009 ; Haghanah, V et al., 2016; Agrawal, N et al., 2014; Cazarin, J et al., 2022).

2. Le complexe de remodelage de la chromatine ‘NURD’

Le complexe NuRD (pour Nucleosome remodeling and deacetylase complex) également connu sous le nom de Mi-2, est l'un des quatre principaux complexes de remodelage de la chromatine dépendant de l'ATP (Allen, H. F et al., 2013). Il joue un rôle important dans divers processus telles que la transcription, l'organisation de la chromatine, la réparation des dommages à l'ADN et la stabilité génomique (Basta, J et Rauchman, M, 2017). Depuis sa découverte, le complexe NURD est considéré comme un répresseur de la transcription génique (Tong, J. K et al., 1998). Il est composé de six sous-unités protéiques, chacune avec plusieurs isoformes : Histone deacetylase ‘HDAC’ 1 et 2, Metastasis-associated ‘MTA’ 1,2 et 3, Retinoblastoma binding protein ‘RBBP’ 4 et 7, P66 α/β , Methyl-CpG-binding domain ‘MBD’ 2 et 3 et Chromodomain Helicase DNA binding ‘CHD’ 3 et 4 (Allen, H. F et al., 2013). Les HDAC 1 et 2 sont d'importants régulateurs de la transcription, qui agissent en éliminant les groupes acétyles des résidus lysine des queues d'histones et d'autres protéines (Millard, C. J et al., 2016). Les MBD 2 et 3 sont des domaines de liaison méthyl-CpG qui se lient à l'ADN méthylé avec des affinités différentes (Hashimoto, H et al., 2012). Les MTA1, 2 et 3 assurent la liaison à l'ADN et à l'HDAC1 et sont également des protéines d'échafaudage favorisant l'assemblage du complexe NuRD (Allen, H. F et al., 2013). Les RBBP 4 et 7 (également connues sous le nom de RbAp48 et RbAp46 respectivement) sont des protéines de liaison aux histones homologues, ils interagissent directement avec les queues d'histone H3 et H4 à travers deux sites de liaison qui leur permettent de moduler le remodelage de la chromatine (Millard, C. J et al., 2016). Elles s'associent également à plusieurs protéines cellulaires et interagissent directement avec MTA1. Les P66 α/β (GATA2a/b) sont des protéines nucléaires à doigt de zinc qui se lient à l'ADN et interagissent directement avec les protéines MBD 2 et 3 (Allen, H. F et al., 2013). Le CHD 3 (Mi2- α) et CHD4 (Mi2- β) sont des Hélicase/ATPase qui utilisent l'énergie de l'ATP pour remodeler la chromatine par glissement des histones ; leur domaines PHD permettant la liaison avec l'histone H3 (Mansfield, R. E et al., 2011). L'assemblage combinatoire de ces sous-unités détermine la fonction de NuRD dans le ciblage génomique. Le complexe NuRD est caractérisé par une double fonctionnalité enzymatique, grâce à ses sous-unités HDAC (la désacétylation) et CHD (le remodelage de la chromatine dépendant de l'ATP) (Basta, J et Rauchman, M, 2017). Les altérations de l'activité du complexe NuRD sont associées à plusieurs maladies humaines, tels que le cancer et le vieillissement (Figure 22) (Basta, J et Rauchman, M, 2017).

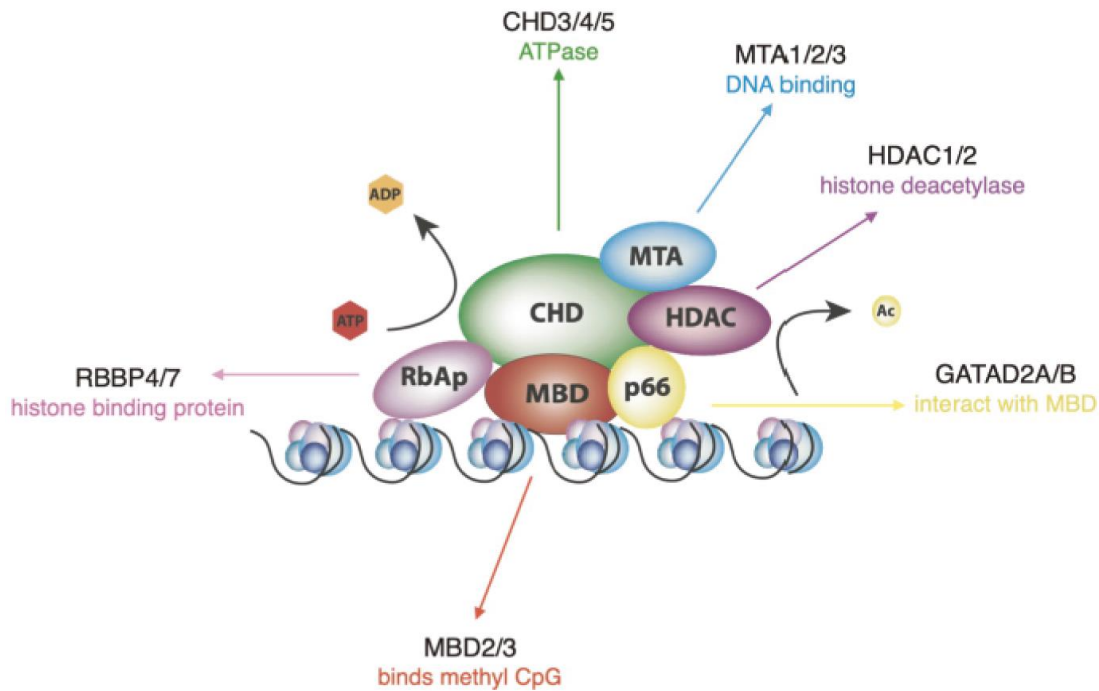


Figure 22 : Représentation schématique des composants de complexe NuRD. Abréviations : HDAC, Histone deacetylase ; MTA, Metastasis-associated ; RBBP, Retinoblastoma binding protein ; MBD, Methyl-CpG-binding domain ; CHD, Chromodomain Helicase DNA binding (Boulasiki, P et al., 2023).

3. La famille CHD

Les protéines CHD constituent une famille importante des remodeleurs, qui jouent un rôle essentiel dans l'homéostasie de la chromatine (Marfella, C. G et Imbalzano, A. N et al., 2007). Les CHD sont des ATPases qui utilisent l'énergie produite via l'hydrolyse de l'ATP pour induire le glissement des nucléosomes. Tous les membres de la famille possèdent un domaine ATPase conservé de type SNF2 situé au centre, deux chromodomaines N-terminaux et un domaine de liaison à l'ADN C-terminal plus ou moins défini (Hall, J. A et Georgel, P. T, 2007). Bien qu'elles sont structurellement assez conservées, les CHD divergent au niveau du domaine de liaison à l'ADN et peuvent exprimer des éléments supplémentaires qui différencient les sous-familles ou les protéines individuelles, ce qui suggère qu'elles pourraient posséder des fonctions distinctes et donc exister dans divers complexes en fonction des combinaisons établies (Marfella, C. G et Imbalzano, A. N et al., 2007). CHD comprend neuf protéines, classées en trois sous-familles en fonction de leur structure. La famille 1 comprend CHD1 et CHD2, contenant des domaines de liaison à l'ADN avec une fonction similaire à celle de SWI3 et ADA2 ; La famille 2 comprend CHD3, CHD4 et CHD5 qui possèdent un domaine de doigt de zinc PHD, favorisant leur liaison aux résidus histones méthylés et aux cofacteurs, enfin la famille 3 comprend CHD6, CHD7, CHD8 et CHD9 qui sont caractérisés par un domaine SANT favorisant la liaison non spécifique à l'ADN et un domaine BRK qui semble

être impliqué dans la liaison aux facteurs de transcription (Marfella, C. G et Imbalzano, A. N et al., 2007 ; Allen, M. D et al., 2020) (Figure 23).

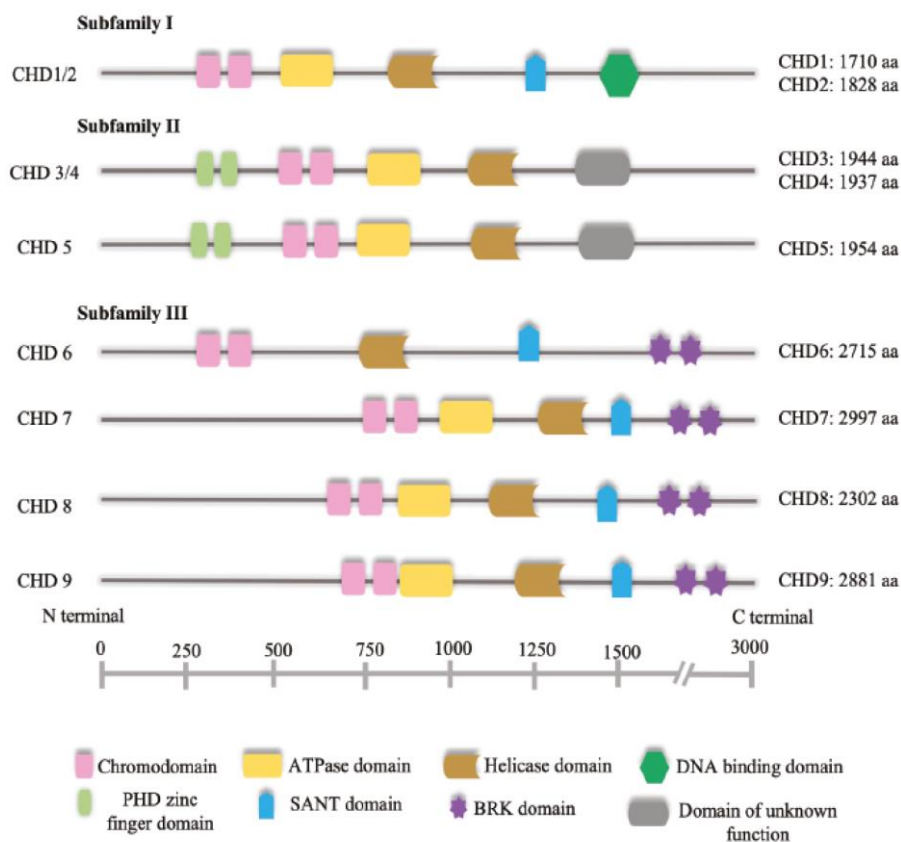


Figure 23 : Représentation schématique de la structure des protéines de famille CHD humaine. Cette figure présente la taille approximative de tous les domaines connus ou prédits (Boulasiki, P et al., 2023).

4. CHD4 et cancer de la thyroïde

4.1. Structure et régulation de CHD4

La Chromodomain helicase DNA-binding 4 'CHD4', également connue sous le nom Mi2- β chez *Drosophila melanogaster*, est une protéine codée par le gène *CHD4*, localisé sur le chromosome 12, en position 12p13.31. Il s'agit d'une protéine d'un poids moléculaire d'environ 250 Kda, hautement conservée chez les animaux et les plantes (Zhang, J et al., 2019). CHD4 appartient à la famille des hélicases SNF2/RAD54. Elle est composée d'un domaine central ATPase/hélicase précédé par deux motifs homéodomaines végétaux (doigts PHD) et de deux chromodomaines en tandem (Farnung, L et al., 2020) (Figure 23). Le domaine ATPase permet à CHD4 d'utiliser l'énergie dérivée de l'hydrolyse de l'ATP pour remodeler la structure des nucléosomes. Les doigts PHD lui permettant de se lier avec les queues N-terminales non méthylées (H3K4) et K9-méthylées (H3K9me3) de l'histone H3, tandis que les chromodomaines assurent la liaison à l'ADN et/ou à l'histone méthylé H3K4. En plus de ces domaines connus, il a été démontré que CHD4 a un domaine de type HMG N-terminal qui se

lie aux acides nucléiques (Silva, A. P et al., 2016), et deux domaines supplémentaires de fonction inconnue situés dans la région C-terminale (Farnung, L et al., 2020). La double fonctionnalité de CHD4, qui régule à la fois la structure des nucléosomes et se lie à l'histone H3, indique qu'elle implique divers aspects de l'accessibilité de la chromatine, constituant ainsi un des principaux composants de complexe NuRD (Allen, H. F et al., 2013). CHD4 peut également agir en tant que remodeleur actif des nucléosomes, et ce indépendamment des autres composants de NuRD. Elle joue également un rôle important dans la réponse aux dommages à l'ADN, la progression du cycle cellulaire, la transduction du signal et le maintien global du génome (Polo, S. E et al., 2010 ; Zhang, J et al., 2019).

La régulation de l'activité enzymatique de CHD4 est médiée par ses domaines en doigts de zinc ou domaine PHD. D'une part, Les PHD régulent négativement l'activité de CHD4 en effectuant des interactions intramoléculaires avec les chromodomaines, ce qui empêche la liaison de CHD4 aux nucléosomes et d'autre part, les PHD stimulent l'activité enzymatique en se liant à l'histone H3 (Watson, A. A et al., 2012).

4.2. Rôle de CHD4 dans la réponse aux dommages à l'ADN

En réponse aux dommages à l'ADN, un programme d'évènement est déclenché, appelé réponse aux dommages à l'ADN (DDR), qui implique plusieurs protéines essentielles au maintien de l'intégrité du génome et à la prévention de la carcinogénèse. En réponse aux rayonnements ionisants ou au stress oxydatif, CHD4 et le complexe NuRD sont recrutés sur les sites de dommages à l'ADN grâce à la liaison directe de CHD4 avec le poly (ADP-ribose) polymérase 1 (PARP1), suggérant une implication de CHD4 dans la réponse aux cassures simples brin (SSB) (Polo, S. E et al., 2010). Ainsi, il a été démontré par Polo S et al., que la déplétion de CHD4 par des siRNA rend les cellules hypersensibles à l'H₂O₂, indiquant que CHD4 répond aussi aux dommages oxydatifs de l'ADN (Polo, S. E et al., 2010). En plus, CHD4 joue également un rôle dans la réponse aux cassures doubles brins, où elle est phosphorylée par ATM (ataxia telangiectasia mutated) et ATR (Ataxia telangiectasia and Rad3 related), deux régulateurs importants des cassures doubles brins (Larsen, D. H et al., 2010 ; Polo, S. E et al., 2010 ; Urquhart, A. J et al., 2011). Il apparaît que la phosphorylation de CHD4 par l'ATM pourrait réguler la cinétique de dissociation de CHD4 des sites endommagés (Polo, S. E et al., 2010). Par ailleurs, il a été démontré que la déplétion en CHD4 rend les cellules défectueuses à la réparation des cassures doubles brins après irradiation. Ceci est matérialisée par la persistance de la phosphorylation de γ H2AX, un marqueur des dommages (Polo, S. E et al., 2010), et par l'accumulation d'ATM/ATR, de BRCA1 et de l'ubiquitine ligase RNF8 qui,

en se liant à CHD4 et BRCA, assure leur recrutement aux sites endommagés (Larsen, D. H et al., 2010 ; Polo, S. E et al., 2010 ; Zhang, J et al., 2019). En plus de son rôle dans la réparation, CHD4 semble avoir une fonction importante dans le contrôle du cycle cellulaire au niveau de la transition de la phase G1 vers S en réprimant l'expression de p21 et en régulant la désacétylation de p53 (Larsen, D. H et al., 2010 ; Polo, S. E et al., 2010).

Dans l'ensemble, CHD4 semble être un contributeur important aux divers aspects de DDR par le biais de multiples mécanismes.

4.3. Implication de CHD4 dans le développement du cancer de la thyroïde

La dérégulation de CHD4 est associée aux divers types de cancers, notamment au glioblastome (McKenzie, L. D et al., 2019), au cancer du sein (Luo, C. W et al., 2018), au cancer colorectal (Xia, L et al., 2017), au cancer du poumon (Xu, N et al., 2020), au cancer rectal (Wang, H. C et al., 2019) et enfin au cancer papillaire de la thyroïde (Pratheeshkumar, P et al., 2021). CHD4 est impliquée dans plusieurs aspects de la carcinogénèse, telles que la prolifération, la migration, et la transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT) (Xia, L et al., 2017). Dans le cancer colorectal, il a été démontré que CHD4 promeut le recrutement des protéines chromatiniques répressives comme les ADN méthyltransférases (DNMT) aux promoteurs des gènes suppresseurs de tumeur (TSG, Tumor suppressor gene), induisant ainsi l'inhibition de leur expression (Cai, Y et al., 2014 ; Xia, L et al., 2017). De ce fait, la rétention de CHD4 au niveau des TSG se traduit par l'hyperméthylation des îlots CpG des promoteurs de ces gènes avec pour conséquence la stimulation de la tumorigénèse. Dans cette même étude, il est montré que CHD4 peut être recrutée soit par OGG1, protéine qui détecte et excise les lésions oxydatives dans le cadre du mécanisme de réparation BER soit par la protéine ZMYND8 (zinc-finger MYND-type containing 8) en réponse aux cassures doubles brins (Xia, L et al., 2017). Le rôle de CHD4 dans la tumorigénèse thyroïdienne est jusqu'à présent peu étudié. Pratheeshkumar, P et ses collègues ont montré une surexpression de CHD4 dans les carcinomes papillaires de la thyroïde (PTCs) (Pratheeshkumar, P et al., 2021). Cette surexpression est associée à l'agressivité tumorale. En effet, dans les lignées tumorales thyroïdiennes BCPAP et TPC-1, CHD4 régule négativement l'expression des gènes impliqués dans la migration et l'EMT y compris, la E-cadhérine (Pratheeshkumar, P et al., 2021). Cependant, le mécanisme moléculaire à la base de recrutement de CHD4 aux sites endommagés et son implication dans le développement des cancers de la thyroïde n'est pas encore démontrée (Pratheeshkumar, P et al., 2021).

V. Diagnostic et traitement des cancers de la thyroïde

1. Diagnostic des cancers de la thyroïde

La plupart des carcinomes thyroïdiens différenciés se présentent sous la forme de nodules thyroïdiens asymptomatiques qui peuvent être détectés par la palpation du cou. Le premier examen réalisé après la détection d'un nodule est le dosage des hormones thyroïdiennes « T₃ » et « T₄ », de thyroïdostimuline (TSH), de thyroglobuline, d'iode et des anticorps antithyroïdiens, afin d'évaluer le fonctionnement global de la glande thyroïde. Des taux élevés ou faibles de ces hormones peuvent signifier que la thyroïde ne fonctionne pas correctement. Alors que la mesure des anticorps antithyroïdiens aide à déterminer la cause d'un trouble de la glande thyroïde. Ensuite, l'échographie cervicale permet d'apprécier les dimensions de la thyroïde, le nombre, la taille, et la forme des nodules ainsi que les extensions ganglionnaires et la multifocalité des lésions via l'utilisation des ondes sonores.

Une fois les nodules sont détectés, une scintigraphie est prescrite afin d'obtenir une cartographie de l'activité de la thyroïde grâce à l'administration d'un radio-isotope (technétium ou iode 131). Les foyers où la captation de l'isotope est élevée (nodules chauds) ou diminuée (nodules froids) permettent de distinguer les zones de possible cancer. Un cancer de la thyroïde est retrouvé dans < 1% des nodules chauds et dans 10 à 20% des nodules froids (Hershman, J.M., 2018). L'emplacement, la taille de cancers, les extensions ganglionnaires et les métastases à distance peuvent être déterminés par la tomodensitométrie (TDM) et l'imagerie par résonance magnétique (IRM), qui sont prescrits lorsque l'échographie n'a pas permis de décrire précisément les anomalies identifiées au niveau de la thyroïde (Wémeau, J.L et al., 2011).

Cependant, la détection d'un nodule non fonctionnel avec des caractéristiques sonographiques suspects et/ou des ganglions lymphatiques anormaux nécessite la réalisation d'une cytoponction par aspiration à l'aiguille (FNAC) qui permet d'obtenir un échantillon d'une lésion pour un examen microscopique (Nguyen, Q.T et al., 2015). Les résultats de biopsie sont classés selon leur apparence cytologique en cellules bénignes, suspectes (ou indéterminées) ou malignes (Abdullah, M.I et al., 2019). Enfin, la confirmation de la nature, la taille, le stade et l'agressivité de la tumeur, est obtenue après la mise en place d'un examen microscopique, d'une analyse d'immunohistochimie et d'un diagnostic moléculaire (biomarqueurs spécifiques de chaque type du cancer thyroïdien).

2. Les stratégies thérapeutiques des cancers de la thyroïde d'origine folliculaire

➤ **La chirurgie** : est généralement le traitement de première intention du cancer thyroïdien. L'étendue de la chirurgie dépend de la taille de la tumeur primitive et de l'absence ou de la présence de métastases ganglionnaires (Abdullah, M.I et al., 2019). En cas d'une tumeur primitive < 1cm une hémithyroïdectomie est recommandée ; tandis qu'en cas d'une tumeur de diamètre >1cm, une thyroïdectomie totale est généralement pratiquée. Les deux actes chirurgicaux peuvent être associés au curage ganglionnaire du compartiment central et/ ou des compartiments latéraux en fonction des métastases ganglionnaires (Paschke, R et al., 2015).

➤ **La thérapie à l'iode radioactif** : L'administration de l'iode ^{131}I est recommandée après une intervention chirurgicale chez tous les patients à haut risque, afin d'effectuer une ablation complète de la glande thyroïde et d'éradiquer un éventuel cancer résiduel (Abdullah M.I et al., 2019). L' ^{131}I agit en se concentrant dans les cellules thyroïdiennes folliculaires via le NIS et le système d'organification de l'iode et en émettant des rayonnements bêta et gamma provoquant une destruction de toutes les cellules cancéreuses fixantes (Paschke, R et al., 2015).

➤ **La radiothérapie externe** : est utilisée comme un traitement palliatif des patients atteints d'un carcinome thyroïdien avancé ou inopérable et d'un carcinome thyroïdien qui ne répond pas au traitement à l'iode ^{131}I (Nguyen, Q.T et al., 2015).

➤ **L'hormonothérapie** : Le cancer de la thyroïde est un cancer hormonodépendant et sa croissance peut être stimulée par des taux élevés de TSH (Do Cao, C et Wémeau, J.L., 2009). Cependant un traitement de suppression de la TSH (la lévothyroxine : L-T₄) après une thyroïdectomie et / ou après la thérapie à l' ^{131}I est recommandé, afin de minimiser la croissance potentielle de cellules cancéreuses thyroïdiennes induite par la TSH (Nguyen, Q.T et al., 2015).

➤ **Les inhibiteurs tyrosine kinase** : constituent une option de traitement des PTCs réfractaire à l'iode ^{131}I (Nguyen, Q.T et al., 2015). Ce sont des médicaments capables d'inhiber l'activité catalytique de plusieurs récepteurs de tyrosine kinase avec différentes puissances et ont en commun l'inhibition du récepteur du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGFR) (viola D et al., 2015). Le plus couramment utilisé est le Sorafénib, qui est le troisième médicament approuvé par la FDA (the United States Food and Drug Administration) pour le traitement de PTC réfractaire à l' ^{131}I . Il s'agit d'un inhibiteur oral de multi-kinases inhibant le RET de type sauvage, le BRAF^{V600E}, les récepteurs VEGF 1 à 3 et d'autres kinases (Higuchi, Y et al., 2017).

Néanmoins, la prise en charge des cancers de la thyroïde est confronté à l'obstacle de la radiorésistance de certaines tumeurs.

3. La radiorésistance thyroïdienne

Dans les carcinomes papillaires de la thyroïde (PTCs) la présence de la mutation BRAF^{V600E} est associée à une répression du promoteur du gène codant le NIS via une stimulation constitutive de la voie de signalisation MAPK (Choi, Y et al., 2014). De plus, l'oncogène BRAF^{V600E} altère la localisation subcellulaire fonctionnelle du NIS dans la membrane (Chakravarty, D et al., 2011; Nagarajah, J et al., 2016). La répression du NIS se traduit par la perte de la captation de l'iode dans les cellules cancéreuses conduisant à la résistance à la radiothérapie métabolique (RAI). Des études cliniques ont montré qu'il existe une corrélation négative entre l'expression du NIS et BRAF^{V600E} (Riesco-Eizaguirre, G et al., 2006; Sabra, M. M et al., 2013). Aussi, l'analyse d'une large cohorte de 496 PTCs humains a révélé que les PTCs BRAF^{V600E}-like présentent un score de différenciation thyroïdienne moins élevé par rapport aux PTCs RAS-like, ce qui soutient l'implication de BRAF^{V600E} dans la résistance à l'iode radioactif (Agrawal, N et al., 2014). L'inhibition de la voie de signalisation MAPK par des inhibiteurs pharmacologiques tels que le dabrafenib ou vemurafenib, qui sont deux inhibiteurs ciblant BRAF^{V600E}, et le selumetinib, un inhibiteur de MEK, chez des patients présentant une mutation RAS ou BRAF^{V600E}, a entraîné la réinduction du NIS et la re-sensibilisation des cellules cancéreuses à l'iode radioactif. Ceci était particulièrement vrai pour les tumeurs mutées RAS (Ho, A. L et al., 2013; Rothenberg, S. M et al., 2015 ; Dunn, L. A et al., 2019) alors que la restauration de la captation de l'iode n'a été observée que dans une seule tumeur-BRAF^{V600E} sur neuf, ce qui suggère l'implication d'autres voies de signalisation coopérant avec l'oncogène BRAF^{V600E} dans la perte d'avidité au RAI. Cette voie pourrait être celle du TGF-β. En effet, il a été rapporté dans plusieurs études que le TGF-β1 est surexprimé dans les cancers papillaires de la thyroïde (PTCs) (Ivanova, K et al., 2018 ; Xie, J et al., 2019 ;). Cette surexpression du TGF-β1 est associée à l'invasion et à la migration de la tumeur, en régulant les gènes impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) (Xie, J et al., 2019). L'implication du TGF-β dans le pouvoir invasif des PTCs, est illustrée par sa surexpression au front périphérique invasif où sont exprimés les acteurs de l'EMT comparativement au centre de la tumeur (Riesco-Eizaguirre, G et al., 2009). Cette expression accrue du TGF-β est associée à la mutation BRAF^{V600E} et au caractère agressif avec la survenue de métastases ganglionnaires et des extensions extra-thyroïdiennes (Eloy, C et al., 2012).

Dans ce contexte, Azouzi, N et ses collègues ont montré que l'oncogène BRAF^{V600E} régule positivement NOX4 via la voie du TGF-β dépendante de SMAD3 dans deux lignées tumorales thyroïdiennes (BCPAP, 8505C), et que les ERO dérivées de NOX4 contribuent à la répression du gène *SLC5A5* codant le NIS (Azouzi, N et al., 2017). La suppression de NOX4

par ARN interférence favorise la réactivation du gène *SLC5A5* (Azouzi, N et al., 2017). Cette réversibilité suggère une contribution de NOX4 à un mécanisme épigénétique qui pourrait impliquer des complexes de remodelage à la chromatine dans la région promotrice de gène *SLC5A5*.

Objectifs du travail

Le cancer papillaire de la thyroïde PTC représente 80% des cancers thyroïdiens. Ce dernier est caractérisé par plusieurs altérations génétiques, dont la plus fréquente et la plus agressive est la mutation BRAF^{V600E}. Le mécanisme moléculaire par lequel la mutation BRAF^{V600E} induit une instabilité génétique est associé à une activation constitutive de la voie de signalisation MAPK. Une dérégulation épigénétique a été observée dans les cancers de la thyroïde porteurs de la mutation BRAF^{V600E}, en particulier l'hyperméthylation des promoteurs de certains gènes impliqués dans le métabolisme de l'iodure comme le sodium iodure symporteur « NIS » qui est associé à la différenciation des cellules thyroïdiennes et donc à la résistance à la thérapie à l'iode radioactif.

A l'échelle transcriptionnelle, Azouzi, N et al., ont montré que la NADPH oxydase NOX4 est surexprimée dans les PTCs porteurs de la mutation BRAF^{V600E} comparativement aux PTCs-BRAF^{wt} (Azouzi, N et al., 2017). Cependant, au niveau protéique, aucun lien n'a été établie entre l'oncogène BRAF^{V600E} et NOX4 dans les tumeurs malignes et non malignes (BRAF^{V600E}/BRAF^{wt}). Le premier objectif de la thèse a été d'établir un lien direct entre l'expression de la protéine NOX4 et l'oncogène BRAF^{V600E} dans des biopsies des patients PTCs à travers une approche translationnelle.

Dans les lignées tumorales thyroïdiennes porteuses de la mutation BRAF^{V600E} (8505C et BCPAP), il a été démontré que l'oncogène BRAF^{V600E} contrôle l'expression de NOX4 et que les ERO produites par celle-ci contribuent à la répression du gène *SLC5A5* codant le NIS. La répression ou l'inhibition de l'expression de NOX4 favorise la réactivation du gène *SLC5A5*. Cette réversibilité suggère une contribution à un mécanisme épigénétique (Azouzi, N et al., 2017). La protéine CHD4, une sous-unité du complexe du remodelage NuRD, est un régulateur épigénétique de l'expression génique. Elle est fortement exprimée dans les PTCs, où elle favorise la migration et la transition épithelio-mésenchymateuse (EMT) (Pratheeshkumar, P et al., 2021). Puisque CHD4 est recruté aux dommages oxydatifs par OGG1 et que les PTCs mutés BRAF^{V600E} surexpriment NOX4, un système générateur des ERO, notre deuxième objectif a été d'analyser si il existait un lien entre CHD4 et NOX4 dans l'inhibition réversible de l'expression du gène codant le NIS.

Matériels et méthodes

I. Approche translationnelle utilisant des tissus thyroïdiens humains

1. Etude rétrospective:

Etude rétrospective de 136 échantillons prélevés à partir des blocs de tissus fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE) de patients diagnostiqués au niveau du service d'anatomopathologie de l'Hôpital Militaire d'Instruction Mohammed V de Rabat entre janvier 2015 et décembre 2021. La cohorte comprend 46 tissus normaux adjacents (NAT), 28 formes classiques de carcinome papillaire de la thyroïde (c-PTC), 17 variantes folliculaires du carcinome papillaire de la thyroïde (F-PTC), 3 carcinomes anaplasiques de la thyroïde (3 ATC) et 40 tissus thyroïdiens non tumoraux (dont 6 thyroïdites lymphocytaires, 4 maladies de Basedow, 10 goîtres et 20 hyperplasies). La validation du type de tissu et la sélection des blocs FFPE ont été effectuées par un pathologiste expérimenté après coloration HE « Hématoxyline et Eosine ». La sélection des blocs était basée sur la suffisance cellulaire (plus de 90 % de cellules tumorales pour les tumeurs thyroïdiennes / absence de cellules tumorales pour les tissus non tumoraux) et la disponibilité des blocs. Les tumeurs thyroïdiennes sont classées histologiquement selon la classification de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) (Lloyd R. V et al., 4e édition. CIRC : Lyon 2017).

Les informations recueillies à partir des dossiers médicaux des patients sélectionnés constituent une base de données de cette étude fournissant toutes les caractéristiques clinico-pathologiques des patients.

2. Analyse mutationnelle :

L'ADN génomique a été extrait de coupes de tissus FFPE (8 coupes de 10 µm chacune) à l'aide du « QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen) » conformément aux instructions du fabricant. Les concentrations et la qualité de l'ADN génomique extrait ont été obtenues à l'aide du 'Implen NanoPhotometer N60'. L'ADN génomique isolé du tissu thyroïdien malin a été soumis à une PCR conventionnelle utilisant la polymérase 'HotStart Taq' (Qiagen). L'ADN a été amplifié en utilisant les amorces suivantes spécifiques de BRAF Exon 15 : sens 5'-TCA TAA TGC TTG CTC TGA TAG GA-3' et antisens 5'-GGC CAA AAA TTT AAT CAG TGG A-3'. Les produits de PCR ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% et visualisés sous lumière UV (Figure 24). Les échantillons positifs pour BRAF^{V600E} ont été séquencés de manière bidirectionnelle avec séquençage de Sanger à l'aide du kit de séquençage « BigDye™ Terminator» (Applied Biosystems) après purification avec 'Exo-SAP' à la Plateforme UATRS (CNRST, Rabat, Maroc). Les séquences d'ADN obtenues ont été analysées à l'aide du logiciel SeqScape® v2.7 (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). Les échantillons ont également

été analysés par digital droplet PCR « ddPCR » après extraction de l'ADN génomique avec « Maxwell® RSC DNA FFPE Kit » selon les instructions du fabricant (ASB1450) à la plateforme de médecine moléculaire (Institut du cancer Gustave Roussy, France) (Figure 24). Le nombre de copies des mutations BRAF^{wt} et BRAF^{V600E} dans chaque échantillon a été notés.

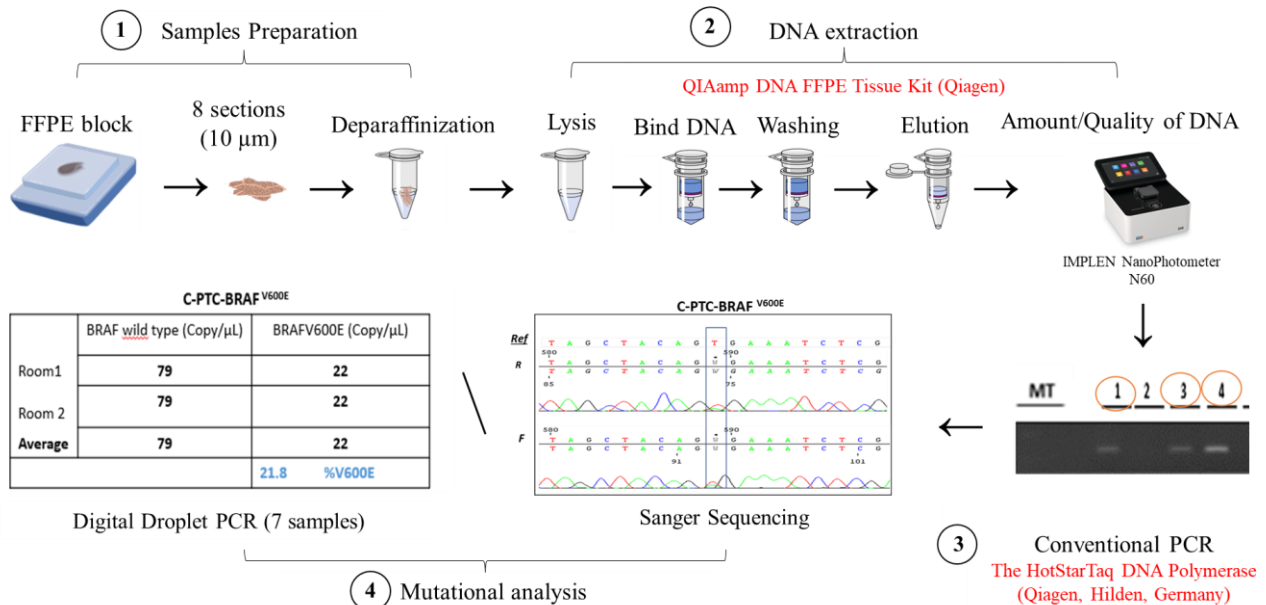


Figure 24: Les étapes principales de l'analyse mutationnel de l'oncogène BRAF^{V600E} dans des tissus FFPE.

3. Marquage immunohistochimique :

Le marquage immunohistochimique (IHC) a été réalisée selon le protocole du fabricant « Dako EnVision™ FLEX Kit (K8000) » à l'aide du dispositif 'Autostainer Link 48' (Agilent). La détection de NOX4 a été réalisée à l'aide d'un anti-NOX4 polyclonal de lapin (ab154244; Abcam), qui cible une région humaine spécifique de NOX4 «aa 252–564». Cet Ab est approprié pour la coloration immunohistochimique des tissus FFPE. La validation de NOX4 Ab a été réalisée sur du tissu rénal normal après avoir tester plusieurs dilutions (1 :250, 1 :500, 1 :750). L'immunomarquage CHD4 a été réalisée à l'aide d'un anti-CHD4 monoclonal de souris (clone 3F2/4, MABE-455 ; Sigma-Aldrich), dont l'immunogène est un peptide linéaire correspondant au CHD4 humain. La coloration CHD4 a été validée sur du tissu thyroïdien malin (bloc FFPE) après avoir testé diverses dilutions d'Ac dans le diluant d'anticorps 'EnVision™ FLEX' (1:50, 1:100, 1:250). La contre-coloration des tissus colorés par IHC a été réalisée à l'aide de 'EnVision™ FLEX Hematoxylin'. Des pathologistes expérimentés de l'Institut Gustave Roussy (France) et de l'HMIMV à Rabat ont attribué deux scores à l'expression des protéines NOX4 et CHD4. Un score faible (<2 pour NOX4 et ≤1 pour CHD4) signifie une absence ou une faible expression des protéines NOX4 et CHD4. Un score élevé

(≥ 2 pour NOX4 et 2 pour CHD4) indique une expression moyenne ou élevée des protéines NOX4 et CHD4. Généralement, les pathologistes qualifiés utilisent un score d'intensité de coloration, qui peut être négative (0), faible (1), modérée (2) et forte (3). Cette étude a classé les scores en deux catégories pour chaque expression protéique. Score < 2 ou ≤ 1 (dont 0 et 1) et score ≥ 2 ou 2 (dont 2 et 3) (Figure 25). De plus, les pathologistes ont déterminé la localisation subcellulaire des protéines NOX4 et CHD4 dans les tissus thyroïdiens malins et leurs tissus normaux adjacents présentés sur la même lame pour chaque échantillon.

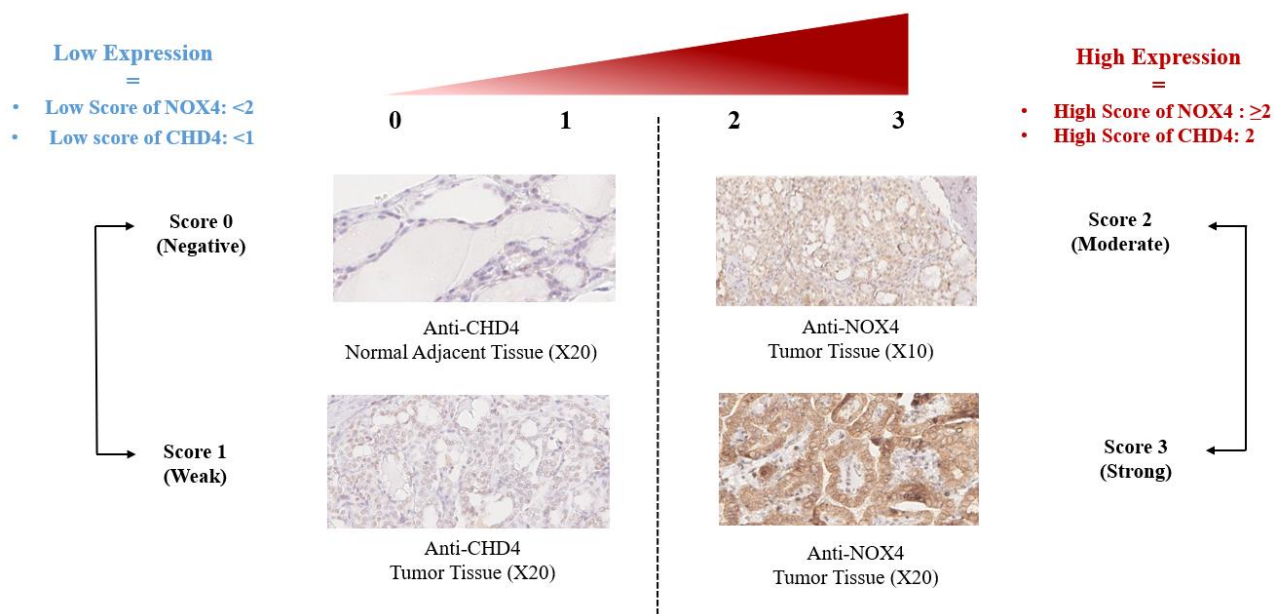


Figure 25: Scores d'intensité de coloration immunohistochimique pour NOX4 et CHD4 dans le tissu thyroïdien.

II. Approche cellulaire :

1. Culture Cellulaire :

Les lignées cellulaires BCPAP et 8505C hébergeant la mutation $\text{BRAF}^{\text{V600E}}$ ont été cultivées respectivement dans les milieux Dulbecco's Modified Eagle Medium 1X (DMEM) et RPMI 1640 (Gibco) additionnés de 10 % de sérum bovin fœtal (FBS) et 1 % d'antibiotiques : pénicilline/streptomycine (100 mg/ml; Gibco). La lignée cellulaire 'xénogreffe dérivée du patient' (PDX) hébergeant la mutation $\text{BRAF}^{\text{V600E}}$ a été cultivée dans le milieu 'Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12' (DMEM F-12) (Gibco) complété par 10 % de FBS et 1 % d'antibiotiques : pénicilline/streptomycine (100 mg/ml ; Gibco). Des cellules thyroïdiennes humaines primaires ont été collectées à l'Institut Gustave Roussy selon les normes éthiques après avoir obtenu le consentement de tous les patients. Le tissu thyroïdien a été collecté dans un milieu DMEM F-12 contenant 1% de pénicilline/streptomycine (100 mg/ml ; gibco), puis lavé deux fois avec du tampon PBS (Phosphate Buffered Saline) avec du

calcium (Ca^{2+}) et du magnésium (Mg^{2+}). Le tissu thyroïdien a ensuite été coupé dans un tampon PBS en petits fragments à l'aide d'un scalpel. Les fragments de tissus ont été digérés avec un tampon de digestion contenant de la collagénase I (100,5 U/ml) (Invitrogen), de la Dispase II (2,35 U/ml) (Roche Applied Science) et du glucose (préparé à 10 mg/ml dans du PBS) à 37 °C pendant 30 min. Le tissu digéré a été filtré sur un filtre 70 μM et collecté dans un Falcon contenant 10 ml de DMEM F-12 et 5 ml de FBS. Les cellules ont ensuite été centrifugées à 300 g pendant 5 min. Enfin, les cellules ont été remises en suspension et cultivées dans du milieu DMEM-F12 additionné de 5 % de FBS, 1 % d'antibiotiques Pénicilline/Streptomycine (100 mg/ml ; Gibco) et trois hormones : 1 mU/l de TSH bovine (Sigma-Aldrich) ; 6 $\mu\text{g/ml}$ de transferrine humaine (Roche Applied Science) et IGF1 10 nM, à 37°C dans 5% de CO_2 .

Un inhibiteur du récepteur TGF- β 1 (SB431542 -Calbiochem ; Vactosertib EW-7197), un inhibiteur de la phosphorylation de Smad3 (SIS3 –Sigma-Aldrich) et d' H_2O_2 (Sigma-Aldrich) ont été utilisés.

2. Transfection cellulaires par ARN interférents :

Les cellules ont été transfectées quatre heures après l'ensemencement avec un contrôle siARN (Thermofisher) et un siARN humain spécifique contre CHD4 (silencer select siRNA, Thermofisher), NOX4 (silencer select siRNA, Thermofisher), p22phox (on target-plus siRNA pool, Horizon Perkin Elmer company) , OGG1 (silencer select siRNA, Thermoscientific Thermofisher), MSH2 (Stealth Select RNAiTM, Thermoscientific) et MSH6 (Eurogentec, les séquences cibles sont 5'-CCCUGGCAAACAGAUUAAA-3'), en utilisant le réactif de transfection INTERFERIN selon le protocole du fabricant (Ozyme-Polyplus).

3. qRT-PCR en temps réel :

L'ARN total des échantillons cellulaires a été purifié avec le kit 'Nucleospin RNA II'(Machery Nagel). Le rendement en ARN a été déterminé sur un spectrophotomètre (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA). 1 μg d'ARN traité à la DNase a été soumis à une transcription inverse en utilisant la transcriptase inverse Maxima (Thermo Fisher Scientific) et oligodT dans un volume réactionnel total de 20 μl du tampon de PCR selon le protocole du fabricant pendant 60 min à 55 ° C. La PCR quantitative (qPCR) a été réalisée sur un système ABI 7500 (Applied Biosystems) à l'aide de 'Taqman gene expression assays' (Thermo Fisher Scientific).

4. Fractionnement de la chromatine :

Les culots cellulaires ont été suspendus dans du tampon A (10 mM HEPES pH 7,9, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl_2 , 0,34 M de saccharose, 10 % de glycérol, 1 mM de DTT, 1 x cocktail

d'inhibiteurs de protéase et de phosphatase. Le Triton X-100 a ensuite été ajouté à la suspension cellulaire pour atteindre une concentration finale de 0,1 % et incubé pendant 5 min dans la glace avant d'être centrifugé pendant 4 min à 1300 x g, 4°C. Le culot a été lavé avec le tampon A, puis remis en suspension dans le tampon B (EDTA 3 mM, EGTA 0,2 mM, DTT 1 mM, 1 x cocktail d'inhibiteurs de protéase et de phosphatase) et incubé 10 minutes dans la glace. La suspension de noyaux a été centrifugée pendant 4 minutes à 1700 x g, 4 °C. Le surnageant a été jeté et le culot, correspondant à la fraction de chromatine, a été lavé dans le tampon B et centrifugé pendant 1 min à 10 000 g, 4 °C. La fraction de chromatine a ensuite été lavée avec du tampon C (50 mM. Tris/HCl pH 8, NaCl 0,45 M, IGEPAL 0,05 %, 1 x cocktail d'inhibiteurs de protéase et de phosphatase) pour solubiliser les protéines faiblement liées à la chromatine et centrifugée pendant 1 min à 10 000 g, 4°C. Le culot restant a été lysé dans un tampon TEX (Tris·HCl 100 mM pH 7,0 contenant 2,5 % (wt/vol) de SDS, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, urée 4 M et un mélange d'inhibiteurs de phosphatase et de protéase) en utilisant Qiashredder (Qiagen). Les extraits totaux ont été préparés à partir de 1/10 du culot collecté après le traitement avant de commencer l'isolement de la fraction chromatinienne.

5. Extraction de protéines et Western Blot :

Les extraits cellulaires ont été solubilisés dans un tampon de lyse (Tris/HCl 100 mM pH 7, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, urée 4 M, 2,5 % de SDS) contenant 0,1 mM de PMSF, des inhibiteurs de protéase et de phosphatase (1X) (Roche Applied Science) . Les échantillons ont ensuite été soniqués pendant 30 secondes. Des échantillons de protéines (20 à 40 µg) additionnés de dithiothréitol DTT 10X (Sigma-Aldrich) et de glycérol/LDS 4X ont été dénaturés pendant 5 min à 95°C, soumis à une SDS-PAGE en utilisant un gel à 6 % et/ou 8 % de Tris-glycine polyacrylamide et électro-transférés sur des membranes de Protran nitrocellulose de 0,2 µm (Amersham). Les sites non spécifiques ont été bloqués par incubation dans du TBST-1X avec 5% de lait pendant 1h. La membrane a ensuite été incubée avec un anticorps primaire qui se lie spécifiquement à la protéine cible 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) et anti-vinculine (1:10000, ab18058 ABCAM). Après avoir éliminé l'anticorps primaire non lié par lavage avec TBST-1X, les membranes ont été incubées avec un anticorps secondaire anti-souris de chèvre (1: 10 000, Dako PO 447) ou anti-lapin de chèvre (1: 10 000, Southern Biotech 4010-05) conjugué à la HRP pendant 1 heure. Les membranes ont été lavées à nouveau 3 fois avec du TBS-T et les protéines ont été visualisées par chimioluminescence améliorée.

6. Analyses statistiques :

Toutes les analyses statistiques ont été exécutées par Graphpad Prism 8. Le test exact de Fisher, le test de Chi-carré, ainsi que le test ANOVA (two-way-ANOVA) sont utilisés dans les analyses statistiques. Une valeur $p < 0,05$ a été définie comme limite de signification pour toutes les analyses statistiques.

Résultats

Article I : A Comparative Analysis of NOX4 Protein Expression in Malignant and Non-Malignant Thyroid Tumors

Fenniche, S., Oukabli, M., Oubaddou, Y., Chahdi, H., Damiri, A., Alghuzlan, A., Laraqui, A., Dakka, N., Bakri, Y., Dupuy, C., and 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), pp. 5811–5823. <https://www.mdpi.com/1467-3045/45/7/367>.

Objectifs : la mutation BRAF^{V600E} est l'altération la plus fréquente des cancers thyroïdiens papillaires (40 - 60%). Elle s'agit d'un activateur potentiel de la voie MAPK. Cette mutation est associée à des caractéristiques clinico-pathologiques agressives. Ceci, en induisant une hyperméthylation des promoteurs de certains gènes métabolisant l'iode tels que, le symporteur d'iode et de sodium 'NIS' qui se traduit par la différenciation des cellules thyroïdiennes et donc la résistance à la thérapie à l'iode radioactif. L'utilisation des inhibiteurs pharmacologiques de BRAF^{V600E} ne permettent pas toujours de réinduire l'expression du NIS, d'où l'intérêt d'étudier les mécanismes moléculaires en aval de la mutation BRAF^{V600E} pour déterminer de nouveaux acteurs impliqués dans la signalisation oncogénique qui pourrait être de potentiels biomarqueurs pour améliorer le diagnostic et la prise en charge des patients. Il a été démontré par notre équipe que l'expression de l'ARNm de la NADPH oxydase 4 (NOX4) est augmentée dans les cancers papillaires de la thyroïde mutés pour BRAF^{V600E} comparativement aux PTCs non mutés. Cependant, aucun lien n'a été établi entre la présence de la mutation BRAF^{V600E} et la protéine NOX4 dans les tumeurs malignes et non malignes.

Résultats : Dans la présente étude nous avons exploré l'expression de la protéine NOX4 par une analyse immunohistochimique qui porte sur 134 échantillons FFPE (formalin-fixed, paraffin-embedded) provenant de tissus thyroïdiens tumoraux (45 PTCs : 28 C-PTC, 17 F-PTC, 3 ATC et 46 NAT) et de tissus thyroïdiens non malins (six thyroïdites lymphocytaires, quatre basedow, dix goîtres et 20 hyperplasies). Nous avons montré que la surexpression de NOX4 est corrélée positivement avec la présence l'oncogène BRAF^{V600E}. Par ailleurs, l'expression de NOX4 est augmentée dans les c-PTCs infiltrant et ce, indépendamment du statut mutationnel de BRAF. D'une manière intéressante, l'analyse immunohistochimique des tissus thyroïdiens non tumoraux a révélé un score élevé de la protéine NOX4 dans les Basedow, les goîtres et hyperplasies avec différentes localisations subcellulaires. **Innovation et Conclusion :** Nos résultats établissent pour la première fois un lien de corrélation positive entre BRAF^{V600E} et la protéine NOX4 dans les tissus tumoraux PTC. Néanmoins, la surexpression de NOX4 dans les c-PTCs infiltrant (90%) suggère son potentiel en tant que biomarqueur

indicatif de l'agressivité du cancer de la thyroïde. Enfin, le niveau élevé de la protéine NOX4 dans les tissus thyroïdiens non malins, suggère que NOX4 pourrait avoir un rôle dans la progression vers la malignité thyroïdienne.

Mots clés : Cancer thyroïdien papillaire (PTC), l'oncogène BRAF^{V600E}, NADPH oxydase 4 (NOX4), biomarqueur



Article

A Comparative Analysis of NOX4 Protein Expression in Malignant and Non-Malignant Thyroid Tumors

Salma Fenniche^{1,2,3,4}, Mohamed Oukabli^{5,6}, Yassire Oubaddou¹ , Hafsa Chahdi^{5,6}, Amal Damiri^{5,6}, Abir Alghuzlan^{2,4} , Abdelilah Laraoui⁵, Nadia Dakka¹, Youssef Bakri¹, Corinne Dupuy^{2,3,4} and Rabii Ameziane El Hassani^{1,*}

- ¹ Laboratory of Biology of Human Pathologies (BioPath), Faculty of Sciences, Mohammed V University in Rabat, Rabat 1014, Morocco; salma.fenniche@um5r.ac.ma (S.F.); yassire.oubaddou@um5r.ac.ma (Y.O.); n.dakka@um5r.ac.ma (N.D.); y.bakri@um5r.ac.ma (Y.B.)
- ² Gustave Roussy Cancer Campus, Pavillon de Recherche N°2, F-94805 Villejuif, France; abir.alghuzlan@gustaveroussy.fr (A.A.); corinne.dupuy@gustaveroussy.fr (C.D.)
- ³ Faculty of Medicine and Pharmacy, University Paris-Saclay, F-91400 Orsay, France
- ⁴ Unité Mixte de Recherche UMR9019 Centre National de la Recherche Scientifique, Pavillon de Recherche N°2, F-94805 Villejuif, France
- ⁵ Service of Anatomical Pathology, Military Hospital of Instruction Mohammed V (HMIMV-R), Rabat 1014, Morocco; oukablimohamed@yahoo.fr (M.O.); hchahdi168@gmail.com (H.C.); amaldamiripath@gmail.com (A.D.); loranjad@yahoo.fr (A.L.)
- ⁶ Faculty of Medicine and Pharmacy, Mohammed V University in Rabat, Rabat 10001, Morocco
- * Correspondence: r.ameziane@um5r.ac.ma or ame_rbi@yahoo.fr



Citation: Fenniche, S.; Oukabli, M.; Oubaddou, Y.; Chahdi, H.; Damiri, A.; Alghuzlan, A.; Laraoui, A.; Dakka, N.; Bakri, Y.; Dupuy, C.; et al. A Comparative Analysis of NOX4 Protein Expression in Malignant and Non-Malignant Thyroid Tumors. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2023**, *45*, 5811–5823. <https://doi.org/10.3390/cimb45070367>

Academic Editor: Dumitru A. Iacobas

Received: 17 May 2023

Revised: 8 June 2023

Accepted: 14 June 2023

Published: 13 July 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The comparative analysis of the expression of the reactive oxygen species-generating NADPH oxidase NOX4 from TCGA data shows that the NOX4 transcript is upregulated in papillary thyroid carcinomas (PTC)-BRAF^{V600E} tumors compared to PTC-BRAF^{wt} tumors. However, a comparative analysis of NOX4 at the protein level in malignant and non-malignant tumors is missing. We explored NOX4 protein expression by immunohistochemistry staining in malignant tumors (28 classical forms of PTC (C-PTC), 17 follicular variants of PTC (F-PTC), and three anaplastic thyroid carcinomas (ATCs)) and in non-malignant tumors (six lymphocytic thyroiditis, four Graves' disease, ten goiters, and 20 hyperplasias). We detected the BRAF^{V600E} mutation by Sanger sequencing and digital droplet PCR. The results show that NOX4 was found to be higher (score ≥ 2) in C-PTC (92.9%) compared to F-PTC (52.9%) and ATC (33.3%) concerning malignant tumors. Interestingly, all C-PTC-BRAF^{V600E} expressed a high score for NOX4 at the protein level, strengthening the positive correlation between the BRAF^{V600E} mutation and NOX4 expression. In addition, independent of the mutational status of BRAF, we observed that 90% of C-PTC infiltrating tumors showed high NOX4 expression, suggesting that NOX4 may be considered a complementary biomarker in PTC aggressiveness. Interestingly, NOX4 was highly expressed in non-malignant thyroid diseases with different subcellular localizations.

Keywords: papillary thyroid carcinomas; BRAF^{V600E} hot spot mutation; NADPH oxidase NOX4; biomarker

1. Introduction

Thyroid cancer is the most common endocrine disease, and papillary thyroid carcinomas (PTC) are the most frequent forms of thyroid cancer from the follicular origin (78–90%), followed by follicular thyroid carcinomas (FTC) and anaplastic thyroid carcinomas (ATC) [1–3]. An alarming worldwide increase in PTC incidence has been reported, and the molecular/histological heterogeneity of PTC complicates their management from both diagnostic and prognostic perspectives [2,4–9]. The BRAF^{V600E} mutation is detected in 28–90% of PTC tumors, indicating that this driver mutation is a common event in these tumors [1,3,10–16].

BRAF^{V600E} is a potent activator of the MAPK pathway and is often associated with aggressiveness, metastasis, radioiodine refractoriness, and mortality in thyroid cancer [13,15–18]. BRAF^{V600E} is exclusively detected in PTC (mainly in classical PTC ‘C-PTC’ and rarely in the follicular variant of PTC ‘F-PTC’) and ATC, but never in FTC and rarely in benign thyroid adenomas [2,19,20]. BRAF^{V600E} is useful as a prognostic and predictive biomarker in managing thyroid cancer. Regarding 10-year survival, PTC and FTC have survival rates of about 90–98%, whereas poorly differentiated thyroid carcinomas (PDTC) and ATC have survival rates of 50% and <10%, respectively [1]. Interestingly, high-grade tumors (PDTC and ATC) can arise from PTC and FTC through progressive genetic alterations and dedifferentiation [1,21], suggesting that thyroid tumor dedifferentiation can occur independently of the BRAF^{V600E} mutation because FTC is always BRAF^{wt}. In addition, the absence of a positive correlation between the BRAF^{V600E} mutation and thyroid tumor aggressiveness was reported [22–25]. An interesting classification of PTC has been proposed that groups PTC tumors independently of their molecular signature. PTC-BRAF^{V600E}-like tumors, including PTC-BRAF^{V600E} and PTC-BRAF^{wt}, share higher transcriptional MAPK pathway activity and higher dedifferentiation [7,26]. Consequently, exploring additional biomarkers other than BRAF^{V600E} could improve the management of PTC patients.

Reactive oxygen species (ROS) have been suspected of being involved in thyroid tumorigenesis for several years, and the role of ROS-generating NADPH oxidases has been analyzed in thyroid carcinomas [17,27,28]. Weyemi U et al. observed that NADPH oxidase 4 (NOX4) protein is overexpressed in thyroid cancer tissue (11 PTC) compared to normal adjacent tissue (eight NAT) [27]. Azouzi N et al. established a positive link between BRAF^{V600E} and NOX4 expression (at the mRNA level) by exploring about 500 PTC (BRAF^{V600E} versus BRAF^{wt}) from the TCGA database ‘Genome Atlas’ [17]. This study explored NOX4 expression at the protein level in 134 thyroid tissues (48 malignant tissues, 46 normal tissues surrounding the tumors, and 40 non-malignant tissues). Our results showed that the NOX4 protein score is higher in PTC, and we strengthened the link between NOX4 protein expression and BRAF^{V600E} mutation in PTC. Interestingly, and unlike the mutational status of BRAF, NOX4 expression is higher in C-PTC infiltrating tumors, highlighting a potential role of NOX4 as a marker of aggressiveness in PTC. Finally, we observed an overexpression of NOX4 in non-malignant diseases with different subcellular localization.

2. Materials and Methods

This study was approved by the Ethics Committee for Biomedical Research (CERB) of the Faculty of Medicine and Pharmacy in Rabat, with approval number 52/20.

2.1. Study Subjects

In this retrospective study, we collected 134 FFPE thyroid tissues from patients diagnosed at the Department of Anatomical Pathology in Military Hospital of Instruction Mohammed V in Rabat (HMIMV-R) between January 2015 and December 2021. Our cohort included 46 NAT, 28 classical forms of papillary thyroid carcinomas (C-PTC), 17 follicular variants of papillary thyroid carcinomas (F-PTC), three ATC, and 40 non-malignant thyroid tissues (including six lymphocytic thyroiditis, four Graves’ disease, ten goiters, and 20 hyperplasias). Malignant and non-malignant thyroid tissues were histologically classified according to the World Health Organization (WHO) classification (Lloyd R.V. et al., 4th Edition, IARC: Lyon 2017) by an experienced anatomopathologist at the time of diagnosis. In addition, retrospective diagnosis confirmation was performed by experienced anatomopathologists from both HMIMV in Rabat (Morocco) and Gustave Roussy Cancer Institute (France). FFPE block selection was based on (1) cell sufficiency (more than 90% of tumor cells in thyroid tumors/absence of tumor cells in non-tumoral tissues) and (2) FFPE block availability.

The collected information from the medical files of the selected patients constituted a database for this study, providing all clinicopathological features of the patients.

2.2. NOX4 Immunohistochemistry Staining

Immunohistochemical staining of NOX4 was performed using rabbit polyclonal anti-NOX4 (ab154244, Abcam, Cambridge, United Kingdom), and Dako EnVision™ FLEX High pH 'LINK' /FLEX IHC Microscope Slides (Agilent, Santa Clara, California, United States) in an automaton (Autostainer Link 48; Agilent) according to the manufacturer's protocols. These antibodies (Abs), whose immunogen corresponds to human NOX4 (aa 252–564), are suitable for IHC staining of FFPE tissue (IHC-P). The validation of NOX4 staining was performed after testing several Ab dilutions (1:250, 1:500, 1:750 in EnVision™ FLEX Antibody Diluent) on normal human kidney tissue (FFPE Block) (Supplementary Figure S2). Counterstaining was performed by hematoxylin 'EnVision™ FLEX Hematoxylin'. Immunostaining of thyroid tissue without NOX4 Ab served as a negative control.

An experienced anatomopathologist from HMIMV in Rabat and Gustave Roussy Cancer Institute (France) assigned two scores to NOX4 protein expression. A score <2 corresponds to an absence or low expression of NOX4 protein, and a score ≥2 corresponds to a medium or high expression of NOX4 protein. As usually used by trained pathologist, the score of the staining intensity could be negative (0), weak (1), moderate (2), and strong (3) [29]. For our study, we classified scores <2 (including 0 and 1) and ≥2 (including 2 and 3).

In addition, the subcellular localization of NOX4 was noted. Slides were scanned with a NanoZoomer HT C9600 (Hamamatsu Photonics KK, Hamamatsu, Japan) digital scanner, using a ×40 objective. Scanned slides were uploaded on the CaloPix database (Tribvn Healthcare, Chatillon, France).

2.3. Mutational Analysis

BRAF^{V600E} hotspot mutation was analyzed in 48 malignant thyroid tissues, including 28 C-PTCs, 17 F-PTCs, and three ATCs, using Sanger direct sequencing and digital droplet PCR after genomic DNA extraction.

The genomic DNA extraction was performed in 8 sections of 10 µm each, according to the manufacturer's 'QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen)' protocol, specially designed for purifying DNA from FFPE tissue sections. The quality and concentration of the extracted DNA were determined using the IMPLen NanoPhotometer N60.

After genomic DNA extraction, PCRs were conducted using the HotStart Taq polymerase (Qiagen) with the following conditions: 95 °C for 15 min, followed by 42 cycles of 95 °C for 30 s, 53 °C for 30 s, and 72 °C for 45 s, and a final extension cycle of 72 °C for 10 min, all carried out in the Thermal Cycler (ProFlex PCR System; Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). The forward and reverse primers for BRAF Exon 15 were (F) 5'-TCA TAA TGC TTG CTC TGA TAG GA-3' and (R) 5'-GGC CAA AAA TTT AAT CAG TGG A-3'. The positive PCR products for BRAF^{V600E}, obtained after migration in 1.5% agarose gel electrophoresis, were purified using Exo-SAP before being bidirectionally sequenced with the Big Dye Terminator sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) at the UATRS Platform, CNRST, Rabat, Morocco. DNA sequences were analyzed with the SeqScape 2.7 software (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA).

For digital droplet PCR, genomic DNA was extracted using the 'Maxwell® RSC DNA FFPE Kit' from Promega/'Maxwell® RSC Instruments (Cat.# AS4500, AS8500)' according to the manufacturer's protocols (ASB1450). The extracted genomic DNA was sequenced using Droplet Digital PCR 'ddPCR' at the platform of molecular medicine in Gustave Roussy institute by determining the copy number of BRAF^{V600E} and BRAF^{wt} in each sample.

2.4. Statistical Analysis

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8. Fisher's exact and chi-square tests examined the associations between clinicopathological variables, BRAF^{V600E}, NOX4 protein expression, and NOX4 protein localization. A *p*-value of <0.05 was considered statistically significant for all analyses.

3. Results

3.1. Clinicopathological Characteristics of Patients

The analysis of the clinicopathologic data of our cohort revealed a female predominance (81%) (Table 1). The median age at diagnosis was 42.5 years, with a standard error of 2.4 years. Histologically, PTC comprise several histological subtypes (variants) that share specific nuclear features of PTC. We observed that C-PTC constituted the most frequent histological subtype (58.33%), followed by F-PTC (35.41%) and finally ATCs (6.26%) (Table 1). Based on aggressive features, we found that most thyroid cancers presented with a tumor size greater than 1 cm, while we noted the presence of vascular emboli in 15% of cases, capsular breach in 23% of cases, and lymph node metastases in 6.3% of cases (Table 1).

Table 1. Clinicopathological parameters of patients with thyroid tumors (n = 48).

Clinicopathological Parameters	n (%)
Gender	
Female	39 (81%)
Male	9 (19%)
Age	
Median ± standard error	42.5 ± 2.4
Histological variant	
C-PTC	28/48 (58.33%)
F-PTC	17/48 (35.41%)
ATC	3/48 (6.26%)
Tumor size	
≤1 cm	7/48 (15%)
>1 cm	30/48 (63%)
unknown	11/48 (23%)
vascular emboli	
Presence	7/48 (15%)
Absence	41/48 (85%)
Capsular breach	
Presence	11/48 (23%)
Absence	37/48 (77%)
lymph node metastasis	
Presence	3/48 (6.3%)
Absence	34/48 (70.8%)
Unknown	11/48 (22.9%)

PTC: papillary thyroid carcinomas, C-PTC: classical form of papillary thyroid carcinomas, F-PTC: follicular variants of papillary thyroid carcinomas, ATC: anaplastic thyroid carcinomas. Unknown: absence of this information in both registers and medical files.

3.2. Clinicopathological Parameters of Each Histological Subtype of Thyroid Carcinomas

The comparative analysis between the histological type of 48 thyroid carcinomas (45 PTCs and three ATCs) and their clinicopathological characteristics revealed that 46.4% of C-PTC occurs in individuals aged ≥45 years old. However, 52.9% of F-PTCs occur in individuals aged <45 years old, while 66.7% of ATCs occur in individuals aged >45 years old (see Table 2). Regarding tumor size, we observed that most PTC tumors were >1 cm (64.3% for C-PTCs and 70.6% for F-PTC). As for vascular emboli and capsular breach, we found them, respectively, in 33.3% and 0% of ATCs, 17.9% and 32.1% of C-PTC, and 5.9% and 11.8% of F-PTC (see Table 2). However, we detected lymph node metastasis only in the classical form of PTC (10.7%) (Table 2).

Table 2. Clinicopathological parameters of each histological subtype of thyroid carcinomas ($n = 48$).

Clinicopathological Parameters	PTC ($n = 45$)	C-PTC ($n = 28$)	F-PTC ($n = 17$)	ATC ($n = 3$)	C-PTC-F-PTC Chi-Square/Fisher's Exact Test (p -Value < 0.05)
Age					
<45	19/45 (42.2%)	10/28 (35.7%)	9/17 (52.9%)	1/3 (33.3%)	0.1516
≥45	16/45 (35.6%)	13/28 (46.4%)	3/17 (17.7%)	2/3 (66.7%)	
unknown	10/45 (22.2%)	5/28 (17.9%)	5/17 (29.4%)	-	
Tumor size					
≤1 cm	7/45 (15.6%)	4/28 (14.3%)	3/17 (17.6%)	-	>0.9999
>1 cm	30/45 (66.7%)	18/28 (64.3%)	12/17 (70.6%)	-	
Unknown	8/45 (17.7%)	6/28 (21.4%)	2/17 (11.8%)	3 (100%)	
vascular emboli					
Presence	6/45 (13.3%)	5/28 (17.9%)	1/17 (5.9%)	1/3 (33.3%)	0.3846
Absence	39/45 (86.7%)	23/28 (82.1%)	16/17 (94.1%)	2/3 (66.7%)	
Capsular breach					
Presence	11/45 (24.4%)	9/28 (32.1%)	2/17 (11.8%)	0 (0%)	0.1647
Absence	34/45 (75.6%)	19/28 (67.9%)	15/17 (88.2%)	3/3 (100%)	
lymph node metastasis					
Presence	3/45 (6.6%)	3/28 (10.7%)	0 (0%)	0 (0%)	0.2432
Absence	34/45 (75.6%)	18/28 (64.2%)	16/17 (94.1%)	0 (0%)	
Unknown	8/45 (17.8%)	7/28 (25%)	1/17 (5.9%)	3/3 (100%)	

PTC: papillary thyroid carcinomas, C-PTC: classical form of papillary thyroid carcinomas, F-PTC: follicular variants of papillary thyroid carcinomas, ATC: anaplastic thyroid carcinomas. *Unknown*: absence of this information in both registers and medical files.

3.3. BRAF^{V600E} Mutation in Thyroid Carcinomas

We analyzed the mutational profile of 48 thyroid carcinomas (45 PTC = 28 C-PTC + 17 F-PTC and three ATC) regarding the BRAF^{V600E} hotspot mutation using Sanger direct sequencing and digital droplet PCR (ddPCR). The mutational profiles of 41 samples (BRAF^{V600E} or BRAF^{wt}) were detected by Sanger direct sequencing, while ddPCR explored 7 samples. Genomic DNA extracted from FFPE block tissues is known to be extensively fragmented [30–32]. Therefore, seven samples whose results were not exploitable by Sanger direct sequencing were analyzed by ddPCR. (Figure S1 Supplementary Materials) shows an example of electropherogram sequences (Figure S1a Supplementary Materials) and an example of results from ddPCR (Figure S1b Supplementary Materials) for BRAF^{V600E} mutation in C-PTC and BRAF^{wt} in F-PTC. In this study, BRAF^{V600E} mutation was found exclusively in the classical form of PTC (10 C-PTC-BRAF^{V600E}/28 C-PTC: 35.7%), while no mutation was detected in the follicular variant of PTC and ATC (see Figure 1). This percentage is about 20.83% in all thyroid carcinomas (10 C-PTC-BRAF^{V600E}/48; 48 = 28 C-PTC + 17 F-PTC + 3 ATC) and 22.22% in all papillary thyroid carcinomas (ten C-PTC-BRAF^{V600E}/45; 45 = 28 C-PTC + 17 F-PTC). Finally, we did not observe any statistically significant association between BRAF^{V600E} mutation and the aggressiveness of thyroid carcinomas (see Table 3).

3.4. NOX4 Protein Expression in Human Malignant Thyroid Tissues

The antibody specificity and dilution choice (1:250) were validated in human kidney tissues (Figure S2) known to express NOX4 protein [33]. NOX4 protein expression was analyzed by immunohistochemistry staining in thyroid tumor tissues and their paired NAT (Figure 2a). Our results showed that 92.8% of C-PTC, 52.9% of F-PTC, and 33.3% of ATC express high levels of NOX4 protein (score ≥ 2) (see Figure 2b). No high NOX4 protein expression was observed in normal adjacent tissues (see Figure 2b). Notably, most FFPE thyroid tumor blocks contain both tumor areas and their normal adjacent tissues

NAT (42/46 NAT), enabling us to immunostain both tumor and normal adjacent tissues on the same slide (see Figure 2a). Importantly, all thyroid tumors (BRAF^{V600E}) overexpressed NOX4 protein (100%: 10 C-PTC/10-C-PTC), highlighting the positive correlation between BRAF^{V600E} mutation and NOX4 protein expression in PTC (p -value < 0.0001) (see Figure 2c). However, a non-negligible percentage of BRAF^{wt} thyroid tumors (68.4%: 26/38) also exhibited a high level of NOX4 expression (see Figure 2c).

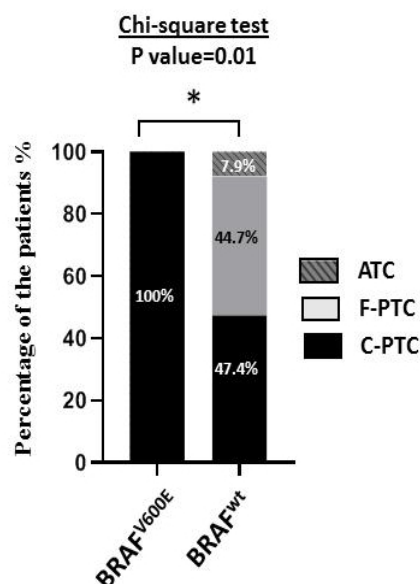


Figure 1. BRAF^{V600E} mutation in thyroid carcinomas. Association between BRAF^{V600E} mutation and histological type of thyroid carcinomas ($n = 48$). In total, 100% of thyroid carcinoma harboring BRAF^{V600E} are exclusively C-PTC. ATC: anaplastic thyroid carcinoma ($n = 3$). C-PTC: classical forms of papillary thyroid carcinoma ($n = 28$). F-PTC: follicular variants of papillary thyroid carcinoma ($n = 17$). BRAF^{V600E} ($n = 10$), BRAF^{wt} ($n = 38$). The statistical tests performed by GraphPad 8. * The statistical significance is affirmed by a p -value less than 0.05. *: p -value ≤ 0.05 .

Table 3. BRAF^{V600E} mutation and C-PTC clinicopathological parameters ($n = 28$).

Clinicopathological Parameters	C-PTC BRAF ^{V600E} ($n = 10$)	C-PTC BRAF ^{wt} ($n = 18$)	Total	Chi-Square/Fisher's Exact Test (p -Value < 0.05)
Tumor size				
≤1 cm	1/10 (10%)	2/18 (11.1%)	3	>0.9999
>1 cm	7/10 (70%)	12/18 (66.7%)	19	
unknown	2/10 (20%)	4/18 (22.2%)	6	
lymph node metastasis				
Presence	1/10 (10%)	2/18 (11.1%)	3	>0.9999
Absence	8/10 (80%)	10/18 (55.6%)	18	
unknown	1/10 (10%)	6/18 (33.3%)	7	
vascular emboli				
Presence	2/10 (20%)	3/18 (16.7%)	5	0.8253
Absence	8/10 (80%)	15/18 (83.3%)	23	
Capsular breach				
Presence	4/10 (40%)	5/18 (27.8%)	9	0.5070
Absence	6/10 (60%)	13/18 (72.2%)	19	

C-PTC: Classical form of papillary thyroid carcinomas. Unknown: absence of this information in both registers and medical files.

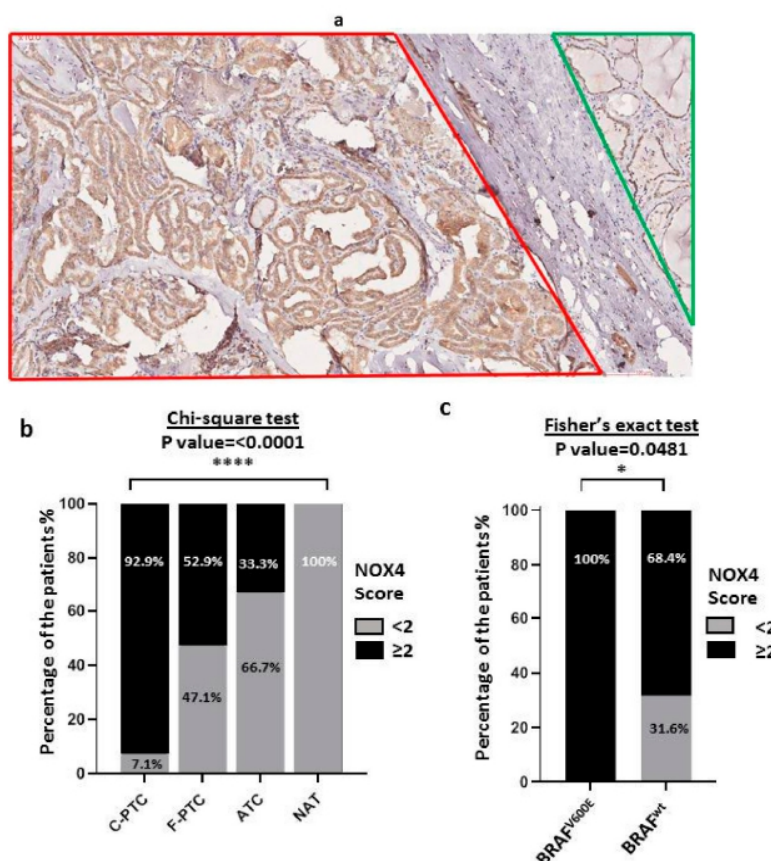


Figure 2. NOX4 protein expression in thyroid carcinomas. (a) Representative example of NOX4 protein expression in C-PTC. Red lines represent tumor tissue sections, and green lines represent normal adjacent tissue (NAT) sections on the same slide ($\times 10$). There is a high expression level of NOX4 protein in C-PTC and a low expression level of NOX4 in its adjacent normal tissue (NAT). (b) Comparative analysis of NOX4 protein expression in human thyroid tumors ($n = 48$: 28 C-PTC, 17 F-PTC, 3 ATC) compared to their normal adjacent tissues (46 NAT). Percentage calculated according to the number of each score <2 and ≥ 2 . The score <2 represents an absence or very low and low expression of NOX4 protein ($n = 58$). The score ≥ 2 represents a middle or/and high expression level of NOX4 protein ($n = 36$). (c) Association between BRAF^{V600E} mutation and NOX4 expression. In total, 100% of thyroid carcinoma harboring BRAF^{V600E} mutation showed high expression level of NOX4 protein. BRAF^{V600E} ($n = 10$), BRAF^{wt} ($n = 38$). The statistical tests are performed by GraphPad 8. * The statistical significance is affirmed by a p -value under 0.05. *: p -value ≤ 0.05 , ****: p -value ≤ 0.0001 .

To investigate the involvement of NOX4 protein in thyroid tumor aggressiveness, we observed a statistically significant correlation between the overexpression of NOX4 protein and the presence of a capsular breach, indicating the association of NOX4 protein with the aggressiveness of thyroid carcinomas in our cohort (p -value = 0.0481) (see Table 4). Additionally, we evaluated NOX4 protein expression in infiltrating PTC tumors, characterized by the infiltration of tumor borders and consequently presenting a risk of metastasis initiation. We found that the majority of PTC infiltrating tumors exhibited a high level of NOX4 protein expression (83.3%: score ≥ 2 for all PTC and 90% for C-PTC: score ≥ 2) (see Figure 3a,b), highlighting a potential role of NOX4 protein in PTC aggressiveness. However, only 40% of infiltrating tumors (C-PTC) were BRAF^{V600E} positive (see Figure 3c), while all these tumors overexpressed NOX4 (100% of C-PTC BRAF^{V600E}: score ≥ 2) (see Figure 3d). Additionally, 83.3% of infiltrating C-PTC (BRAF^{wt}) overexpressed NOX4 protein independently of the presence of the BRAF^{V600E} mutation (Figure 3d) (Fisher's test: $p \geq 0.999$ for BRAF^{wt} infiltrating C-PTC versus BRAF^{V600E} infiltrating C-PTC).

Table 4. NOX4 protein expression and clinicopathological parameters of thyroid tumors.

Clinicopathological Parameters	n (%)	NOX4 Overexpression (Score: ≥ 2)	NOX4 Low Expression (Score: < 2)	Fisher's Exact Test (p -Value < 0.05)
Gender				
Female	39/48 (81%)	30/39 (76.9%)	9/39 (23.1%)	>0.9999
Male	9/48 (19%)	7/9 (77.8%)	2/9 (22.2%)	
Histological variant				
C-PTC	28/48 (58.33%)	26/28 (92.9%)	2/28 (7.1%)	<0.0001
F-PTC	17/48 (35.41%)	9/17 (52.9%)	8/17 (47.1%)	
ATC	3/48 (6.26%)	1/3 (33.3%)	2/3 (66.7%)	
Tumor size				
≤ 1 cm	7/48 (15%)	7/7 (100%)	0 (0%)	0.3079
> 1 cm	30/48 (63%)	22/30 (73.3%)	8/30 (26.7%)	
unknown	11/48 (23%)	7/11 (63.4%)	4/11 (36.6%)	
vascular emboli				
Presence	7/48 (15%)	6/7 (85.7%)	1/7 (14.3%)	0.6621
Absence	41/48 (85%)	30/41 (73.2%)	11/41 (26.8%)	
Capsular breach				
Presence	11/48 (23%)	11/11 (100%)	0/11 (0%)	0.0442
Absence	37/48 (77%)	25/37 (67.6%)	12/37 (32.4%)	
lymph node metastasis				
Presence	3/48 (6.3%)	3/3 (100%)	0/3 (0%)	0.5483
Absence	34/48 (70.8%)	24/34 (70.6%)	10/34 (29.4%)	
unknown	11/48 (22.9%)	9/11 (81.8%)	2/11 (18.2%)	

PTC: papillary thyroid carcinomas, C-PTC: classical form of papillary thyroid carcinomas, F-PTC: follicular variant of papillary thyroid carcinomas, ATC: anaplastic thyroid carcinomas. NOX4: NADPH oxidase 4. Unknown: absence of this information in both registers and medical files.

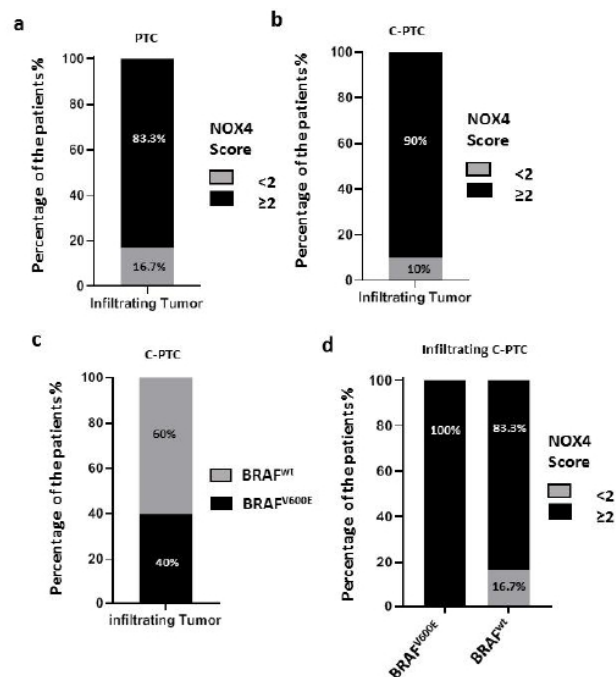


Figure 3. Correlation of infiltrating character followed by the limitation of the border of the tumor with NOX4 protein expression and BRAF^{V600E} mutation in PTC ($n = 21$: 17 c-PTC, 4 F-PTC). (a) In total, 83% (10/12) of papillary thyroid carcinoma with an infiltrating character show overexpression of NOX4 protein ($n = 12$). (b) C-PTC: high expression of NOX4 protein in infiltrating tumors ($n = 10$) (90% (9/10)) with a score ≥ 2 . (c) C-PTC: 40% (4/10) of papillary thyroid carcinoma with an infiltrating character harbor BRAF^{V600E} mutation. (d) In total, 100% of infiltrating C-PTC harboring BRAF^{V600E} mutation overexpress NOX4 protein. Percentage calculated according to the total number of infiltrating tumors of each histological type.

3.5. NOX4 Protein Expression and Subcellular Localization in Non-Malignant Human Thyroid Tissues

We explored 40 non-malignant human thyroid disease tissues (six lymphocytic thyroiditis, four Graves' disease, ten goiters, and 20 hyperplasias) and observed that the protein level of NOX4 was higher in Graves' disease (100%: 4/4), goiters (80%: 8/10), and hyperplasias (70%: 14/20) (Figure 4a). Interestingly, we observed a different subcellular localization of NOX4 in non-malignant human thyroid tissues compared to malignant thyroid tissues (Figure 4c,d). NOX4 immunostaining revealed a perinuclear and cytoplasmic (intracellular) localization in both malignant thyroid tissues (100%: 48/48) and their normal adjacent tissues (100%: 46/46) (see Figure 4c). However, NOX4 localization was different in non-malignant thyroid tissues, being exclusively intracellular in both lymphocytic thyroiditis (100%: 6/6) and Graves' disease (100%: 4/4), nuclear and intracellular in goiters (100%: 10/10), and at different localizations in hyperplasias: intracellular (15%: 3/20), nuclear (35%: 7/20), and intracellular and nuclear (50%: 10/20) (Figure 4b).

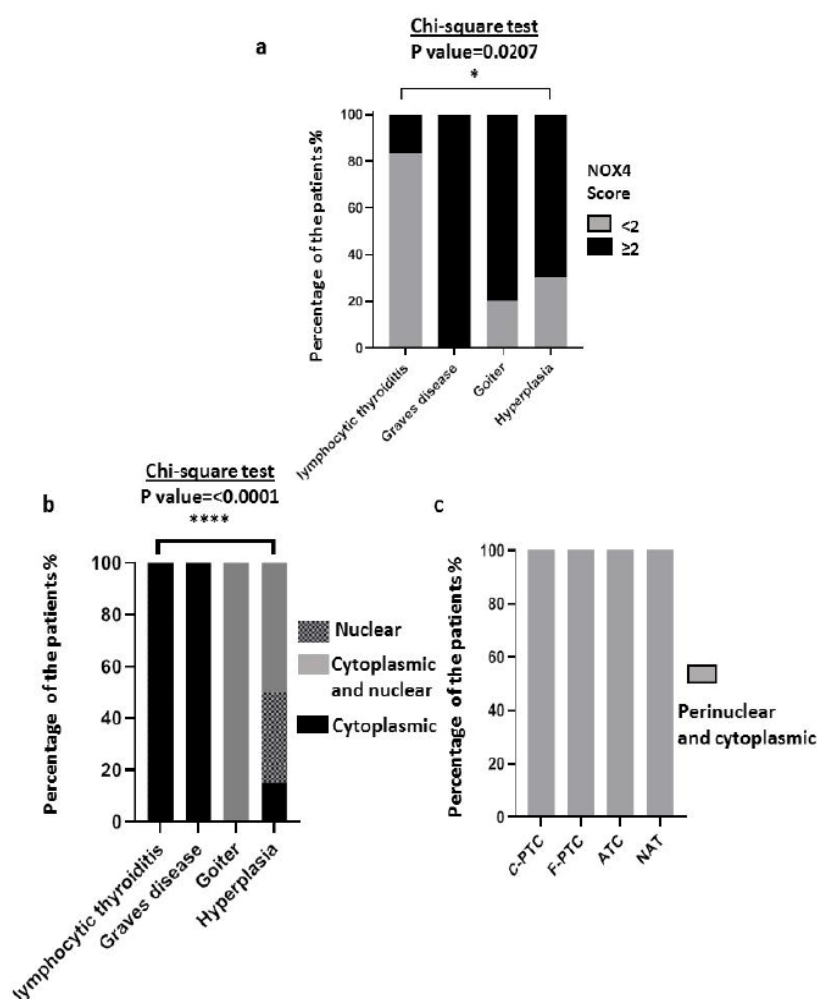


Figure 4. Immunohistochemical analysis of NOX4 protein expression and subcellular localization in thyroid carcinomas and non-malignant thyroid diseases. (a) NOX4 protein expression in 40 non-malignant thyroid diseases (six lymphocytic thyroiditis, four Graves' disease, ten goiters, and 20 hyperplasias). (b) Subcellular localization of NOX4 protein in 40 non-malignant thyroid diseases (six lymphocytic thyroiditis, four Graves' disease, ten goiters, and 20 hyperplasias). (c) Subcellular localization of NOX4 protein in 94 malignant thyroid tissues (28 c-PTC, 17 F-PTC, 3 ATC, and 46 NAT). The statistical tests performed by GraphPad 8. * The statistical significance is affirmed by a *p*-value less than 0.05. *: *p*-value ≤ 0.05 , ****: *p*-value ≤ 0.0001 .

4. Discussion

PTC is a heterogeneous group of thyroid cancer, and its molecular and histological diversity constitute a real challenge for managing these tumors. Molecular exploration of new and/or complementary biomarkers could improve the management of PTC patients. ROS are involved in both physiological and pathological processes in the thyroid, and human cells can produce ROS through various enzymes, including NADPH oxidases (NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1, and DUOX2). Thyrocytes express three NADPH oxidases (DUOX1, DUOX2, and NOX4) with different subcellular localizations and functions. In the thyroid gland, DUOX2 contributes mainly to thyroid hormone synthesis by providing H_2O_2 to thyroid peroxidase (TPO), while ROS-generating NADPH oxidases DUOX1 and NOX4 are associated with oxidative DNA damage that could promote thyroid radio-carcinogenesis and oncogenes thyroid cancer dedifferentiation, respectively [17,27,33–35].

Importantly, unlike the other NADPH oxidases, the level of NOX4 protein is directly related to the level of ROS generation. Therefore, a high level of NOX4 may promote oxidative DNA damage and genomic instability in thyroid cells [33]. In this study, we analyzed NOX4 expression at the protein level by immunostaining in 134 thyroid tissues (48 thyroid carcinomas, 46 normal adjacent tissues, and 40 non-malignant thyroid tissues) to improve our understanding of the potential role of NOX4 as a predictive marker of aggressiveness in PTC. Overall, we observed a high level of NOX4 protein in thyroid cancer tissues compared to normal adjacent tissues (92.9% of C-PTC, 52.9% of F-PTC, and 33.3% of ATC and 0% of NAT), which is consistent with previous reports with fewer tissues [28,36] (Figure 2b).

We previously showed a positive correlation between NOX4 mRNA and BRAF^{V600E} mutation in about 500 PTC from TCGA data [17], but this has not been established at the protein level in thyroid cancer tissues. In this study, all PTC-BRAF^{V600E} overexpressed NOX4 protein (Figure 2c). However, 68.4% of PTC-BRAF^{wt} also showed a high score of NOX4 protein (Figure 2c), emphasizing that NOX4 expression could be upregulated in thyroid cancer independently of BRAF mutational status. The TGF- β pathway plays a key role in thyroid tumorigenesis. The oncogenic effect of BRAF^{V600E} in thyroid cells was shown to be mediated in part by TGF- β [37], and NOX4 is upregulated in thyroid cancer cells under the control of the BRAF^{V600E}-TGF- β axis [17]. The tumor microenvironment, including cancer-associated fibroblasts (CAF) and myeloid cells such as macrophages, also produces TGF- β [38]. Therefore, the microenvironment may contribute to inducing NOX4 in tumoral cells.

To establish the link between NOX4 protein and the infiltrating ability of PTC, we explored the presence or absence of a frank capsular breach, as its presence indicates the ability of tumors to extend/invoke and promote extrathyroidal extension. More than 90% of C-PTC infiltrating tumors overexpressed NOX4 protein (score ≥ 2), suggesting a role of NOX4 in thyroid tumor aggressiveness (Figure 3).

Certainly, the expression level of NOX4 protein in terms of ROS production can be related to the incidence of oxidative DNA damage in thyrocytes. Therefore, the cellular localization of NOX4 appears to be of great interest. Indeed, the nuclear and perinuclear localization of ROS-generating NOX4 can promote genomic instability associated with thyrocyte transformation. The perinuclear localization of NOX4 observed in malignant human thyroid tissues (Figure 4) is concordant with this, as genomic instability is a characteristic of malignant tumors. Interestingly, goiter and hyperplasia tissues with a high score of NOX4 protein also showed nuclear and perinuclear localization (Figure 4), questioning the potential role of NOX4 in the progression of these non-malignant diseases to thyroid cancer. Indeed, a high risk of cancer was reported in goiters (18%) [39], and thyroid hyperplasia is reported as the most frequent benign disease associated with PTC [40]. Graves' disease also shows a high level of NOX4 protein (Figure 4a), and this result can be explained by the constitutive activation of the TSH receptor (stimulating antibody, mutations) in Graves' disease tissue [41]. The upregulation of NOX4 by TSH has previously been reported [27].

5. Conclusions

Taken together, the main conclusion of our study is that NOX4 expression could be a potential co-marker of thyroid cancer aggressiveness. However, complementary studies are needed to explore this possibility further. Indeed, BRAF^{V600E} mutation is not often associated with thyroid aggressiveness [22–25]. Several isoforms of NOX4 exist (from GenCards and Aceview), and an antibody recognizing the conserved catalytic core of NOX4 cannot discriminate between the different isoforms in thyroid tissues. Therefore, identifying NOX4 isoforms associated with different diseases may improve diagnosis and/or prognosis.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cimb45070367/s1>, Figure S1: An example of electropherogram sequences (Figure S1a) and an example of results from ddPCR (Figure S1b) for BRAF^{V600E} mutation in C-PTC and BRAF^{wt} in F-PTC. Figure S2: NOX4 Immunoeexpression in normal kidney cells. Validation of anti-NOX4 antibody (ab154244) using different dilutions test (1:250, 1:500 and 1:750).

Author Contributions: Conceptualization, R.A.E.H.; methodology, S.F., Y.O., M.O. and A.A.; software, S.F. and Y.O.; validation, S.F., Y.O., H.C., A.D. and A.L.; formal analysis, Y.B., N.D., M.O., C.D. and R.A.E.H.; investigation, R.A.E.H., Y.B., M.O. and C.D.; resources, R.A.E.H. and M.O.; data curation, S.F. and Y.O.; writing—original draft preparation, R.A.E.H., S.F. and Y.O.; writing—review and editing, R.A.E.H., C.D., Y.B., M.O., S.F. and Y.O.; visualization, R.A.E.H.; supervision, R.A.E.H., C.D., Y.B., N.D. and M.O.; project administration, R.A.E.H.; funding acquisition, R.A.E.H., C.D. and Y.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Research funded by (1) Cancer Research Institute (IRC). www.irc.ma; Project: 767/AAMP2019. (2) PHC TOUBKAL N° TBK/20/113 N° CAMPUS: 43586YA (Maroc/France) (2020–2022); (3) Agence Nationale Des Plantes Médicinales Et Aromatiques (ANPMA’); and (4) doctoral scholarship to S. FENNICHE from CNRST, Maroc (Bourse d’excellence); (5): Publication fees supported by the “Cancer Research Institute IRC”, Kingdom of Morocco. www.irc.ma.

Institutional Review Board Statement: This study was approved by the Ethics Committee for Biomedical Research (CERB) of the Faculty of Medicine and Pharmacy in Rabat, with approval number 52/20.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Archived datasets are not available due to the ethic restriction.

Acknowledgments: We thank Abderrahmane Al Bouzidi for his constructive contribution at the initiation of this research work.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Nikiforov, Y.E.; Nikiforova, M.N. Molecular Genetics and Diagnosis of Thyroid Cancer. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2011**, *7*, 569–580. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Hu, J.; Yuan, I.J.; Mirshahidi, S.; Simental, A.; Lee, S.C.; Yuan, X. Thyroid Carcinoma: Phenotypic Features, Underlying Biology and Potential Relevance for Targeting Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1950. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Kaabouch, M.; Chahdi, H.; Azouzi, N.; Oukabli, M.; Rharrassi, I.; Boudhas, A.; Jaddi, H.; Ababou, M.; Dakka, N.; Boichard, A.; et al. BRAFV600E Hot Spot Mutation in Thyroid Carcinomas: First Moroccan Experience from a Single-Institution Retrospective Study. *Afr. Health Sci.* **2020**, *20*, 1849–1856. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Agarwal, S.; Bychkov, A.; Jung, C.-K. Emerging Biomarkers in Thyroid Practice and Research. *Cancers* **2021**, *14*, 204. [[CrossRef](#)]
5. Aschebrook-Kilfoy, B.; Schechter, R.B.; Shih, Y.-C.T.; Kaplan, E.L.; Chiu, B.C.H.; Angelos, P.; Grogan, R.H. The Clinical and Economic Burden of a Sustained Increase in Thyroid Cancer Incidence. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2013**, *22*, 1252–1259. [[CrossRef](#)]
6. Kilfoy, B.A.; Zheng, T.; Holford, T.R.; Han, X.; Ward, M.H.; Sjodin, A.; Zhang, Y.; Bai, Y.; Zhu, C.; Guo, G.L.; et al. International Patterns and Trends in Thyroid Cancer Incidence, 1973–2002. *Cancer Causes Control* **2009**, *20*, 525–531. [[CrossRef](#)]
7. Agrawal, N.; Akbani, R.; Aksoy, B.A.; Ally, A.; Arachchi, H.; Asa, S.L.; Auman, J.T.; Balasundaram, M.; Balu, S.; Baylin, S.B.; et al. Integrated Genomic Characterization of Papillary Thyroid Carcinoma. *Cell* **2014**, *159*, 676–690. [[CrossRef](#)]
8. Giordano, T.J. Follicular Cell Thyroid Neoplasia: Insights from Genomics and The Cancer Genome Atlas Research Network. *Curr. Opin. Oncol.* **2016**, *28*, 1–4. [[CrossRef](#)]

30. Ofner, R.; Ritter, C.; Ugurel, S.; Cerroni, L.; Stiller, M.; Bogenrieder, T.; Solca, F.; Schrama, D.; Becker, J.C. Non-Reproducible Sequence Artifacts in FFPE Tissue: An Experience Report. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2017**, *143*, 1199–1207. [[CrossRef](#)]
31. Wong, S.Q.; Li, J.; Tan, A.Y.C.; Vedururu, R.; Pang, J.M.B.; Do, H.; Ellul, J.; Doig, K.; Bell, A.; Macarthur, G.A.; et al. Sequence Artefacts in a Prospective Series of Formalin-Fixed Tumours Tested for Mutations in Hotspot Regions by Massively Parallel Sequencing. *BMC Med. Genom.* **2014**, *7*, 23. [[CrossRef](#)]
32. Cazzato, G.; Caporusso, C.; Arezzo, F.; Cimmino, A.; Colagrande, A.; Loizzi, V.; Cormio, G.; Lettini, T.; Maiorano, E.; Scarcella, V.; et al. Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Samples for Next Generation Sequencing: Problems and Solutions. *Genes* **2021**, *12*, 1472. [[CrossRef](#)]
33. Ameziane-El-Hassani, R.; Schlumberger, M.; Dupuy, C. NADPH Oxidases: New Actors in Thyroid Cancer? *Nat. Rev. Endocrinol.* **2016**, *12*, 485–494. [[CrossRef](#)]
34. Ameziane El Hassani, R.; Buffet, C.; Leboulleux, S.; Dupuy, C. Oxidative Stress in Thyroid Carcinomas: Biological and Clinical Significance. *Endocr. Relat. Cancer* **2019**, *26*, R131–R143. [[CrossRef](#)]
35. Ameziane-El-Hassani, R.; Talbot, M.; de Souza Dos Santos, M.C.; Al Ghuzlan, A.; Hartl, D.; Bidart, J.-M.; De Deken, X.; Miot, F.; Diallo, I.; de Vathaire, F.; et al. NADPH Oxidase DUOX1 Promotes Long-Term Persistence of Oxidative Stress after an Exposure to Irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 5051–5056. [[CrossRef](#)]
36. Weyemi, U.; Lagente-Chevallier, O.; Boufraqueh, M.; Preno, F.; Courtin, F.; Caillou, B.; Talbot, M.; Dardalhon, M.; Al Ghuzlan, A.; Bidart, J.-M.; et al. ROS-Generating NADPH Oxidase NOX4 Is a Critical Mediator in Oncogenic H-Ras-Induced DNA Damage and Subsequent Senescence. *Oncogene* **2012**, *31*, 1117–1129. [[CrossRef](#)]
37. Riesco-Eizaguirre, G.; Rodríguez, I.; De la Vieja, A.; Costamagna, E.; Carrasco, N.; Nistal, M.; Santisteban, P. The BRAFV600E Oncogene Induces Transforming Growth Factor β Secretion Leading to Sodium Iodide Symporter Repression and Increased Malignancy in Thyroid Cancer. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 8317–8325. [[CrossRef](#)]
38. Rabold, K.; Zoodsma, M.; Grondman, I.; Kuijpers, Y.; Bremmers, M.; Jaeger, M.; Zhang, B.; Hobo, W.; Bonenkamp, H.J.; de Wilt, J.H.W.; et al. Reprogramming of Myeloid Cells and Their Progenitors in Patients with Non-Medullary Thyroid Carcinoma. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 6149. [[CrossRef](#)]
39. Smith, J.J.; Chen, X.; Schneider, D.F.; Broome, J.T.; Sippel, R.S.; Chen, H.; Solórzano, C.C. Cancer after Thyroidectomy: A Multi-Institutional Experience with 1523 Patients. *J. Am. Coll. Surg.* **2013**, *216*, 571–577. [[CrossRef](#)]
40. de Carlos, J.; Ernaga, A.; Irigaray, A.; Pineda, J.J.; Echegoyen, A.; Salvador, P.; Anda, E. Incidentally Discovered Papillary Thyroid Microcarcinoma in Patients Undergoing Thyroid Surgery for Benign Disease. *Endocrine* **2022**, *77*, 325–332. [[CrossRef](#)]
41. Führer, D. Constitutive TSH Receptor Activation as a Hallmark of Thyroid Autonomy. *Endocrine* **2020**, *68*, 274–278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Article II: 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.

Fenniche, S., Harinquet, M., Radom, M., Coelho de Faria, C., Saleh, M., Al Ghuzlan, A., Bani, M.A., Lamartina, L., Ameziane El Hassani, R., and Dupuy, C. Role of NADPH oxidase NOX4 in regulating the expression and the activity of CHD4 in BRAF^{V600E} mutated thyroid cancer cells. En cours de préparation

Objectifs : La prise en charge des patients atteints des cancers papillaires de la thyroïde réfractaires à la radiothérapie métabolique constitue un véritable défi clinique. Cette thérapie est basée sur l'expression au niveau du pôle basal des thyrocytes du transporteur de l'iode appelé NIS pour « Natrium Iodide Symporter ». Les cancers papillaires de la thyroïde représentent 80% des cancers thyroïdiens. Ces cancers sont caractérisés par plusieurs altérations génétiques dont la plus fréquente est la mutation BRAF^{V600E} (40 à 60%). La présence de cette mutation est associée à une activation constitutive de la voie MAPK et à une répression du gène codant le NIS et d'autres gènes métabolisant l'iodure, ceci se traduisant par la perte de la captation de l'iode radioactif et donc par la résistance à la radiothérapie métabolique. L'une des approches thérapeutiques consiste à augmenter l'absorption de l'iode via la réexpression du NIS et des gènes métabolisant l'iodure. A cette fin, notre équipe a précédemment montré que BRAF^{V600E} contrôle l'expression de NOX4 sous l'effet du TGF- β /SMAD3 et que les ERO dérivées de NOX4 contribuent à la répression du NIS. L'inhibition de NOX4 favorise la réactivation du NIS. Cette réversibilité suggère une contribution à un mécanisme épigénétique. CHD4 est une hélicase dépendante de l'ATP, jouant un rôle important dans la répression des gènes. Elle est fortement exprimée dans les PTCs pour lesquels elle est associée à un mauvais pronostic. Cependant le rôle de l'oncogène BRAF^{V600E} dans la régulation de l'expression et de l'activité de CHD4 dans les PTCs demeure inconnu. **Résultats :** Dans la présente étude, nous montrons que l'expression de CHD4 est régulée positivement par l'oncogène BRAF^{V600E} via la voie de signalisation TGF β /SMAD3 ; et que CHD4 coopère avec les DNMTs dans la répression de NIS dans plusieurs lignées thyroïdiennes tumorales mutées pour BRAF^{V600E} (BCPAP et 8505C). Par ailleurs, nous avons montré que CHD4 répond aux dommages oxydatifs à l'ADN. En effet, la suppression de NOX4 ou de son partenaire fonctionnel p22^{phox}, entraîne une inhibition du recrutement à la chromatine de CHD4. Ce résultat est mimé par l'inhibition de l'expression ou répression des protéines impliquées dans la réparation des dommages oxydatifs à l'ADN notamment OGG1 et MSH6. **Innovation et Conclusion :** Nos résultats mettent en évidence une corrélation positive entre BRAF^{V600E} et CHD4 et révèlent que CHD4 est un nouvel élément clé

de la signalisation oncogénique BRAF^{V600E} /TGF-B/SMAD3/NOX4 dans le cancer papillaire de la thyroïde et pourrait être une cible thérapeutique dans le cas des cancers papillaires réfractaires à l'iode radioactif.

Mot clés : Cancer thyroïdien papillaire (PTC), radiothérapie métabolique, l'oncogène BRAF^{V600E}, NADPH oxydase 4 (NOX4), Natrium Iodide Symporter (NIS), espèces réactives de l'oxygène (ERO), Chromodomain Helicase DNA binding 4 (CHD4), dommages oxydatifs, réparation de l'ADN.

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 repair 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.

1. 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- β , produces 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 repairs 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.

2. Materials and Methods

2.1. 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.

2.2. 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).

2.3. 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).

2.4. Chromatin fractionation:

Adherent cells from 70-90% confluent monolayer culture were washed twice with PBS and scraped using fresh PBS. The cell suspension was then centrifuged at 1500rpm for 5 minutes. Cell pellets were suspended in 1X isotonic Lysis Buffer (25 mM Tris HCl pH 7.5, 2mM MgCl₂, 3 mM CaCl₂, 0.3 M sucrose, 1 mM DTT, 1X protease and phosphatase inhibitor cocktail) and incubated for 15 min on ice, allowing cells to swell. Then, IGEPAL CA-630 detergent was added to the cell suspension to reach a final concentration of 0.6%. The cell suspension was vortexed vigorously for 10s before to be centrifuged for 30s at 10,000-11,000 x g, 4°C. The supernatant that is enriched in cytoplasm soluble proteins was discarded and the nuclei pellet was washed with 1X isotonic Lysis Buffer, 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 4 or 2.5% (wt/vol) SDS, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 4 M urea, 0.1 M of PMSF 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.

2.5. 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.

3. Results and Discussion

3.1. 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.

3.2. 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 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 CHD4 and NOX4 mRNAs levels 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 α 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.

3.3. 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 inhibition 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-oxo-G is associated with carcinogenesis and can be repaired by Base Excision Repair (BER) including OGG1 protein [26]. As CHD4 was previously shown to be recruited by OGG1 for oxidative damage to interact with 8-oxod-G [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 (Fig. 6C). 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.

3.4. 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 promotor 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 the repression 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 no effect alone. The western-blot analysis highlights that decitabine by itself has no effect on the 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, the CHD4/NuRD complex may also have an impact on the 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 an important NuRD-independent role in DNA damage response, cell cycle progression, signal transduction and overall genome maintenance [37]. At this study level, it is unclear whether CHD4 functions as a part of NuRD or independently of NuRD. Further experiments are necessary to clarify this point.

In conclusion, our study shows that oxidative DNA damage produced by NOX4 leads 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 maintaining the silencing of the *SLC5A5* gene encoding NIS. This is modeled in

Figure 8. As NOX4, CHD4 is also a key effector of TGF- β , which plays 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 a 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/Toukba, 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 Ameziene 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, Waldhaüsl 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- β 1 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, Efisio 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.

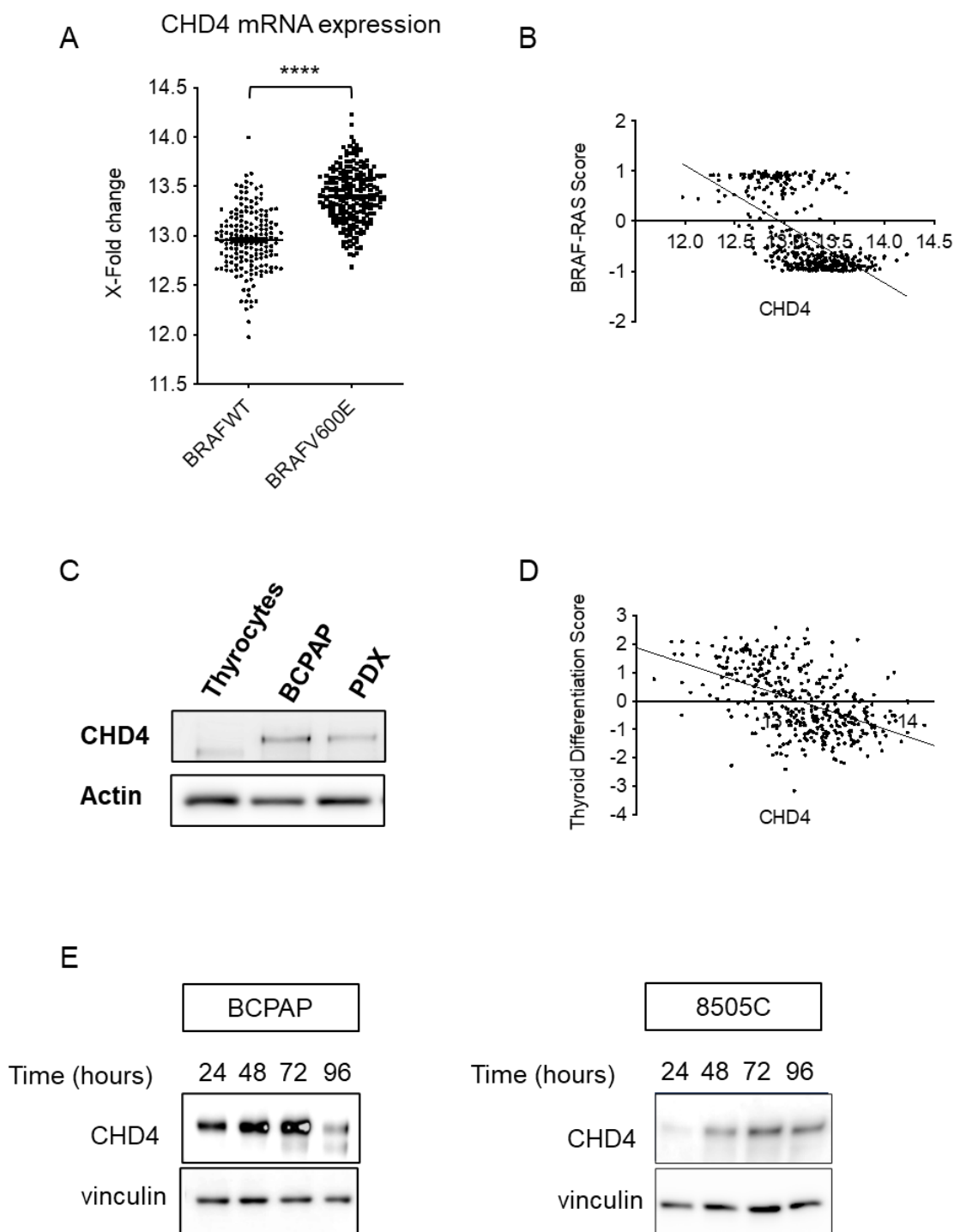


Figure 1: CHD4 is increased in BRAF-mutated PTC. A) Correlation analysis between CHD4 mRNA and BRAF^{V600E} mutation in 390 PTCs (170 BRAFWT and 220 BRAF^{V600E} PTCs). B) Correlative analysis between BRAF-RAS score and CHD4 mRNA in 390 PTCs. C) CHD4 protein was analyzed by Western-blot as described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

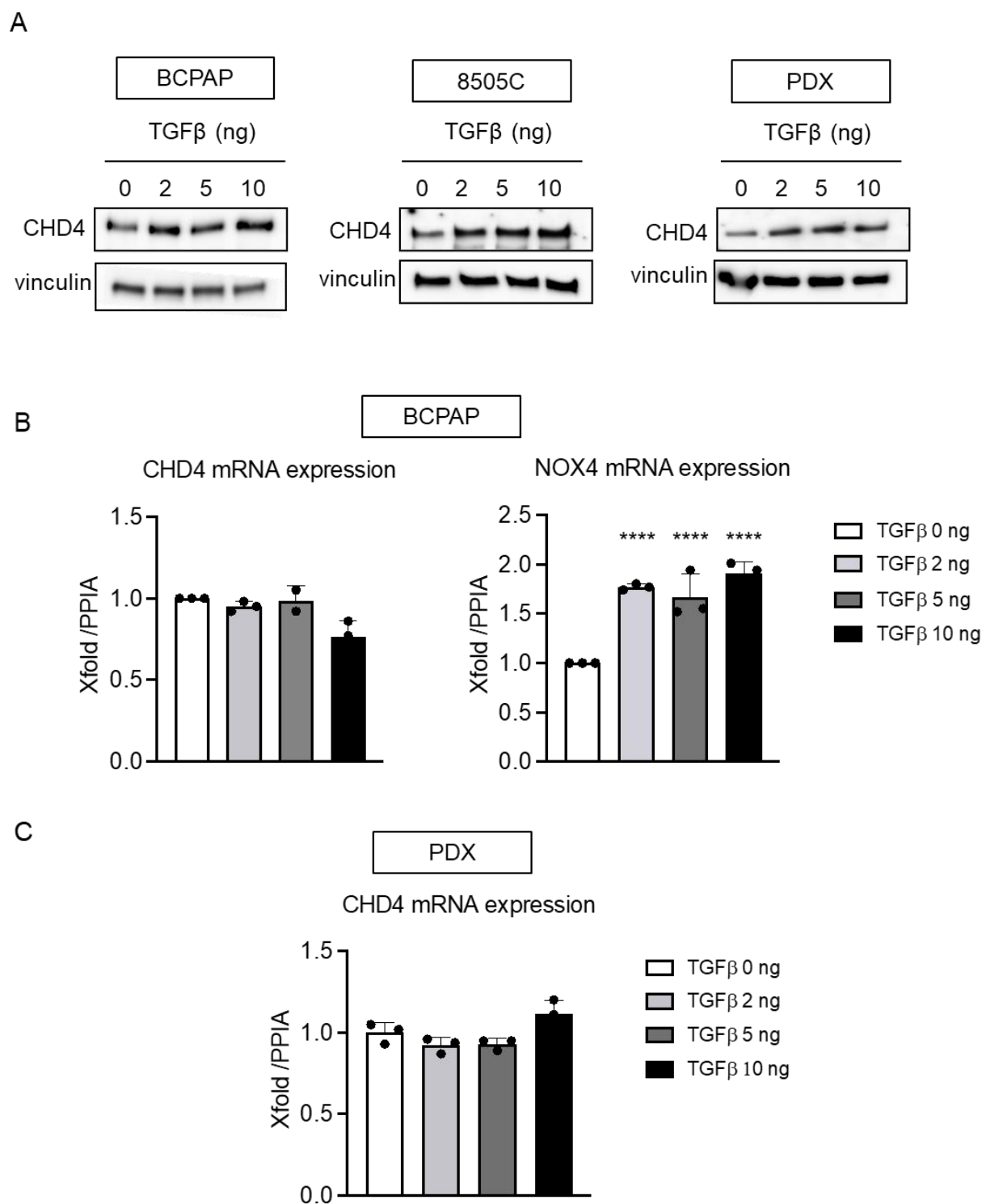


Figure 2: CHD4 is regulated by TGF- β in BRAF-mutated PTC cell lines . A) Dose-dependent stimulation of CHD4 protein expression in BRAF-mutated PTC cell lines treated with TGF- β for 48h. B) CHD4 and NOX4 mRNA were quantified by real-time quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) in BCPAP cells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

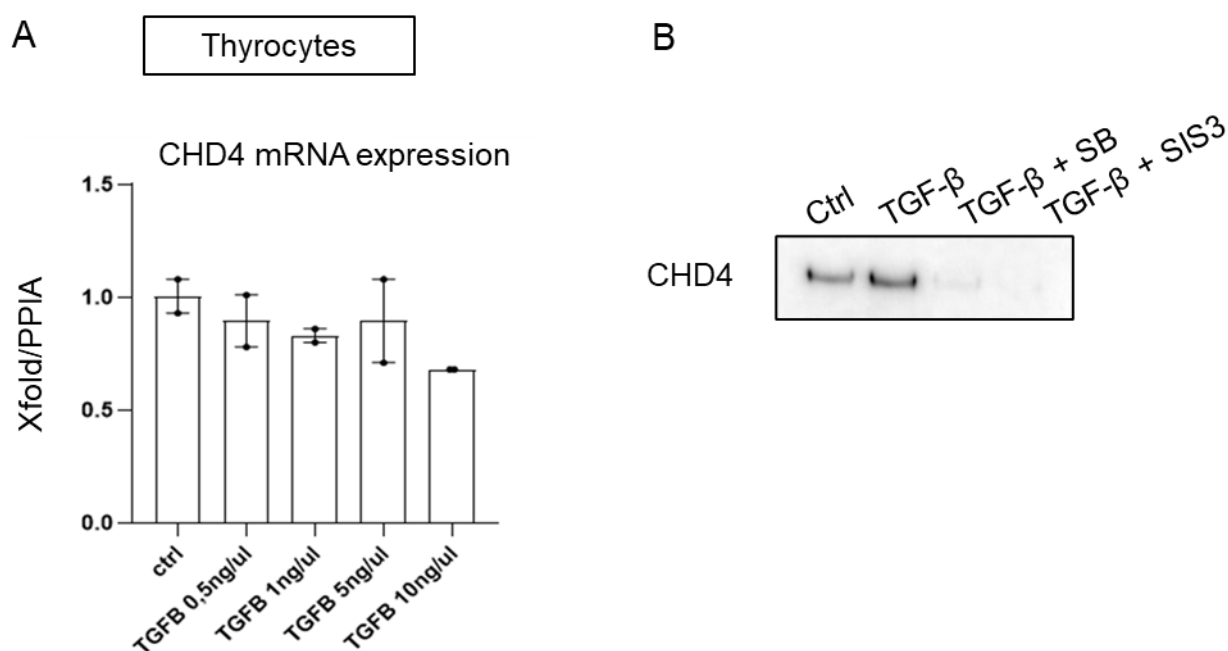


Figure 3: CHD4 is regulated by TGF- β in primary human thyrocytes. A) Dose-dependent gene expression of CHD4 by RT-qPCR in human thyrocytes treated with TGF- β for 24h. B) Immunoblot detection of CHD4 protein in human thyrocytes after treatment by TGF- β for 48h in the absence or in the presence of pharmacological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

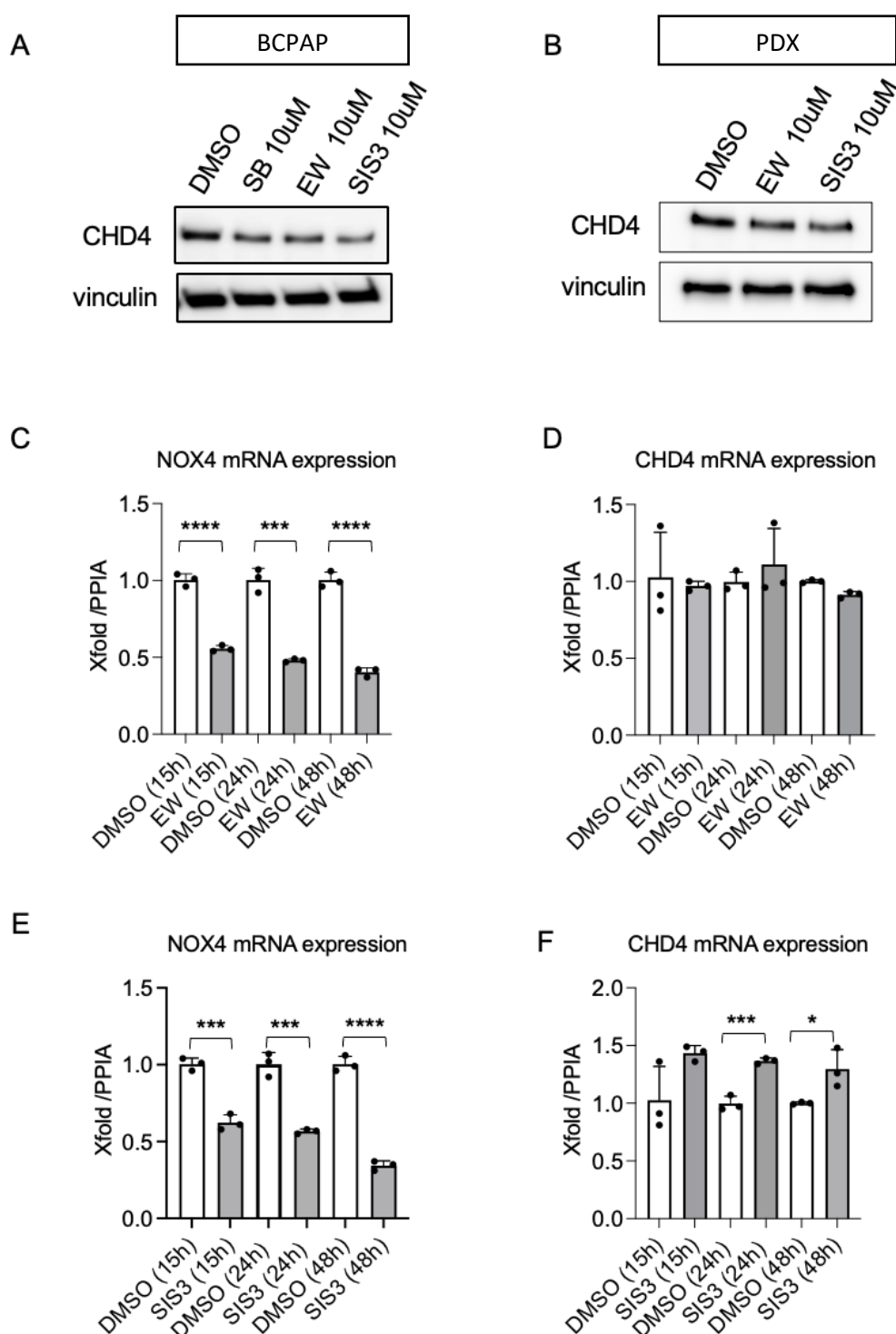


Figure 4: CHD4 protein expression is inhibited by inhibitors of the TGF- β pathway. A-B) Immunoblot detection of CHD4 protein in BCPAP (A) and in PDX (B) cells after pharmacological inhibition of TGF- β pathway by SB431542 (10 μ M) or by TEW-7197 (10 μ M) or by SIS3 (10 μ M). Vinculin was used as loading 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.

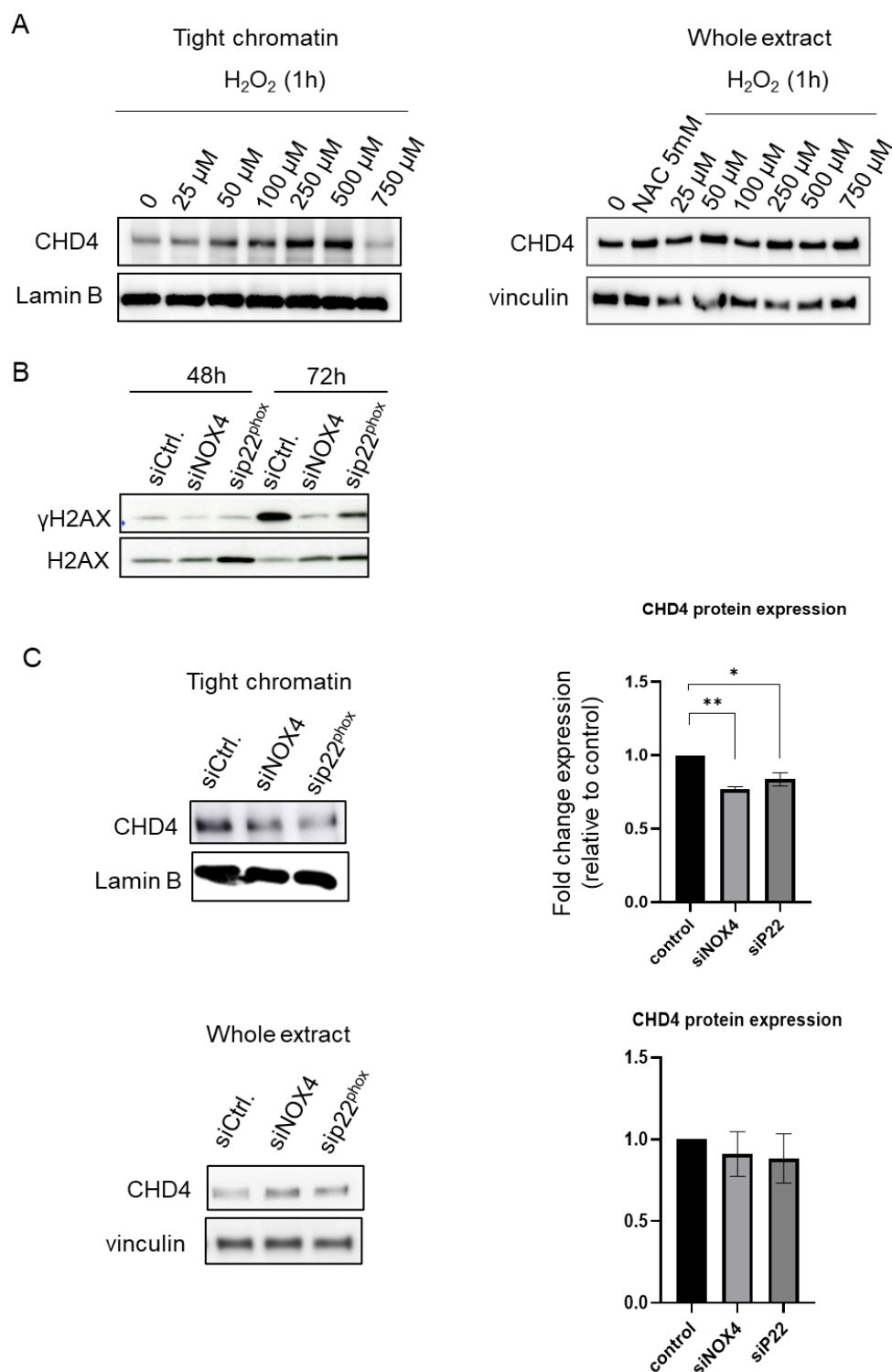


Figure 5: Recruitment of CHD4 to chromatin is dependent of NOX4-derived ROS. A) Immunoblot detection of CHD4 protein levels in tight chromatin fraction and whole extract prepared from BCPAP cells treated by increased concentration of H₂O₂ for 1 hour. Lamin B and Vinculin were used as loading control.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

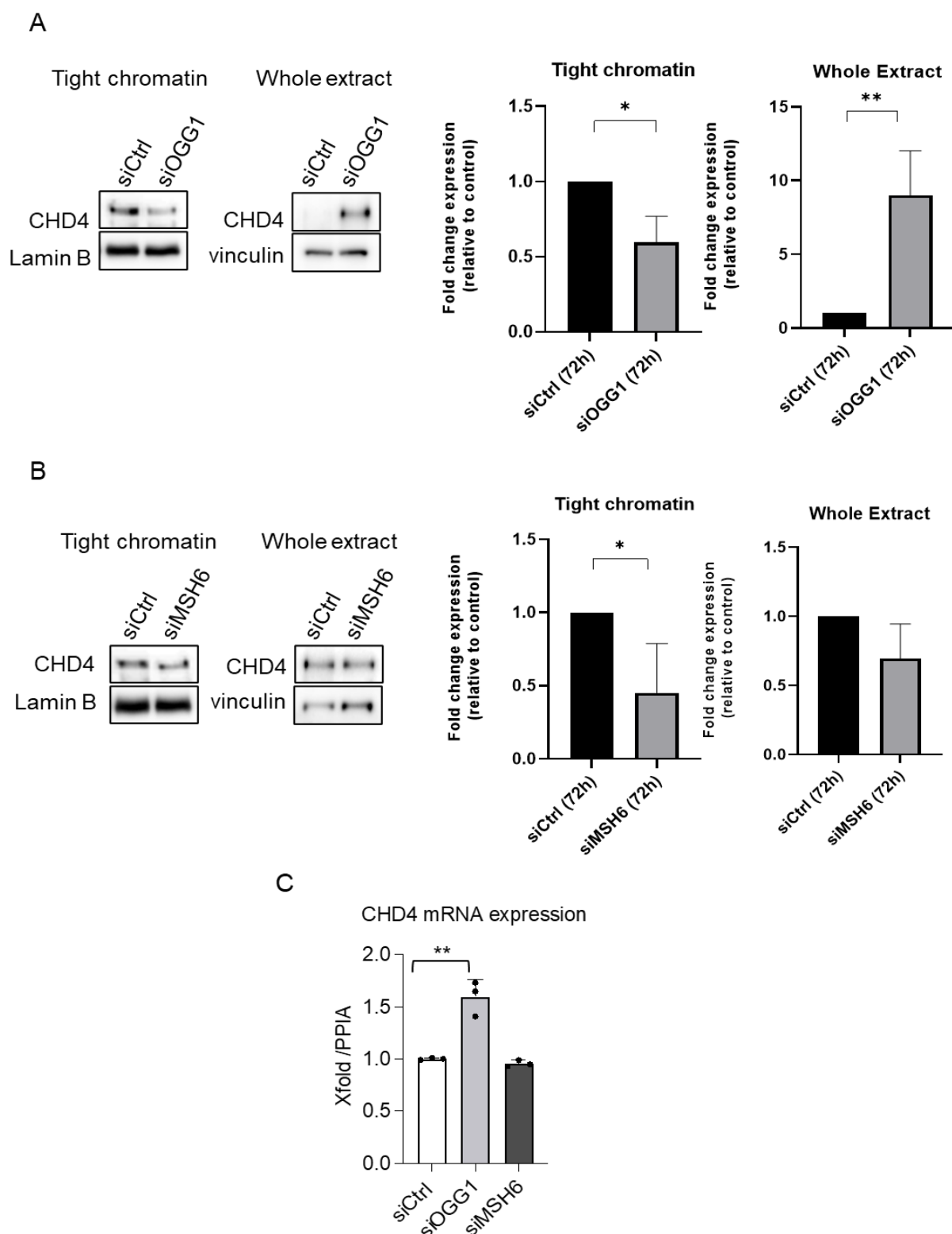


Figure 6: Recruitment of CHD4 to chromatin is dependent of DNA repair proteins. A) Western-blot analysis of CHD4 protein expression levels in tight chromatin fraction and whole extract 72h after knocking down of OGG1. Lamin B and Vinculin were used as loading control. B) Western-blot analysis of CHD4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

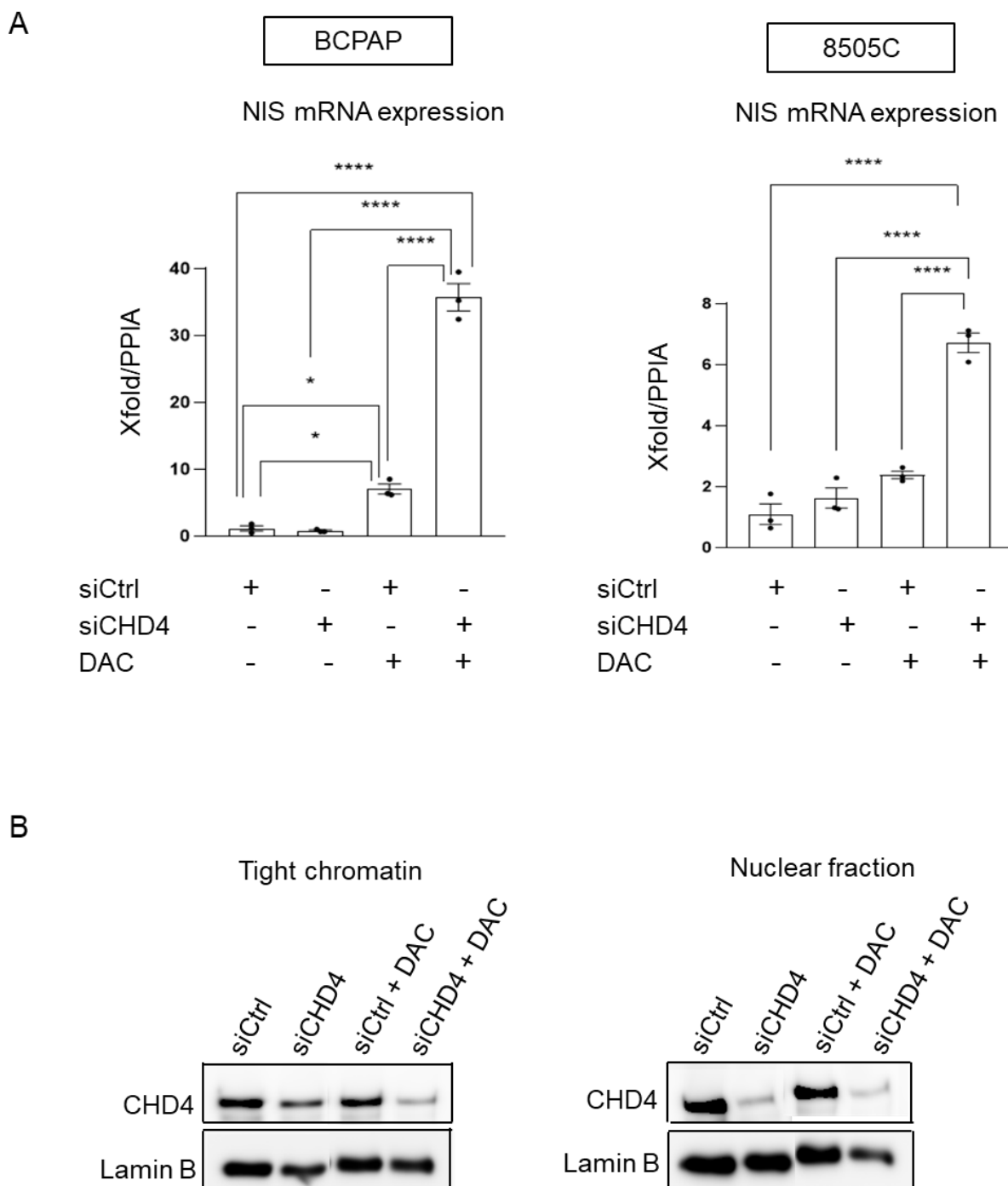


Figure 7: CHD4 cooperates with DNMTs to maintain silencing of SLC5A5 gene. A) NIS mRNA were quantified by real-time quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) in BCPAP and 8505C cells 72h after knocking down or not of CHD4. DAC (1 μ M) was added in the cell culture medium 24h before to recover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

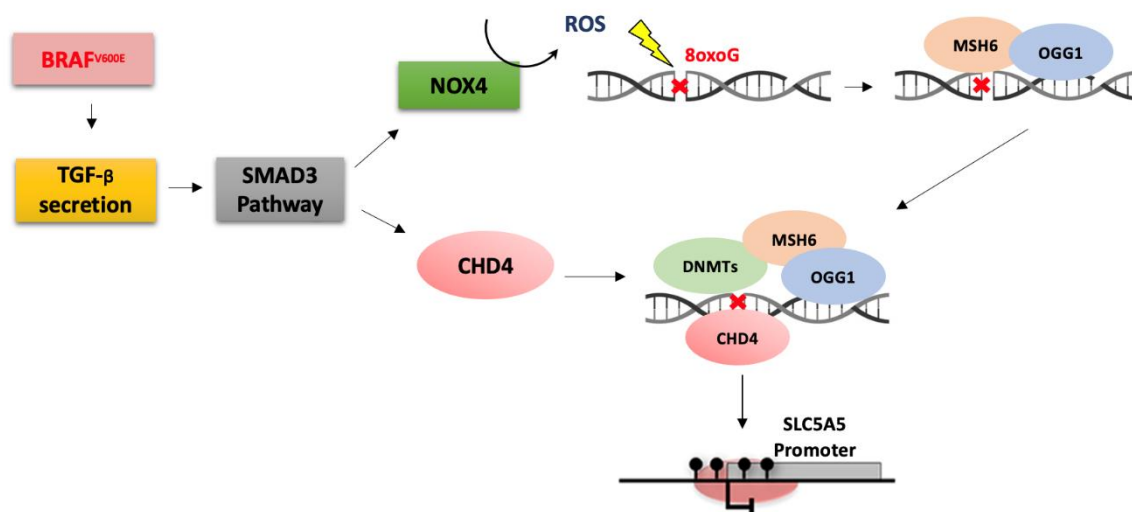


Figure 8: Graphical abstract. BRAF^{V600E} regulates TGF- β secretion, which activates the Smad3-dependent signaling pathway. This pathway controls the expression of both NOX4 and CHD4 proteins. By producing ROS, NOX4 induces oxidative DNA damage that promote the recruitment of DNA repair proteins, such 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.

Article III: CHD4 and NOX4 expression in thyroid tumor tissues

Fenniche, S., Oukabli, M., Oubaddou, Y., Chahdi, H., Damiri, A., Alghuzlan, A., Laraqui, A., Dakka, N., Bakri, Y., Dupuy, C., and Ameziane El Hassani, R. En cours de préparation.

Objectifs : La protéine CHD4 (Chromodomain Helicase DNA binding 4) est une sous-unité ATPase du complexe de remodelage NURD qui joue un rôle crucial en tant qu'un répresseur des gènes. Sa surexpression a été rapportée dans plusieurs cancers. Dans le cancer papillaire de la thyroïde (PTC), CHD4 est fortement exprimé et associé à des caractéristiques agressives de la tumeur, telles que la prolifération, la migration et la transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT). Notre équipe a précédemment montré dans les PTCs que l'expression de NOX4 est régulée positivement par l'oncogène BRAF^{V600E}, qui constitue l'altération la plus agressive des PTCs. Dans cette étude rétrospective, nous visons à établir un lien entre l'expression des protéines CHD4 et NOX4 dans les tissus thyroïdiens malins induite par l'oncogène BRAF^{V600E}. Nous avons exploré l'expression de la protéine CHD4 par une analyse immunohistochimique dans 44 tissus tumoraux thyroïdiens (28 formes classiques de PTC (C-PTC), 13 variantes folliculaires de PTC (F-PTC) et trois carcinomes anaplasiques de la thyroïde (ATC) et 42 de leurs tissus normaux adjacents (NAT). **Résultats :** L'analyse de l'expression de la protéine CHD4 a montré un niveau très significatif d'expression de la protéine CHD4 dans les tissus thyroïdiens malins par rapport à leurs tissus normaux adjacents (66,7 % des ATCs, 53,6 % des C-PTCs, 23,1 % des F-PTCs et 0 % des NATs). Par ailleurs, nous avons observés que les C-PTC-BRAF^{V600E} surexpriment CHD4 au niveau protéique, confirmant la corrélation positive entre l'expression de CHD4 et la mutation BRAF^{V600E}. De plus, nous avons observé qu'il y a une tendance de corrélation entre l'expression des protéines CHD4 et NOX4 dans 70 % des C-PTC-BRAF^{V600E}. **Innovation et Conclusion :** Les résultats de cette étude suggèrent que CHD4 pourrait être utilisé comme marqueur moléculaire complémentaire pour améliorer le diagnostic et la prise en charge des PTC-BRAF^{V600E}.

Mot clés : Chromodomain Helicase DNA binding 4 (CHD4), Cancer papillaire de la thyroïde (PTC), la mutation BRAF^{V600E}, NADPH oxydase 4 (NOX4), marqueur moléculaire.

CHD4 and NOX4 expression in thyroid tumor tissues

Fenniche, S., Oukabli, M., Oubaddou, Y., Chahdi, H., Damiri, A., Alghuzlan, A., Laraqui, A., Dakka, N., Bakri, Y., Dupuy, C., and Ameziane El Hassani, R.

Abstract:

Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4 (CHD4) is a core NURD remodeling complex ATPase that plays a crucial role as a gene repressor. Its overexpression has been reported in several cancers. In papillary thyroid cancer (PTC), CHD4 is overexpressed and associated with aggressive features of the tumor, such as proliferation, migration, and epithelial-mesenchymal transition (EMT). We previously showed in PTCs that NOX4 expression is positively regulated by BRAF^{V600E} mutation, which is the most aggressive alteration in PTCs. In this retrospective study, we wondered whether there is a link between CHD4 and NOX4 proteins expression in malignant thyroid tissues driven by BRAF^{V600E} mutation. We explored CHD4 protein expression by immunostaining analysis in 44 thyroid tumor tissues (28 classical forms of PTC (C-PTC), 13 follicular variants of PTC (F-PTC), and three anaplastic thyroid carcinomas (ATCs) and 42 of their normal adjacent tissues (NAT). The CHD4 protein expression analysis with already published data from our group (BRAF^{V600E} status and NOX4 expression) reveals a highly significant level of CHD4 protein expression in ATCs and C-PTCs compared to F-PTCs. Importantly, 70% of C-PTCs-BRAF^{V600E} overexpress CHD4 at the protein level, confirming the positive correlation between the CHD4 expression and BRAF^{V600E} mutation. Furthermore, a high level of CHD4 is associated with the presence of capsular beach and vascular emboli, affirming the involvement of CHD4 in thyroid tumor aggressiveness. Interestingly, we showed for the first time a positive correlation between CHD4 and NOX4 proteins expression; and 70% of C-PTCs-BRAF^{V600E} overexpress simultaneously CHD4 and NOX4 proteins. The results of this study suggest that CHD4 could be used as a complementary molecular marker to improve the diagnosis and the management of PTCs-BRAF^{V600E}.

Keywords: Chromodomain-helicase-DNA-binding protein CHD4; papillary thyroid carcinomas; NADPH oxidase NOX4; BRAF^{V600E} mutation; molecular marker

1. Introduction

Papillary thyroid cancer (PTC) represents approximately 80% of thyroid cancers. PTC is characterized by several genetic alterations, the most frequent being the BRAF^{V600E} mutation [1, 2]. This mutation is known to be associated with thyroid tumor aggressiveness [1, 3-5]. The molecular mechanism by which the BRAF^{V600E} mutation induces genetic instability is associated with constitutive activation of the MAPK signaling pathway [1,3-5]. Furthermore, epigenetic deregulation has been observed in PTCs driven by BRAF^{V600E} mutation, in particular, the hypermethylation of the promoters of certain iodide-metabolizing genes such as sodium iodide symporter “NIS” which is related to resistance to radioactive iodine therapy [6-9]. We recently showed by immunohistochemical analysis that NADPH oxidase 4 (NOX4), a constitutive generator of reactive oxygen species (ROS), is highly expressed in classical form of PTCs (92.9% with a high level of NOX4 protein) compared to their normal adjacent tissues (100% with a low level of NOX4 protein)[10]. Additionally, this overexpression of NOX4 was positively correlated with the presence of the BRAF^{V600E} mutation (100% of PTCs-BRAF^{V600E}

present a high level of NOX4 protein) [10]. Likewise, at the transcriptional level, Azouzi N et al., have previously shown in thyroid tumor cell lines driven by BRAF^{V600E} that NOX4 is positively regulated by the BRAF^{V600E} oncogene and that the ROS produced by NOX4 contributes to the repression of NIS [8]. In addition, NOX4 depletion reverses this effect, suggesting the involvement of an epigenetic mechanism.

CHD4 (Chromodomain helicase DNA binding protein 4), a subunit of the NuRD (Nucleosome Remodeling and Deacetylation) complex, is an epigenetic regulator of gene expression [11]. CHD4 dysregulation is associated with various types of cancers, including glioblastoma [12], breast cancer [13-15], colorectal [16], lung [17], rectal cancer [18] and papillary thyroid cancer [19]. It has been found to be involved in several aspects of carcinogenesis such as proliferation, cell cycle regulation, migration, epithelial-mesenchymal transition (EMT) and DNA damage repair [16, 19]. Pratheeshkumar, P and his colleagues showed an overexpression of CHD4 in papillary thyroid carcinomas (PTCs). This overexpression was found to be associated with tumor aggressiveness [19]. Indeed, in the BCPAP and TPC-1 thyroid tumor lines, CHD4 negatively regulates the expression of genes involved in migration and EMT, including E-cadherin [19]. Interestingly, it has been shown that CHD4 is recruited to DNA damage sites in response to oxidative damage and double-strand breaks [20,21]. In this retrospective study, we investigate the CHD4 expression at the protein level in 86 human thyroid tissues (44 malignant tissues and 42 normal adjacent tissues), and we perform a comparative analysis of its expression with our recently published data regarding BRAF^{V600E} status and NOX4 protein expression [10]. Our results showed that CHD4 protein expression was significantly increased in C-PTCs compared to their NATs, with 53.6% of tumor tissues showing a high expression of CHD4. Additionally, our results highlight the association between the high levels of CHD4 and aggressive features of thyroid cancer, notably the presence of vascular emboli (57.1%) and capsular breach (63.7%). Interestingly, we establish for the first time a positive correlation between CHD4 and NOX4 proteins expression in PTCs harboring the BRAF^{V600E} mutation.

2. Materials and methods

2.1. Retrospective study

This research was approved by the Ethics Committee for Biomedical Research (CERB) of the Faculty of Medicine and Pharmacy in Rabat, under approval number 52/20.

In this retrospective analysis, we collected 86 samples from thyroid cancer patients diagnosed from January 2015 to December 2021 at the Department of Anatomical Pathology (Military Hospital of Instruction Mohammed V (HMIMV), Rabat, Morocco). Our cohort comprised 44 malignant thyroid tumor samples containing 41 papillary thyroid carcinomas (PTC) (28 C-PTC, 13 F-PTC), 3 anaplastic thyroid carcinomas (ATC) and 42 of their normal adjacent tissues (NATs). Histologically, Thyroid tissues were classified by an experienced pathologist based on classification of the World Health Organization (WHO) (Lloyd R.V. et al., 4th Edition, IARC: Lyon 2017). Additionally, the validation of retrospective diagnosis was performed by experienced pathologists from both Gustave Roussy Cancer Institute (France) and HMIMV in Rabat (Morocco). FFPE block was selected as previously described [10].

2.2. Immunohistochemical staining

Immunohistochemical staining was performed according to the manufacturer's 'Dako EnVision™ FLEX Kit (K8000)' protocol using Autostainer Link 48 device (Agilent). CHD4

immunostaining was performed using a mouse monoclonal anti-CHD4 (clone 3F2/4, MABE-455; Sigma-Aldrich), whose immunogen is a linear peptide corresponding to human CHD4. CHD4 staining was validated on malignant thyroid tissue (FFPE block) after testing divers Ab dilutions in EnVision™ FLEX Antibody Diluent (1:50, 1:100, 1:250). Counterstaining of IHC stained tissue was performed using EnVision™ FLEX Hematoxylin. Experienced pathologists from Gustave Roussy Cancer Institute (France) and HMIMV in Rabat assigned two scores to CHD4 protein expression. A low score ≤ 1 for CHD4 signifies an absence or low expression of CHD4 protein. A high score 2 for CHD4 indicates either a medium or high expression of CHD4 protein. Generally, trained pathologists use a score of staining intensity, which might be Negative (0), Weak (1), Moderate (2), and Strong (3). This study classified the scores into two categories for each protein expression. Score < 2 or ≤ 1 (including 0 and 1) and score ≥ 2 or 2 (including 2 and 3). Additionally, the pathologists determined the subcellular localization of CHD4 protein in malignant thyroid tissues and their adjacent normal tissues presented on the same IHC slide for each sample. Finally, slides were scanned as previously described [10].

2.3. Statistical analysis

Statistical analyses were executed by GraphPad Prism 8 software. Different tests were used to assess the statistical relevance of several correlations, including Fisher exact test and chi-square test. A p-value of < 0.05 indicates a statistical significance.

3. Results

3.1. Clinicopathological Characteristics of Patients

Our study population confirmed a female predominance (80%) (Table 1). The median age of patients was 42.5 years at the time of diagnosis (with a standard error of 2.4 years). Histologically, 63.6% (28/44) of cases were a classical form of PTCs (C-PTC), while 29.6% (13/44) were a follicular variant of PTC (F-PTC) and 6.8% (3/44) were anaplastic thyroid carcinomas (ATC) (Table 1). In terms of aggressiveness, about 63.6% (28/44) of tumors present a size larger than 1 cm, 15.9% (7/44) had vascular emboli, 25% (11/44) had a capsular breach, and 6.8% (3/44) present node lymph metastasis (Table 1).

Table 1. Clinicopathological characteristics of the cohorte population (n = 44).

Clinico-pathological parameters	n (%)
Gender	
Female	35/44 (80%)
Male	9/44 (20%)
Age	
Median $\pm$ standard error	42.5 $\pm$ 2.4
Histological variant	
C-PTC	28/44(63.6%)
F-PTC	13/44(29.6%)
ATC	3/44(6.8%)
Tumor size	
≤ 1 cm	6/44(13.7%)
> 1 cm	28/44(63.6%)
Missing data	10/44(22.7%)
vascular emboli	
Presence	7/44(15.9%)

Absence	37/44(84.1%)
Capsular breach	
Presence	11/44(25%)
Absence	33/44(75%)
lymph node metastasis	
Presence	3/44(6.8%)
Absence	30/44(68.2%)
Missing data	11/44(25%)

PTC: papillary thyroid carcinomas, *F-PTC*: follicular variant of papillary thyroid carcinomas, *C-PTC*: classical form of papillary thyroid carcinomas, *ATC*: anaplastic thyroid carcinomas, *NAT*: normal adjacent tissue.

3.2. *CHD4* protein expression in thyroid tumor tissues

To investigate the involvement of *CHD4* in $\text{BRAF}^{\text{V600E}}$ tumors, we analyzed the expression of *CHD4* protein by immunohistochemistry staining in malignant thyroid tissues from patients and their paired normal adjacent tissues (NAT) (see Figure 1a). Our findings revealed that 66.7% (2/3) of anaplastic thyroid carcinoma (ATCs), 53.6% (15/28) of the classical form of PTCs (C-PTCs), and 23.1% (3/13) of follicular variant of PTCs (F-PTCs) overexpress *CHD4* protein (score 2) comparatively to their normal adjacent tissues (NAT) where we note a weak expression of *CHD4* protein (score ≤ 1) (p-value < 0.0001) (see Figure 1b). In the aim to correlate *CHD4* protein expression with $\text{BRAF}^{\text{V600E}}$ status in this cohort, we explored the recent published data of our group with this same cohort [10]. Our results showed that 70% (7/10) of thyroid tumor tissues carrying the $\text{BRAF}^{\text{V600E}}$ mutation present a high level of *CHD4* protein expression, confirming the positive correlation between *CHD4* and $\text{BRAF}^{\text{V600E}}$ mutation in PTCs (see Figure 1c, d).

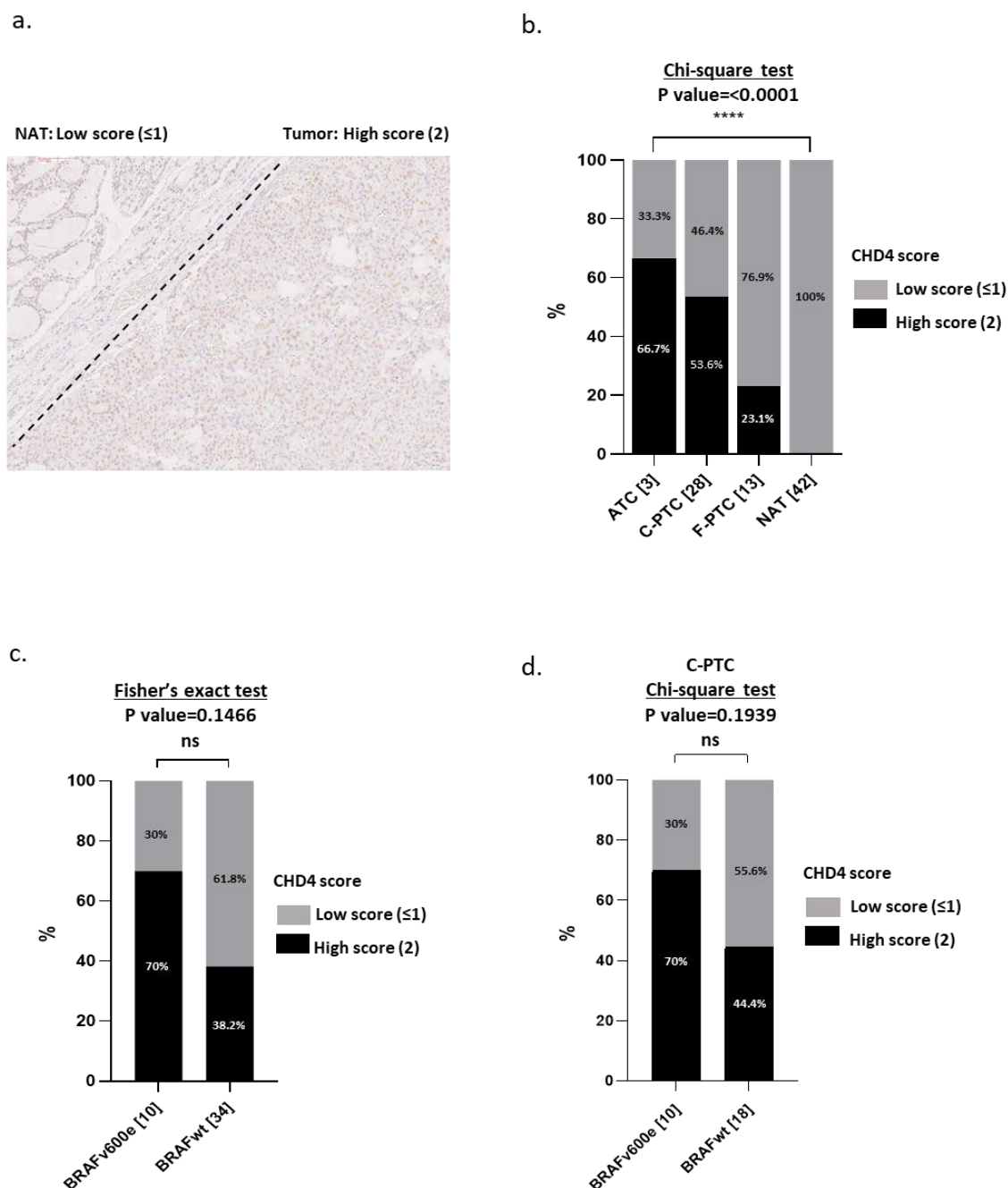


Figure 1: CHD4 protein expression in thyroid carcinomas. a. Representative example of PTC with high expression of CHD4 protein and its normal adjacent tissue (NAT) with low expression of CHD4 protein presented on the same slide (Magnification $\times 10$). b. Comparative analysis of CHD4 protein expression in human thyroid carcinomas (n=44: 28 C-PTC, 13 F-PTC, 3 ATC) and their NAT (n=42). Percentage calculated according to the number of each histological variant. Two scores are attributed to the level of CHD4 protein expression. score ≤ 1 and 2. the score ≤ 1 represent an absence or low expression of CHD4 protein (n=66). The score 2 represents a mean or/and high expression of CHD4 protein (n=20). c. Association between BRAF profile and CHD4 expression in human thyroid carcinomas (n= 44: 10 BRAFV600E and 34 BRAFWt). d. Association between BRAF profile and CHD4 expression in C-PTC (n=28: 10 BRAFV600E and 18 BRAFWt). The percentage is calculated according to the number of each BRAF profile. The statistical significance is confirmed by a P value <0.05 . ****: p-value <0.0001 . CHD4: Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 4, PTC: papillary thyroid carcinomas, F-PTC: follicular variant of papillary thyroid carcinomas, C-PTC: classical form of papillary thyroid carcinomas, ATC: anaplastic thyroid carcinomas, NAT: normal adjacent tissue.

3.3. Association between levels of CHD4 protein expression and clinicopathological parameters of thyroid carcinomas

The comparative analysis between the levels of CHD4 protein expression and clinicopathological characteristics of 44 thyroid carcinomas (28 C-PTCs, 13 F-PTCs, and three ATCs) demonstrates that the over-expression of CHD4 was found to be associated with a tumor size <1cm (66.7%:4/6 show a score 2). The level of CHD4 protein expression was higher within tumors with aggressive features of thyroid cancer, such as the presence of vascular emboli (57.1%: 4/7 show a score 2) and capsular breach (63.7%:7/11 show a score 2), suggesting a role of CHD4 in the thyroid tumor progression. However, a low level of CHD4 protein expression was positively correlated with lymph node metastasis (66.7%: 2/3 show a score ≤ 1). Oppositely, Gender and age did not appear to be influenced by levels of CHD4 protein expression (Table 2).

Table 2. CHD4 protein expression and clinicopathological parameters of thyroid carcinoma

Clinico-pathological parameters	n (%)	CHD4 Over expression (score: 2)	CHD4 low expression (score: ≤ 1)	Chi-square/ Fisher's exact test (P-value <0.05)
Gender				
Female	35/44 (80%)	16/35(46%)	19/35(54%)	>0,9999
Male	9/44 (20%)	4/9(44%)	5/9(56%)	
Age				
<45	17/44(38.6%)	8/17(47.1%)	9/17(52.9%)	0,9857
≥ 45	18/44(40.3%)	8/18(44.4%)	10/18(55.6%)	
unknown	9/44(20.5%)	4/9 (44.4%)	5/9(55.6%)	
Histological variant				
C-PTC	28/44(63.6%)	15/28(53.6%)	13/28(46.4%)	<0,0001
F-PTC	13/44(29.6%)	3/13(23.1%)	10/13(76.9%)	
ATC	3/44(6.8%)	2/3(66.7%)	1/3(33.3%)	
Tumor size				
≤ 1 cm	6/44(13.7%)	4/6(66.7%)	2/6(33.3%)	0,4489
>1cm	28/44(63.6%)	11/28(39.3%)	17/28(60.7%)	
unknown	10/44(22.7%)	5/10(50%)	5/10(50%)	
vascular emboli				
Presence	7/44(15.9%)	4/7(57.1%)	3/7(42.9%)	0,6839
Absence	37/44(84.1%)	16/37(43.2%)	21/41(56.8%)	
Capsular breach				
Presence	11/44(25%)	7/11(63.7%)	4/11(36.3%)	0,1851
Absence	33/44(75%)	13/33(39.4%)	20/33(60.6%)	
lymph node metastasis				
Presence	3/44(6.8%)	1/3(33.3%)	2/3(66.7%)	0,3671
Absence	30/44(68.2%)	12/30(40%)	18/30(60%)	
unknown	11/44(25%)	7/11(63.6%)	4/11(36.4%)	

CHD4: Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 4, PTC: papillary thyroid carcinomas, F-PTC: follicular variant of papillary thyroid carcinomas, C-PTC: classical form of papillary thyroid carcinomas, ATC: anaplastic thyroid carcinomas, NAT: normal adjacent tissue.

3.4. CHD4 and NOX4 proteins expression in human thyroid tumor tissues

In the aim to correlate CHD4 protein expression with NOX4 protein expression in this cohort, we explored the recent published data of our group with this same cohort [10]. We observe that 90% (18/20) of PTC showed a concomitant overexpression of CHD4 and NOX4 proteins (see Figure 2a). Interestingly, all C-PTC overexpressing CHD4 overexpressed NOX4 (see Figure 2b). Furthermore, we analyzed the association between the expression of CHD4 and NOX4 proteins in PTCs harboring BRAF^{V600E} (see Figure 2c). We observed that 70% (7/10) of C-PTCs-BRAF^{V600E} with a high level of CHD4 protein (score 2) overexpress NOX4 protein (score ≥ 2). These results indicate for the first time a positive correlation between NOX4 and CHD4 proteins expression in human thyroid tumor tissues driven by BRAF^{V600E}.

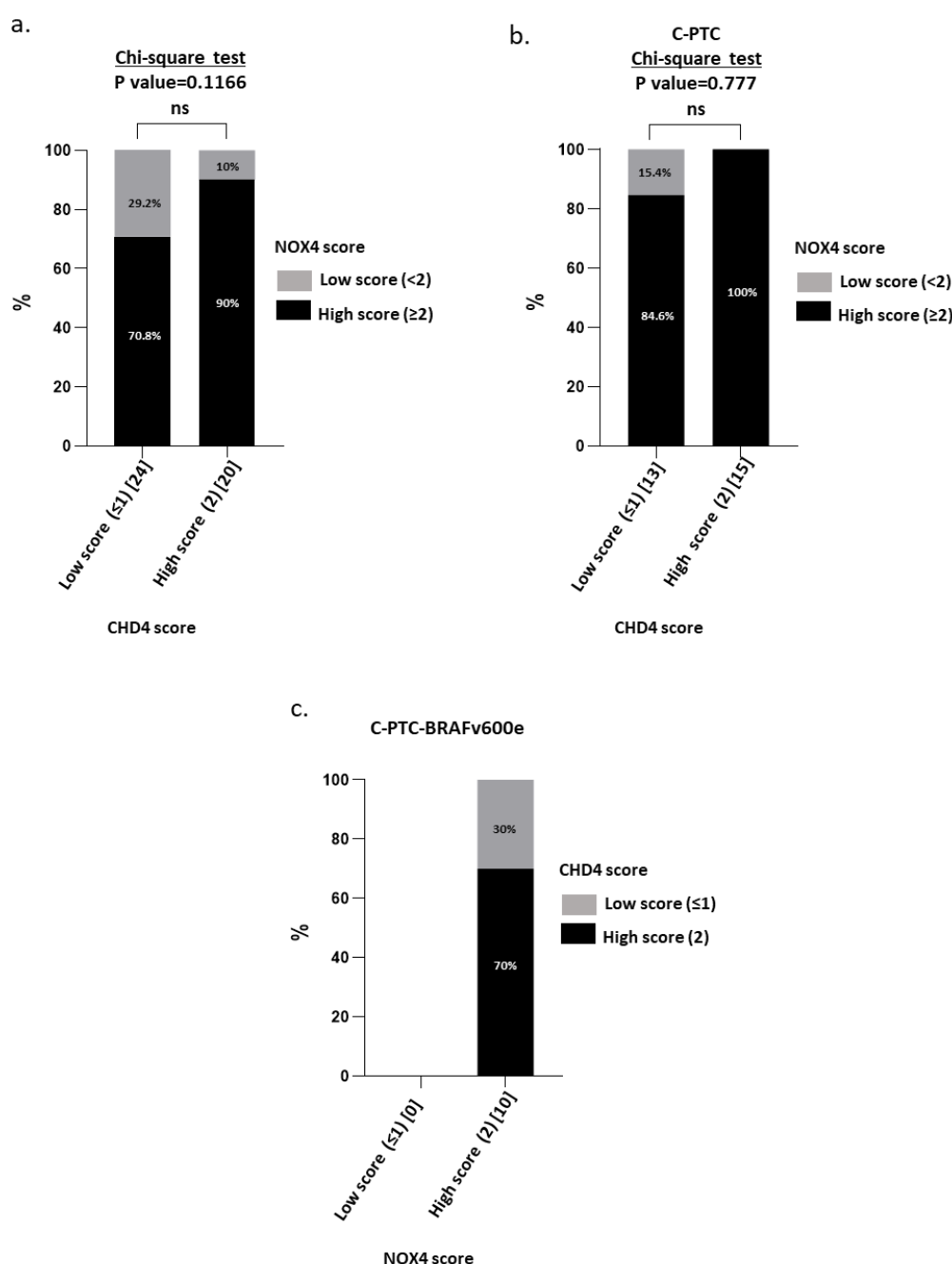


Figure 2: NOX4 and CHD4 proteins expression in thyroid carcinomas. a. Comparative analysis between the levels of CHD4 and NOX4 proteins expression in human thyroid carcinomas (n=44: 28 C-PTC, 13 F-PTC, 3

ATC). Percentage calculated according to the number of each CHD4 score (score ≤ 1 (n=24) and score 2 (n=20). b. Association between CHD4 and NOX4 proteins expression in C-PTCs (n= 28). Percentage calculated according to the number of each CHD4 score (score ≤ 1 (n=13) and score 2 (n=15). c. Association between CHD4 and NOX4 proteins expression levels in C-PTCs harboring BRAFV600E mutation (n= 10). Percentage calculated according to the number of each NOX4 score. The score < 2 indicates an absence or a low level of NOX4 protein expression (n=0). The score ≥ 2 indicates a mean or/and high level of NOX4 protein expression (n=10). The statistical significance is confirmed by a P value < 0.05 . CHD4: Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 4, NOX4: NADPH oxidase 4, PTC: papillary thyroid carcinomas, F-PTC: follicular variant of papillary thyroid carcinomas, C-PTC: classical form of papillary thyroid carcinomas, ATC: anaplastic thyroid carcinomas.

4. Discussion

Thyroid cancer represents the most common neoplasm of endocrine gland cancers. Among thyroid cancers, papillary thyroid cancer 'PTC' is the most common type of malignancy, accounting for approximately 80% of all thyroid cancers and predominates in women where the incidence rate is 3 times higher compared to man [1-2,22-23]. Histologically, papillary thyroid cancer includes several histological subtypes that share specific nuclear features of PTC. PTC is mainly found in the classical form (C-PTC) and the follicular variant (F-PTC) with a predominance of the classical form present in more than 50% of cases [24-26]. From a molecular point of view, each PTC variant is characterized by specific genetic alterations and this diversity constitutes a real challenge for the management of these tumors. BRAF^{V600E} mutation is the most common alteration in PTC, accounting for 28 to 90% of cases [1-3, 26]. This mutation corresponds to a substitution of valine by glutamic acid at amino acid residue 600 (V600E). This substitution results in a constitutive activation of the BRAF oncogene, leading to a constitutive stimulation of the MAPK signaling pathway [1,3-5]. The BRAF^{V600E} mutation is mainly identified in the classical form (C-PTC) and less identified in Follicular variant of PTC (F-PTC) and ATC. From a clinical point of view, this mutation is associated with aggressive clinicopathological characteristics including an advanced clinical stage, a significant risk of recurrence and mortality, extrathyroidal and lymph node invasion in thyroid cancer [2,27]. Epigenetic dysregulation has been observed in PTC driven by BRAF^{V600E}, including hypermethylation of the promoters of certain iodide-metabolizing genes such as SLC5A5 encoding for the sodium iodide symporter 'NIS' [6-9,28]; and CHD4, an epigenetic regulator of gene expression, seem to play an interesting role in thyroid cancer.

In this retrospective study, we analyzed at the protein level the expression of CHD4, an epigenetic regulator of gene expression, in 44 malignant thyroid tissues (41 PTCs: 28 C-PTC, 13 F-PTC, and 3 ATCs) and 42 of their normal adjacent tissues (NATs) to determine the involvement of CHD4 in thyroid malignancy. Our results showed a highly significant level of CHD4 protein expression in malignant thyroid tissues compared to their normal adjacent tissues (66.7% of ATC, 53.6% of C-PTC, 23.1% of F-PTC, and 0% of NAT) (see Figure 1b). This finding is consistent with similar results from another study carried out on a large cohort of Middle Eastern PTC patients which revealed an overexpression of CHD4 in 46.7% of C-PTC and 34.4% of F-PTC [19]. Additionally, the comparative analysis between CHD4 protein expression and the presence of the BRAF^{V600E} mutation showed a high expression of CHD4 in 70% of thyroid tumors driven by BRAF^{V600E} (see Figure 1c,d) This result agrees with another study, which also showed an overexpression of CHD4 in more than 50% of PTCs-BRAF^{V600E} [19], suggesting the regulation of CHD4 gene expression by the BRAF^{V600E} oncogene in thyroid cancers.

In thyroid cancer, CHD4 is involved in diverse aspects of tumorigenesis, including cell proliferation, epithelial-mesenchymal transition (EMT), and migration [19]. Furthermore, in human bone osteosarcoma epithelial cells (U2OS cell line) CHD4 was shown to be recruited to DNA damage sites leading to recruitment of DNA Methyltransferases DNMTs to chromatin in response to oxidative damage [20,30]. Azouzi et al., showed that ROS derived from NOX4 are involved in cell dedifferentiation in BRAF^{V600E}-driven PTC [8]. Recently, we have shown for the first time, a positive correlation between NOX4 protein and BRAF^{V600E} mutation in human thyroid tumors [10]. In this study, we performed a supplementary immunostaining of the same cohort [10] with CHD4 antibody. In this context, we observed for the first time a positive correlation between CHD4 and NOX4 protein expression in tumoral thyroid tissues. Indeed, 90% (18/20) of PTC showed a concomitant overexpression of CHD4 and NOX4 proteins (see Figure 2a); and, all C-PTC overexpressing CHD4 overexpressed NOX4 (see Figure 2b). Additionally, we have shown a positive correlation between CHD4 and NOX4 protein expression in 70% of C-PTCs harboring BRAF^{V600E} mutation (figure 2 c). These results suggest a potential involvement of these two actors in thyroid cancer development and could open a new perspective in the management of PTC. The molecular mechanisms interconnecting BRAF^{V600E}, NOX4 and CHD4 in appropriate cell line models of PTCs deserve to be illustrated.

References

1. Nikiforov, Y. E., & Nikiforova, M. N. (2011). Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. *Nature Reviews Endocrinology*, 7(10), 569-580.
2. Newfield, R. S., Jiang, W., Sugganth, D. X., Hantash, F. M., Lee, E., & Newbury, R. O. (2022). Mutational analysis using next generation sequencing in pediatric thyroid cancer reveals BRAF and fusion oncogenes are common. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 157, 111121.
3. Kebebew, E., Weng, J., Bauer, J., Ranvier, G., Clark, O. H., Duh, Q. Y., ... & Griffin, A. (2007). The prevalence and prognostic value of BRAF mutation in thyroid cancer. *Annals of surgery*, 246(3), 466.
4. Kimura, E. T., Nikiforova, M. N., Zhu, Z., Knauf, J. A., Nikiforov, Y. E., & Fagin, J. A. (2003). High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer research*, 63(7), 1454-1457.
5. Xing, M., Alzahrani, A. S., Carson, K. A., Viola, D., Elisei, R., Bendlova, B., ... & Sykorova, V. (2013). Association between BRAF V600E mutation and mortality in patients with papillary thyroid cancer. *Jama*, 309(14), 1493-1501.
6. Galrao, A. L., Camargo, R. Y., Friguglietti, C. U., Moraes, L., Cerutti, J. M., Serrano-Nascimento, C., ... & Rubio, I. G. (2014). Hypermethylation of a New Distal Sodium/Iodide Symporter (NIS) enhancer (NDE) is associated with reduced NIS expression in thyroid tumors. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 99(6), E944-E952.
7. Yi, J. W., Ha, S. Y., Jee, H. G., Kim, K., Kim, S. J., Chai, Y. J., ... & Lee, K. E. (2022). Induction of the BRAFV600E mutation in thyroid cells leads to frequent hypermethylation. *Clinical and Experimental Otorhinolaryngology*, 15(3), 273-282.

8. Azouzi, N., Cailloux, J., Cazarin, J. M., Knauf, J. A., Cracchiolo, J., Al Ghuzlan, A., ... & Dupuy, C. (2017). NADPH oxidase NOX4 is a critical mediator of BRAFV600E-induced downregulation of the sodium/iodide symporter in papillary thyroid carcinomas. *Antioxidants & redox signaling*, 26(15), 864-877.
9. Riesco-Eizaguirre, G., Santisteban, P., & De la Vieja, A. (2021). The complex regulation of NIS expression and activity in thyroid and extrathyroidal tissues. *Endocrine-Related Cancer*, 28(10), T141-T165.
10. Fenniche, S., Oukabli, M., Oubaddou, Y., Chahdi, H., Damiri, A., Alghuzlan, A., ... & Ameziane El Hassani, R. (2023). A Comparative Analysis of NOX4 Protein Expression in Malignant and Non-Malignant Thyroid Tumors. *Current Issues in Molecular Biology*, 45(7), 5811-5823.
11. Xue, Y., Wong, J., Moreno, G. T., Young, M. K., Côté, J., & Wang, W. (1998). NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities. *Molecular cell*, 2(6), 851-861.
12. McKenzie, L. D., LeClair, J. W., Miller, K. N., Strong, A. D., Chan, H. L., Oates, E. L., ... & Chheda, M. G. (2019). CHD4 regulates the DNA damage response and RAD51 expression in glioblastoma. *Scientific reports*, 9(1), 4444.
13. Wang, Y., Chen, Y., Bao, L., Zhang, B., Wang, J. E., Kumar, A., ... & Luo, W. (2020). CHD4 promotes breast cancer progression as a coactivator of hypoxia-inducible factors. *Cancer research*, 80(18), 3880-3891.
14. Novillo, A., Fernandez-Santander, A., Gaibar, M., Galan, M., Romero-Lorca, A., El Abdellaoui-Soussi, F., & Gomez-del Arco, P. (2021). Role of chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4 (CHD4) in breast cancer. *Frontiers in oncology*, 11, 633233.
15. D'Alesio, C., Bellese, G., Gagliani, M. C., Lechiara, A., Dameri, M., Grasselli, E., ... & Castagnola, P. (2019). The chromodomain helicase CHD4 regulates ERBB2 signaling pathway and autophagy in ERBB2+ breast cancer cells. *Biology open*, 8(4), bio038323.
16. Xia, L., Huang, W., Bellani, M., Seidman, M. M., Wu, K., Fan, D., ... & Baylin, S. B. (2017). CHD4 has oncogenic functions in initiating and maintaining epigenetic suppression of multiple tumor suppressor genes. *Cancer cell*, 31(5), 653-668.
17. Xu, N., Liu, F., Wu, S., Ye, M., Ge, H., Zhang, M., ... & Bai, C. (2020). CHD4 mediates proliferation and migration of non-small cell lung cancer via the RhoA/ROCK pathway by regulating PHF5A. *BMC cancer*, 20(1), 1-11.
18. Wang, H. C., Chou, C. L., Yang, C. C., Huang, W. L., Hsu, Y. C., Luo, C. W., ... & Pan, M. R. (2019). Over-expression of CHD4 is an independent biomarker of poor prognosis in patients with rectal cancers receiving concurrent chemoradiotherapy. *International journal of molecular sciences*, 20(17), 4087.
19. Pratheeshkumar, P., Siraj, A. K., Divya, S. P., Parvathareddy, S. K., Alobaisi, K., Al-Sobhi, S. S., ... & Al-Kuraya, K. S. (2021). CHD4 predicts aggressiveness in PTC patients and promotes cancer stemness and EMT in PTC cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 504.
20. Polo, S. E., Kaidi, A., Baskcomb, L., Galanty, Y., & Jackson, S. P. (2010). Regulation of DNA-damage responses and cell-cycle progression by the chromatin remodelling factor CHD4. *The EMBO journal*, 29(18), 3130-3139.

21. Zhang, J., Shih, D. J., & Lin, S. Y. (2019). The tale of CHD4 in DNA damage response and chemotherapeutic response. *Journal of cancer research and cellular therapeutics*, 3(1)
22. Li, P., Ding, Y., Liu, M., Wang, W., & Li, X. (2021). Sex disparities in thyroid cancer: a SEER population study. *Gland Surgery*, 10(12), 3200.
23. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394-424.
24. Shi, X., Liu, R., Basolo, F., Giannini, R., Shen, X., Teng, D., ... & Xing, M. (2016). Differential clinicopathological risk and prognosis of major papillary thyroid cancer variants. *The Journal of Clinical Endocrinology*, 101(1), 264-274.
25. Shafique, Khurram, and Zubair Baloch. "Risk stratification of papillary thyroid carcinoma and its variants; from clinicopathologic features to molecular profiling." *Diagnostic Histopathology* 25.5 (2019): 143-153.
26. Hu, J., Yuan, I. J., Mirshahidi, S., Simental, A., Lee, S. C., & Yuan, X. (2021). Thyroid carcinoma: phenotypic features, underlying biology and potential relevance for targeting therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1950.
27. Kim, S. J., Lee, K. E., Myong, J. P., Park, J. H., Jeon, Y. K., Min, H. S., ... & Youn, Y. K. (2012). BRAF V600E mutation is associated with tumor aggressiveness in papillary thyroid cancer. *World journal of surgery*, 36, 310-317.
28. 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
29. Ameziane-El-Hassani, R., Schlumberger, M., & Dupuy, C. (2016). NADPH oxidases: new actors in thyroid cancer?. *Nature Reviews Endocrinology*, 12(8), 485-494.
30. Larsen, D. H., Poinsignon, C., Gudjonsson, T., Dinant, C., Payne, M. R., Hari, F. J., ... & Lukas, J. (2010). The chromatin-remodeling factor CHD4 coordinates signaling and repair after DNA damage. *Journal of Cell Biology*, 190(5), 731-740.

Discussion générale

Les cancers papillaires de la thyroïde PTC représentent 80% des cancers thyroïdiens. Ces cancers sont caractérisés par une diversité moléculaire et histologique qui constitue un véritable défi pour la prise en charge de ces tumeurs. Du point de vue moléculaire, le PTC comprend plusieurs altérations génétiques, dont la plus fréquente est la mutation BRAF^{V600E}. Cette mutation correspond à une substitution de la valine par l'acide glutamique au niveau du résidu d'acide aminé 600 (V600E) (Davies H et al., 2002). Il a été démontré au niveau des PTCs que cette substitution induit une instabilité génétique via une activation constitutive de la voie de signalisation MAPK, et une instabilité épigénétique via l'hyperméthylation de promoteurs de certains gènes métabolisant l'iodure comme le sodium iodure symporter « NIS » qui se traduit par la dédifférenciation des cellules thyroïdiennes et la résistance à la thérapie à l'iode radioactif. L'exploration des mécanismes moléculaires en aval de la mutation BRAF^{V600E} doit permettre de déterminer de nouvelles cibles thérapeutiques qui pourront améliorer la prise en charge des patients présentant des PTCs radio-résistants. Dans ce cadre, notre équipe s'est intéressée à la NADPH oxydase 4 (NOX4), une enzyme transmembranaire dont le rôle principal est la synthèse des espèces réactives de l'oxygène (Ameziane El Hassani, R et al., 2016) et qui est bien exprimée dans la thyroïde. Sa localisation intracellulaire suggère un rôle dans la signalisation redox, laquelle si elle est dérégulée peut contribuer à une instabilité génomique des cellules thyroïdiennes. A cette fin, notre équipe a montré ultérieurement que l'ARNm de NOX4 est surexprimé dans les PTCs porteurs de la mutation BRAF^{V600E} comparativement aux PTCs non mutés. Bien que l'expression de la protéine NOX4 soit directement liée à l'expression de son messenger nous avons souhaité compléter l'étude par une analyse de l'expression de la protéine NOX4 dans les tumeurs de la thyroïde dont les PTCs mutés BRAF^{V600E}.

- NOX4, un biomarqueur potentiel de l'agressivité tumorale ?

Le premier volet de ce travail a été orienté vers l'analyse comparative de l'expression de la protéine NOX4 dans les tissus thyroïdiens malins et non malins (BRAF^{V600E}/BRAFwt). L'analyse de l'expression de la protéine NOX4 par immunomarquage dans 134 tissus thyroïdiens montre un niveau élevé de NOX4 dans les tissus cancéreux de la thyroïde par rapport aux tissus normaux adjacents. Ce résultat concorde avec des résultats similaires obtenus à partir de moins des tissus (Weyemi, U et al 2012; Muzza, M et al., 2022). Cette étude confirme également la corrélation positive entre NOX4 et la mutation BRAF^{V600E}. Cependant, de manière intéressante, 68,4% des PTCs non mutés présentent un score élevé pour la protéine

NOX4, soulignant que l'expression de NOX4 pourrait être régulée indépendamment du statut mutationnel de BRAF. La voie TGF- β joue un rôle clé dans la tumorigenèse thyroïdienne. Il a été démontré que l'effet oncogénique de BRAF^{V600E} dans les cellules thyroïdiennes est en partie médié par le TGF- β (Riesco-Eizaguirre, G et al., 2009), lequel régule positivement NOX4 (Azouzi, N et al., 2017). Le microenvironnement tumoral, comprenant les fibroblastes associés au cancer (CAF) et les cellules myéloïdes telles que les macrophages, produit également du TGF- β (Rabold, K et al., 2022). Par conséquent, le microenvironnement peut contribuer à induire NOX4 dans les cellules tumorales. Pour établir le lien entre la protéine NOX4 et la capacité d'infiltration du PTC, nous avons exploré la présence ou l'absence d'effraction capsulaire, celle-ci indiquant la capacité des tumeurs à s'étendre/envahir le tissu adjacent et donc l'extension extrathyroïdienne. Plus de 90 % des tumeurs C-PTCs infiltrants surexpriment la protéine NOX4 (score ≥ 2), suggérant un rôle de NOX4 dans l'agressivité des tumeurs thyroïdiennes.

- Le Rôle potentiel de NOX4 dans la progression vers des maladies malignes de la thyroïde

Certes, le niveau d'expression de la protéine NOX4 en termes de production de ERO peut être lié à l'incidence des dommages oxydatifs de l'ADN dans les thyrocytes. La localisation cellulaire de NOX4 semble donc présenter un grand intérêt. En effet, les localisations nucléaire et périnucléaire de NOX4 peuvent favoriser l'instabilité génomique associée à la transformation des thyrocytes. La localisation périnucléaire de NOX4 observée dans les tissus thyroïdiens humains malins concorde avec cela. Il est intéressant de noter que les tissus de goître et d'hyperplasie présentant un score élevé de la protéine NOX4 présentent également une localisation nucléaire et périnucléaire, suggérant un rôle potentiel de NOX4 dans la progression de ces maladies non malignes vers le cancer de la thyroïde. En effet, un risque élevé de cancer a été rapporté dans les goîtres (18 %) (Smith, J. J et al., 2013), et l'hyperplasie thyroïdienne est rapportée comme étant la maladie bénigne la plus fréquemment associée au PTC (Paparodis, R et al., 2020). La maladie de Basedow montre également un taux élevé de protéine NOX4, et ce résultat peut s'expliquer par l'activation constitutive du récepteur TSH (stimulation des anticorps) dans les tissus de la maladie de Basedow (Führer, D, 2020). La régulation positive de NOX4 par la TSH a en effet été rapportée (Weyemi, U et al., 2010).

- CHD4 est un nouvel médiateur de la dédifférenciation thyroïdienne

Le deuxième volet de notre étude a été orienté vers l'analyse de l'expression de CHD4 dans les cancers thyroïdiens porteurs de la mutation BRAF^{V600E}. Dans les lignées tumorales thyroïdiennes porteuses de la mutation BRAF^{V600E} (8505C et BCPAP), il a été rapporté que les

ROS dérivées de NOX4 contribuent à la répression réversible du NIS. Parmi les modifications réversibles ou épigénétiques, il y a la méthylation de l'ADN qui correspond à un transfert d'un groupement méthyle-CH₃ sur la position C5 de la cytosine pour former la 5-méthylcytosine. Ce transfert est catalysé par les ADN méthyltransférases (DNMT). Cette modification se produit fréquemment dans les régions 5' des promoteurs des gènes riches en îlots CpG, entraînant soit une activation (des proto-oncogènes) ou une inactivation des gènes (tels que les gènes de différenciation thyroïdienne). Il a été démontré que les ERO régulent les principaux processus épigénétiques, en induisant des dommages oxydatifs à l'ADN. La réponse à ces dommages recrute divers complexes de remodelage à la chromatine permettant la régulation de l'expression génique. CHD4, une sous-unité du complexe du remodelage NuRD, est un régulateur épigénétique de l'expression génique qui joue un rôle important dans la réponse aux dommages à l'ADN (Polo, S. E et al., 2010). Elle s'est trouvée fortement exprimée dans les PTCs, favorisant la migration et la transition épithelio-mésenchymateuse (EMT) (Pratheeshkumar, P et al., 2021). Cependant, la régulation de la protéine CHD4 par l'oncogène BRAF^{V600E} dans les PTCs n'avait pas encore été établie.

Dans notre étude, nous avons montré, par une analyse immunohistochimique qui porte sur 44 tissus thyroïdiens, un niveau très significatif d'expression de la protéine CHD4 dans les tissus thyroïdiens malins par rapport à leurs tissus normaux adjacents. Ce résultat est en accord avec une étude réalisée sur une large cohorte de patients PTC du Moyen-Orient qui a révélé une surexpression de CHD4 dans 46,7 % des C-PTC et 34,4 % des F-PTC (Pratheeshkumar, P et al., 2021). De plus, l'analyse comparative entre l'expression de la protéine CHD4 et la présence de la mutation BRAF^{V600E} a confirmé une expression élevée de la protéine CHD4 dans les tumeurs thyroïdiennes exprimant BRAF^{V600E} (Pratheeshkumar, P et al., 2021).

Notre analyse de la base de données TCGA a révélé une corrélation entre la surexpression de l'ARNm de CHD4 et un faible score de différenciation thyroïdienne, suggérant que CHD4 pourrait être impliqué dans la différenciation thyroïdienne et donc dans l'inhibition des gènes codant des marqueurs thyroïdiens tel que le NIS. Nos résultats montrent pour la première fois que CHD4 coopère avec les DNMTs dans la répression du gène *SLC5A5* codant le NIS dans plusieurs lignées thyroïdiennes tumorales mutées pour BRAF^{V600E} (BCPAP et 8505c).

- La régulation de l'expression et de l'activité CHD4 par le TGF-β et NOX4 dans les PTCs-BRAF^{V600E}

Le troisième volet de notre étude concerne l'analyse de la régulation de CHD4 par la voie de signalisation TGF- β -SMAD3. L'équipe a précédemment mis en évidence que la voie TGF- β -SMAD3 est régulé par l'oncogène BRAF^{V600E} (Azouzi, N et al., 2017). Dans cette étude, en utilisant deux lignées cellulaires cancéreuses humaines porteuses de la mutation BRAF^{V600E} (BCPAP et 8505c), une lignée thyroïdienne dérivée de patients porteurs de la mutation BRAF^{V600E} (PDX), et des thyrocytes primaires, nous mettons en évidence que l'expression de CHD4 est contrôlée au niveau protéique via l'activation de la voie de signalisation du TGF- β dépendante de SMAD3. Par ailleurs, cette voie régule également l'expression de NOX4 (Azouzi, N et al., 2017). L'analyse comparative de l'expression de CHD4 par immunomarquage a révélé qu'il existe une corrélation positive entre les expressions de NOX4 et de CHD4 dans les PTCs porteurs de la mutation BRAF^{V600E} (70% des PTCs-BRAF^{V600E} présentent des scores élevés de la protéine CHD4 et NOX4).

CHD4 est recruté à la chromatine par plusieurs protéines en réponse aux dommages à l'ADN (DDR) dont OGG1 (Polo, S. E et al., 2010). Nous montrons ici que le recrutement à la chromatine de CHD4 dans les lignées tumorales mutées pour BRAF^{V600E} (BCPAP et PDX), est dépendant des dommages oxydatifs à l'ADN produit par NOX4.

L'ensemble de ces résultats montrent que le TGF- β , associé aux tumeurs thyroïdiennes les plus agressives, contrôle l'expression de CHD4, lequel via son association avec les protéines de la réparation des dommages oxydatifs et les DNMTs, réprime l'expression du gène codant le NIS.

- CHD4, une cible thérapeutique potentielle ?

Dans les PTCs, la présence de la mutation BRAF^{V600E} entraîne une hyperméthylation du promoteur du gène codant le NIS via une activation constitutive de la voie MAPK (Choi, Y et al., 2014). La répression de NIS induit la perte de la captation de l'iode dans les cellules cancéreuses de la thyroïde qui se traduit par la résistance à la thérapie à l'iode radioactif (RAI), constituant en conséquence un véritable défi pour le traitement des patients atteints d'un cancer de la thyroïde. Cependant, l'utilisation des inhibiteurs pharmacologiques de la voie MAPK tel que le selumétinib, qui est un inhibiteur de MEK et le dabrafenib ou vemurafenib qui sont des inhibiteurs de BRAF^{V600E}, chez des patients présentant une mutation RAS ou BRAF^{V600E}, a permis de ré-induire l'expression des gènes métabolisant l'iodure et de re-sensibiliser les cellules cancéreuses à la thérapie à l'iode radioactif, en particulier dans les tumeurs mutées RAS (Ho, A. L et al., 2013; Rothenberg, S. M et al., 2015 ; Dunn, L. A et al., 2019). Cependant, la restauration de la captation de l'iode était partielle chez les patients présentant une mutation BRAF^{V600E}. Cette résistance pourrait s'expliquer en partie par l'activation d'une voie de

signalisation alternative comme celle de TGF- β -SMAD3, qui fonctionne d'une manière autocrine. Cependant, le TGF- β peut être pro- ou anti-tumoral, ce qui ne lui permet pas d'être un bon candidat à cibler, d'où l'intérêt de cibler un effecteur en aval. Dans cette étude, CHD4 est trouvé impliqué dans la régulation négative de l'expression du transporteur de l'iode NIS. De ce fait, il serait intéressant d'évaluer dans les futurs traitements, l'effet d'inhibiteurs spécifiques de CHD4, en association avec des inhibiteurs de la voie MAPK kinase sur la potentialisation de la thérapie à l'iode radioactif.

Conclusions et perspectives

Cette étude s'inscrit dans le cadre de deux projets complémentaires (approche translationnelle et approche cellulaire) visant à analyser l'expression de la protéine NOX4 et de CHD4 dans les tumeurs thyroïdiennes malignes et non malignes et à déterminer l'implication de NOX4 dans la régulation de l'expression et/ou de l'activité de CHD4 dans les cellules tumorales thyroïdiennes porteuses de la mutation BRAF^{V600E}. Notre objectif étant de déchiffrer les mécanismes moléculaires qui sont dérégulés dans les PTC-BRAF^{V600E}, et qui sont impliqués dans l'agressivité et la radiorésistance de certaines de ces tumeurs.

A travers cette étude menée durant ma thèse, nous avons montré que tous les PTC-BRAF^{V600E} surexpriment la protéine NOX4, illustrant pour la première fois la corrélation positive entre BRAF^{V600E} et la protéine NOX4 dans les tissus tumoraux PTC. Ainsi, nous avons révélé que la surexpression de NOX4 est associée au caractère agressif des tumeurs. Néanmoins, 60% des C-PTCs infiltrant surexpriment également NOX4 et ce, indépendamment de l'oncogène BRAF^{V600E}. Ces résultats démontrent que l'expression de NOX4 pourrait être un biomarqueur complémentaire de l'agressivité du cancer de la thyroïde. Cependant, des études complémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre le rôle oncogénique de NOX4. Nous observons aussi une surexpression de NOX4 dans les Basedow, goîtres et hyperplasies, suggérant un rôle de NOX4 dans la progression vers la malignité thyroïdienne (Figure 26).

En prenant en considération la localisation subcellulaire, il a été démontré que NOX4 est active dans des compartiments et organites intracellulaires, comme le réticulum endoplasmique, les mitochondries et le noyau (Block, K et al., 2009 ; Lee, W et al., 2014 ; Azouzi, N et al., 2017). De ce fait, plusieurs isoformes de NOX4 ont été décrites (Goyal, P et al., 2005), certaines étant fonctionnelles. Nous avons observé une localisation à la fois périnucléaire et cytoplasmique dans les tissus tumoraux et leurs tissus normaux adjacents. Cependant, la localisation de NOX4 semble être perturbée dans les autres pathologies (Cytoplasmique dans les Basedow et les thyroïdites, cytoplasmiques et nucléaires dans les goîtres et le 1/3 des hyperplasies montre un marquage exclusivement nucléaire). L'identification des isoformes de NOX4 associées à différentes pathologies peut aider à mieux comprendre le rôle de NOX4 dans la physiopathologie thyroïdienne et améliorer le diagnostic et/ou le pronostic de ces pathologies. Ceci nécessite le développement en parallèle d'anticorps spécifiques pour chaque isoforme à potentiel pathologique.

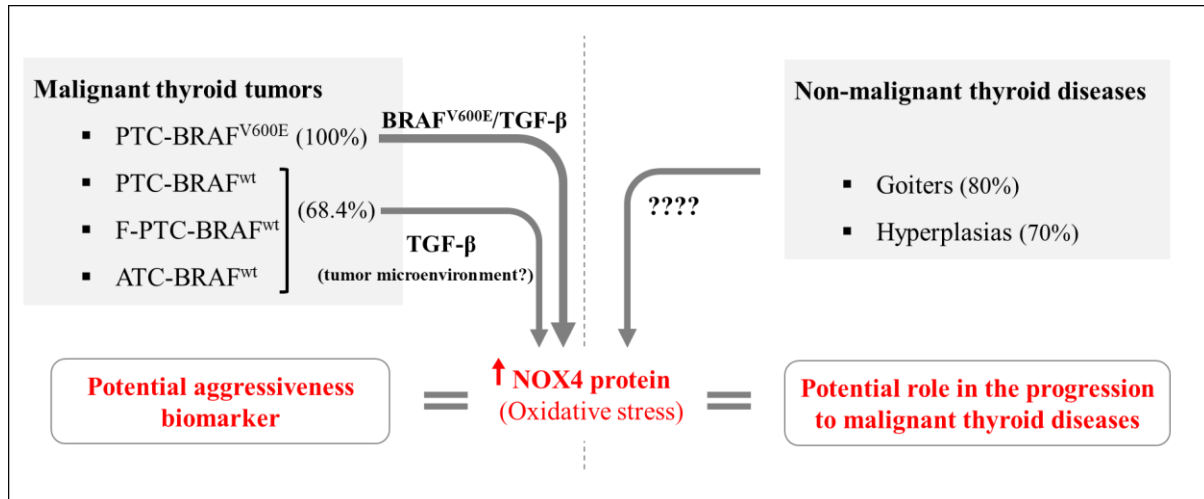


Figure 26: Schéma récapitulatif 1. Les tissus tumoraux PTC pilotés par l'oncogène BRAF^{V600E} surexpriment NOX4 via la voie TGF-β. Plus de 60% des tissus tumoraux surexpriment également NOX4 indépendamment de l'oncogène BRAF^{V600E}, suggérant un rôle de NOX4 autant qu'un potentiel biomarqueur d'agressivité thyroïdienne. En outre, la surexpression de NOX4 a été retrouvée dans les tissus thyroïdiens non malins notamment les goitres (80% des cas) et les hyperplasias (70% des cas). Ceci suggère que NOX4 pourrait avoir également un rôle potentiel dans la progression vers la malignité thyroïdienne.

Nous avons montré que la voie du TGF-β dépendante de SMAD3 régule l'expression de la protéine CHD4. Ce régulateur épigénétique coopère avec les DNMTs dans la répression du gène *SLC5A5* codant le NIS dans plusieurs lignées thyroïdiennes tumorales mutées pour BRAF^{V600E}. L'analyse du recrutement à la chromatine de CHD4 montre que celui-ci est dépendant des dommages oxydatifs à l'ADN induit par NOX4. Ce recrutement est dépendant d'OGG1 et de MSH6, deux protéines impliquées respectivement dans le « Base Excision Repair » (BER) et le « Mismatch Repair » (MMR), deux mécanismes de réparation des dommages oxydatifs à l'ADN (Figure 27). Enfin, cette étude démontre que CHD4 est un nouvel élément clé de la signalisation oncogénique BRAF^{V600E}/TGF-β/SMAD3/NOX4 dans le cancer papillaire de la thyroïde. Par ailleurs, afin d'identifier CHD4 en tant que cible thérapeutique pour augmenter l'efficacité de la thérapie à l'iode radioactif, il serait important d'analyser si CHD4 est enrichie dans les régions géniques oxydées et dans les régions promotrices du gène codant le NIS et d'autres gènes de différenciation thyroïdiennes tels que PAX8 et TTF1.

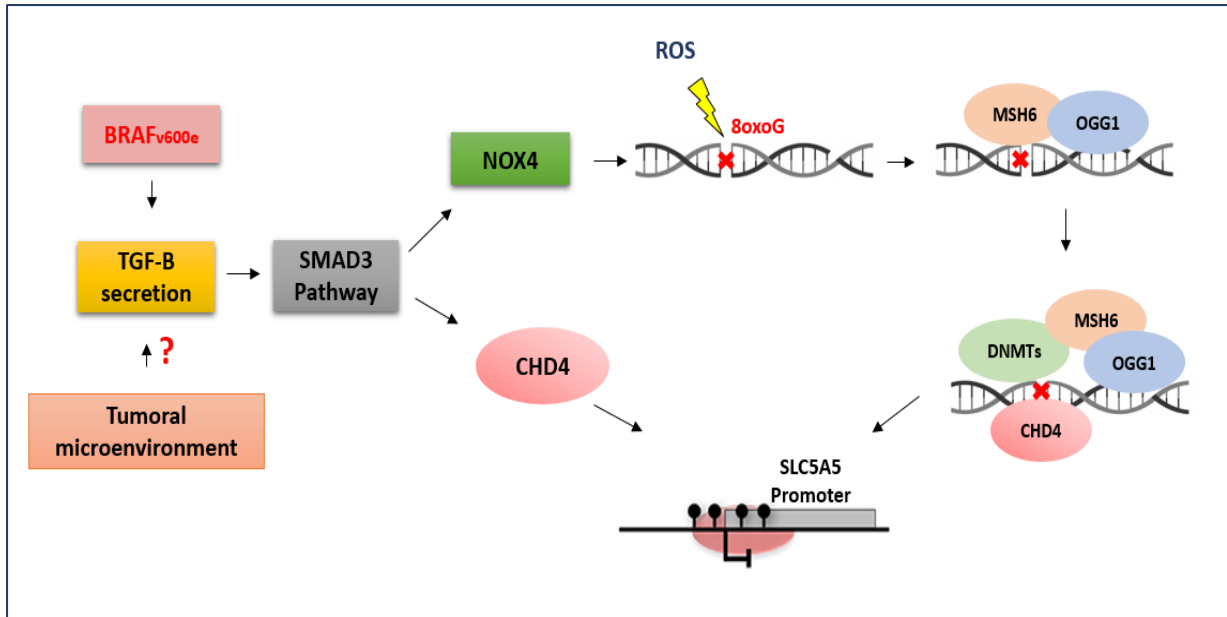


Figure 27: Schéma récapitulatif 2. BRAF^{V600E} régule la sécrétion de TGF-β, qui active la voie de signalisation dépendante de SMAD3. Cette voie contrôle l'expression des protéines NOX4 et CHD4. En produisant des ROS, NOX4 induit des dommages oxydatifs à l'ADN qui favorisent le recrutement de protéines de réparation de l'ADN, telles que OGG1 et MSH6, augmentant ainsi l'affinité de CHD4 à la chromatine. La coopération entre CHD4 et DNMT contribue à maintenir l'inactivation du gène *SLC5A5* codant pour NIS.

Références bibliographiques

- Abdullah MI, Junit SM, Ng KL, Jayapalan JJ, Karikalan B, and Hashim OH. (2019). Papillary Thyroid Cancer: Genetic Alterations and Molecular Biomarker Investigations. *International Journal of Medical Sciences*, 16(3), 450–460
- Acosta, J. C., Banito, A., Wuestefeld, T., Georgilis, A., Janich, P., Morton, J. P., ... & Gil, J. (2013). A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nature cell biology*, 15(8), 978-990.
- Agrawal, N., Akbani, R., Aksoy, B. A., Ally, A., Arachchi, H., Asa, S. L., ... Baylin, S. B. (2014). Integrated Genomic Characterization of Papillary Thyroid Carcinoma. *Cell*, 159(3), 676–690. doi:10.1016/j.cell.2014.09.050
- Alkemade, A., Vuijst, C. L., Unmehopa, U. A., Bakker, O., Vennström, B., Wiersinga, W. M., ... & Fliers, E. (2005). Thyroid hormone receptor expression in the human hypothalamus and anterior pituitary. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90(2), 904-912.
- Allen, H. F., Wade, P. A., & Kutateladze, T. G. (2013). The NuRD architecture. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70, 3513-3524.
- Allen, M. D., Bycroft, M., & Zinzalla, G. (2020). Structure of the BRK domain of the SWI/SNF chromatin remodeling complex subunit BRG1 reveals a potential role in protein–protein interactions. *Protein Science*, 29(4), 1033-1039.
- Ambasta, R. K., Kumar, P., Griendling, K. K., Schmidt, H. H., Busse, R., & Brandes, R. P. (2004). Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 279(44), 45935-45941.
- Ameziane El Hassani R, Benfares, N., Caillou, B., Talbot, M., Sabourin, J. C., Belotte, V., ... & Dupuy, C. (2005). Dual oxidase2 is expressed all along the digestive tract. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 288(5), G933-G942.
- Ameziane El Hassani R, Buffet C, Leboulleux S, and Dupuy C. (2019). Oxidative stress in thyroid carcinomas: biological and clinical significance. *Endocrine-related cancer*, 26(3), 131-143.
- Ameziane El Hassani R, Schlumberger M, and Dupuy C. (2016). NADPH oxidases: new actors in thyroid cancer? *Nature Reviews Endocrinology*, 12(8), 485–494.
- Ameziane-El-Hassani, R., Boufraquech, M., Lagente-Chevallier, O., Weyemi, U., Talbot, M., Métivier, D., ... & Dupuy, C. (2010). Role of H₂O₂ in RET/PTC1 chromosomal rearrangement produced by ionizing radiation in human thyroid cells. *Cancer research*, 70(10), 4123-4132.

- Ameziane-El-Hassani, R., Talbot, M., de Souza Dos Santos, M. C., Al Ghuzlan, A., Hartl, D., Bidart, J. M., ... & Dupuy, C. (2015). NADPH oxidase DUOX1 promotes long-term persistence of oxidative stress after an exposure to irradiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(16), 5051-5056.
- Arrangoiz R, Cordera F, Caba D, Muñoz M, Moreno E, and Luque de León E. (2018). Comprehensive Review of Thyroid Embryology, Anatomy, Histology, and Physiology for Surgeons. *International Journal of Otolaryngology and Head & Neck Surgery*, 7, 160-188.
- Asya, O., Yumuşakhuylu, A. C., Bağcı, P., Kaya, H., Gönen, A., Gündoğdu, Y., ... & Oysu, Ç. (2022). Relationship of PPAR γ overexpression with prognostic parameters in papillary thyroid carcinoma. *Acta Otorhinolaryngologica Italica*, 42(1), 34.
- Au, A. Y., McBride, C., Wilhelm Jr, K. G., Koenig, R. J., Speller, B., Cheung, L., ... & Clifton-Bligh, R. J. (2006). PAX8-peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) disrupts normal PAX8 or PPAR γ transcriptional function and stimulates follicular thyroid cell growth. *Endocrinology*, 147(1), 367-376.
- Azouzi, N., Cailloux, J., Cazarin, J. M., Knauf, J. A., Cracchiolo, J., Al Ghuzlan, A., ... & Dupuy, C. (2017). NADPH oxidase NOX4 is a critical mediator of BRAFV600E-induced downregulation of the sodium/iodide symporter in papillary thyroid carcinomas. *Antioxidants & redox signaling*, 26(15), 864-877.
- Ba X, and Boldogh I. (2018). 8-Oxoguanine DNA glycosylase 1: Beyond repair of the oxidative lymodified base lesions. *Redox Biology*, 14, 669–678.
- Basta, J., & Rauchman, M. (2017). The nucleosome remodeling and deacetylase complex in development and disease. *Translating epigenetics to the clinic*, 37-72.
- Bedard, K., & Krause, K. H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological reviews*, 87(1), 245-313.
- Benvenga S, Tuccari G, Ieni A, and Vita R. (2018). Thyroid Gland: Anatomy and Physiology. *Reference Module in Biomedical Sciences*.
- Bhattarai, C., Poudel, P. P., Ghosh, A., & Kalthur, S. G. (2022). The RET gene encodes RET protein, which triggers intracellular signaling pathways for enteric neurogenesis, and RET mutation results in Hirschsprung's disease. *AIMS neuroscience*, 9(1), 128.
- Biernacka, A., Dobaczewski, M., & Frangogiannis, N. G. (2011). TGF- β signaling in fibrosis. *Growth factors*, 29(5), 196-202.
- Block, K., Gorin, Y., & Abboud, H. E. (2009). Subcellular localization of Nox4 and regulation in diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(34), 14385-14390.

- Boiteux S and Radicella J. P. (2000). The Human OGG1 Gene: Structure, Functions, and Its Implication in the Process of Carcinogenesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 377(1), 1–8.
- Boudreau, H. E., Casterline, B. W., Rada, B., Korzeniowska, A., & Leto, T. L. (2012). Nox4 involvement in TGF-beta and SMAD3-driven induction of the epithelial-to-mesenchymal transition and migration of breast epithelial cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 53(7), 1489-1499.
- Boulasiki, P., Tan, X. W., Spinelli, M., & Riccio, A. (2023). The NuRD Complex in Neurodevelopment and Disease: A Case of Sliding Doors. *Cells*, 12(8), 1179.
- Bowden, S. A., & Goldis, M. (2023). Congenital Hypothyroidism. In StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing.
- Braunstein, G.D. (2022). Revue générale de la fonction thyroïdienne. Le MANUEL MSD. <https://www.msdmanuals.com/fr/professional/troubles-endocriniens-et-m%C3%A9taboliques/troubles-thyro%C3%A9diens/thyro%C3%A9dite-lymphocytaire-silencieuse>
- Bridge, G., Rashid, S., & Martin, S. A. (2014). DNA mismatch repair and oxidative DNA damage: implications for cancer biology and treatment. *Cancers*, 6(3), 1597-1614.
- Brummer, T., Naegele, H., Reth, M., & Misawa, Y. (2003). Identification of novel ERK-mediated feedback phosphorylation sites at the C-terminus of B-Raf. *Oncogene*, 22(55), 8823-8834.
- Cai, Y., Geutjes, E. J., De Lint, K., Roepman, P., Bruurs, L., Yu, L. R., ... & Baylin, S. B. (2014). The NuRD complex cooperates with DNMTs to maintain silencing of key colorectal tumor suppressor genes. *Oncogene*, 33(17), 2157-2168.
- Carrasco, N. (1993). Iodide transport in the thyroid gland. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 1154(1), 65–82. doi:10.1016/0304-4157(93)90017-i
- Carvalho DP, and Dupuy C. (2013). Role of the NADPH Oxidases DUOX and NOX4 in Thyroid Oxidative Stress. *European Thyroid Journal*, 2(3), 160–167.
- Carvalho, D. P., & Dupuy, C. (2017). Thyroid hormone biosynthesis and release. *Molecular and cellular endocrinology*, 458, 6-15.
- Catalano MG, Fortunati N, and Boccuzzi G. (2012). Epigenetics Modifications and Therapeutic Prospects in Human Thyroid Cancer. *Frontiers in Endocrinology*, 3.
- Cazarin, J., Dupuy, C., & Pires de Carvalho, D. (2022). Redox Homeostasis in Thyroid Cancer: Implications in Na⁺/I⁻ Symporter (NIS) Regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11), 6129.

- Chakravarty, D., Santos, E., Ryder, M., Knauf, J. A., Liao, X. H., West, B. L., ... & Fagin, J. A. (2011). Small-molecule MAPK inhibitors restore radioiodine incorporation in mouse thyroid cancers with conditional BRAF activation. *The Journal of clinical investigation*, 121(12), 4700-4711.
- Choi, Y. W., Kim, H. J., Kim, Y. H., Park, S. H., Chwae, Y. J., Lee, J., ... & Park, T. J. (2014). B-RafV600E inhibits sodium iodide symporter expression via regulation of DNA methyltransferase 1. *Experimental & molecular medicine*, 46(11), e120-e120.
- Chong, H., Lee, J., & Guan, K. L. (2001). Positive and negative regulation of Raf kinase activity and function by phosphorylation. *The EMBO journal*, 20(14), 3716-3727.
- Christmann, M., Tomicic, M. T., Roos, W. P., & Kaina, B. (2003). Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology*, 193(1-2), 3-34.
- Chung, T., Youn, H., Yeom, C. J., Kang, K. W., & Chung, J. K. (2015). Glycosylation of sodium/iodide symporter (NIS) regulates its membrane translocation and radioiodine uptake. *PloS one*, 10(11), e0142984.
- Ciampi, R., Knauf, J. A., Kerler, R., Gandhi, M., Zhu, Z., Nikiforova, M. N., ... & Nikiforov, Y. E. (2005). Oncogenic AKAP9-BRAF fusion is a novel mechanism of MAPK pathway activation in thyroid cancer. *The Journal of clinical investigation*, 115(1), 94-101.
- Cianfarani, F., Baldini, E., Cavalli, A., Marchioni, E., Lembo, L., Teson, M., ... & D'armiento, M. (2010). TSH receptor and thyroid-specific gene expression in human skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 130(1), 93-101.
- Citterio cintia E, targovnik Héctor M, and ARVAN, Peter. (2019). The role of thyroglobulin in thyroid hormone genesis. *Nature Reviews Endocrinology*, p. 1.
- Claisse, D., Martiny, I., Chaqour, B., Wegrowski, Y., Petitfrere, E., Schneider, C., ... & Bellon, G. (2000). Influence of transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) on the behaviour of porcine thyroid epithelial cells in primary culture through thrombospondin-1 synthesis. *Journal of Cell Science*, 112(9), 1405-1416.
- Coscia, F., Taler-Verčič, A., Chang, V. T., Sinn, L., O'Reilly, F. J., Izoré, T., ... & Löwe, J. (2020). The structure of human thyroglobulin. *Nature*, 578(7796), 627-630.
- Costamagna, E., García, B., & Santisteban, P. (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(5), 3439-3446.

- Dai, G., Levy, O., & Carrasco, N. (1996). Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature*, 379(6564), 458–460. doi:10.1038/379458a0
- Davalos, V., & Esteller, M. (2023). Cancer epigenetics in clinical practice. *CA: a cancer journal for clinicians*, 73(4), 376-424.
- Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., ... & Futreal, P. A. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 417(6892), 949-954.
- De Deken X, Corvilain B, Dumont JE, and Miot F. (2013). Roles of DUOX-Mediated Hydrogen Peroxide in Metabolism, Host Defense, and Signaling. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(17), 2776–2793.
- De Deken, X., Wang, D., Many, M. C., Costagliola, S., Libert, F., Vassart, G., ... & Miot, F. (2000). Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *Journal of Biological Chemistry*, 275(30), 23227-23233.
- De Leo, S., Lee, S. Y., & Braverman, L. E. (2016). Hyperthyroidism. *The Lancet*, 388(10047), 906-918.
- Delorme, N., Remond, C., Sartelet, H., Petitfrere, E., Clement, C., Schneider, C., ... & Martiny, L. (2002). TGFbeta1 effects on functional activity of porcine thyroid cells cultured in suspension. *Journal of Endocrinology*, 173(2), 345-355.
- Di Meo S, Reed T.T, Venditti P, and Victor V. M. (2016). Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1–44.
- Do Cao C, and Wémeau JL. (2009). Aspects diagnostiques et thérapeutiques actuels des cancers thyroïdiens. *La Presse Médicale*, 38(2), 210–219.
- Dohán, O., De la Vieja, A., Paroder, V., Riedel, C., Artani, M., Reed, M., ... Carrasco, N. (2003). The Sodium/Iodide Symporter (NIS): Characterization, Regulation, and Medical Significance. *Endocrine Reviews*, 24(1), 48–77. doi:10.1210/er.2001-0029
- Donghi, R., Longoni, A., Pilotti, S., Michieli, P., Della Porta, G., & Pierotti, M. A. (1993). Gene p53 mutations are restricted to poorly differentiated and undifferentiated carcinomas of the thyroid gland. *The Journal of clinical investigation*, 91(4), 1753-1760.
- Driessens, N., Versteyhe, S., Ghaddhab, C., Burniat, A., De Deken, X., Van Sande, J., ... & Corvilain, B. (2009). Hydrogen peroxide induces DNA single-and double-strand breaks in thyroid cells and is therefore a potential mutagen for this organ. *Endocrine-related cancer*, 16(3), 845.

- Dunn, L. A., Sherman, E. J., Baxi, S. S., Tchekmedyian, V., Grewal, R. K., Larson, S. M., ... & Ho, A. L. (2019). Vemurafenib redifferentiation of BRAF mutant, RAI-refractory thyroid cancers. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 104(5), 1417-1428.
- Dupuy, C., Ohayon, R., Valent, A., Noël-Hudson, M. S., Deme, D., & Virion, A. (1999). Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase: cloning of the porcine and human cDNAs. *Journal of Biological Chemistry*, 274(52), 37265-37269.
- Eberhardt, N. L., Grebe, S. K., McIver, B., & Reddi, H. V. (2010). The role of the PAX8/PPAR γ fusion oncogene in the pathogenesis of follicular thyroid cancer. *Molecular and cellular endocrinology*, 321(1), 50-56.
- Edelbrock, M. A., Kaliyaperumal, S., & Williams, K. J. (2013). Structural, molecular and cellular functions of MSH2 and MSH6 during DNA mismatch repair, damage signaling and other noncanonical activities. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 743, 53-66.
- El-Benna, J., Hurtado-Nedelec, M., Marzaioli, V., Marie, J. C., Gougerot-Pocidallo, M. A., & Dang, P. M. C. (2016). Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. *Immunological reviews*, 273(1), 180-193.
- Eloy, C., Santos, J., Cameselle-Teijeiro, J., Soares, P., & Sobrinho-Simões, M. (2012). TGF-beta/Smad pathway and BRAF mutation play different roles in circumscribed and infiltrative papillary thyroid carcinoma. *Virchows Archiv*, 460, 587-600.
- Eng, Z. H., Abdul Aziz, A., Ng, K. L., & Mat Junit, S. (2023). Changes in antioxidant status and DNA repair capacity are corroborated with molecular alterations in malignant thyroid tissue of patients with papillary thyroid cancer. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 10, 1237548.
- Espadinha, C., Cavaco, B. M., & Leite, V. (2007). PAX8PPAR γ stimulates cell viability and modulates expression of thyroid-specific genes in a human thyroid cell line. *Thyroid*, 17(6), 497-509.
- Farnung, L., Ochmann, M., & Cramer, P. (2020). Nucleosome-CHD4 chromatin remodeler structure maps human disease mutations. *Elife*, 9, e56178.
- Fayadat, L., Niccoli-Sire, P., Lanet, J., & Franc, J. L. (1998). Human thyroperoxidase is largely retained and rapidly degraded in the endoplasmic reticulum. Its N-glycans are required for folding and intracellular trafficking. *Endocrinology*, 139(10), 4277-4285.
- Fayadat, L., Niccoli-Sire, P., Lanet, J., & Franc, J. L. (1999). Role of heme in intracellular trafficking of thyroperoxidase and involvement of H₂O₂ generated at the apical surface of

thyroid cells in autocatalytic covalent heme binding. *Journal of Biological Chemistry*, 274(15), 10533-10538.

- Fayyad, N., Kobaisi, F., Fayyad-Kazan, M., Nasrallah, A., Fayyad-Kazan, H., & Rachidi, W. (2021). Link between base excision repair (BER), reactive oxygen species (ROS), and cancer.
- Fernando, R., Lu, Y., Atkins, S. J., Mester, T., Branham, K., & Smith, T. J. (2014). Expression of thyrotropin receptor, thyroglobulin, sodium-iodide symporter, and thyroperoxidase by fibrocytes depends on AIRE. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 99(7), E1236-E1244.
- Fishel, R. (1998). Mismatch repair, molecular switches, and signal transduction. *Genes & development*, 12(14), 2096-2101.
- Fu, C., Chen, S., Chen, R., Fan, X., Luo, J., Li, C., & Qian, J. (2014). Mutation screening of the sodium iodide symporter gene in a cohort of 105 China patients with congenital hypothyroidism. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 58, 828-832.
- Führer, D. (2020). Constitutive TSH receptor activation as a hallmark of thyroid autonomy. *Endocrine*, 68(2), 274-278.
- Gagné F. (2014). Oxidative Stress. *Biochemical Ecotoxicology*, 103–115.
- Galrao, A. L., Camargo, R. Y., Friguglietti, C. U., Moraes, L., Cerutti, J. M., Serrano-Nascimento, C., ... & Rubio, I. G. (2014). Hypermethylation of a New Distal Sodium/Iodide Symporter (NIS) enhancer (NDE) is associated with reduced NIS expression in thyroid tumors. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 99(6), E944-E952.
- Ganong, W. F. (1995). Review of medical physiology. Dynamics of blood and lymph flow, 30, 525-541.
- Garbi, C., Colletta, G., Cirafici, A. M., Marchisio, P. C., & Nitsch, L. (1990). Transforming growth factor-beta induces cytoskeleton and extracellular matrix modifications in FRTL-5 thyroid epithelial cells. *European journal of cell biology*, 53(2), 281-289.
- Garcia-Rostan, G., Camp, R. L., Herrero, A., Carcangiu, M. L., Rimm, D. L., & Tallini, G. (2001). β -catenin dysregulation in thyroid neoplasms: down-regulation, aberrant nuclear expression, and CTNNB1 exon 3 mutations are markers for aggressive tumor phenotypes and poor prognosis. *The American journal of pathology*, 158(3), 987-996.
- Geiszt, M., Kopp, J. B., Várnai, P., & Leto, T. L. (2000). Identification of renox, an NAD (P) H oxidase in kidney. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(14), 8010-8014.

- Ghosh, S., Xie, W. Q., Quest, A. F., Mabrouk, G. M., Strum, J. C., & Bell, R. M. (1994). The cysteine-rich region of raf-1 kinase contains zinc, translocates to liposomes, and is adjacent to a segment that binds GTP-ras. *Journal of Biological Chemistry*, 269(13), 10000-10007.
- Girardi, F. M., Barra, M. B., & Zettler, C. G. (2013). Variants of papillary thyroid carcinoma: association with histopathological prognostic factors. *Brazilian journal of otorhinolaryngology*, 79, 738-744.
- Gnidehou, S., Caillou, B., Talbot, M., Ohayon, R., Kaniewski, J., Noël-Hudson, M. S., ... & Dupuy, C. (2004). Iodotyrosine dehalogenase 1 (DEHAL1) is a transmembrane protein involved in the recycling of iodide close to the thyroglobulin iodination site. *The FASEB journal*, 18(13), 1574-1576.
- Gnidehou, S., Lacroix, L., Sezan, A., Ohayon, R., Noël-Hudson, M. S., Morand, S., ... & Dupuy, C. (2006). Cloning and characterization of a novel isoform of iodotyrosine dehalogenase 1 (DEHAL1) DEHAL1C from human thyroid: comparisons with DEHAL1 and DEHAL1B. *Thyroid*, 16(8), 715-724.
- Godlewska, M., & Banga, P. J. (2019). Thyroid peroxidase as a dual active site enzyme: Focus on biosynthesis, hormonogenesis and thyroid disorders of autoimmunity and cancer. *Biochimie*, 160, 34-45.
- Gong, S., Wang, S., & Shao, M. (2022). NADPH oxidase 4: a potential therapeutic target of malignancy. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 884412.
- Gordon Betts., J, Young, K.A., Wise, J.A., Johnson, B., Poe,B., Kruse, D.H., Korol, O., Johnson, J.E., Womble, M., DeSaix, P. (2013). *Anatomy and Physiology*. OpenStax website. <https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology/pages/17-4-the-thyroid-gland>
- Gorin Y. (2013). Nox4 as a potential therapeutic target for treatment of uremic toxicity associated to chronic kidney disease. *Kidney International*, 83(4), 541–543. doi:10.1038/ki.2012.434
- Goyal, P., Weissmann, N., Rose, F., Grimminger, F., Schäfers, H. J., Seeger, W., & Hänze, J. (2005). Identification of novel Nox4 splice variants with impact on ROS levels in A549 cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 329(1), 32-39.
- Grasberger, H., & Refetoff, S. (2006). Identification of the maturation factor for dual oxidase: evolution of an eukaryotic operon equivalent. *Journal of Biological Chemistry*, 281(27), 18269-18272.
- Grasberger, H., & Refetoff, S. (2011). Genetic causes of congenital hypothyroidism due to dyshormonogenesis. *Current opinion in pediatrics*, 23(4), 421-428.

- Gugnoni, M., Lorenzini, E., Faria do Valle, I., Remondini, D., Castellani, G., Torricelli, F., ... & Manzotti, G. (2023). Adding pieces to the puzzle of differentiated-to-anaplastic thyroid cancer evolution: the oncogene E2F7. *Cell Death & Disease*, 14(2), 99.
- Haghpanah, V., Fallah, P., Tavakoli, R., Naderi, M., Samimi, H., Soleimani, M., & Larijani, B. (2016). Antisense-miR-21 enhances differentiation/apoptosis and reduces cancer stemness state on anaplastic thyroid cancer. *Tumor Biology*, 37, 1299-1308.
- Hall, J. A., & Georgel, P. T. (2007). CHD proteins: a diverse family with strong ties. *Biochemistry and Cell Biology*, 85(4), 463-476.
- Halleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Charlier, C., Chapelle, J.P. (2007). Le stress oxydant. *Rev Med liege*, 62 (10) ; 628- 638.
- Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology*, 141(2), 312-322.
- Hashimoto, H., Liu, Y., Upadhyay, A. K., Chang, Y., Howerton, S. B., Vertino, P. M., ... & Cheng, X. (2012). Recognition and potential mechanisms for replication and erasure of cytosine hydroxymethylation. *Nucleic acids research*, 40(11), 4841-4849.
- Hernandez-Pigeon, H., Quillet-Mary, A., Louat, T., Schambourg, A., Humbert, O., Selves, J., ... & Lautier, D. (2005). hMutS α is protected from ubiquitin-proteasome-dependent degradation by atypical protein kinase C ζ phosphorylation. *Journal of molecular biology*, 348(1), 63-74.
- Herranz, N., & Gil, J. (2018). Mechanisms and functions of cellular senescence. *The Journal of clinical investigation*, 128(4), 1238-1246.
- Hershman JM. (2018). Revue générale de la fonction thyroïdienne.
- Higuchi Y, Motoki T, Ishida H, Kanamitsu K, Washio K, Oyama T, Noda T, Tsurumaru Y, Okada A, Tsukahara H and Shimada A. (2017). Sorafenib treatment for papillary thyroid carcinoma with diffuse lung metastases in a child with autism spectrum disorder: a case report. *BMC Cancer*, 17(1).
- Ho, A. L., Grewal, R. K., Leboeuf, R., Sherman, E. J., Pfister, D. G., Deandreis, D., ... & Fagin, J. A. (2013). Selumetinib-enhanced radioiodine uptake in advanced thyroid cancer. *New England Journal of Medicine*, 368(7), 623-632.
- Hong, S., Xie, Y., Cheng, Z., Li, J., He, W., Guo, Z., ... & Xiao, H. (2022). Distinct molecular subtypes of papillary thyroid carcinoma and gene signature with diagnostic capability. *Oncogene*, 41(47), 5121-5132.

- Howell, G. M., Hodak, S. P., & Yip, L. (2013). RAS mutations in thyroid cancer. *The oncologist*, 18(8), 926-932.
- Hsiao, S. J., & Nikiforov, Y. E. (2019). Molecular genetics and diagnostics of thyroid cancer. *The Thyroid and Its Diseases: A Comprehensive Guide for the Clinician*, 549-561.
- Hu, S., Zhang, G., Xu, J., Zhu, X., Lu, X., Jiang, L., ... & Ge, M. (2014). Disparity expression of gammaH2AX in papillary thyroid cancer and nodular goiter. *Clinical laboratory*, 60(12), 2031-2037.
- Huc, S. (2007). Caractérisation moléculaire et structurale de l'extrémité C-Terminale du co-transporteur sodium/iode humain (hNIS): implication de ce domaine dans la régulation du transporteur (Doctoral dissertation, Montpellier 1).
- Ikawa, S., Fukui, M., Ueyama, Y., Tamaoki, N., Yamamoto, T., & Toyoshima, K. (1988). B-raf, a new member of the raf family, is activated by DNA rearrangement. *Molecular and cellular biology*, 8(6), 2651-2654.
- Ivanova, K., Manolova, I., Ignatova, M. M., & Gulubova, M. (2018). Immunohistochemical expression of TGF-B1, SMAD4, SMAD7, TGFβRII and CD68-positive TAM densities in papillary thyroid cancer. *Open access Macedonian journal of medical sciences*, 6(3), 435.
- Jafari, N., Kim, H., Park, R., Li, L., Jang, M., Morris, A. J., ... & Huang, C. (2017). CRISPR-Cas9 mediated NOX4 knockout inhibits cell proliferation and invasion in HeLa cells. *PloS one*, 12(1), e0170327.
- Jajoo, S., Mukherjea, D., Kaur, T., Sheehan, K. E., Sheth, S., Borse, V., ... & Ramkumar, V. (2013). Essential role of NADPH oxidase-dependent reactive oxygen species generation in regulating microRNA-21 expression and function in prostate cancer. *Antioxidants & redox signaling*, 19(16), 1863-1876.
- Juhlin, C. C., Mete, O., & Baloch, Z. W. (2023). The 2022 WHO classification of thyroid tumors: novel concepts in nomenclature and grading. *Endocrine-Related Cancer*, 30(2).
- Jung, C. K., Bychkov, A., & Kakudo, K. (2022). Update from the 2022 world health organization classification of thyroid tumors: A standardized diagnostic approach. *Endocrinology and Metabolism*, 37(5), 703-718.
- Kahara T, Igarashi N, Hishinuma A, Nakanishi Y, Uchiyama A, Miwa A, Ishizawa S, Yamamoto Y, Noto S, Sumiya H, Ishikura K, Usuda R, and Iida H. (2012). Thyroglobulin Gene Mutation with Cold Nodule on Thyroid Scintigraphy. *Case Reports in Endocrinology*, 1–4.

- Kang, H. C., Ohmori, M., Harii, N., Endo, T., & Onaya, T. (2001). Pax-8 is essential for regulation of the thyroglobulin gene by transforming growth factor- β 1. *Endocrinology*, 142(1), 267-275.
- Karger, S., Krause, K., Engelhardt, C., Weidinger, C., Gimm, O., Dralle, H., ... & Fuhrer, D. (2012). Distinct pattern of oxidative DNA damage and DNA repair in follicular thyroid tumours. *Journal of molecular endocrinology*, 48(3), 193.
- Katerji M, Filippova M, and Duerksen-Hughes P. (2019). Approaches and Methods to Measure Oxidative Stress in Clinical Samples: Research Applications in the Cancer Field. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1–29.
- KAWAGUCHI, A., IKEDA, M., ENDO, T., KOGAI, T., MIYAZAKI, A., & ONAYA, T. (1997). Transforming growth factor- β 1 suppresses thyrotropin-induced Na⁺/I-symporter messenger RNA and protein levels in FRTL-5 rat thyroid cells. *Thyroid*, 7(5), 789-794.
- Keller-Petrot I, Leger J, Sergent-Alaoui A, and de Labriolle-Vaylet C. (2017). Congenital Hypothyroidism: Role of Nuclear Medicine. *Seminars in Nuclear Medicine*, 47(2), 135–142.
- Koibuchi, N. (2018). Molecular Mechanisms of Thyroid Hormone Synthesis and Secretion. *Principles of Endocrinology and Hormone Action*, 73-81.
- Kostopoulou, E., Miliordos, K., & Spiliotis, B. (2021). Genetics of primary congenital hypothyroidism—a review. *Hormones*, 20, 225-236.
- Krol, T. G., Sarraf, P., Pecciarini, L., Chen, C. J., Mueller, E., Spiegelman, B. M., & Fletcher, J. A. (2000). PAX8-PPARgamma fusion oncogene in human thyroid carcinoma. *Science*, 289(5483), 1357-1360.
- Kuo, L. J., & Yang, L. X. (2008). γ -H2AX-a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In vivo*, 22(3), 305-309.
- Lake, D., Corrêa, S. A., & Müller, J. (2016). Negative feedback regulation of the ERK1/2 MAPK pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(23), 4397-4413.
- Landa, I., Ibrahimpasic, T., Boucai, L., Sinha, R., Knauf, J. A., Shah, R. H., ... & Fagin, J. A. (2016). Genomic and transcriptomic hallmarks of poorly differentiated and anaplastic thyroid cancers. *The Journal of clinical investigation*, 126(3), 1052-1066.
- Larsen, D. H., Poinsignon, C., Gudjonsson, T., Dinant, C., Payne, M. R., Hari, F. J., ... & Lukas, J. (2010). The chromatin-remodeling factor CHD4 coordinates signaling and repair after DNA damage. *Journal of Cell Biology*, 190(5), 731-740.
- Lavoie, H., & Therrien, M. (2015). Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(5), 281–298. doi:10.1038/nrm3979

- Lee, W. J., Sheu, W. H. H., Liu, S. H., Yi, Y. C., Chen, W. C., Lin, S. Y., ... & Sheu, M. L. (2014). N ϵ -carboxymethyllysine-mediated endoplasmic reticulum stress promotes endothelial cell injury through Nox4/MKP-3 interaction. *Free Radical Biology and Medicine*, 74, 294-306.
- Lejon, S., Thong, S. Y., Murthy, A., AlQarni, S., Murzina, N. V., Blobel, G. A., ... & Mackay, J. P. (2011). Insights into association of the NuRD complex with FOG-1 from the crystal structure of an RbAp48 $\cdot$ FOG-1 complex. *Journal of Biological Chemistry*, 286(2), 1196-1203.
- Levy, O., De la Vieja, A., Ginter, C. S., Riedel, C., Dai, G., & Carrasco, N. (1998). N-linked Glycosylation of the Thyroid Na $^{+}$ /I $^{-}$ -Symporter (NIS). *Journal of Biological Chemistry*, 273(35), 22657–22663. doi:10.1074/jbc.273.35.22657
- Limaïem, F., Kashyap, S., Naing, P. T., & Giwa, A. O. (2019). Anaplastic thyroid cancer.
- Limaïem, F., Rehman, A., Anastasopoulou, C., & Mazzoni, T. (2019). Papillary thyroid carcinoma.
- Lin, X. L., Yang, L., Fu, S. W., Lin, W. F., Gao, Y. J., Chen, H. Y., & Ge, Z. Z. (2017). Overexpression of NOX4 predicts poor prognosis and promotes tumor progression in human colorectal cancer. *Oncotarget*, 8(20), 33586.
- Lokhandwala, P. M., Tseng, L. H., Rodriguez, E., Zheng, G., Pallavajjala, A., Gocke, C. D., ... & Lin, M. T. (2019). Clinical mutational profiling and categorization of BRAF mutations in melanomas using next generation sequencing. *BMC cancer*, 19(1), 665.
- Lommel, L., Ortolan, T., Chen, L., Madura, K., & Sweder, K. S. (2002). Proteolysis of a nucleotide excision repair protein by the 26 S proteasome. *Current genetics*, 42, 9-20.
- Lui, W. O., Zeng, L., Rehrmann, V., Deshpande, S., Tretiakova, M., Kaplan, E. L., ... & Kroll, T. G. (2008). CREB3L2-PPAR γ fusion mutation identifies a thyroid signaling pathway regulated by intramembrane proteolysis. *Cancer research*, 68(17), 7156-7164.
- Luo, C. W., Wu, C. C., Chang, S. J., Chang, T. M., Chen, T. Y., Chai, C. Y., ... & Pan, M. R. (2018). CHD4-mediated loss of E-cadherin determines metastatic ability in triple-negative breast cancer cells. *Experimental Cell Research*, 363(1), 65-72.
- Macchia, P. E., Lapi, P., Krude, H., Pirro, M. T., Missero, C., Chiovato, L., ... & Lauro, R. D. (1998). PAX8 mutations associated with congenital hypothyroidism caused by thyroid dysgenesis. *Nature genetics*, 19(1), 83-86.
- Maier, J., Van Steeg, H., Van Oostrom, C., Karger, S., Paschke, R., & Krohn, K. (2006). Deoxyribonucleic acid damage and spontaneous mutagenesis in the thyroid gland of rats and mice. *Endocrinology*, 147(7), 3391-3397.

- Malaguarnera, R., Vella, V., Vigneri, R., & Frasca, F. (2007). p53 family proteins in thyroid cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 14(1), 43-60.
- Maniakas, A., Davies, L., & Zafereo, M. E. (2018). Thyroid disease around the world. *Otolaryngologic Clinics of North America*, 51(3), 631-642.
- Mansfield, R. E., Musselman, C. A., Kwan, A. H., Oliver, S. S., Garske, A. L., Davrazou, F., ... & Mackay, J. P. (2011). Plant homeodomain (PHD) fingers of CHD4 are histone H3-binding modules with preference for unmodified H3K4 and methylated H3K9. *Journal of Biological Chemistry*, 286(13), 11779-11791.
- Marfella, C. G., & Imbalzano, A. N. (2007). The Chd family of chromatin remodelers. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 618(1-2), 30-40.
- McKenzie, L. D., LeClair, J. W., Miller, K. N., Strong, A. D., Chan, H. L., Oates, E. L., ... & Chheda, M. G. (2019). CHD4 regulates the DNA damage response and RAD51 expression in glioblastoma. *Scientific reports*, 9(1), 4444.
- Metere A, Frezzotti F, Graves CE, Vergine M, De Luca A, Pietraforte D, Giacomelli L. (2018). A possible role for seleno protein glutathione peroxidase (GPx1) and thioredoxin reductases (TrxR1) in thyroid cancer: our experience in thyroid surgery. *Cancer Cell International* 18 7
- Migdal C, and Serres M. (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *Médecine /sciences*, 27(4), 405-412.
- Millard, C. J., Varma, N., Saleh, A., Morris, K., Watson, P. J., Bottrill, A. R., ... & Schwabe, J. W. (2016). The structure of the core NuRD repression complex provides insights into its interaction with chromatin. *Elife*, 5, e13941.
- Mincione, G., Di Marcantonio, M. C., Tarantelli, C., D'Inzeo, S., Nicolussi, A., Nardi, F., ... & Coppa, A. (2011). EGF and TGF- β 1 effects on thyroid function. *Journal of thyroid research*, 2011.
- Muzza M, Colombo C, Cirello V, Perrino M, Vicentini L, and Fugazzola L. (2016). Tert and the oxidative stress in papillary thyroid cancer. In 18th European Congress of Endocrinology. BioScientifica. Vol. 41
- Muzza, M., Pogliaghi, G., Colombo, C., Carbone, E., Cirello, V., Palazzo, S., ... & Fugazzola, L. (2022). Oxidative Stress Correlates with More Aggressive Features in Thyroid Cancer. *Cancers*, 14(23), 5857.

- Nagarajah, J., Le, M., Knauf, J. A., Ferrandino, G., Montero-Conde, C., Pillarsetty, N., ... & Fagin, J. A. (2016). Sustained ERK inhibition maximizes responses of Braf V600E thyroid cancers to radioiodine. *The Journal of clinical investigation*, 126(11), 4119-4124.
- Nakabeppu Y. (2014). Cellular Levels of 8-Oxoguanine in either DNA or the Nucleotide Pool Play Pivotal Roles in Carcinogenesis and Survival of Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(7), 12543–12557.
- Nguyen QT, Lee EJ, Huang MG, Park YI, Khullar A, and Plodkowski RA. (2015). Diagnosis and treatment of patients with thyroid cancer. *American health & drug benefits*, 8(1), 30.
- Nikiforov, Y. E. (2002). RET/PTC rearrangement in thyroid tumors. *Endocrine pathology*, 13, 3-16.
- Nikiforov, Y. E., & Nikiforova, M. N. (2011). Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. *Nature Reviews Endocrinology*, 7(10), 569-580.
- Oglio, R., Salvarredi, L., Rossich, L., Copelli, S., Pisarev, M., Juvenal, G., & Thomasz, L. (2019). Participation of NADPH 4 oxidase in thyroid regulation. *Molecular and cellular endocrinology*, 480, 65-73.
- Omar, B., Yassir, H., Youssef, O., Sami, R., Larbi, A. R., Mohamed, R., & Mohamed, M. (2022). A rare case of follicular thyroid carcinoma metastasis to the sacral region: A case report with literature review. *International Journal of Surgery Case Reports*, 94, 107001.
- Paparodis, R. D., Karvounis, E., Bantouna, D., Chourpiliadis, C., Chourpiliadi, H., Livadas, S., ... & Jaume, J. C. (2020). Incidentally discovered papillary thyroid microcarcinomas are more frequently found in patients with chronic lymphocytic thyroiditis than with multinodular Goiter or Graves' disease. *Thyroid*, 30(4), 531-535.
- Paschke R, Lincke T, Müller SP, Kreissl MC, Dralle H, and Fassnacht M. (2015). The Treatment of Well-Differentiated Thyroid Carcinoma. *Deutsches Aerzteblatt Online*.
- Pereira, S. S., Lobato, C. B., & Monteiro, M. P. (2020). Cell signaling within endocrine glands: thyroid, parathyroids and adrenal glands. *Tissue-Specific Cell Signaling*, 63-91.
- Polager, S., Kalma, Y., Berkovich, E., & Ginsberg, D. (2002). E2Fs up-regulate expression of genes involved in DNA replication, DNA repair and mitosis. *Oncogene*, 21(3), 437-446.
- Polo, S. E., Kaidi, A., Baskcomb, L., Galanty, Y., & Jackson, S. P. (2010). Regulation of DNA-damage responses and cell-cycle progression by the chromatin remodelling factor CHD4. *The EMBO journal*, 29(18), 3130-3139.

- Poniatowski, Ł. A., Wojdasiewicz, P., Gasik, R., & Szukiewicz, D. (2015). Transforming growth factor Beta family: insight into the role of growth factors in regulation of fracture healing biology and potential clinical applications. *Mediators of inflammation*, 2015.
- Pratheeshkumar, P., Siraj, A. K., Divya, S. P., Parvathareddy, S. K., Alobaisi, K., Al-Sobhi, S. S., ... & Al-Kuraya, K. S. (2021). CHD4 predicts aggressiveness in PTC patients and promotes cancer stemness and EMT in PTC cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 504.
- Principe, D. R., Doll, J. A., Bauer, J., Jung, B., Munshi, H. G., Bartholin, L., ... & Grippo, P. J. (2014). TGF- β : duality of function between tumor prevention and carcinogenesis. *Journal of the National Cancer Institute*, 106(2), djt369.
- Qiao, P. P., Tian, K. S., Han, L. T., Ma, B., Shen, C. K., Zhao, R. Y., ... & Chen, X. P. (2022). Correlation of mismatch repair deficiency with clinicopathological features and programmed death-ligand 1 expression in thyroid carcinoma. *Endocrine*, 76(3), 660-670.
- Rabold, K., Zoodma, M., Grondman, I., Kuijpers, Y., Bremmers, M., Jaeger, M., ... & Netea-Maier, R. T. (2022). Reprogramming of myeloid cells and their progenitors in patients with non-medullary thyroid carcinoma. *Nature Communications*, 13(1), 6149.
- Rai, P. (2010). Oxidation in the nucleotide pool, the DNA damage response and cellular senescence: Defective bricks build a defective house. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 703(1), 71-81.
- Raman, P., & Koenig, R. J. (2014). Pax-8–PPAR- γ fusion protein in thyroid carcinoma. *Nature Reviews Endocrinology*, 10(10), 616-623.
- Ravera, S., Reyna-Neyra, A., Ferrandino, G., Amzel, L. M., & Carrasco, N. (2017). The sodium/iodide symporter (NIS): molecular physiology and preclinical and clinical applications. *Annual review of physiology*, 79, 261-289.
- Ren, B., Cam, H., Takahashi, Y., Volkert, T., Terragni, J., Young, R. A., & Dynlacht, B. D. (2002). E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G2/M checkpoints. *Genes & development*, 16(2), 245-256.
- Richardson, C., & Jasin, M. (2000). Frequent chromosomal translocations induced by DNA double-strand breaks. *Nature*, 405(6787), 697-700.
- Riesco-Eizaguirre, G., Rodríguez, I., De la Vieja, A., Costamagna, E., Carrasco, N., Nistal, M., & Santisteban, P. (2009). The BRAFV600E oncogene induces transforming growth factor β secretion leading to sodium iodide symporter repression and increased malignancy in thyroid cancer. *Cancer research*, 69(21), 8317-8325.

- Riesco-Eizaguirre, G., Wert-Lamas, L., Perales-Paton, J., Sastre-Perona, A., Fernandez, L. P., & Santisteban, P. (2015). The miR-146b-3p/PAX8/NIS regulatory circuit modulates the differentiation phenotype and function of thyroid cells during carcinogenesis. *Cancer research*, 75(19), 4119-4130.
- Rigutto, S., Hoste, C., Grasberger, H., Milenkovic, M., Communi, D., Dumont, J. E., ... & De Deken, X. (2009). Activation of dual oxidases Duox1 and Duox2. *Journal of Biological Chemistry*, 284(11), 6725-6734.
- Ríos, A., Rodríguez, J. M., Ferri, B., Martínez-Barba, E., Torregrosa, N. M., & Parrilla, P. (2015). Prognostic factors of follicular thyroid carcinoma. *Endocrinología y Nutrición (English Edition)*, 62(1), 11-18.
- Roger, L., Tomas, F., & Gire, V. (2021). Mechanisms and regulation of cellular senescence. *International journal of molecular sciences*, 22(23), 13173.
- Romei, C., & Elisei, R. (2012). RET/PTC translocations and clinico-pathological features in human papillary thyroid carcinoma. *Frontiers in endocrinology*, 3, 54.
- Roskoski Jr, R. (2010). RAF protein-serine/threonine kinases: structure and regulation. *Biochemical and biophysical research communications*, 399(3), 313-317.
- Rothenberg, S. M., McFadden, D. G., Palmer, E. L., Daniels, G. H., & Wirth, L. J. (2015). Redifferentiation of iodine-refractory BRAF V600E-mutant metastatic papillary thyroid cancer with dabrafenib. *Clinical Cancer Research*, 21(5), 1028-1035.
- Ryndak-Swiercz, A. (2010). Ontogenèse, anatomie, histologie et physiologie de la thyroïde-les maladies de la thyroïde. ELSEVIER-MASSON.
- Sabra, M. M., Dominguez, J. M., Grewal, R. K., Larson, S. M., Ghossein, R. A., Tuttle, R. M., & Fagin, J. A. (2013). Clinical outcomes and molecular profile of differentiated thyroid cancers with radioiodine-avid distant metastases. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 98(5), E829-E836.
- Scott, T. L., Rangaswamy, S., Wicker, C. A., & Izumi, T. (2014). Repair of oxidative DNA damage and cancer: recent progress in DNA base excision repair. *Antioxidants & redox signaling*, 20(4), 708-726.
- Sedelnikova OA, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Georgakilas AG, and Bonner WM. (2010). Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 704(1-3), 152-159.
- Seib, C. D., and Sosa, J.A. (2018). Evolving Understanding of the Epidemiology of Thyroid Cancer. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. volume 48, pages 23-35

- Shahid, M. A., Ashraf, M. A., & Sharma, S. (2018). Physiology, thyroid hormone.
- Shima, Y., Nakanishi, K., Togawa, H. et al. Membranous nephropathy associated with thyroid-peroxidase antigen. *Pediatr Nephrol* **24**, 605–608 (2009). <https://doi.org/10.1007/s00467-008-0973-0>
- Silva, A. P., Ryan, D. P., Galanty, Y., Low, J. K., Vandevenne, M., Jackson, S. P., & Mackay, J. P. (2016). The N-terminal region of chromodomain helicase DNA-binding protein 4 (CHD4) is essential for activity and contains a high mobility group (HMG) box-like-domain that can bind poly (ADP-ribose). *Journal of Biological Chemistry*, 291(2), 924-938.
- Skonieczna M, Hejmo T, Poterala-Hejmo A, Cieslar-Pobuda A, and Buldak RJ. (2017). NADPH Oxidases: Insights into Selected Functions and Mechanisms of Action in Cancer and Stem Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1–15.
- Smanik, P. A., Liu, Q., Furminger, T. L., Ryu, K., Xing, S., Mazzaferri, E. L., & Jhiang, S. M. (1996). Cloning of the Human Sodium Iodide Symporter. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 226(2), 339–345. doi:10.1006/bbrc.1996.1358
- Smanik, P. A., Ryu, K.-Y., Theil, K. S., Mazzaferri, E. L., & Jhiang, S. M. (1997). Expression, Exon-Intron Organization, and Chromosome Mapping of the Human Sodium Iodide Symporter. *Endocrinology*, 138(8), 3555–3558. doi:10.1210/endo.138.8.5262
- Smith, J. J., Chen, X., Schneider, D. F., Broome, J. T., Sippel, R. S., Chen, H., & Solórzano, C. C. (2013). Cancer after thyroidectomy: a multi-institutional experience with 1,523 patients. *Journal of the American college of Surgeons*, 216(4), 571-577.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209-249..
- Suteau, V., Munier, M., Briet, C., & Rodien, P. (2021). Sex bias in differentiated thyroid cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12992.
- Swaroop Das S, Mishra S, Kaul J M. (2017). *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. Jul, Vol-11(7): AC01-AC04
- Syed, V. (2016). TGF- β signaling in cancer. *Journal of cellular biochemistry*, 117(6), 1279-1287.
- Takac, I., Schröder, K., Zhang, L., Lardy, B., Anilkumar, N., Lambeth, J. D., ... & Brandes, R. P. (2011). The E-loop is involved in hydrogen peroxide formation by the NADPH oxidase Nox4. *Journal of Biological Chemistry*, 286(15), 13304-13313.

- Takahashi, M. (2022). RET receptor signaling: Function in development, metabolic disease, and cancer. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 98(3), 112-125.
- Tang, P., Sheng, J., Peng, X., Zhang, R., Xu, T., Hu, J., ... & Dang, H. (2022). Targeting NOX4 disrupts the resistance of papillary thyroid carcinoma to chemotherapeutic drugs and lenvatinib. *Cell Death Discovery*, 8(1), 177.
- Therond P. (2006). Dommages créés aux biomolécules (lipides, protéines, ADN) par le stress oxydant. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 64(6), 383–389.
- Tong, J. K., Hassig, C. A., Schnitzler, G. R., Kingston, R. E., & Schreiber, S. L. (1998). Chromatin deacetylation by an ATP-dependent nucleosome remodelling complex. *Nature*, 395(6705), 917-921.
- Tramalloni, J., and Monpeyssen H. (2013). 1-Thyroïde normale et variantes-Échographie de la thyroïde (2e édition), Pages 1-26
- Tran, N. H., Wu, X., & Frost, J. A. (2005). B-Raf and Raf-1 are regulated by distinct autoregulatory mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, 280(16), 16244-16253.
- Tran, Q. L., & Davies, L. (2023). Thyroid Cancer Incidence Differences Between Men and Women. *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research*, 100472.
- Tzavlaki, K., & Moustakas, A. (2020). TGF- β Signaling. *Biomolecules*, 10(3), 487.
- Urquhart, A. J., Gatei, M., Richard, D. J., & Khanna, K. K. (2011). ATM mediated phosphorylation of CHD4 contributes to genome maintenance. *Genome integrity*, 2, 1-12.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, and Telser J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44–84.
- Venkataraman, G. M., Yatin, M., Marcinek, R., & Ain, K. B. (1999). Restoration of iodide uptake in dedifferentiated thyroid carcinoma: relationship to human Na⁺/I⁻ symporter gene methylation status. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84(7), 2449-2457.
- Vermot, A., Petit-Härtlein, I., Smith, S. M., & Fieschi, F. (2021). NADPH oxidases (NOX): an overview from discovery, molecular mechanisms to physiology and pathology. *Antioxidants*, 10(6), 890.
- Viola D and Elisei R. (2015). Tyrosine Kinase Inhibitors for the Treatment of Thyroid Cancer: Present and Future. *International Journal of Endocrinology and Metabolism*, 2(4)
- Visser, T. J. (2018). Regulation of thyroid function, synthesis and function of thyroid hormones. *Thyroid Diseases Endocrinology*. Springer, Cham, 1-30.

- Vizioli, M. G., Possik, P. A., Tarantino, E., Meissl, K., Borrello, M. G., Miranda, C., et al. (2011). Evidence of oncogene-induced senescence in thyroid carcinogenesis. *Endocrine-Related Cancer*, 18(6), 743–757.
- Wang, D., Kreutzer, D. A., & Essigmann, J. M. (1998). Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: insights from studies using defined lesions. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 400(1-2), 99-115.
- Wang, H. C., Chou, C. L., Yang, C. C., Huang, W. L., Hsu, Y. C., Luo, C. W., ... & Pan, M. R. (2019). Over-expression of CHD4 is an independent biomarker of poor prognosis in patients with rectal cancers receiving concurrent chemoradiotherapy. *International journal of molecular sciences*, 20(17), 4087.
- Wang, H., Kong, X., Pei, Y., Cui, X., Zhu, Y., He, Z., ... & Yan, X. (2020). Mutation spectrum analysis of 29 causative genes in 43 Chinese patients with congenital hypothyroidism. *Molecular medicine reports*, 22(1), 297-309.
- Watson, A. A., Mahajan, P., Mertens, H. D., Deery, M. J., Zhang, W., Pham, P., ... & Laue, E. D. (2012). The PHD and chromo domains regulate the ATPase activity of the human chromatin remodeler CHD4. *Journal of molecular biology*, 422(1), 3-17.
- Wegrowski, Y., Perreau, C., Martiny, L., Haye, B., Maquart, F. X., & Bellon, G. (1999). Transforming growth factor β -1 Up-regulates clusterin synthesis in thyroid epithelial cells. *Experimental cell research*, 247(2), 475-483.
- Wémeau J. L, Sadoul J. L, d'Herbomez M, Monpeyssen H, Tramalloni J, Leteurtre E, Borson-Chazot F, Caron P, Carnaille B, Léger J, Do Cao C, Klein M, Raingeard I, Desailoud R, and Leenhardt L. (2011). Recommandations de la Société française d'endocrinologie pour la prise en charge des nodules thyroïdiens. *Presse Med*, 40(9 Pt 1), 793-826.
- Weyemi UE, Redon CR, Parekh P, Dupuy C, and Bonner W. (2013). NADPH Oxidases NOXs and DUOXs as putative targets for cancer therapy. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 13(3), 502-514.
- Weyemi, U., Caillou, B., Talbot, M., Ameziane-El-Hassani, R., Lacroix, L., Lagente-Chevallier, O., ... & Dupuy, C. (2010). Intracellular expression of reactive oxygen species-generating NADPH oxidase NOX4 in normal and cancer thyroid tissues. *Endocrine-related cancer*, 17(1), 27.
- Weyemi, U., Lagente-Chevallier, O., Boufraquech, M., Preno, F., Courtin, F., Caillou, B., ... & Dupuy, C. (2012). ROS-generating NADPH oxidase NOX4 is a critical mediator in

oncogenic H-Ras-induced DNA damage and subsequent senescence. *Oncogene*, 31(9), 1117-1129.

- Xia, L., Huang, W., Bellani, M., Seidman, M. M., Wu, K., Fan, D., ... & Baylin, S. B. (2017). CHD4 has oncogenic functions in initiating and maintaining epigenetic suppression of multiple tumor suppressor genes. *Cancer cell*, 31(5), 653-668.
- Xie, J., Liu, Y., Du, X., & Wu, Y. (2019). TGF- β 1 promotes the invasion and migration of papillary thyroid carcinoma cells by inhibiting the expression of lncRNA-NEF. *Oncology Letters*, 17(3), 3125-3132.
- Xing M. (2012). Oxidative stress: a new risk factor for thyroid cancer. *Endocrine Related Cancer*, 19(1), C7–C11
- Xu, N., Liu, F., Wu, S., Ye, M., Ge, H., Zhang, M., ... & Bai, C. (2020). CHD4 mediates proliferation and migration of non-small cell lung cancer via the RhoA/ROCK pathway by regulating PHF5A. *BMC cancer*, 20(1), 1-11.
- Yao Z., Torres, N. M., Tao, A., Gao, Y., Luo, L., Li, Q., ... & Rosen, N. (2015). BRAF mutants evade ERK-dependent feedback by different mechanisms that determine their sensitivity to pharmacologic inhibition. *Cancer cell*, 28(3), 370-383.
- Yao, Z., Yaeger, R., Rodrik-Outmezguine, V. S., Tao, A., Torres, N. M., Chang, M. T., ... Rosen, N. (2017). Tumours with class 3 BRAF mutants are sensitive to the inhibition of activated RAS. *Nature*. doi:10.1038/nature23291
- Young, O., Crotty, T., O'Connell, R., O'Sullivan, J., & Curran, A. J. (2010). Levels of oxidative damage and lipid peroxidation in thyroid neoplasia. *Head & Neck: Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck*, 32(6), 750-756.
- Younis E. (2017). *Oncogenesis of Thyroid Cancer*. 18 (5) : 1191-1199
- Zhang, J., Shih, D. J., & Lin, S. Y. (2019). The tale of CHD4 in DNA damage response and chemotherapeutic response. *Journal of cancer research and cellular therapeutics*, 3(1)
- Zhang, K., Wang, J., He, Z., Qiu, X., Sa, R., & Chen, L. (2023). Epigenetic Targets and Their Inhibitors in Thyroid Cancer Treatment. *Pharmaceuticals*, 16(4), 559.
- Zhang, Z., Liu, D., Murugan, A. K., Liu, Z., & Xing, M. (2014). Histone deacetylation of NIS promoter underlies BRAF V600E-promoted NIS silencing in thyroid cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 21(2), 161.