



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN MÉDECINE

Présentée et soutenue publiquement

dans le cadre du troisième cycle de Médecine Spécialisée

par

Guillaume GAUCHOTTE

le 14 octobre 2010

**ETUDE DE L'EXPRESSION DES RÉCEPTEURS
AUX RÉTINOÏDES ACIDES ET RÉTINOÏDES X,
 α ET β , ET ANALYSE DU STATUT DE
MÉTHYLATION DU PROMOTEUR DE RAR β 2
DANS LES CARCINOMES DE LA THYROÏDE**

Examineurs de la thèse :

M. Jean-Michel VIGNAUD	Professeur		Président
M. François PLENAT	Professeur	}	
M. Claude SIMON	Professeur		
M. Marc KLEIN	Professeur		
M. Bruno TOUSSAINT	Docteur en Médecine		Juges

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1

FACULTÉ DE MÉDECINE DE NANCY

Président de l'Université : Professeur Jean-Pierre FINANCE

Doyen de la Faculté de Médecine : Professeur Henry COUDANE

Vice Doyen Mission « sillon lorrain » : Professeur Annick BARBAUD

Vice Doyen Mission « Campus » : Professeur Marie-Christine BÉNÉ

Vice Doyen Mission « Finances » : Professeur Marc BRAUN

Vice Doyen Mission « Recherche » : Professeur Jean-Louis GUÉANT

Assesseeurs :

- Pédagogie :	Professeur Karine ANGIOÏ-DUPREZ
- 1 ^{er} Cycle :	Professeur Bernard FOLIGUET
- « Première année commune aux études de santé (PACES) et universitarisation études para-médicales »	M. Christophe NÉMOS
- 2 ^{ème} Cycle :	Professeur Marc DEBOUVERIE
- 3 ^{ème} Cycle :	
« DES Spécialités Médicales, Chirurgicales et Biologiques »	Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI
« DES Spécialité Médecine Générale	Professeur Francis RAPHAËL
- Filières professionnalisées :	M. Walter BLONDEL
- Formation Continue :	Professeur Hervé VESPIGNANI
- Commission de Prospective :	Professeur Pierre-Edouard BOLLAERT
- Recherche :	Professeur Didier MAINARD
- Développement Professionnel Continu :	Professeur Jean-Dominique DE KORWIN

DOYENS HONORAIRES

Professeur Adrien DUPREZ – Professeur Jean-Bernard DUREUX

Professeur Jacques ROLAND – Professeur Patrick NETTER

=====

PROFESSEURS HONORAIRES

Pierre ALEXANDRE - Jean-Marie ANDRE - Daniel ANTHOINE - Alain BERTRAND - Pierre BEY - Jean BEUREY - Jacques BORRELLY - Michel BOULANGE - Jean-Claude BURDIN - Claude BURLET - Daniel BURNEL - Claude CHARDOT Jean-Pierre CRANCE - Gérard DEBRY - Jean-Pierre DELAGOUTTE - Emile de LAVERGNE - Jean-Pierre DESCHAMPS - Michel DUC - Jean DUHEILLE - Adrien DUPREZ - Jean-Bernard DUREUX – Gérard FIEVE - Jean FLOQUET - Robert FRISCH - Alain GAUCHER - Pierre GAUCHER - Hubert GERARD - Jean-Marie GILGENKRANTZ - Simone GILGENKRANTZ - Oliéro GUERCI - Pierre HARTEMANN - Claude HURIET – Christian JANOT - Jacques LACOSTE Henri LAMBERT - Pierre LANDES - Alain LARCAN - Marie-Claire LAXENAIRE - Michel LAXENAIRE - Jacques LECLERE Pierre LEDERLIN - Bernard LEGRAS - Michel MANCIAUX - Jean-Pierre MALLIÉ - Pierre MATHIEU - Denise MONERET-VAUTRIN - Pierre NABET - Jean-Pierre NICOLAS - Pierre PAYSANT - Francis PENIN - Gilbert PERCEBOIS Claude PERRIN - Guy PETIET - Luc PICARD - Michel PIERSON - Jean-Marie POLU – Jacques POUREL - Jean PREVOT Antoine RASPILLER - Michel RENARD - Jacques ROLAND - René-Jean ROYER - Paul SADOUL - Daniel SCHMITT - Jean SOMMELET - Danièle SOMMELET - Michel STRICKER - Gilbert THIBAUT - Augusta TREHEUX - Hubert UFFHOLTZ Gérard VAILLANT – Paul VERT - Colette VIDAILHET - Michel VIDAILHET - Michel WAYOFF - Michel WEBER

=====

**PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS
PRATICIENS HOSPITALIERS**

(Disciplines du Conseil National des Universités)

42^{ème} Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE

1^{ère} sous-section : (*Anatomie*)

Professeur Gilles GROSDIDIER

Professeur Pierre LASCOMBES – Professeur Marc BRAUN

2^{ème} sous-section : (*Cytologie et histologie*)

Professeur Bernard FOLIGUET

3^{ème} sous-section : (*Anatomie et cytologie pathologiques*)

Professeur François PLENAT – Professeur Jean-Michel VIGNAUD

43^{ème} Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDICALE

1^{ère} sous-section : (*Biophysique et médecine nucléaire*)

Professeur Gilles KARCHER – Professeur Pierre-Yves MARIE – Professeur Pierre OLIVIER

2^{ème} sous-section : (*Radiologie et imagerie médicale*)

Professeur Denis REGENT – Professeur Michel CLAUDON

Professeur Serge BRACARD – Professeur Alain BLUM – Professeur Jacques FELBLINGER

Professeur René ANXIONNAT

44^{ème} Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET NUTRITION

1^{ère} sous-section : (*Biochimie et biologie moléculaire*)

Professeur Jean-Louis GUÉANT – Professeur Jean-Luc OLIVIER – Professeur Bernard NAMOUR

2^{ème} sous-section : (*Physiologie*)

Professeur François MARCHAL – Professeur Bruno CHENUÉL – Professeur Christian BEYAERT

3^{ème} sous-section : (*Biologie Cellulaire*)

Professeur Ali DALLOUL

4^{ème} sous-section : (*Nutrition*)

Professeur Olivier ZIEGLER – Professeur Didier QUILLIOT

45^{ème} Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE

1^{ère} sous-section : (*Bactériologie – virologie ; hygiène hospitalière*)

Professeur Alain LE FAOU – Professeur Alain LOZNIEWSKI

3^{ème} sous-section : (*Maladies infectieuses ; maladies tropicales*)

Professeur Thierry MAY – Professeur Christian RABAUD

46^{ème} Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ

1^{ère} sous-section : (*Épidémiologie, économie de la santé et prévention*)

Professeur Philippe HARTEMANN – Professeur Serge BRIANÇON – Professeur Francis GUILLEMIN

Professeur Denis ZMIROU-NAVIER – Professeur François ALLA

2^{ème} sous-section : (*Médecine et santé au travail*)

Professeur Christophe PARIS

3^{ème} sous-section : (*Médecine légale et droit de la santé*)

Professeur Henry COUDANE

4^{ème} sous-section : (*Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication*)

Professeur François KOHLER – Professeur Éliane ALBUISSON

47^{ème} Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE

1^{ère} sous-section : (*Hématologie ; transfusion*)

Professeur Thomas LECOMPTE – Professeur Pierre BORDIGONI

Professeur Jean-François STOLTZ – Professeur Pierre FEUGIER

2^{ème} sous-section : (Cancérologie ; radiothérapie)
Professeur François GUILLEMIN – Professeur Thierry CONROY
Professeur Didier PEIFFERT – Professeur Frédéric MARCHAL
3^{ème} sous-section : (Immunologie)
Professeur Gilbert FAURE – Professeur Marie-Christine BENE
4^{ème} sous-section : (Génétique)
Professeur Philippe JONVEAUX – Professeur Bruno LEHEUP

**48^{ème} Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION, MÉDECINE D'URGENCE,
PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE**

1^{ère} sous-section : (Anesthésiologie et réanimation chirurgicale ; médecine d'urgence)
Professeur Claude MEISTELMAN – Professeur Hervé BOUAZIZ
Professeur Paul-Michel MERTES – Professeur Gérard AUDIBERT
2^{ème} sous-section : (Réanimation médicale ; médecine d'urgence)
Professeur Alain GERARD - Professeur Pierre-Édouard BOLLAERT
Professeur Bruno LÉVY – Professeur Sébastien GIBOT
3^{ème} sous-section : (Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie)
Professeur Patrick NETTER – Professeur Pierre GILLET
4^{ème} sous-section : (Thérapeutique ; médecine d'urgence ; addictologie)
Professeur François PAILLE – Professeur Gérard GAY – Professeur Faiez ZANNAD

**49^{ème} Section : PATHOLOGIE NERVEUSE ET MUSCULAIRE, PATHOLOGIE MENTALE,
HANDICAP et RÉÉDUCATION**

1^{ère} sous-section : (Neurologie)
Professeur Gérard BARROCHE – Professeur Hervé VESPIGNANI
Professeur Xavier DUCROCQ – Professeur Marc DEBOUVERIE
2^{ème} sous-section : (Neurochirurgie)
Professeur Jean-Claude MARCHAL – Professeur Jean AUQUE
Professeur Thierry CIVIT
3^{ème} sous-section : (Psychiatrie d'adultes ; addictologie)
Professeur Jean-Pierre KAHN – Professeur Raymund SCHWAN
4^{ème} sous-section : (Pédopsychiatrie ; addictologie)
Professeur Daniel SIBERTIN-BLANC – Professeur Bernard KABUTH
5^{ème} sous-section : (Médecine physique et de réadaptation)
Professeur Jean PAYSANT

**50^{ème} Section : PATHOLOGIE OSTÉO-ARTICULAIRE, DERMATOLOGIE et CHIRURGIE
PLASTIQUE**

1^{ère} sous-section : (Rhumatologie)
Professeur Isabelle CHARY-VALCKENAERE – Professeur Damien LOEUILLE
2^{ème} sous-section : (Chirurgie orthopédique et traumatologique)
Professeur Daniel MOLE - Professeur Didier MAINARD
Professeur François SIRVEAUX – Professeur Laurent GALOIS
3^{ème} sous-section : (Dermato-vénéréologie)
Professeur Jean-Luc SCHMUTZ – Professeur Annick BARBAUD
4^{ème} sous-section : (Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie)
Professeur François DAP – Professeur Gilles DAUTEL

51^{ème} Section : PATHOLOGIE CARDIORESPIRATOIRE et VASCULAIRE

1^{ère} sous-section : (Pneumologie ; addictologie)
Professeur Yves MARTINET – Professeur Jean-François CHABOT – Professeur Ari CHAOUAT
2^{ème} sous-section : (Cardiologie)
Professeur Etienne ALIOT – Professeur Yves JUILLIERE – Professeur Nicolas SADOUL
Professeur Christian de CHILLOU

3^{ème} sous-section : (Chirurgie thoracique et cardiovasculaire)
Professeur Jean-Pierre VILLEMOT - Professeur Jean-Pierre CARTEAUX – Professeur Loïc MACÉ
4^{ème} sous-section : (Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire)
Professeur Denis WAHL – Professeur Sergueï MALIKOV

52^{ème} Section : MALADIES DES APPAREILS DIGESTIF et URINAIRE
1^{ère} sous-section : (Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie)
Professeur Marc-André BIGARD - Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI – Professeur Laurent PEYRIN-
BIROULET
2^{ème} sous-section : (Chirurgie digestive)
3^{ème} sous-section : (Néphrologie)
Professeur Michèle KESSLER – Professeur Dominique HESTIN – Professeur Luc FRIMAT
4^{ème} sous-section : (Urologie)
Professeur Philippe MANGIN – Professeur Jacques HUBERT – Professeur Pascal ESCHWEGE

53^{ème} Section : MÉDECINE INTERNE, GÉRIATRIE et CHIRURGIE GÉNÉRALE
1^{ère} sous-section : (Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; médecine générale ; addictologie)
Professeur Jean-Dominique DE KORWIN – Professeur Pierre KAMINSKY
Professeur Athanase BENETOS - Professeur Gisèle KANNY
2^{ème} sous-section : (Chirurgie générale)
Professeur Patrick BOISSEL – Professeur Laurent BRESLER
Professeur Laurent BRUNAUD – Professeur Ahmet AYAV

**54^{ème} Section : DÉVELOPPEMENT ET PATHOLOGIE DE L'ENFANT, GYNÉCOLOGIE-
OBSTÉTRIQUE, ENDOCRINOLOGIE ET REPRODUCTION**
1^{ère} sous-section : (Pédiatrie)
Professeur Pierre MONIN - Professeur Jean-Michel HASCOET - Professeur Pascal CHASTAGNER
Professeur François FEILLET - Professeur Cyril SCHWEITZER
2^{ème} sous-section : (Chirurgie infantile)
Professeur Michel SCHMITT – Professeur Pierre JOURNEAU – Professeur Jean-Louis LEMELLE
3^{ème} sous-section : (Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale)
Professeur Michel SCHWEITZER – Professeur Jean-Louis BOUTROY
Professeur Philippe JUDLIN – Professeur Patricia BARBARINO
4^{ème} sous-section : (Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques ; gynécologie médicale)
Professeur Georges WERYHA – Professeur Marc KLEIN – Professeur Bruno GUERCI

55^{ème} Section : PATHOLOGIE DE LA TÊTE ET DU COU
1^{ère} sous-section : (Oto-rhino-laryngologie)
Professeur Claude SIMON – Professeur Roger JANKOWSKI
2^{ème} sous-section : (Ophtalmologie)
Professeur Jean-Luc GEORGE – Professeur Jean-Paul BERROD – Professeur Karine ANGIOI-DUPREZ
3^{ème} sous-section : (Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie)
Professeur Jean-François CHASSAGNE – Professeur Etienne SIMON

=====

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS

64^{ème} Section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
Professeur Sandrine BOSCHI-MULLER

=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

42^{ème} Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE

1^{ère} sous-section : (*Anatomie*)

Docteur Bruno GRIGNON – Docteur Thierry HAUMONT

2^{ème} sous-section : (*Cytologie et histologie*)

Docteur Edouard BARRAT – Docteur Françoise TOUATI – Docteur Chantal KOHLER

3^{ème} sous-section : (*Anatomie et cytologie pathologiques*)

Docteur Béatrice MARIE

43^{ème} Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDICALE

1^{ère} sous-section : (*Biophysique et médecine nucléaire*)

Docteur Marie-Hélène LAURENS – Docteur Jean-Claude MAYER

Docteur Pierre THOUVENOT – Docteur Jean-Marie ESCANYE – Docteur Amar NAOUN

2^{ème} sous-section : (*Radiologie et imagerie médicale*)

Docteur Damien MANDRY

44^{ème} Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET NUTRITION

1^{ère} sous-section : (*Biochimie et biologie moléculaire*)

Docteur Jean STRACZEK – Docteur Sophie FREMONT

Docteur Isabelle GASTIN – Docteur Marc MERTEN – Docteur Catherine MALAPLATE-ARMAND

Docteur Shyue-Fang BATTAGLIA

2^{ème} sous-section : (*Physiologie*)

Docteur Nicole LEMAU de TALANCE

3^{ème} sous-section : (*Biologie Cellulaire*)

Docteur Véronique DECOT-MAILLERET

4^{ème} sous-section : (*Nutrition*)

Docteur Rosa-Maria RODRIGUEZ-GUEANT

45^{ème} Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE

1^{ère} sous-section : (*Bactériologie – Virologie ; hygiène hospitalière*)

Docteur Francine MORY – Docteur Véronique VENARD

2^{ème} sous-section : (*Parasitologie et mycologie*)

Docteur Nelly CONTET-AUDONNEAU – Madame Marie MACHOUART

46^{ème} Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ

1^{ère} sous-section : (*Epidémiologie, économie de la santé et prévention*)

Docteur Alexis HAUTEMANIERE – Docteur Frédérique CLAUDOT

3^{ème} sous-section : (*Médecine légale et droit de la santé*)

Docteur Laurent MARTRILLE

4^{ème} sous-section : (*Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication*)

Docteur Pierre GILLOIS – Docteur Nicolas JAY

47^{ème} Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE

1^{ère} sous-section : (*Hématologie ; transfusion*)

Docteur François SCHOONEMAN

2^{ème} sous-section : (*Cancérologie ; radiothérapie : cancérologie (type mixte : biologique)*)

Docteur Lina BOLOTINE

3^{ème} sous-section : (Immunologie)

Docteur Marcelo DE CARVALHO BITTENCOURT

4^{ème} sous-section : (Génétique)

Docteur Christophe PHILIPPE – Docteur Céline BONNET

**48^{ème} Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION, MÉDECINE D'URGENCE,
PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE**

3^{ème} sous-section : (Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique)

Docteur Françoise LAPICQUE – Docteur Marie-José ROYER-MORROT – Docteur Nicolas GAMBIER

4^{ème} sous-section : (Thérapeutique ; médecine d'urgence ; addictologie)

Docteur Patrick ROSSIGNOL

50^{ème} Section : RHUMATOLOGIE

1^{ère} sous-section : (Rhumatologie)

Docteur Anne-Christine RAT

**54^{ème} Section : DÉVELOPPEMENT ET PATHOLOGIE DE L'ENFANT, GYNÉCOLOGIE-
OBSTÉTRIQUE,**

ENDOCRINOLOGIE ET REPRODUCTION

5^{ème} sous-section : (Biologie et médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale)

Docteur Jean-Louis CORDONNIER

=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES

5^{ème} section : SCIENCE ÉCONOMIE GÉNÉRALE

Monsieur Vincent LHUILLIER

40^{ème} section : SCIENCES DU MÉDICAMENT

Monsieur Jean-François COLLIN

60^{ème} section : MÉCANIQUE, GÉNIE MÉCANIQUE ET GÉNIE CIVILE

Monsieur Alain DURAND

61^{ème} section : GÉNIE INFORMATIQUE, AUTOMATIQUE ET TRAITEMENT DU SIGNAL

Monsieur Jean REBSTOCK – Monsieur Walter BLONDEL

64^{ème} section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Mademoiselle Marie-Claire LANHERS

65^{ème} section : BIOLOGIE CELLULAIRE

Mademoiselle Françoise DREYFUSS – Monsieur Jean-Louis GELLY

Madame Ketsia HESS – Monsieur Hervé MEMBRE – Monsieur Christophe NEMOS

Madame Natalia DE ISLA – Monsieur Pierre TANKOSIC

66^{ème} section : PHYSIOLOGIE

Monsieur Nguyen TRAN

67^{ème} section : BIOLOGIE DES POPULATIONS ET ÉCOLOGIE
Madame Nadine MUSSE

=====

PROFESSEURS ASSOCIÉS

Médecine Générale

Professeur associé Alain AUBREGE

Professeur associé Francis RAPHAEL

MAÎTRES DE CONFÉRENCES ASSOCIÉS

Médecine Générale

Docteur Jean-Marc BOIVIN

Docteur Jean-Louis ADAM

Docteur Elisabeth STEYER

Docteur Paolo DI PATRIZIO

=====

PROFESSEURS ÉMÉRITES

Professeur Jean-Marie ANDRÉ - Professeur Daniel ANTHOINE - Professeur Pierre BEY - Professeur Michel BOULANGÉ - Professeur Jean-Pierre CRANCE - - Professeur Jean FLOQUET - Professeur Jean-Marie GILGENKRANTZ - Professeur Simone GILGENKRANTZ – Professeur Henri LAMBERT - Professeur Alain LARCAN - Professeur Denise MONERET-VAUTRIN - Professeur Jean-Pierre NICOLAS - Professeur Guy PETIET - Professeur Luc PICARD - Professeur Michel PIERSON - Professeur Jacques POUREL - Professeur Jacques ROLAND - - Professeur Michel STRICKER - Professeur Gilbert THIBAUT - Professeur Hubert UFFHOLTZ - Professeur Paul VERT - Professeur Colette VIDAILHET - Professeur Michel VIDAILHET

=====

DOCTEURS HONORIS CAUSA

Professeur Norman SHUMWAY (1972)
Université de Stanford, Californie (U.S.A)
Professeur Paul MICHIELSEN (1979)
Université Catholique, Louvain (Belgique)
Professeur Charles A. BERRY (1982)
Centre de Médecine Préventive, Houston (U.S.A)
Professeur Pierre-Marie GALETTI (1982)
Brown University, Providence (U.S.A)
Professeur Mamish Nisbet MUNRO (1982)
Massachusetts Institute of Technology (U.S.A)
Professeur Mildred T. STAHLMAN (1982)
Vanderbilt University, Nashville (U.S.A)
Harry J. BUNCKE (1989)
Université de Californie, San Francisco (U.S.A)
Professeur Daniel G. BICHET (2001)
Université de Montréal (Canada)
Professeur Brian BURCHELL (2007)
Université de Dundee (Royaume Uni)

Professeur Théodore H. SCHIEBLER (1989)
Institut d'Anatomie de Würzburg (R.F.A)
Professeur Maria DELIVORIA-PAPADOPOULOS (1996)
Université de Pennsylvanie (U.S.A)
Professeur Mashaki KASHIWARA (1996)
Research Institute for Mathematical Sciences de Kyoto (JAPON)
Professeur Ralph GRÄSBECK (1996)
Université d'Helsinki (FINLANDE)
Professeur James STEICHEN (1997)
Université d'Indianapolis (U.S.A)
Professeur Duong Quang TRUNG (1997)
Centre Universitaire de Formation et de Perfectionnement des Professionnels de Santé d'Hô Chi Minh-Ville (VIÊTNAM)

Professeur Marc LEVENSTON (2005)
Institute of Technology, Atlanta (USA)

Remerciements

A notre Maître et Président de thèse,

Monsieur le Professeur Jean-Michel VIGNAUD

Professeur d'Anatomie et Cytologie Pathologiques

Vous nous avez fait l'honneur de nous confier ce travail et d'accepter la présidence du jury de cette thèse,

Pour vos précieux conseils et vos encouragements qui nous ont permis de mener à bien ce travail,

Pour votre riche enseignement dont nous avons pu bénéficier pendant ces dernières années,

Veillez trouver ici la manifestation de notre profonde reconnaissance et de notre plus grande estime.

A notre Maître et Juge,

Monsieur le Professeur François PLENAT

Professeur d'Anatomie et Cytologie Pathologiques (option Biologie)

Vous nous avez fait l'honneur d'accepter de juger cette thèse,

*Pour votre précieux enseignement délivré avec enthousiasme au cours de notre
Internat,*

*Veillez recevoir recevoir l'expression de notre profond respect et de nos
sincères remerciements.*

A nos Maîtres et Juges,

Monsieur le Professeur Claude SIMON

Professeur d'Oto-Rhino-Laryngologie

Vous nous avez fait l'honneur de juger cette thèse,

Veillez recevoir l'expression de notre grand respect et de notre sincère reconnaissance.

Monsieur le Professeur Marc KLEIN

Professeur d'Endocrinologie, Diabète et Maladies Métaboliques

Vous nous avez fait l'honneur de juger cette thèse,

Pour votre bienveillance et votre active participation à la réalisation de ce travail,

Veillez trouver ici le témoignage de notre profonde considération et de nos sincères remerciements.

Monsieur le Docteur Bruno TOUSSAINT

Docteur en Oto-Rhino-Laryngologie

Vous nous avez fait l'honneur d'accepter de juger cette thèse,

Pour votre agréable et enrichissante collaboration au cours de ces dernières années,

Que ce travail soit pour nous l'occasion de vous exprimer toute notre considération et notre gratitude.

A nos Maîtres successifs,

Monsieur le Docteur Jean-Louis ULRICH

Monsieur le Docteur Alain PEUTOT

Monsieur le Docteur Alain COURRIER

Monsieur le Professeur Denis REGENT

Monsieur le Professeur Jean-Michel VIGNAUD

Monsieur le Professeur François PLENAT

Madame le Docteur Agnès LEROUX

A tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail :

Madame Lydia BROCHIN,

Pour ta très grande participation à ce travail, ta disponibilité, tes nombreux conseils avisés et tes encouragements,

Reçois mes sincères remerciements et ma profonde reconnaissance.

Madame Claudine DEMESY, Mademoiselle Stéphanie LACOMME, Madame Elisabeth BOURGAUX et toute l'équipe du laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologiques et du Centre de Ressources Biologiques de l'Hôpital Central,

Merci à tous pour votre aide, votre efficacité et votre soutien aux différentes étapes de ce travail.

Monsieur Benjamin TOURNIER,

Merci pour ta grande aide et ton efficacité.

Madame le Professeur Françoise PIARD, Madame Caroline CHAPUSOT et Madame Sophie LEROND, du laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologiques du CHU de Dijon,

Je vous remercie sincèrement pour votre aide très précieuse et votre chaleureux accueil.

Madame Brigitte LEOTARD, Monsieur le Docteur Christophe PHILIPPE et leurs collègues du service de Génétique du CHU de Nancy,

Madame le Docteur Nathalie MONHOVEN et ses collègues du laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologiques et de la plate-forme commune de Biologie Moléculaire des Hôpitaux de Brabois,

Mademoiselle le Docteur Virginie CAHN et Monsieur le Docteur Guillaume GRANIER,

Recevez mes profonds remerciements pour votre contribution à ce travail.

A tous les médecins qui ont contribué à ma formation en Anatomie et Cytologie Pathologiques, et en particulier :

Madame le Docteur Béatrice MARIE,

Je te remercie sincèrement pour ton riche enseignement au quotidien, ainsi que pour la gentillesse et la bienveillance dont tu as fait preuve dès le début de mon Internat en Anatomie et Cytologie Pathologiques.

Madame le Docteur Aude BRESSENOT,

Reçois tous mes remerciements pour l'enseignement pratique que tu m'as délivré au cours de mon Internat, mais aussi pour ton énergie et ta constante émulation dans le domaine scientifique.

Madame le Docteur Jacqueline CHAMPIGNEULLE,

Madame le Docteur Nicole EHMANN-KRIER,

Madame le Docteur Agnès LEROUX,

Madame le Docteur Nathalie MARCON,

Madame le Docteur Karine MONTAGNE,

Madame le Docteur Amandine ROUSSEAU,

Monsieur le Docteur Pascal GENIN,

Monsieur le Docteur Nicolas WEINBRECK,

Soyez tous assurés de ma profonde reconnaissance pour votre rigoureux enseignement et votre disponibilité au cours de mes différents stages d'Internat.

A mes collègues et futurs pathologistes :

Marie-Pierre,

Merci sincèrement pour ton soutien et ta gentillesse au cours de ces derniers mois.

Camille, Charlène et Claire,

Merci pour votre soutien, et recevez mes plus vifs encouragements pour votre carrière future.

A mon épouse,

Pour ton soutien de tous les instants,

Pour le bonheur de t'avoir eu à mes côtés pendant la plus grande partie de ces études,

Pour le bonheur que tu me procures et que tu me procureras au quotidien,

Reçois le témoignage de toute ma tendresse et de mon plus grand amour.

A mon fils,

Haut comme trois pommes et déjà tant de questions...

Pour le bonheur et la joie de t'avoir tous les jours près de moi,

Reçois tout mon amour.

A mes parents,

Je vous dois tout tant sur le plan personnel que professionnel,

Pour votre soutien infaillible pendant ces longues années d'études,

Recevez toute ma reconnaissance, mon amour et ma profonde affection.

A ma sœur,

Pour ton soutien inconditionnel, et en particulier lors de ma première année de

Médecine où tu t'es si bien occupée de ton petit frère,

Reçois toute ma plus profonde affection.

A mes grands-parents Jacqueline et Roger,

A Mamie Renée et à mon défunt grand-père Papi Pierre,

A ma tante Sylvie,

A toute ma famille,

A mes dévoués beaux-parents,

A mes belles sœurs Virginie et Virginie,

A mes beaux frères Alain et Laurent,

A mes amis de toujours Christophe, Thibault et Thierry, à Marie-Carole et à tous les autres,

Avec mon affection,

A tous, je vous dédie cette Thèse.

Serment

"Au moment d'être admis à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité. Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux. Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité. J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences. Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me sont confiés. Reçu à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs. Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré et méprisé si j'y manque".

Table des matières

Remerciements	1
Serment	11
Table des matières	12
Introduction.....	16
I. Notions anatomo-cliniques et biologiques	17
1. Anatomie et histologie normales de la glande thyroïde	17
2. Le cancer de la thyroïde	17
2.1 Epidémiologie	17
2.2 Facteurs de risque	18
2.3 Démarche diagnostique devant un nodule thyroïdien	19
2.4 Classification anatomo-pathologique des carcinomes de la thyroïde (OMS 2004)	21
Les carcinomes de souche vésiculaire.....	21
Le carcinome papillaire	21
Le carcinome vésiculaire	22
Le carcinome peu différencié	23
Le carcinome indifférencié/anaplasique	24
Le carcinome médullaire	26
Autres	27
2.5 Oncogenèse des carcinomes thyroïdiens de souche vésiculaire	27
Carcinome papillaire.....	27
Réarrangements <i>RET/PTC</i>	27
Réarrangements de <i>TRK</i>	28
Mutations de <i>RAS</i>	28
Mutation de <i>BRAF</i>	28
Béta-caténine	29
Carcinome vésiculaire	29
Déséquilibres chromosomiques	29
Réarrangements de <i>PPARγ</i>	30
Mutations ponctuelles.....	30
Carcinome peu différencié	30
Carcinome indifférencié/anaplasique	31
2.6 Pronostic.....	32

Stade TNM	32
T- Tumeur primitive	32
N - Adénopathies régionales	33
Carcinome papillaire.....	33
Carcinome vésiculaire	33
Carcinome peu différencié	34
Carcinome indifférencié/anaplasique	34
2.7 Principes de prise en charge des carcinomes thyroïdiens de souche vésiculaire	34
Carcinomes différenciés de souche vésiculaire.....	34
Chirurgie	34
Totalisation isotopique.....	35
Hormonothérapie.....	36
Surveillance	37
Carcinome indifférencié/anaplasique	37
3. Rétinoïdes et récepteurs aux rétinoïdes	38
3.1 La vitamine A	38
Structure et propriétés physicochimiques	38
Transport et métabolisme	38
Absorption.....	38
Distribution.....	39
Métabolisme.....	40
Élimination et catabolisme	41
3.2 Mécanismes généraux d'action de l'acide rétinoïque.....	41
3.3 Propriétés anti-tumorales de l'acide rétinoïque et applications cliniques	42
3.4 Altération de l'absorption et du métabolisme de l'acide rétinoïque dans la cancérogénèse	44
3.5 Les récepteurs des rétinoïdes.....	45
Les récepteurs de l'acide rétinoïque (RARs).....	45
Structure des RARs	45
Analyse fonctionnelle	48
Rôles physiologiques et pathologiques des RARs	51
Les récepteurs aux rétinoïdes X (RXRs)	52
Structure et analyse fonctionnelle	52
Rôles physiologiques et pathologiques des RXRs.....	54
4. Epigénétique et cancérogénèse	56

4.1 Généralités sur l'épigénétique	56
4.2 Altérations des profils de méthylation de l'ADN dans la cancérogénèse	57
Hypométhylation globale et hyperméthylation localisée des cellules tumorales	57
Hyperméthylation du promoteur de <i>RARβ2</i> dans la cancérogénèse	58
Autres gènes hyperméthylés dans le cancer thyroïdien	58
II. Matériel et méthodes	60
1. Etude immunohistochimique de <i>RARα</i> , <i>RARβ</i> , <i>RXRα</i> et <i>RXRβ</i>	60
1.1 Sélection du matériel tumoral	60
1.2 Caractéristiques des anticorps	60
1.3 Technique immunohistochimique avec amplification par un conjugué tyramine	61
Principes généraux de la technique	61
Protocole	62
1.4 Interprétation, recueil des données cliniques et analyse statistique	63
2. Détermination du statut de méthylation de <i>RARβ2</i>	64
2.1 Sélection du matériel tumoral	64
2.2 Extraction d'ADN et dosage	64
Déparaffinage et digestion	64
Extraction sur automate et dosage	64
2.3 Technique de conversion	65
Principe de la technique	65
Protocole classique	65
Protocole de conversion à haute concentration	67
2.4 MS-PCR	67
Choix des amorces	67
Protocole	68
2.5 Pyroséquençage	69
Principe du pyroséquençage	69
Protocole	70
Mesure du taux de conversion d'une séquence externe au promoteur de <i>RARβ2</i> avec comparaison des deux techniques de conversion de l'ADN	72
2.4 Analyse statistique	73
3. Analyse de l'exon 15 de <i>BRAF</i>	73
3.1 Sélection du matériel tumoral	73
3.2 Séquençage	74

3.3 Analyse statistique	75
III. Résultats	76
1. Etude immunohistochimique de RAR α , RAR β , RXR α et RXR β	76
RAR α	76
RAR β	78
RXR α	80
RXR β	82
Performances diagnostiques de l'utilisation combinée des différents anticorps	84
Corrélation entre les profils d'expression des différents récepteurs.....	85
2. Détermination du statut de méthylation de <i>RARβ2</i>	87
2.1 MS-PCR	87
Technique classique de conversion.....	87
Conversion à haute concentration de bisulfite	89
2.2 Pyroséquençage	90
Statut de méthylation de <i>RARβ2</i>	90
Contrôle du taux de conversion de séquences interne et externe au promoteur de <i>RARβ2</i> avec comparaison des deux techniques de conversion de l'ADN.....	92
Contrôle interne au promoteur de <i>RARβ2</i>	92
Contrôle portant sur une région externe au promoteur de <i>RARβ2</i> (chromosome 11)	92
3. Analyse de l'exon 15 de <i>BRAF</i>	94
IV. Discussion	98
Profils d'expression des récepteurs des rétinoïdes.....	98
Méthylation du promoteur de <i>RARβ2</i>	101
Analyse de l'exon 15 de <i>BRAF</i>	104
Perspectives thérapeutiques.....	105
Conclusion	107
Références bibliographiques	108

Introduction

Les rétinoïdes, dérivant de la vitamine A, jouent d'importants rôles dans l'apoptose, la prolifération et la différenciation cellulaire. Leur signal est relayé au niveau nucléaire par les récepteurs aux rétinoïdes acides et aux rétinoïdes X. Les thérapeutiques à base de rétinoïdes sont utilisées dans certains cancers, comme la leucémie myéloïde aiguë ou le neuroblastome, et pourraient s'étendre à d'autres indications, thérapeutiques ou préventives. L'expression de ces récepteurs est néanmoins anormale dans certains cancers, suggérant leur implication dans la cancérogénèse, et pouvant ainsi limiter l'action des rétinoïdes naturels ou de synthèse. Les mécanismes de dérégulation des récepteurs aux rétinoïdes sont peu connus. A partir de tissus tumoraux thyroïdiens, incluant des adénomes vésiculaires et différents types de carcinomes de souche vésiculaire, nous étudierons le profil d'expression immunohistochimique de 4 récepteurs aux rétinoïdes : $RAR\alpha$, $RAR\beta$, $RXR\alpha$ et $RXR\beta$. Nous étudierons également le principal mécanisme connu de dérégulation épigénétique de l'un de ces récepteurs, la méthylation du promoteur de $RAR\beta2$, en utilisant deux techniques différentes : la MS-PCR (methylation specific polymerase chain reaction) et le pyroséquençage. Enfin, nous nous intéresserons à la mutation T1799A (V600E) du gène *BRAF*, afin de rechercher une éventuelle association de cette mutation avec les anomalies des récepteurs aux rétinoïdes, comme le suggèrent certaines données de la littérature.

I. Notions anatomo-cliniques et biologiques

1. Anatomie et histologie normales de la glande thyroïde

La glande thyroïde est une glande endocrine siégeant dans le cou, en avant de la partie antérieure de la trachée. Elle est constituée de deux lobes latéraux et d'une partie centrale, l'isthme thyroïdien.

Les unités fonctionnelles de la glande thyroïde sont les vésicules thyroïdiennes (ou follicules thyroïdiens), structures sphériques bordées par un épithélium cubique ou cylindrique simple (thyrocytes), responsable de la synthèse des hormones iodées T3 et T4, et contenant un matériel colloïde homogène, constitué de thyroglobuline, correspondant à la forme de stockage des hormones avant leur sécrétion. La thyroïde est entourée par une capsule fibreuse à partir de laquelle de fins septa collagènes s'enfoncent vers l'intérieur de la glande, délimitant des lobules. Ces septa sont le support d'un riche réseau vasculaire sanguin, de lymphatiques et de nerfs.

Il existe dans la thyroïde un second type cellulaire sécrétoire, les cellules C, sous forme de cellules dispersées parmi les cellules vésiculaires, disposées contre les membranes basales des vésicules. Chez l'homme, ces cellules sont à l'état normal difficiles à reconnaître, et sont constituées d'un cytoplasme clair granuleux. Les cellules C synthétisent et sécrètent la calcitonine en réponse directe à une augmentation du taux de calcium circulant. Elles s'observent principalement au niveau du tiers moyen des lobes latéraux de la thyroïde.

2. Le cancer de la thyroïde

2.1 Epidémiologie

Le cancer de la thyroïde représente en France 2,1% de l'ensemble des cancers incidents, et se situe au 19ème rang chez l'homme et au 5ème rang chez la femme [1].

Il s'agit le plus souvent de tumeurs épithéliales, la grande majorité étant représentée par les carcinomes de souche vésiculaire (papillaire, vésiculaire, peu différencié et indifférencié/anaplasique), loin devant les carcinomes dérivant des cellules C (carcinome médullaire). Les lymphomes primitifs de la thyroïde sont rares, et les autres tumeurs malignes, comme les sarcomes, sont exceptionnelles [2].

L'incidence varie selon les régions du monde, s'étendant de 0,8 à 5 cas pour 100000 habitants par an chez l'homme, et de 1,9 à 19,4 chez la femme [2]. L'incidence est relativement élevée en France. En effet, les projections de l'incidence standardisée du cancer de la thyroïde en

2008 sont de 5 cas pour 100000 chez l'homme, et de 15,2 chez la femme, le sex-ratio homme/femme étant de 0,3 [1]. Le carcinome papillaire représente 72,9% des cas incidents, le carcinome vésiculaire 13,8%, le carcinome indifférencié/anaplasique 3,2%, le carcinome médullaire 8,3% et les autres types de cancer 1,8% [3].

L'incidence est en constante augmentation, aussi bien chez les hommes que chez les femmes avec un taux d'évolution du taux d'incidence standardisé de l'ordre de 6% par an entre 1980 et 2005 [4]. L'évolution de la mortalité varie en sens inverse de celle de l'incidence, avec une diminution de l'ordre de 1,8% chez les hommes et de 3,1% chez les femmes entre 1980 et 2005 [4]. Cette augmentation d'incidence concerne les types papillaires, et plus particulièrement, mais pas exclusivement, les microcarcinomes. L'augmentation observée des taux d'incidence des cancers thyroïdiens est retrouvée dans la plupart des pays développés. Les techniques diagnostiques, ainsi que la réalisation plus fréquente de thyroïdectomie totale pour pathologie bénigne amènent à la découverte fortuite de cancers et jouent vraisemblablement un rôle important dans l'augmentation constatée [5]. L'accident de Tchernobyl ne semble pas avoir eu d'impact sur l'incidence en France [5]. La diminution de la mortalité peut s'expliquer d'une part par les progrès thérapeutiques, et d'autre part par la baisse de l'incidence des cancers indifférenciés/anaplasiques, de très mauvais pronostic [4], alors que les carcinomes papillaires, et plus particulièrement les microcarcinomes, sont de très bon pronostic.

Les cancers de la thyroïde surviennent essentiellement chez l'adulte jeune ou d'âge moyen. Le carcinome papillaire est diagnostiqué en moyenne vers 45-50 ans, le carcinome vésiculaire vers 50-60 ans, et le carcinome peu différencié ou le carcinome indifférencié/anaplasique après 60 ans [2]. L'incidence est très faible chez les enfants, le taux moyen d'incidence sur la période 1978 - 2001, pour les moins de 15 ans, étant compris entre 0,5 et 2 par million [5].

2.2 Facteurs de risque

Le principal facteur de risque reconnu est l'exposition à des radiations ionisantes, d'origine environnementale, comme par exemple à la suite de la catastrophe de Tchernobyl en Europe de l'Est, ou de l'explosion de la bombe atomique au Japon, ou d'origine iatrogène (traitement locorégional par radiothérapie) [2].

Le risque de cancer thyroïdien est également augmenté en cas de carence en iode, et d'antécédents de thyroïdite lymphocytaire [2].

Les carcinomes médullaires de la thyroïde surviennent souvent dans un contexte de susceptibilité génétique familiale, pouvant s'intégrer dans des syndromes spécifiques tels que la

néoplasie endocrinienne multiple de type II. La plupart des formes familiales de carcinome médullaire sont liés à une mutation de l'oncogène *RET*. Le risque est également plus élevé en cas d'antécédent familial de carcinome papillaire [2]. Enfin, une augmentation du risque de carcinome thyroïdien est constatée dans le syndrome de Cowden et la polypose adénomateuse familiale [2].

2.3 Démarche diagnostique devant un nodule thyroïdien

La prévalence des nodules thyroïdiens est élevée, la fréquence des nodules palpables dans la population générale étant de 3 à 7% [6, 7], et de nodules de découverte échographique de 20 à 76% [8, 9]. Les causes de nodule thyroïdien sont multiples et le plus souvent bénignes (tableau 1). En effet, toutes tailles confondues, la probabilité qu'un nodule soit un cancer thyroïdien serait d'environ 5% [9-11].

Causes bénignes - Nodules colloïdes et adénomes vésiculaires - Thyroïdite de Hashimoto - Kyste simple ou hémorragique - Thyroïdite subaiguë
Causes malignes - Carcinome de souche vésiculaire - Carcinome médullaire de la thyroïde - Lymphome thyroïdien - Métastase

Tableau 1. Principales causes de nodule thyroïdien [12].

La découverte d'un nodule thyroïdien impose la réalisation d'un bilan clinique, biologique et d'imagerie. Il n'y a pas de consensus quant à la nécessité d'explorer des nodules thyroïdiens infracentimétriques de découverte fortuite [13].

Sur le plan biologique, le dosage sanguin de la TSH doit être systématique. Le caractère systématique du dosage de la calcitonine reste discuté, mais il est indispensable en cas d'antécédents personnels ou familiaux de néoplasie endocrinienne multiple ou de carcinome médullaire de la thyroïde [13].

En dehors de situations cliniques particulières, plusieurs stratégies diagnostiques ont été proposées en 1995 par l'Agence Nationale pour le Développement de l'Evaluation Médicale, reposant en première intention sur l'échographie, la scintigraphie ou la cytoponction thyroïdienne [13]. Au vu des données publiées, Guevara *et al.* [14] recommandent que la stratégie diagnostique repose en première intention sur la réalisation de l'échographie haute résolution et la cytoponction.

Les principaux critères échographiques prédictifs de malignité sont : l'irrégularité des contours ou des limites floues, le caractère solide du nodule, l'aspect hypoéchogène, l'absence de halo péri-nodulaire, les microcalcifications, un nodule plus haut que large, la vascularisation intra-nodulaire [14]. La scintigraphie à l'iode 123 pourrait être utile en présence d'un nodule avec une cytoponction indéterminée et une TSH basse (TSH inférieure à 0,45 µUI/mL), l'absence de fixation étant en faveur de la bénignité [14].

Le test de référence reste pour le moment la cytoponction, pour laquelle de nombreuses études à haut niveau de preuve ont été publiées. La cytoponction ne serait cependant pas indiquée dans les cas suivants, la chirurgie pouvant alors être proposée en première intention :

- points d'appel cliniques évocateurs de cancer : présence d'une adénopathie suspecte, paralysie récurrentielle, envahissement d'un organe de voisinage, induration du nodule ;
- critères échographiques prédictifs de malignité ;
- difficultés de réalisation de la cytoponction (nodules nombreux, nodule endothoracique) [14].

La prise en charge chirurgicale pourra s'accompagner éventuellement d'un examen extemporané afin d'adapter le geste chirurgical (lobo-isthmectomie, suivie en cas de pathologie maligne d'une thyroïdectomie totale voire d'un curage ganglionnaire). Si les examens réalisés sont en faveur de la nature bénigne du nodule, la conduite à tenir reposera sur la surveillance simple.

2.4 Classification anatomo-pathologique des carcinomes de la thyroïde (OMS 2004)

Les carcinomes de souche vésiculaire

Le carcinome papillaire

Macroscopiquement, le carcinome papillaire se présente classiquement comme une masse ferme, de couleur grisâtre ou blanchâtre, de bords irréguliers, comportant parfois des calcifications [15]. Il peut s'agir fréquemment de tumeurs multifocales. La taille varie de moins d'un millimètre à plusieurs centimètres, la tumeur étant ainsi, selon sa taille, découverte fortuitement sur pièce opératoire ou révélée par l'apparition d'un nodule palpable plus ou moins compressif.

Le diagnostic cytologique, par ponction à l'aiguille fine, repose sur la mise en évidence de fragments papillaires ou d'amas tridimensionnels constitués de cellules de forme variable, cubique, cylindrique ou fusiforme, dont les noyaux sont de taille augmentée, irréguliers, contenant une chromatine poussiéreuse ou grumeleuse, et un petit nucléole souvent disposé à proximité de la membrane nucléaire, avec des incisures ou des pseudoinclusions [15]. Il peut s'y associer des cellules géantes et des calcosphérites.

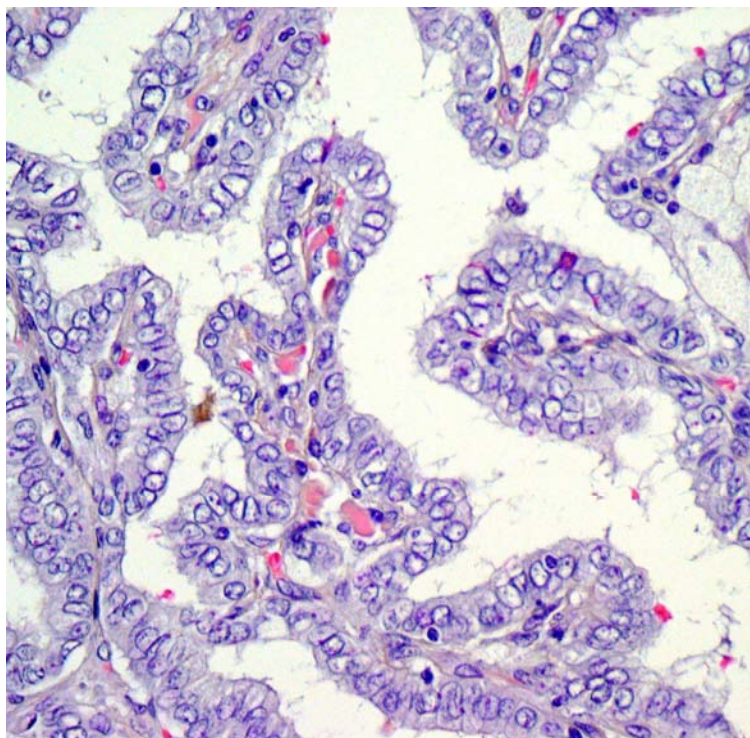


Figure 1. Carcinome papillaire. Lésion d'architecture papillaire, dont les cellules tumorales présentent les critères nucléaires caractéristiques du diagnostic : noyaux de taille augmentée, ovalaires, se chevauchant, d'aspect clarifié et contenant des incisures (HES, x400).

Histologiquement, le diagnostic de carcinome papillaire repose sur des critères nucléaires caractéristiques, les noyaux étant de taille augmentée, de forme ovalaire, se chevauchant, d'aspect clarifié et contenant des incisures et des pseudoinclusions [15] (figure 1). Des calcifications à type de psammomes sont classiquement présentes. L'architecture est variable, la tumeur étant constituée de papilles, mais également fréquemment de vésicules de taille variable. L'architecture peut également être kystique, solide ou trabéculaire, dans tous les cas ce sont les critères nucléaires qui permettront de faire le diagnostic de carcinome papillaire. De multiples variantes de carcinome papillaire sont décrites : forme vésiculaire ou macrovésiculaire, oncocytaire, à cellules claires, à cellules hautes, sclérosante diffuse, solide et cribriforme.

L'immunohistochimie n'est en principe pas utile pour porter le diagnostic de carcinome papillaire. Comme pour tous les carcinomes de souche vésiculaire, les cellules tumorales expriment les cytokératines, la thyroglobuline et TTF-1 (thyroid transcription factor-1). La recherche d'une expression de la thyroglobuline et de TTF-1 est particulièrement utile dans les formes métastatiques, en particulier pour différencier une métastase d'un carcinome papillaire d'un adénocarcinome broncho-pulmonaire (thyroglobuline-, TTF-1 +) ou d'autre origine (thyroglobuline-, TTF-1 -). D'autres marqueurs comme la galectine 3, CK19, HBME-1 ou RET ont été proposés pour porter le diagnostic de carcinome papillaire, mais leur utilité reste controversée [15].

Le carcinome vésiculaire

Le carcinome vésiculaire se présente généralement comme une lésion arrondie mesurant plus d'un centimètre, cernée par une capsule épaisse et irrégulière, avec une surface de section bombante, de couleur grise ou brunâtre [16].

L'examen cytologique retrouve des cellules agencées en microvésicules, sur un fond pauvre en colloïde. La présence d'atypie nucléaire n'est pas spécifique, et ne permet pas de différencier un carcinome vésiculaire d'un adénome. Le diagnostic de malignité n'est donc pas possible sur l'analyse cytologique seule, et repose sur l'examen histologique [16].

Histologiquement, le carcinome vésiculaire se présente comme une tumeur invasive sans critère nucléaire de carcinome papillaire, dont le diagnostic peut être particulièrement difficile. L'architecture tumorale est variable, consistant en des vésicules plus ou moins bien formées, plus rarement formant des travées, voire des massifs cribriformes. La coexistence de plusieurs types architecturaux est habituelle. Le diagnostic de malignité repose sur des critères d'invasion tumorale. L'invasion capsulaire se définit comme la pénétration de la tumeur à travers la capsule, réalisant l'aspect classique « en bouton de chemise ». Ce critère peut nécessiter la réalisation de multiples

coupes sériees. L'invasion vasculaire correspond à la présence de cellules tumorales intravasculaires (figure 2), recouvertes par un endothélium ou associées à des phénomènes thrombotiques. Le terme de carcinome vésiculaire à invasion minime est utilisé pour les tumeurs ne comportant qu'une invasion capsulaire et/ou vasculaire focale. Deux variantes sont reconnues : oncocytaire et à cellules claires.

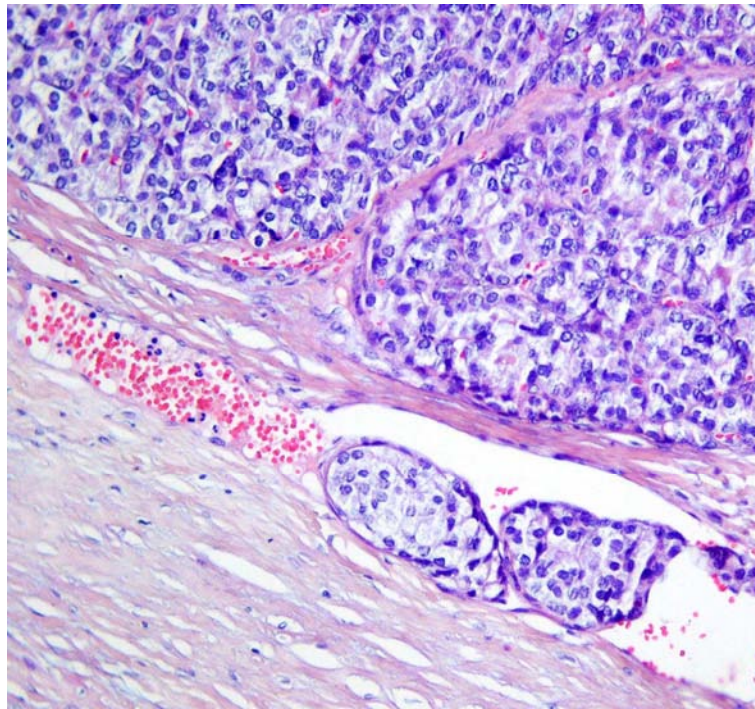


Figure 2. Carcinome vésiculaire. Présence d'une invasion vasculaire (en bas), permettant de confirmer le diagnostic de malignité (HES, x200).

Comme pour le carcinome papillaire, l'immunohistochimie n'est pas utile au diagnostic. Les cellules tumorales expriment les cytokératines de bas poids moléculaire, la thyroglobuline et TTF-1 [16].

Le carcinome peu différencié

Le carcinome peu différencié est rare, et connu sous diverses autres appellations : carcinome trabéculaire, carcinome insulaire, carcinome peu différencié avec composante à cellules primordiales.

La plupart des tumeurs mesurent au diagnostic plus de 3 cm de diamètre. Il s'agit classiquement d'une lésion solide blanc-grise, fréquemment nécrotique, refoulant ou infiltrant les

structures adjacentes, rarement cernée par une épaisse capsule. Des nodules satellites sont souvent présents [17].

L'examen cytologique met en évidence des cellules de taille petite à moyenne, peu cohésives, s'associant à quelques microvésicules avec peu de colloïde. Les noyaux sont monomorphes, à chromatine fine, et pourvus de petits nucléoles. Le diagnostic de carcinome peu différencié ne peut néanmoins être porté qu'au terme de l'analyse histologique.

L'aspect histologique du carcinome peu différencié de la thyroïde est variable, trois types histologiques étant reconnus : insulaire, trabéculaire et solide. Le type insulaire est défini par la présence d'îlots bien limités de cellules tumorales, entourés par de fins septa fibro-vasculaires, avec de fréquentes fentes de rétraction artéfactuelles. Les îlots cellulaires sont préférentiellement solides, mais peuvent contenir quelques vésicules. L'architecture trabéculaire se caractérise par une disposition des cellules tumorales en cordons ou en rubans. Le type solide est constitué de vastes plages de cellules tumorales pouvant contenir des ébauches de vésicules ou des gouttelettes de colloïde [17]. Les cellules tumorales sont généralement de petite taille et monomorphes, contenant un noyau arrondi ou de contours convolutés, hyperchromatique ou vésiculeux, au nucléole indistinct. D'après le consensus de Turin, les critères suivants doivent être présents pour porter le diagnostic de carcinome peu différencié [18] :

- Présence d'une architecture solide, trabéculaire ou insulaire
- Absence de critère nucléaire de carcinome papillaire
- Présence d'au moins une des caractéristiques suivantes : noyau convoluté ; activité mitotique ≥ 3 mitoses pour 10 champs au fort grossissement ; nécrose tumorale.

L'étude immunohistochimique retrouve une expression de TTF-1 et de la thyroglobuline, l'expression de cette dernière pouvant être limitée à des cellules isolées ou aux ébauches vésiculaires [17]. Un signal nucléaire focal pour p53 et une perte d'expression de la E-cadhérine sont également décrits [19, 20].

La présence d'un contingent peu différencié de plus de 10% au sein d'un carcinome thyroïdien bien différencié serait un facteur de mauvais pronostic [21].

Le carcinome indifférencié/anaplasique

Le carcinome indifférencié ou anaplasique de la thyroïde se présente généralement comme une masse très invasive, infiltrant la plupart du parenchyme thyroïdien et les tissus adjacents, avec des zones nécrotiques et hémorragiques.

La cytologie sur liquide d'aspiration est richement cellulaire. Les cellules sont pléomorphes, isolées ou regroupées en amas, et peuvent prendre des aspects fusiformes, épidermoïdes ou à cellules géantes. Les noyaux sont très atypiques, de forme bizarre, parfois multiples, contenant une chromatine hétérogène et un ou plusieurs volumineux nucléoles. Les mitoses peuvent être nombreuses. Le fond contient des débris nécrotiques avec des polynucléaires neutrophiles [22].

Sur le plan histologique, le carcinome indifférencié (anaplasique) est constitué de cellules fusiformes, de cellules géantes pléomorphes ou épithéloïdes, voire épidermoïde, en proportion très variable (figure 3). La présence de cellules géantes de type ostéoclastique est fréquente. Une nécrose extensive et une infiltration des structures vasculaires sont souvent présentes. Les tumeurs prennent fréquemment un aspect sarcomatoïde, lorsque la composante à cellules fusiformes domine.

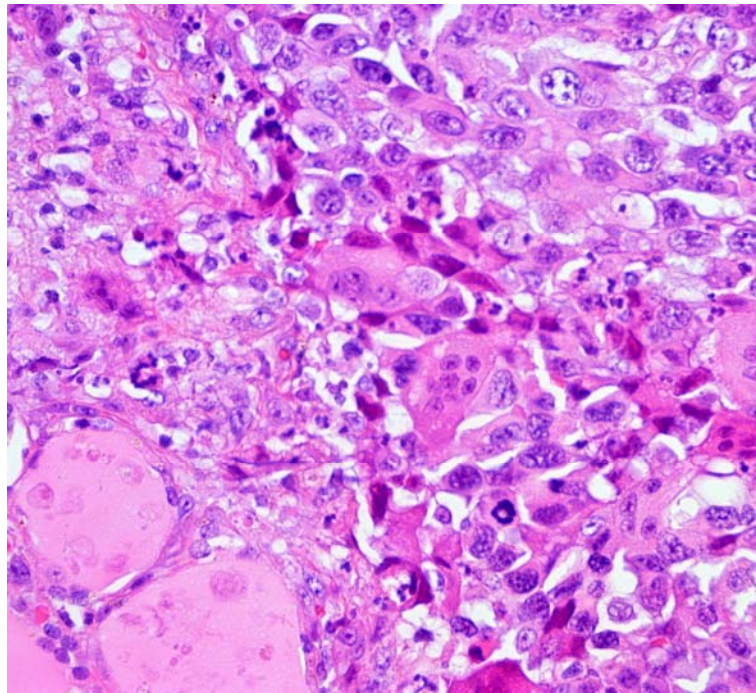


Figure 3. Carcinome indifférencié/anaplasique. Cellules tumorales pléomorphes, aux noyaux volumineux et très atypiques (HES, x200).

L'immunohistochimie peut être utile pour distinguer le carcinome thyroïdien indifférencié d'une autre tumeur d'aspect morphologique proche, comme le rhabdomyosarcome (expression de la desmine et de la myogénine), le léiomyosarcome (actine musculaire lisse et desmine), l'angiosarcome (CD31 et CD34), le mélanome (PS100, HMB-45 et Melan A), voire le lymphome à grandes cellules (CD45). Dans le carcinome peu différencié (anaplasique), on observe une expression des cytokératines AE1-AE3 dans environ 80% des cas [23, 24], de l'EMA dans 30 à 50% des cas [25] et

de l'antigène carcino-embryonnaire (ACE) dans moins de 10% [23, 26]. Le signal pour p53 est typiquement fortement positif [20]. La thyroglobuline et le TTF-1 ne sont le plus souvent pas exprimés [22].

Le carcinome médullaire

Le carcinome médullaire de la thyroïde présente une différenciation à cellules C. Dans 25% des cas, il s'agit d'une pathologie héréditaire liée à une perte de fonction du proto-oncogène *RET*, pouvant s'intégrer dans le cadre d'une néoplasie endocrinienne multiple de type 2. Sur le plan biologique, le carcinome médullaire s'accompagne d'une élévation du taux sérique de calcitonine.

Macroscopiquement, il s'agit d'une tumeur ferme, blanc-gris ou beige, bien limitée mais non encapsulée [27]. Dans les formes familiales, on retrouve fréquemment des lésions multiples et bilatérales. Typiquement, la tumeur se développe à la jonction des tiers supérieur et moyen.

Cytologiquement, les prélèvements sont richement cellulaires et constitués de cellules peu ou non cohésives. Les cellules tumorales sont de forme variable, polygonale, bipolaire ou fusiforme. Les noyaux sont modérément pléomorphes, hyperchromatiques, à chromatine grossière, plus ou moins excentrés au sein de cytoplasmes granuleux [27]. Il peut s'y associer des dépôts de substance amyloïde, de couleur verte sur les préparations de type Papanicolaou, et biréfringents en lumière polarisée sur les colorations au rouge Congo [27].

L'aspect histologique est variable, la lésion étant constituée de massifs, de nids ou de travées de cellules tumorales arrondies, polygonales ou fusiformes, séparés par un tissu conjonctif fibro-vasculaire plus ou moins abondant. Les cellules tumorales contiennent un noyau ovalaire, plus ou moins régulier, à chromatine grossière, avec un petit nucléole. Les mitoses sont généralement peu nombreuses. Le cytoplasme est granuleux, pâle ou éosinophile, de contours mal limités. Des cellules sustentaculaires peuvent être retrouvées. Des dépôts de substance amyloïdes sont identifiés dans 80% des cas [27].

Dans la grande majorité des cas les cellules tumorales expriment la calcitonine et des marqueurs neuro-endocrines variés, comme la chromogranine A et la synaptophysine. D'autres marqueurs sont également fréquemment exprimés : le TTF-1, les cytokératines de bas poids moléculaire et l'ACE [27, 28].

Des formes mixtes de carcinome médullaire et de carcinome de souche vésiculaire ont par ailleurs été décrites [29].

Autres

Les autres carcinomes thyroïdiens sont très rares. Les entités décrites dans la classification de l'OMS sont les suivantes :

- Le carcinome épidermoïde, pour lequel il faut éliminer une extension de contiguïté ou une métastase [30]
- Le carcinome muco-épidermoïde [31]
- Le carcinome muco-épidermoïde sclérosant avec éosinophilie [32]
- Le carcinome mucineux [33]
- La tumeur à cellules fusiformes avec différenciation pseudo-thymique [34]
- Le carcinome à différenciation pseudo-thymique [35].

La thyroïde peut également être le siège de métastases d'autres tumeurs, les plus fréquentes étant dans les séries cliniques ou autopsiques d'origine rénale, pulmonaire, utérine ou mammaire [36, 37].

2.5 Oncogénèse des carcinomes thyroïdiens de souche vésiculaire

Diverses altérations génétiques somatiques ont été décrites dans la cancérogénèse thyroïdienne. Nous nous intéresserons ici aux principales altérations rencontrées dans les carcinomes de souche vésiculaire.

Carcinome papillaire

Réarrangements *RET/PTC*

Les réarrangements chromosomiques des gènes codant pour les récepteurs à tyrosine-kinase RET et TRK sont les altérations génétiques structurales les plus fréquentes dans le carcinome papillaire. Le réarrangement du gène *RET*, appelé *RET/PTC*, est retrouvé avec une grande variabilité selon les études et les régions géographiques (0-80%) [15]. Le taux moyen de réarrangements *RET/PTC* est de 20 à 30% chez l'adulte [38, 39]. Il atteint 45 à 60% chez l'enfant et l'adulte jeune, et 50 à 80% en cas d'irradiation thérapeutique ou accidentelle [40, 41]. Il existe plusieurs types de réarrangements *RET/PTC*, tous par fusion du domaine tyrosine-kinase de *RET* en 10q11.2 avec l'extrémité terminale de séquences de différents gènes localisés sur 10q ou d'autres chromosomes [15]. Le réarrangement le plus fréquent est *RET/PTC1* [42], suivi par *RET/PTC3* [43]. Tous les réarrangements *RET/PTC* ont en commun le remplacement du domaine extracellulaire de fixation du ligand de RET par des gènes de fusion de RET. Cela entraîne, par dimérisation, une activation ligand

indépendante de la kinase RET, et ainsi une expansion clonale et une transformation néoplasique des cellules vésiculaires [44, 45]. Ces gènes de fusion peuvent avoir un impact sur le phénotype tumoral : *RET/PTC1* est plus commun dans les microcarcinomes papillaires et les tumeurs d'architecture papillaire classique, alors que *RET/PTC3* prédomine dans les variantes solides ou à cellules hautes [46, 47].

Réarrangements de *TRK*

Des réarrangements chromosomiques impliquant le gène *TRK* sont retrouvés dans environ 10% des carcinomes papillaires [38, 48], et pourraient constituer un facteur de mauvais pronostic [48]. Ils résultent de la fusion du domaine tyrosine kinase de *TRK* en 1q22 avec la séquence 5'-terminale du gène de la tropomyosine (*TPM3*) ou de *TPR* également localisé en 1q [49, 50], ou avec le gène *TFG* situé sur le chromosome 3 [51]. Tous les types de réarrangements surviennent avec environ la même fréquence [38], à l'exception de *TRK-TPM3* qui serait plus fréquent en cas de carcinome papillaire associé aux radiations [52].

Mutations de *RAS*

Des mutations ponctuelles activatrices de l'un des trois proto-oncogènes *RAS* surviennent dans moins de 10% des carcinomes papillaires, touchant le plus souvent le codon 61 de N-Ras [53, 54], et sont considérées comme un facteur de mauvais pronostic [55].

Mutation de *BRAF*

BRAF est une sérine-thréonine kinase impliquée dans la voie MAPK (mitogen-activated protein kinase). Une mutation activatrice de *BRAF* est présente dans une grande proportion de carcinomes papillaires. La quasi-totalité des mutations de *BRAF* dans les cancers thyroïdiens consiste en une mutation ponctuelle du gène *BRAF* au niveau du nucléotide 1799 par transversion thymine-adénine (T1799A, anciennement T1796A, par oubli d'un codon lors du séquençage initial ; nouvelle nomenclature : c.1799T>A), entraînant une substitution valine-glutamate en position 600 (V600E, anciennement V599E ; nouvelle nomenclature : p.Val600Glu). La mutation T1799A est mise en évidence dans 29 à 70% des carcinomes papillaires [15, 56-60], 13% des carcinomes peu différenciés et environ 10 à 20% des carcinomes indifférenciés/anaplasiques [57, 61]. Dans ces derniers cas, il pourrait s'agir de formes dédifférenciées de carcinomes papillaires [57, 62].

Les mutations de *BRAF* ou *RAS* seraient mutuellement exclusives, ces gènes encodant pour des protéines agissant sur la même voie de signalisation, aboutissant à l'activation de la cascade MAPK [15]. La mutation de *BRAF* est associée dans 32% des cas à une méthylation aberrante du gène *hMLH1*, impliqué dans la réparation de l'ADN [63]. 38% des tumeurs mutées pour *BRAF* comportent également des réarrangements *RET/PTC*, suggérant que ces deux altérations pourraient coopérer dans la cancérogénèse thyroïdienne [64].

Plusieurs études ont démontré que la mutation de *BRAF* était un facteur indépendant de mauvais pronostic dans les carcinomes papillaires [60, 65]. La recherche de cette mutation pourrait par ailleurs, dans les cas difficiles, constituer une aide diagnostique précieuse, du fait de sa très bonne spécificité : la présence de cette mutation permet d'affirmer le diagnostic de carcinome papillaire (son absence n'excluant par contre pas le diagnostic).

Béta-caténine

Dans les variantes cribriformes de carcinome papillaire associé à la polypose adénomateuse familiale, de fréquentes mutations somatiques du gène *CTNNB1* encodant pour la bêta-caténine ont été mises en évidence [66], et dans de rares cas des mutations somatiques d'*APC* [67].

Carcinome vésiculaire

Déséquilibres chromosomiques

Les études cytogénétiques ont mis en évidence dans le carcinome vésiculaire des déséquilibres impliquant les chromosomes 2 [68], 3p [69], 6 [70], 7q [71], 8 [70], 9 [72], 10q, 11 [71], 17p [69] et 22 [73], dans les formes conventionnelles comme dans les variantes oncocytaires. Les tumeurs oncocytaires comportent par ailleurs fréquemment des déséquilibres de l'ADN par des altérations chromosomiques numériques [74].

Des mutations somatiques et des variations de séquence de l'ADN mitochondrial ont été identifiées dans des carcinomes vésiculaires oncocytaires [75, 76]. Des changements similaires sont également présents dans le tissu tumoral de patients atteints de tumeur oncocyttaire, suggérant que certains polymorphismes prédisposent à ces altérations [75].

Réarrangements de *PPARγ*

PPARγ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) appartient à la superfamille des récepteurs hormonaux nucléaires, et *PAX8* (paired box 8) est un facteur de transcription essentiel au développement des thyrocytes et à la régulation de l'expression des gènes thyroïdiens. Des réarrangements des gènes de *PPARγ* sont retrouvés dans 25 à 50% des carcinomes vésiculaires [77-79], entraînant la production de protéines de fusion variées, la plus fréquente d'entre elles, *PAX8/PPARγ*, pouvant déréguler la transcription ligand-dépendante induite par *PPARγ* [79], inhibant l'apoptose, et promouvant et la croissance indépendante des cellules vésiculaires [80]. Des réarrangements de *PPARγ* sont retrouvés plus fréquemment dans les carcinomes vésiculaires peu avancés pour lesquels on identifie des invasions vasculaires [78, 81], et dans certains carcinomes localement agressifs et métastatiques [77, 82]. Ces réarrangements sont rares dans les adénomes thyroïdiens [78], et leur recherche pourrait être utile au diagnostic différentiel entre carcinome vésiculaire et adénome [83].

Mutations ponctuelles

Des mutations de *RAS* sont retrouvées dans 20 à 50% des carcinomes vésiculaires [84, 85], les mutations activatrices du codon 61 de *N-RAS* et *H-RAS* étant les plus fréquentes.

Les mutations de *RAS* et les réarrangements de *PPARγ* seraient des voies indépendantes dans la cancérogénèse des carcinomes vésiculaires [16]. La mutation et la régulation négative de *TP53* [86], *PTEN* [87] et de la bêta-caténine [88] pourraient faciliter la progression des formes bien différenciées vers les formes peu différenciées ou anaplasiques.

Carcinome peu différencié

Des altérations clonales complexes sont fréquemment mises en évidence dans les rares cas de carcinome peu différencié analysés en cytogénétique conventionnelle. La proportion de profils d'ADN déséquilibrés détectés par CGH (hybridation génomique comparative) atteint 80%, avec un nombre médian de perte ou de gains chromosomiques de 5,5 par cas, situé à mi-chemin entre celui observé dans les carcinomes bien différenciés (1 par cas) et les carcinomes indifférenciés (10 par cas) [89]. Des altérations chromosomiques spécifiques ont été mises en évidence dans la transition des formes bien différenciées vers les formes peu différenciées [89]. Ces altérations sont communes aux carcinomes peu différenciés et indifférenciés, mais des altérations additionnelles spécifiques ont été observées dans ces derniers [89].

Les carcinomes peu différenciés présentent des altérations génétiques intermédiaires entre les formes bien différenciées et indifférenciées. L'analyse des exons 5-9 de *TP53* retrouve des mutations dans 20 à 30% des carcinomes peu différenciés [86, 90], avec une bonne corrélation à l'expression immunohistochimique de p53. Une expression aberrante de p53 est en effet retrouvée dans 40 à 50% des cas [20, 91]. Des mutations activatrices de H-, K- ou N-Ras sont présentes dans 50% des carcinomes peu différenciés, avec un haut degré d'hétérogénéité [92]. Une dérégulation de la voie *WNT* a également été décrite, mise en évidence par la recherche de mutations et/ou par une expression nucléaire aberrante de la bêta-caténine [88]. Enfin, un faible nombre de carcinomes peu différenciés comporte des réarrangements de gènes de la tyrosine kinase, comme *RET/PTC* ou *NTRK1* [38, 93].

Carcinome indifférencié/anaplasique

Des altérations chromosomiques complexes ont été mises en évidence dans les carcinomes indifférenciés, les études par CGH retrouvant des déséquilibres dans des loci nombreux et variés [89]. Le nombre médian de pertes ou de gains chromosomiques est en effet de 10 par cas [89]. Des pertes alléliques ont été décrites en 1p, 5, 8, 9p, 11, 17p, 19p, 22q, 16p et 18q [89, 94-97]. Des gains ou des pertes spécifiques telles que 3p13-14+, 5q11-31-, 11q13+, ou des pertes et des gains en 8p et 8q, pourraient être associés à la progression des formes peu différenciées vers les formes indifférenciées [94-97]. Des études portant sur des cas de carcinomes avec des aspects coexistant de carcinome peu différencié et indifférencié retrouvent dans la plupart des cas un certain nombre de mutations conservées dans les deux composantes, avec cependant un taux plus élevé de mutations dans la composante indifférenciée. Ceci conforte ainsi l'hypothèse d'une cancérogénèse en plusieurs étapes des carcinomes indifférenciés [98, 99].

Les altérations de composants impliqués dans la régulation du cycle cellulaire sont fréquentes, comme la surexpression de la cycline D1, la baisse de p27, ou l'inactivation de PTEN et de p16 [22, 100]. La mutation de *TP53* est l'altération la plus souvent rencontrée dans les carcinomes indifférenciés [86]. Des mutations de *PIK3CA* (impliqué dans la voie PI3K/Akt) [101] et du gène de la bêta-caténine [102] ont également été décrites.

2.6 Pronostic

Stade TNM

Pour la plupart des équipes, l'établissement du stade des cancers thyroïdiens repose sur l'utilisation de la classification internationale TNM, selon l'UICC (Union Internationale Contre le Cancer) [103].

La classification en T (tumeur primitive) est la même pour tous les types histologiques, à l'exception du carcinome indifférencié/anaplasique. En cas de tumeur multifocale, la tumeur de plus grande taille détermine le T, en précisant la multifocalité par (m) (exemple : T2(m)). Pour le stade N (adénopathies), les ganglions lymphatiques régionaux sont de siège cervical et médiastinal supérieur, les autres métastases ganglionnaires étant classées en M (métastases à distance).

T- Tumeur primitive

TX La tumeur primitive ne peut être évaluée

T0 La tumeur primitive n'est pas décelable

Pour tous les types histologiques, excepté le carcinome indifférencié :

T1 Tumeur de 2 cm ou moins dans sa plus grande dimension, limitée à la thyroïde

T1a Tumeur de 1 cm ou moins dans sa plus grande dimension

T1b Tumeur de plus de 1 cm mais pas plus de 2 cm dans sa plus grande dimension

T2 Tumeur de plus de 2 cm, ne dépassant pas 4 cm dans sa plus grande dimension, limitée à la thyroïde

T3 Tumeur de plus de 4 cm dans sa plus grande dimension, limitée à la thyroïde ou tumeur avec extension extrathyroïdienne minime (par exemple extension au muscle sterno-thyroïdien ou aux tissus mous périthyroïdiens)

T4a Tumeur s'étendant au-delà de la capsule thyroïdienne et envahissant l'une des structures suivantes : tissus mous sous-cutanés, larynx, trachée, œsophage, nerf récurrent

T4b Tumeur envahissant le fascia prévertébral, les vaisseaux médiastinaux ou englobant l'artère carotide

Carcinome indifférencié (tous sont classés en T4) :

T4a Tumeur (de toute taille) limitée à la thyroïde, considérée comme chirurgicalement résécable

T4b Tumeur (de toute taille) s'étendant au-delà de la capsule thyroïdienne, considérée comme chirurgicalement non résécable

N - Adénopathies régionales

NX Les adénopathies régionales ne peuvent être évaluées

N0 Pas d'adénopathie régionale métastatique

N1a Métastase au niveau VI (ganglions prétrachéaux et paratrachéaux, y compris préaryngés)

N1b Autres métastases ganglionnaires cervicales unilatérales, bilatérales ou controlatérales ou médiastinales

Carcinome papillaire

Pour les microcarcinomes papillaires, de taille inférieure ou égale à 1 cm, le taux de survie globale serait identique à la population normale [104]. Pour l'ensemble des carcinomes papillaires, le taux de survie relative à 5 ans est de 99% [3]. Les principaux facteurs pronostiques sont l'âge, la taille tumorale, l'extension extrathyroïdienne, la qualité de l'exérèse et la présence de métastases. D'un point de vue histologique, d'autres facteurs péjoratifs ont été rapportés : la présence d'invasions vasculaires, des atypies cytonucléaires sévères, les variantes à cellules hautes ou à cellules cylindriques [15].

Carcinome vésiculaire

Le taux de survie relative à 5 ans est de 95% [3]. La mortalité à long terme est de 3 à 5% pour les carcinomes vésiculaires à invasion minime, proche de la population générale, et d'environ 50% pour les carcinomes largement invasifs [105].

Les facteurs de mauvais pronostic sont un âge supérieur à 45 ans, la variante oncocytaire, la taille supérieure ou égale à 4 cm, la présence d'une extension extrathyroïdienne ou de métastases à distance. Des groupes de risques ont ainsi été définis en fonction de ces critères. Pour le groupe à bas risque, les survies globales à 10 et 20 ans sont respectivement de 98% et 97%, à risque intermédiaire

de 88% et 87%, et à haut risque de 56% et 49%. Le sexe, la multifocalité et la présence de métastases ganglionnaires n'auraient par contre pas d'impact sur le pronostic global [106].

Carcinome peu différencié

La survie moyenne à 5 ans est de 50%, la plupart des décès survenant dans les 3 premières années. Les décès sont le plus souvent liés à des métastases régionales ou à distance, plutôt que par invasion locale [17]. Les formes diffuses (composante peu différenciée supérieure à 10% du volume tumoral) sont de plus mauvais pronostic que les formes focales [21]. La présence de nécrose et le sous-type histologique ont un impact pronostique controversé [17].

Carcinome indifférencié/anaplasique

Le pronostic est sombre, avec une survie à 5 ans comprise selon les études entre 0 et 15%, et une médiane de survie entre 2,5 et 6 mois [3, 22, 107-109]. Le carcinome indifférencié/anaplasique peut être associé à un contingent bien différencié, mais le pronostic dépend de la taille du contingent indifférencié, et de la qualité de l'exérèse chirurgicale. Des survies prolongées peuvent ainsi être obtenues en cas de résection chirurgicale complète associée à une chimiothérapie à base de doxorubicine et à une radiothérapie [110].

2.7 Principes de prise en charge des carcinomes thyroïdiens de souche vésiculaire

Carcinomes différenciés de souche vésiculaire

Le traitement des cancers thyroïdiens différenciés de souche vésiculaire a fait l'objet en France en 2008 d'une conférence de consensus [111, 112].

Chirurgie

Le diagnostic de malignité étant connu en pré- ou per-opératoire (examen extemporané), le traitement chirurgical repose sur une thyroïdectomie totale. En cas de diagnostic différé sur une pièce de thyroïdectomie partielle, il n'y a pas d'indication à ré-intervenir en cas de tumeur unique, infracentimétrique, sans extension dans le tissu périthyroïdien (pT1). L'absence de totalisation chirurgicale peut se discuter chez les sujets de moins de 45 ans, avec une tumeur de stade pT1 mesurant de 10 à 20 mm, sous réserve de : l'absence d'anomalie décelable dans le lobe

controlatéral, l'absence de suspicion d'atteinte ganglionnaire à l'échographie et la possibilité d'une surveillance prolongée.

Le curage ganglionnaire comporte au minimum un curage central (VI), éventuellement complété par un curage latéral, homo- ou bilatéral selon les données du bilan (curage latéral complet ou simple curage jugulo-carotidien moyen et inférieur - III et IV). Le curage doit être réalisé en cas d'adénopathie suspecte mise en évidence en pré- ou en peropératoire. Il n'y a pas de consensus quant à l'intérêt de réaliser un curage en l'absence d'adénopathie suspecte.

Totalisation isotopique

Le traitement par iode 131 a pour buts de :

- Détruire d'éventuels reliquats de parenchyme thyroïdien, pour faciliter la surveillance ultérieure,
- Traiter d'éventuels foyers tumoraux résiduels macro- ou microscopiques,
- Compléter le bilan d'extension par la scintigraphie post-thérapeutique, dont la grande sensibilité permet la détection de reliquats de petite taille.

Les indications reposent sur la définition de 3 groupes pronostiques (tableau 2). Le traitement est indiqué pour les patients à haut risque évolutif. Il n'y a pas de consensus quant à l'intérêt du traitement pour les patients à risque intermédiaire.

Indications de la totalisation isotopique	Groupe pronostique
Pas de totalisation isotopique car pas de bénéfice démontré	<u>Patients à très faible risque évolutif</u> pT1 ≤ 10 mm, unifocal, N0-Nx, M0-Mx
Totalisation isotopique par au moins 3700 MBq (100 mCi) d'iode 131 après sevrage en hormones thyroïdiennes	<u>Patients à haut risque évolutif</u> - Exérèse tumorale incomplète non ré-opérable - Exérèse tumorale complète, mais risque important de récurrence ou de mortalité : • grosse tumeur et/ou extension extra thyroïdienne (T3 et T4) • extension ganglionnaire (tout T, N1) • métastase à distance (tout T, tout N, M1).
Pas de consensus : nécessité de la totalisation isotopique ? quelle activité ? quelle stimulation ?	<u>Patients à risque intermédiaire</u> Tous les autres cas

Tableau 2. Indications du traitement par iode 131 en fonction du groupe pronostique [111].

Hormonothérapie

L'hormonothérapie est indiquée chez tous les patients opérés d'un carcinome thyroïdien, quelle que soit l'étendue de l'exérèse. Le traitement a pour but d'assurer les besoins en hormones thyroïdiennes, mais aussi d'obtenir le freinage d'un éventuel résidu tumoral, en diminuant le taux de TSH. En effet, les cellules tumorales thyroïdiennes possèdent des récepteurs de la TSH, celle-ci favorisant la multiplication des thyrocytes.

Le traitement le plus commun repose sur la lévothyroxine (LT4), administrée généralement à la posologie de 2 à 2,5 µg/kg/j en traitement freinateur, et de 1,6 à 2 µg/kg/j en traitement substitutif. Au décours de la chirurgie, le traitement est administré avec une posologie proche de 2 µg/kg/j, et adapté au-delà de six semaines à deux mois pour obtenir une valeur de TSH :

- proche de la limite inférieure des normes (entre 0,1 et 0,5 mU/l) en cas de cancers de bon pronostic (T1 et 2, N0-Nx, M0, carcinomes papillaires ou vésiculaires bien différenciés)

- ou à une valeur inférieure ou égale à 0,1 mU/l en cas de cancers de moins bon pronostic : T3 et 4, extension ganglionnaire (tout T, N1), métastase à distance (tout T, tout N, M1), histologie défavorable (carcinomes papillaires à cellules hautes ou sclérosants diffus, carcinomes vésiculaires oncocytaires ou carcinomes peu différenciés).

A distance de l'éventuel traitement radio-isotopique, après la réalisation d'une échographie cervicale et l'évaluation de la thyroglobuline sérique sous TSH recombinante (rhTSH) entre le 6ème et le 12ème mois, le traitement est adapté en fonction du risque de récurrence, ou de la persistance d'un reliquat tumoral.

Surveillance

L'objectif de la surveillance est le dépistage précoce des récurrences, le suivi étant maintenu à vie. Elle repose essentiellement sur le dosage de la thyroglobuline (Tg) sérique de base ou après stimulation par rhTSH, l'échographie cervicale et la scintigraphie à l'iode 131 (figure 4).

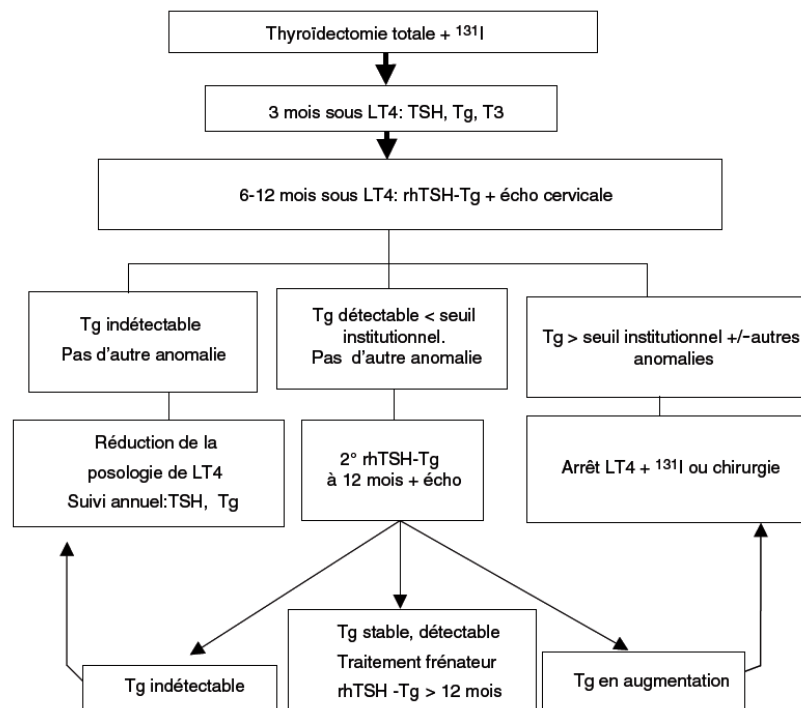


Figure 4. Protocole de suivi à court terme après un traitement initial associant thyroïdectomie totale et iode radioactif (source : [111]).

Carcinome indifférencié/anaplasique

Le traitement du carcinome indifférencié de la thyroïde doit être rapidement mis en place. En effet, la croissance de ce type de tumeur est très rapide, et le degré d'extension conditionne les possibilités chirurgicales et la survie. Lorsqu'elle est possible, la chirurgie complète peut permettre

d'obtenir des survies prolongées. Elle peut être proposée en première intention, ou après radiochimiothérapie néoadjuvante pour les tumeurs initialement inextirpables [113]. La chirurgie peut également être proposée dans certains cas pour améliorer le confort de vie du patient, dans un contexte palliatif. La chirurgie curative ne dispense pas du traitement complémentaire par radiothérapie et chimiothérapie. La radiothérapie peut être réalisée à titre curatif, mais aussi palliatif, préférentiellement par irradiation hyperfractionnée et accélérée [113]. Enfin, la chimiothérapie repose essentiellement sur la doxorubicine ou le placicel, et tient une place importante du fait d'une présentation métastatique au moment du diagnostic dans 20 à 50% des cas [113].

3. Rétinoïdes et récepteurs aux rétinoïdes

3.1 La vitamine A

Le terme « vitamine A » regroupe le rétinol, ses esters et ses dérivés métaboliques. L'appellation « rétinoïdes » désigne les composés naturels, mais également les composés obtenus par synthèse, dérivés de la vitamine A.

Structure et propriétés physicochimiques

Le rétinol est constitué d'un noyau β -ionone et d'une chaîne latérale méthylée et insaturée (chaîne isoprénoïde). Cette forme alcool constitue la principale forme circulante de la vitamine A. Il est stocké sous forme d'esters de rétinol et, majoritairement, de palmitate de rétinol. Les dérivés actifs du rétinol sont produits après oxydation du rétinol en rétinal, lui-même oxydé en acide rétinoïque (figure 2). Le rétinol tout-*trans* et ses esters (acétate et palmitate) sont insolubles dans l'eau et solubles dans les solvants organiques, les huiles et les graisses. Ils sont rapidement dégradés par la lumière, l'oxygène et les acides [114].

Transport et métabolisme

Absorption

L'alimentation apporte la vitamine A sous forme de vitamine A préformée (principalement du palmitate de rétinol) dans les produits animaux et sous forme de provitamine A (caroténoïdes) dans les produits végétaux. Dans l'estomac, les esters de rétinol et les caroténoïdes sont libérés à partir des protéines alimentaires. Dans l'intestin grêle, les esters de rétinol sont hydrolysés en rétinol par

des hydrolases, puis incorporés aux micelles lipidiques. La capture du rétinol par les entérocytes est médiée par un transporteur. Le rétinol internalisé est séquestré par CRBP-II (cellular retinol binding protein-II), puis estérifié par LRAT (lecithin retinol acyltransferase) et ARAT (acyl-CoA-retinol acyltransferase), principalement en palmitate de rétinol, qui est sécrété dans la lymphe après avoir été incorporé dans les chylomicrons [114].

Les caroténoïdes sont extraits de leur matrice végétale, puis transférés vers la phase lipidique du bol alimentaire. Après avoir dépassé le pylore, ils sont incorporés dans des micelles mixtes.

Distribution

Les esters de rétinol, le rétinol, les caroténoïdes, les phospholipides, les triglycérides (TG) et les apoprotéines sont incorporés dans les chylomicrons libérés dans la lymphe. Lors du transport des chylomicrons dans le sang, les TG sont dégradés par la lipoprotéine lipase plasmatique ; lorsqu'une proportion importante de TG a été hydrolysée et libérée, des remnants de chylomicrons sont formés. Les trois quarts de ces remnants de chylomicrons sont captés par le foie et le quart restant par les autres tissus [114].

Lorsque les tissus extrahépatiques ont un besoin accru en vitamine A, le foie, représentant 90% des réserves corporelles (principalement sous forme de rétinyl palmitate), libère du rétinol dans la circulation sanguine. Lorsque l'approvisionnement de l'organisme en vitamine A est satisfaisant, les esters de rétinol sont transférés aux cellules stellaires (cellules de Ito), qui peuvent stocker de grandes quantités de vitamine A. La mobilisation de la vitamine A stockée dans le foie est un processus fortement régulé. Le rétinol se lie à RBP (retinol binding protein) et forme un complexe avec la transthyrétine, qui est sécrété dans le plasma. Du fait de sa masse moléculaire élevée, ce complexe n'est pas filtré dans le glomérule rénal. La RBP est synthétisée par le foie (taux plasmatique : 40-50 mg/l). Un apport insuffisant en énergie et en protéines limite la synthèse hépatique de RBP. Le rétinol transporté dans le sang lié à la RBP est soit capté par les tissus périphériques, soit recyclé par le foie et le rein. La majorité du rétinol plasmatique est recyclée. Le rétinol est le rétinoïde majoritaire dans le sang, l'acide rétinoïque étant présent en beaucoup plus faibles concentrations dans le plasma. L'acide rétinoïque plasmatique est lié à l'albumine et les esters de rétinol sont incorporés dans les lipoprotéines, principalement les lipoprotéines de faible densité (LDL) et les lipoprotéines de très faible densité (VLDL) [114].

Le captage du complexe RBP-rétinol par les cellules cibles fait appel à un récepteur membranaire spécifique, la protéine STRA6 (stimulated by retinoic acid gene 6) [115]. Après avoir été

internalisé, le rétinol se lie à la CRBP (cellular retinol-binding protein) avant d'être oxydé en rétinol et acide rétinoïque.

Métabolisme

Le métabolisme de la vitamine A fait appel à des réactions d'estérification, d'oxydation, de conjugaison, d'isomérisation et de rupture de chaîne (figure 5). L'oxydation du rétinol en rétinol est réversible. La voie classique fait appel à une rétinol déshydrogénase cytosolique. L'oxydation du rétinol en acide rétinoïque est irréversible et fait appel à des aldéhydes déshydrogénases [114, 116]. L'acide rétinoïque est synthétisé dans les tissus possédant le système enzymatique approprié [116]. La synthèse de l'acide rétinoïque implique plusieurs déshydrogénases appartenant à 4 familles distinctes : les alcool-déshydrogénases (ADH), les déshydrogénases/réductases à chaînes courtes (SDR), les aldéhyde-déshydrogénases (ALDH), et les enzymes de la famille des cytochromes P450 [117, 118].

Le rétinol peut être phosphorylé en présence d'ATP en rétinyl phosphate ou glucuronylé en rétinyl glucuronate en présence d'uridine diphosphate glucuronate [114].

Deux familles de protéines cytoplasmiques pourraient aussi participer au métabolisme de la vitamine A : les cellular retinol-binding proteins (CRBP I, II et III) et les cellular retinoic acid-binding proteins (CRABP I et II) [117, 119]. CRBPI n'est pas indispensable au développement normal et à la survie, en l'absence de carence en vitamine A, mais joue un rôle important dans l'accumulation des rétinyl esters dans le foie [120]. CRABPI est impliquée dans le catabolisme de l'acide rétinoïque, et CRABPII dans la présentation de l'acide rétinoïque aux RARs, cependant l'inactivation génique de CRABPI et II chez la souris ne semble pas affecter la signalisation par l'acide rétinoïque de façon importante [121].

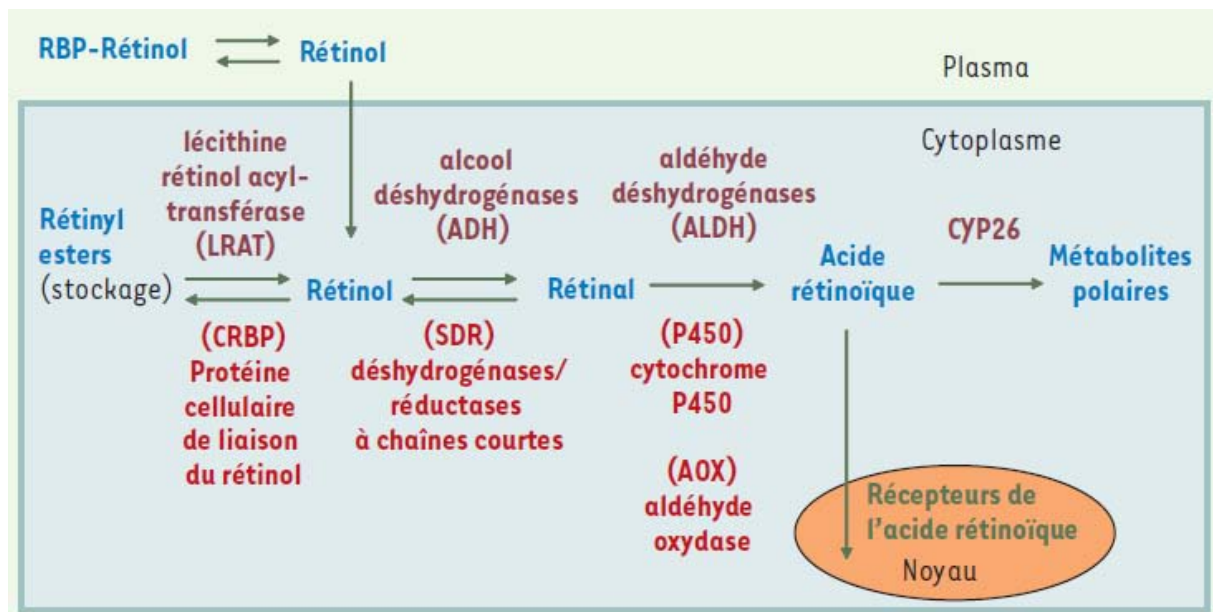


Figure 5. Etapes enzymatiques impliquées dans la synthèse de l'acide rétinoïque à partir du rétinol
(source : [116]).

Élimination et catabolisme

Environ 10 % à 20 % de la vitamine A ingérée ne sont pas absorbés et sont éliminés dans les selles. Une proportion importante de la fraction absorbée est dégradée en différents métabolites. On retrouve dans les selles des métabolites de l'acide rétinoïque oxydés en C4 ou hydroxylés au niveau du méthyle en C5, conservant une chaîne latérale intacte. Les métabolites urinaires sont également oxydés en C4 mais sont caractérisés par un raccourcissement de la chaîne latérale. Certains métabolites excrétés dans la bile subissent un cycle entérohépatique [114].

3.2 Mécanismes généraux d'action de l'acide rétinoïque

Les deux principales formes actives de rétinoïdes, dérivant du rétinol, sont le rétinol 11-*cis*, participant au cycle visuel, et l'acide rétinoïque, jouant d'importants rôles dans la différenciation cellulaire et l'apoptose [116]. L'acide rétinoïque intervient ainsi dans l'embryogénèse et la différenciation des tissus humains normaux, en particulier dans la différenciation des tissus épithéliaux, et dans l'immunité humorale et cellulaire, mais occupe également une place importante dans la cancérogénèse.

Parmi les isomères de l'acide rétinoïque, les formes tout-*trans* et 9-*cis* sont des ligands de deux familles distinctes de récepteurs nucléaires : les RARs (retinoic acid receptors), interagissant avec les deux formes d'acide rétinoïque, et les RXRs (retinoid X receptors), qui s'associent

spécifiquement à l'acide rétinoïque 9-*cis*, l'existence in vivo de ce dernier restant cependant controversée [117]. Les récepteurs de l'acide rétinoïque agissent comme facteurs de transcription, s'associant à des séquences spécifiques d'ADN sous formes d'homodimères de RXR ou d'hétérodimères RAR-RXR (figure 6). Ces séquences sont composées de motifs répétés, séparés par 1, 2 ou 5 paires de bases. Des combinaisons complexes des hétérodimères provenant de l'existence de plusieurs formes de RAR et de RXR (trois gènes α , β et γ pour chaque type, ainsi que plusieurs isoformes par gène) permettent d'assurer une régulation transcriptionnelle complexe des gènes cibles par l'acide rétinoïque [117, 122]. Les RXRs peuvent également former des hétérodimères avec d'autres récepteurs nucléaires, dont certains sont permissifs pour une réponse transcriptionnelle à l'acide rétinoïque 9-*cis* [123].

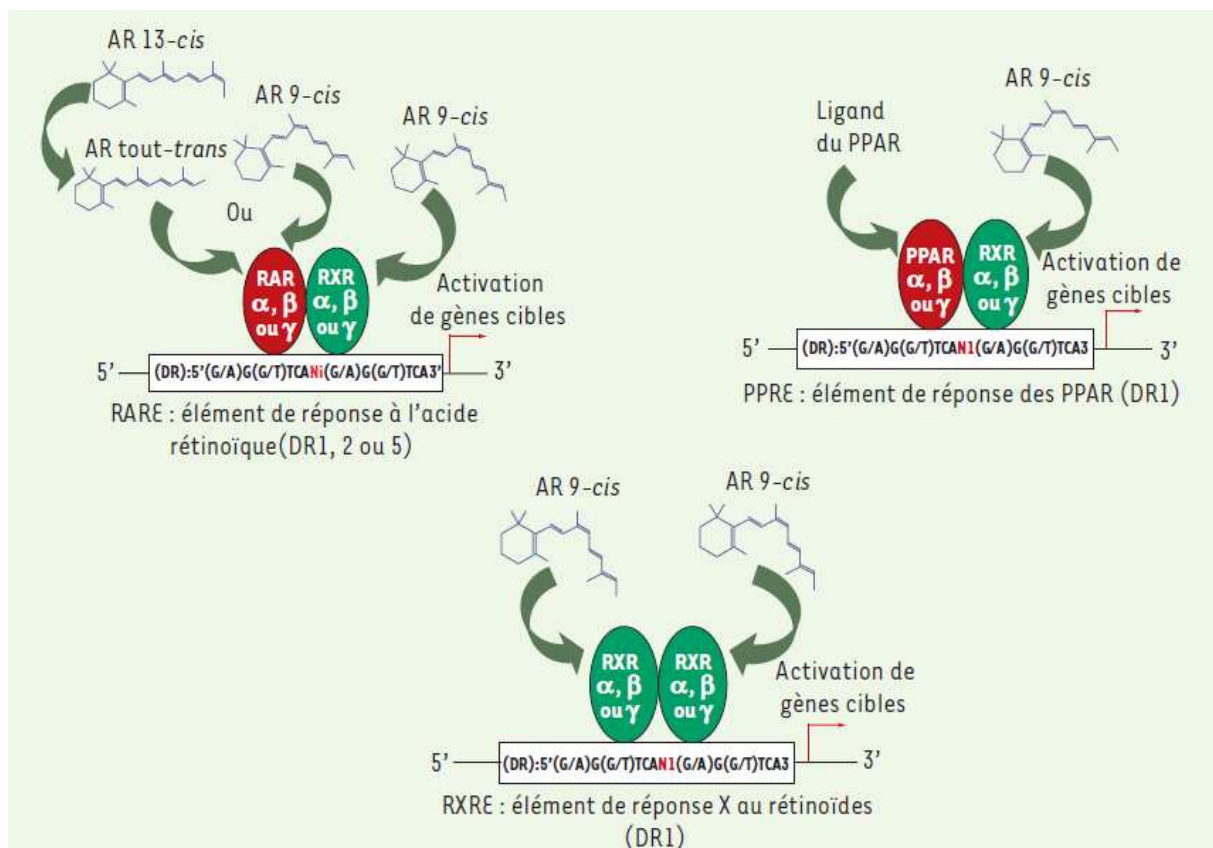


Figure 6. Activation des récepteurs nucléaires par l'acide rétinoïque (AR) (source : [116]).

3.3 Propriétés anti-tumorales de l'acide rétinoïque et applications cliniques

De multiples études sur des lignées cellulaires objectivent en présence d'acide rétinoïque une inhibition de la prolifération cellulaire, comme par exemple dans les lignées issues de mélanome [124], d'adénocarcinome mammaire, de sarcome, de lymphome [125] ou de carcinomes thyroïdiens

[126-128]. Il a également été constaté une induction de l'apoptose dans des lignées issues d'adénocarcinomes mammaire et œsophagien, de médulloblastome ou de leucémie myéloïde [129-131]. L'acide rétinoïque pourrait également diminuer le risque de dissémination métastatique, comme le suggèrent l'inhibition de l'expression de la collagénase de type IV et de la stromélysine 3 dans des lignées hématopoïétiques [132], synoviales [133] et fibroblastiques [134].

L'une des propriétés les plus importantes de l'acide rétinoïque est l'induction de la différenciation cellulaire, constatée par exemple sur des lignées de leucémie promyélocytaire [135], de carcinomes thyroïdiens [136] ou sur des modèles murins dans la cancérogénèse vésicale [137].

L'acide rétinoïque est utilisé en pratique oncologique dans quelques indications thérapeutiques, en particulier dans le traitement de la leucémie promyélocytaire aigüe et du neuroblastome [138, 139]. La leucémie promyélocytaire aigüe est la première application de l'acide rétinoïque en cancérologie, dès les années 1980, permettant d'obtenir une rémission dans plus de 90% des cas. Cette pathologie se caractérise par une translocation t(15 ;17) avec fusion *PML/RAR α* .

Des essais de prévention du cancer du poumon ont été tentés, mais se sont soldés par des échecs [140], et même par une incidence accrue de cancers dans l'étude CARET (apports conjoints de rétinol et en β -carotène) [141]. Quelques essais ont montré l'efficacité du fenretinide, un rétinoïde de synthèse, dans la prévention du cancer mammaire ou ovarien [142].

Dans le domaine du cancer thyroïdien, les rétinoïdes seraient particulièrement intéressants de par leur rôle dans la différenciation cellulaire. Des études sur des lignées cellulaires ont montré que l'acide rétinoïque induit l'activation de la iodo-thyronine-5'-déiodinase, jouant un rôle important dans la production d'hormones thyroïdiennes, et considérée comme un marqueur spécifique de la différenciation des thyrocytes [143]. Les rétinoïdes pourraient induire une redifférenciation cellulaire, celle-ci se manifestant en particulier par la capacité des cellules tumorales à réabsorber l'iode radioactif. Quelques essais cliniques ont en effet montré l'efficacité des rétinoïdes dans le traitement des carcinomes thyroïdiens métastatiques avec perte de la réponse à l'iode radioactif : l'acide rétinoïque a permis d'obtenir une régression tumorale ou une stabilisation de la croissance tumorale, en particulier en resensibilisant les cellules tumorales à l'iode radioactif [144-147], avec cependant des effets variables selon les patients [147]. Il serait donc utile de pouvoir identifier les patients susceptibles de répondre à cette thérapie, par exemple en fonction du statut des cellules tumorales pour les récepteurs aux rétinoïdes [128], ou de leur propriétés métaboliques vis-à-vis des rétinoïdes [116].

3.4 Altération de l'absorption et du métabolisme de l'acide rétinoïque dans la cancérogénèse

La réponse spécifique d'un tissu à l'acide rétinoïque est liée en partie aux profils d'expression des différents types de récepteurs aux rétinoïdes, mais aussi aux enzymes impliquées dans le métabolisme de l'acide rétinoïque [116, 119, 122].

Des altérations du métabolisme de l'acide rétinoïque sont en particulier constatées dans certains cancers. La concentration en acide rétinoïque tout-*trans* est plus faible dans certains tissus cancéreux que dans les tissus normaux, comme dans le cancer de la prostate [148]. Une diminution de l'absorption de rétinol et de l'activité rétinol oxydase a été observée dans un modèle de carcinome mammaire induit par la N-méthyl-nitroso-urée chez le rat [149]. Une autre étude a montré une diminution de la production de rétinyl esters et de la synthèse d'acide rétinoïque dans deux lignées humaines de cancer du sein [150]. Une inactivation épigénétique de *CRBPI* est observée dans plusieurs cancers, dont le cancer du sein. La réexpression de cette protéine dans des cellules mammaires immortalisées supprime la tumorigénèse in vivo [151]. Une importante réduction de la synthèse de l'acide rétinoïque a été observée dans plusieurs lignées humaines de carcinome mammaire, même en présence de liarozole (agent bloquant du métabolisme de l'acide rétinoïque), démontrant que l'inactivation de l'acide rétinoïque par les enzymes P450 n'est pas responsable de la faible concentration en acide rétinoïque [152]. Les cellules humaines MCF-7 de cancer du sein transfectées avec l'ADNc de *cRDH* (*RDH5*) retrouvent la capacité d'absorber rapidement et d'oxyder le rétinol 9-*cis* en rétinol 9-*cis*, mais pas en acide rétinoïque 9-*cis* [153]. Les cellules MCF7 n'expriment en effet pas la *RALDH3* trouvée dans les cellules épithéliales mammaires normales [154].

D'autres altérations dans les voies de synthèse de l'acide rétinoïque ont été observées dans divers types de cancer. L'expression de *RALDH2* est fréquemment réduite dans les tumeurs de la prostate, corrélée à une durée de rémission plus courte. Le traitement par un inhibiteur de la méthylation de l'ADN permet de restaurer l'expression de ce gène dans la lignée cellulaire DU145 [155]. Dans les tumeurs du poumon, l'expression de *RALDH1* est fortement réduite [156]. Dans les adénomes et carcinomes du côlon, il a été observé une réduction de l'expression de deux gènes impliqués dans la biosynthèse de l'acide rétinoïque, *RDH5* et *RDHL* (*DHRS9*). Les auteurs ont aussi constaté une diminution de la conversion du rétinol en acide rétinoïque dans 7 lignées de carcinome du côlon en comparaison avec des cellules normales [157]. Enfin, l'expression de la *RoDH-4* est nettement réduite dans les tumeurs de l'endomètre [158].

Ces observations suggèrent donc qu'une altération in situ de l'expression d'enzymes essentielles à la biosynthèse d'acide rétinoïque peut être associée au développement de plusieurs

types de cancer. Les mécanismes de ces altérations restent encore à explorer, et pourraient impliquer une inactivation épigénétique des gènes correspondants ou de facteurs transcriptionnels contrôlant leur expression, dont les RARs.

3.5 Les récepteurs des rétinoïdes

Les récepteurs de l'acide rétinoïque (RARs)

On distingue 3 sous-types de récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque (RARs) : α (NR1B1), β (NR1B2) et γ (NR1B3), encodés par des gènes distincts, avec au moins 2 isoformes pour chaque sous-type (générées à partir de promoteurs variables ou par épissage alternatif). En particulier, l'ARNm de RAR β 2 est transcrit à partir du promoteur situé dans l'exon 3 de RAR β (3p24). Les RARs sont des régulateurs de transcription ligand-dépendants, agissant par hétérodimérisation avec les récepteurs aux rétinoïdes X (RXRs), après fixation de l'acide rétinoïque *tout-trans* ou 9-*cis*. Les gènes cibles sont impliqués dans la différenciation cellulaire, la prolifération et l'apoptose [159].

Structure des RARs

Comme la plupart des récepteurs nucléaires, les RARs présentent une structure modulaire, constituée de 6 régions homologues désignées de A à F, de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale (figure 7). Les régions C et E, comportant respectivement les domaines de liaison à l'ADN et au ligand, sont les régions les plus conservées et régissent l'activité transcriptionnelle des RARs. Les régions A/B, D et F sont au contraire des régions peu conservées [119].



Figure 7. Structure des récepteurs de l'acide rétinoïque (RA).

Domaine de liaison à l'ADN

Le domaine de liaison à l'ADN permet une reconnaissance de séquences spécifiques. Il est composé de deux modules à doigt de Zinc, deux hélices alpha et une extension COOH terminale [160]. Les RARs forment des hétérodimères asymétriques en se liant avec les RXRs, permettant leur

fixation à des séquences spécifiques d'ADN, les éléments de réponse à l'acide rétinoïque (RAREs, retinoic acid response elements). Ceux-ci sont typiquement constitués de deux répétitions directes d'un motif hexamérique : PuG(G/T)TCA, localisées dans les séquences de régulation des gènes cibles [159]. Les RAREs sont classiquement caractérisés par une répétition directe espacée de 5 paires de bases (DR5), mais les hétérodimères peuvent aussi se lier à des répétitions directes séparées par une (DR1) ou deux (DR2) paires de bases. Les homodimères RXR peuvent aussi se lier à DR1 [159].

Les RAREs ont été identifiés dans les domaines promoteurs de nombreux gènes, remplissant des fonctions variées. On trouve en particulier des éléments DR5 dans les promoteurs du gène *RARβ2* [161], de *CYP26A1* (famille du cytochrome 450) [162, 163], de plusieurs *Homeobox* [163] et de *HNF* (hepatocyte nuclear factor) [164]. Des éléments DR2 sont présents dans les promoteurs des gènes *CRBP I* et *CRBP II* [165, 166], et DR1, chez le rat, dans le promoteur du gène *CRBP II* [167].

Sur les éléments DR2 et DR5, on constate *in vitro* une disposition de type 5'-RXR-RAR-3', entraînant l'activation du gène cible. Au contraire, sur les éléments DR1, la polarité est inversée (5'-RAR-RXR-3'), entraînant en présence d'acide rétinoïque une activité répressive sur le gène cible [119].

Chaque domaine de fixation à l'ADN interagit au niveau de la boîte P de la première hélice contenant trois résidus exposés, responsables de la reconnaissance des sites spécifiques. Des contacts coopératifs entre les domaines de liaison à l'ADN de chacun des hétérodimères permettent un renforcement des interactions protéine-protéine et protéine-ADN. La spécificité de reconnaissance d'un RARE dépend de la configuration du domaine de liaison à l'ADN de chacun des partenaires d'hétérodimérisation [159].

Domaine de liaison au ligand

Le domaine de liaison au ligand est constitué de 12 hélices α et d'un feuillet β . L'hélice C-terminale H12 est la plus flexible, et adopte une conformation qui peut varier selon le sous-type de RAR. Le domaine de liaison est constitué d'une poche de liaison du ligand, du domaine principal de dimérisation et du domaine d'activation ligand-dépendante AF-2 (activation function-2) [159].

La forme de la poche de fixation du ligand est adaptée au volume du ligand, renforçant les contacts hydrophobes et la sélectivité pour le ligand. Les contacts avec les ligands intéressent différents résidus situés en H3, H5 et H11, ces résidus étant spécifiques aux différents sous-types de récepteur. Des ligands spécifiques pour RAR α ou RAR γ ont ainsi été synthétisés [168].

La surface d'hétérodimérisation est constituée de résidus des hélices H7, H9, H10 et H11, et des boucles L8-9 et L9-10 [169, 170]. Dans les hétérodimères RAR-RXR, la fixation du ligand pourrait améliorer la stabilité et la propagation des signaux [171].

L'hélice 12 C-terminale, correspondant à AF-2, permet de contrôler la capacité des RARs à se lier à des corégulateurs. H12 présente une importante flexibilité conformationnelle, variable selon le sous-type de RAR. La fixation du ligand à RAR α pourrait générer, par un repositionnement de H12, une surface d'interaction avec des coactivateurs transcriptionnels. Au contraire, les sous-types RAR β et RAR γ présenteraient même en l'absence de ligand une conformation de H12 proche de celle de RAR α lié au ligand [159].

Domaine N-terminal AF-1

Le domaine N-terminal des RARs, correspondant aux régions A et B, incluant AF-1 (activation function-1), joue un rôle fondamental dans le contrôle de la transcription des gènes cibles de l'acide rétinoïque [172]. La région A diffère selon les différents sous-types et isoformes. Au contraire, la région B est plus conservée, et contient des motifs riches en proline, avec de multiples sites de phosphorylation [159].

Région D

La région D est peu conservée, et permet d'espacer les domaines de liaison au ligand et à l'ADN. Elle comporte également des signaux de localisation nucléaire [159].

Région F

Cette région étend le domaine C-terminal à l'hélice 12 dans les RARs, mais elle est absente dans les RXRs. Elle est très variable selon le sous-type de RAR. La région F est phosphorylée en de multiples positions, ce qui pourrait modifier les propriétés des RARs [159]. En l'absence de ligand, cette région pourrait stabiliser l'hélice H12 de RAR α dans une conformation ouverte, favorisant la liaison à des corépresseurs [173]. Elle pourrait également se lier à des motifs spécifiques d'ARN messager, jouant ainsi un rôle de régulation post-traductionnelle [174].

Analyse fonctionnelle

Mécanisme classique de régulation de la transcription par les RARs

Les RARs sont des facteurs de transcription hautement régulés par de multiples mécanismes, en particulier par l'association à des corépresseurs et des coactivateurs. L'action de ceux-ci est gouvernée par la position de l'hélice H12, elle-même liée à la fixation du ligand, la position de H12 permettant de générer ou de faire disparaître les surfaces d'interaction [159].

En l'absence de ligand, RAR α présente une fente hydrophobe générée par H3, L3-4 et H4, pouvant se lier aux motifs LxxI/Hlxxx/L des corépresseurs, l'extrémité N-terminale de ce motif masquant la surface d'interaction de H12. RAR γ et RAR β interagissent peu avec les corépresseurs. Par des interactions hydrophobes avec H3, H12 est séquestrée dans une position fermée, empêchant leur liaison aux corépresseurs comme aux coactivateurs [159]. Les principaux corépresseurs décrits sont NCor/NCor1/RIP13 et SMRT/NCor2/TRAC [159, 175]. La liaison des corépresseurs entraîne le recrutement de complexes de haut poids moléculaire à activité histone désacétylase (HDAC), la désacétylation des résidus lysine aux extrémités N-terminales des histones générant une condensation de la chromatine dans la région promotrice des RAREs [159].

Au décours de la liaison du ligand aux RARs, H12 se réoriente, permettant avec H3 la fixation à des motifs LxxLL de coactivateurs. Ceux-ci appartiennent principalement à la sous-famille p160 des coactivateurs des récepteurs des rétinoïdes (SRC, steroid receptor coactivators), nommés SRC-1 (NCoA-1), SRC-2 (TIF-2, GRIP-1) et SRC-3 (pCIP, ACTR, AIB1, TRAM1, RAC3) [176]. Ces coactivateurs permettent de recruter des complexes enzymatiques à activité histone acétyl-tranférase (HAT) comme par exemple CBP/p300 (CREB binding protein) et p/CAF (p300/CBP-associated factor), à activité histone méthyl-tranférase (HMT), comme CARM1 (coactivator-associated arginine methyl-transferase 1) et PRMT1 (protein arginine methyl transferase 1), et à activités ubiquitinase/dés-ubiquitinase et de remodelage du nucléosome, tel que SWI/SNF (switch/sucrose non-fermenting) [159]. Tous ces complexes modifient la structure de la chromatine autour des promoteurs des gènes cibles, créant un « code des histones », formant des sites de liaison à d'autres effecteurs. D'autres enzymes à activités HAT et HMT sont en particulier recrutées, entraînant la décompaction de la chromatine, ainsi que d'autres remodeleurs de la chromatine, formant des régions dépourvues de nucléosomes, ou dont les nucléosomes sont espacés [159].

En plus des positions active et inactive, H12 peut adopter des positions intermédiaires, ce qui pourrait générer des interfaces alternatives de liaison aux corégulateurs. De multiples composés ont ainsi été synthétisés, avec des actions agonistes, antagonistes, agonistes inverses ou partiels, plus ou moins sélectifs pour un certain type de RARs [159, 177].

Effets extra-génomiques non conventionnels des RARs

En plus des fonctions nucléaires de régulation des gènes, les RARs exercent des rôles de régulation extra-génomique. Par exemple, l'acide rétinoïque entraîne une activation très rapide de la voie MAPK, suggérant le rôle des RARs par des interactions cytoplasmiques ou membranaires [178]. RAR α pourrait par ailleurs se lier directement à des ARN messagers, en réprimant ainsi la traduction [174].

Phosphorylation des RARs et autres modifications post-traductionnelles par interaction avec les cascades de kinases

En réponse à l'acide rétinoïque et à l'activation de la voie p38MPAK/MSK1, les RARs sont rapidement phosphorylés, en particulier sur deux résidus lysine, l'un dans le domaine de liaison au ligand, et l'autre dans le domaine de fixation à l'ADN [159], impliquant notamment les kinases MSK1 et cdk7 [179]. Ces phosphorylations vont promouvoir le recrutement des promoteurs cibles. Les coactivateurs et corépresseurs font également l'objet de phosphorylations, jouant un rôle crucial dans l'activité transcriptionnelle de RAR α [159]. La phosphorylation de SRC-3 pourrait ainsi affiner la dynamique des échanges de ce coactivateur avec RAR α ou d'autres corégulateurs [180], alors que la phosphorylation de TBLR1 module l'ubiquitination et la dégradation de NCoR/SMRT, permettant ainsi de lever son activité répressive [181]. Enfin, la phosphorylation de H3 modulée par MSK1 contribue à l'induction des gènes cibles de RAR α , probablement par des effets sur la structure de la chromatine, en coopération avec des complexes de remodelage chromatinien [179].

Les RARs sont également la cible d'autres modifications, comme des ubiquitinations et des méthylations. Par exemple, L'ubiquitination de RAR γ , et par conséquent sa dégradation par le protéasome 26S, est dépendante de sa phosphorylation dans son domaine N-terminal [182]. RAR α peut par ailleurs être tri-méthylé sur une lysine située dans le domaine de liaison au ligand, et mono-méthylé sur une lysine du domaine de fixation à l'ADN [183, 184]. Ces méthylations pourraient jouer un rôle positif dans l'activité transcriptionnelle de RAR α .

La phosphorylation des RARs peut aussi survenir en l'absence de ligand, au niveau d'autres résidus que ceux impliqués dans la réponse à l'acide rétinoïque, sous l'effet de cascades de kinases dépendantes de multiples signaux exogènes comme des facteurs de croissance, l'insuline, le stress ou des cytokines, ces cascades se terminant par Akt, PKC ou les kinases C-Jun N-terminales (JNKs). Par exemple, PKC peut phosphoryler le domaine de fixation à l'ADN des RARs, inhibant leur hétérodimérisation et leur liaison à l'ADN, ou entraînant leur export nucléaire [185, 186]. Dans certains cancers caractérisés par une amplification ou une dérégulation des activités Akt ou JNK,

plusieurs résidus localisés dans la région C-terminale de RAR α sont ainsi phosphorylés, contribuant à la dégradation de RAR α [187, 188]. SMRT peut également être phosphorylé par Akt, entraînant la stabilisation de l'interaction RAR-SMRT, ce qui a en particulier été mis en évidence pour RAR β 2 [189]. Ces tumeurs pourraient ainsi devenir résistantes à l'acide rétinoïque [159].

Rôle du système ubiquitine-protéasome

En réponse à l'acide rétinoïque, les RARs, ainsi que leurs coactivateurs, comme par exemple SRC3 [180, 190], sont ubiquitinés et dégradés par le protéasome 26S, qui est composé du noyau protéolytique 20S et du complexe régulateur 19S. Celui-ci reconnaît les protéines ubiquitinées et prépare leur entrée dans 20S [191]. Dans le cas particulier de RAR γ , l'ubiquitination et la dégradation du récepteur dépend de sa phosphorylation préalable du domaine N-terminal [182], et la dégradation de SRC-3 dépend également de sa phosphorylation par p38MAPK [180].

Le rôle exact de l'activité protéolytique du protéasome dans la transcription médiée par les RARs n'est encore totalement clair [192]. L'une des hypothèses est que la dégradation par le protéasome serait une façon efficace de limiter l'action des RARs et/ou pourrait servir de signal de fin du processus transcriptionnel [193]. La protéolyse pourrait également servir à dégrader les corépresseurs ou les coactivateurs, permettant ainsi à d'autres corégulateurs d'intervenir [194].

Le système ubiquitine-protéasome pourrait cependant également jouer un rôle dans le contrôle de la transcription par les RARs en l'absence de protéolyse. En particulier, SUG-1, l'une des 6 ATPases de 19S, interagit avec les RARs et SRC3, étant ainsi recruté au niveau des promoteurs des gènes cibles, sans interruption de leur transcription. Les sous-unités ATPases de 19S pourraient interagir avec des composants des complexes de régulation de la transcription, facilitant leur fixation ou leur départ des promoteurs, et pourraient aussi reconfigurer localement la chromatine pour promouvoir le recrutement d'enzymes modificatrices des histones [195, 196].

Mécanismes de transrépression par les RARs

L'action des RARs n'est pas limitée à la régulation positive ou négative de ses gènes cibles. Ils pourraient aussi jouer un rôle dans l'expression d'autres gènes, en interférant avec d'autres récepteurs nucléaires ou avec des complexes de transcription comme AP-1 (activating protein-1) [197]. AP-1 régule l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la transformation et la prolifération des cellules cancéreuses, et inclue les membres de la famille Fos et Jun. L'inhibition de AP-1 peut être secondaire à l'action de RARs liés à leur ligand, voire même, pour RAR β , en l'absence de ligand [198].

Plusieurs modèles d'interaction entre les RARs et AP-1 ont été proposés : par interaction directe avec Jun/Fos ; par dissociation du dimère Jun-Fos ; par compétition avec des coactivateurs, comme CBP ; enfin, par inhibition des JNKs, empêchant ainsi la phosphorylation activatrice de c-Jun [199].

L'inhibition d'AP-1 est corrélée au pouvoir inhibiteur de l'acide rétinoïque sur la croissance tumorale, la capacité des RARs à inhiber les gènes de réponse à AP-1 semblant ainsi primordiale dans les effets préventifs et thérapeutiques de l'acide rétinoïque dans les pathologies prolifératives [200, 201].

Rôles physiologiques et pathologiques des RARs

Développement embryonnaire

Les RARs permettent la transduction du signal de l'acide rétinoïque, et jouent ainsi de multiples rôles dans l'embryogénèse, principalement démontrés à partir d'études de mutagenèse dirigée chez la souris. Ils agiraient principalement par hétérodimérisation avec RXR α [202].

Le rôle de RAR α et RAR β a été en particulier démontré dans la migration des cellules post-otiques de la crête neurale et la formation des arcs branchiaux [202, 203]. RAR α , β et γ sont par ailleurs tous les trois impliqués dans la segmentation cérébrale [204]. RAR β et RAR γ ont un rôle crucial dans la morphogénèse oculaire, sous l'influence de la crête neurale [205]. D'autres études à partir de souris mutantes ont enfin démontré le rôle des RARs dans la formation des poumons (RAR α et β), du cœur (RAR α , β et γ) et du système urogénital (RAR α et β) [202].

Il faut également noter que le rôle tératogène de l'acide rétinoïque agit par l'intermédiaire des RARs, ce qui a été en particulier démontré par leur surexpression génétique chez la souris [206]. Ces effets tératogènes ont également été constatés chez l'homme, lors d'expositions accidentelles de femmes enceintes à des rétinoïdes de synthèse (ex : isotrétinoïne ROACCUTANE, en particulier dans le traitement de l'acné), aboutissant à des malformations cranio-faciales, thymiques, cardiaques et du système nerveux central [207]. L'un des mécanismes évoqués serait l'activation ectopique d'hétérodimères RXR/RAR α [208].

Profils d'expression tissulaire des sous-types de RARs

Il y a chez l'homme peu d'études décrivant l'expression des différents sous-types de RARs selon les tissus. Elles reposent sur des techniques variées, comme la recherche de transcrits (ARN messagers) par Northern Blot, PCR ou hybridation in situ, ou l'étude de l'expression des protéines par Western Blot ou immunohistochimie. Dans la plupart des tissus étudiés, une expression des 3 sous-

types de RARs est retrouvée. RAR α serait néanmoins plus fortement exprimé dans les cellules hématopoïétiques [209], et RAR β dans le rein, la prostate ou le système nerveux central [209].

Fonctions physiologiques des RARs chez l'individu adulte

Si le rôle des RARs a été largement exploré dans l'embryogénèse, il y a au contraire très peu de données concernant leurs fonctions chez l'individu adulte. Le rôle des RARs est essentiellement abordé par l'étude des effets des carences en vitamine A, entraînant des troubles de la vision, des altérations cutanées et une immunodépression [210]. Les fonctions respectives de chacun des récepteurs aux rétinoïdes restent cependant très peu connues. RAR γ pourrait en particulier intervenir dans la régulation de l'inflammation [211], RAR α dans la régulation de la granulopoïèse [212], RAR α et RAR γ dans le contrôle de l'apoptose des lymphocytes T [213]. RAR α et RAR γ participeraient également au maintien de l'homéostasie épidermique et dans la différenciation kératinocytaire [214]. Les différents sous-types de RARs auraient par ailleurs des rôles distincts dans la spermatogénèse [215, 216]. La plupart des autres études concernent la cancérogénèse, les RARs jouant un rôle important dans la prolifération, l'apoptose et la différenciation cellulaire.

Les récepteurs aux rétinoïdes X (RXRs)

Comme pour les RARs, il existe trois sous-types de RXR α , β et γ , codés par des gènes différents, avec de multiples variantes d'épissage. Ils agissent par hétérodimérisation avec les RARs, mais également avec d'autres récepteurs nucléaires, pouvant ainsi jouer un rôle dans de nombreuses voies biologiques. Les RXRs ont également la propriété de pouvoir s'homodimériser, et pourraient alors en particulier activer les gènes cibles de PPAR [217]. Les RXRs ne peuvent être activés par l'acide rétinoïque que dans sa forme 9-*cis*. Il existe par ailleurs d'autres composés naturels ou synthétiques pouvant se lier aux RXRs, appelés réxinoïdes [218].

Structure et analyse fonctionnelle

Comme les autres récepteurs nucléaires, les RXRs sont constitués d'un domaine N-terminal variable (A/B), d'un domaine hautement conservé de fixation à l'ADN (C), d'une zone charnière non conservée (D) et d'un domaine C-terminal modérément conservé comprenant le domaine de liaison au ligand (E/F) [218].

Le domaine de fixation à l'ADN est constitué deux motifs riches en cystéine, en doigt de zinc, permettant la fixation à des séquences spécifiques de l'ADN PuG(G/T)TCA(X)_nPuG(G/T)TCA. Ces

séquences consensus forment des répétitions directes, indirectes ou inversées, consistant en deux demi sites séparés par un court espaceur. Dans le premier doigt de zinc, une portion hautement conservée, appelée P-box, détermine la spécificité de la séquence de liaison de l'ADN, alors qu'une autre zone conservée, située dans le deuxième doigt de zinc, définit l'espacement des demi-sites [218].

L'activité transcriptionnelle est médiée par le domaine de liaison au ligand, constitué d'une poche de liaison pour de petites molécules lipophiles, un domaine de transactivation (hélice 12/AF12), une surface de liaison aux cofacteurs et une surface de dimérisation. La structure globale est la même que pour les autres récepteurs nucléaires. La poche de liaison du ligand est de très petite taille, l'acide rétinoïque 9-*cis* en occupant la plus grande partie [218].

Les RXRs sont des partenaires d'hétérodimérisation pour les récepteurs nucléaires des groupes 1 (exemples : RAR, PPAR, thyroid hormone receptor, vitamin D receptor) et 4 (NGF-induced clone B, Nurr1, Nor1) [219], mais peuvent également induire la transcription en tant qu'homodimères. La formation d'homodimères de RXR permet d'exposer une autre surface de dimérisation, impliquant les hélices 11 et 12, et aboutissant ainsi à la formation de tétramères [220], représentant probablement le mode principal de séquestration des RXRs. Quand le ligand est présent, cela induit des changements affectant l'hélice 12 et une dissociation des tétramères. RXR peut ainsi former des homodimères ou des hétérodimères, en fonction de la disponibilité des partenaires [218]. La surface d'hétérodimérisation est légèrement plus grande que celle d'homodimérisation (550 contre 500 Angström), ce qui pourrait favoriser la formation d'hétérodimères plutôt que d'homodimères [218].

Comme pour les RARs, de nombreux corégulateurs ont été identifiés, les domaines d'interaction comportant des motifs LxxLL dans les coactivateurs, et Lxxxlxxxl/L dans les corépresseurs [218]. La liaison du ligand entraîne des changements conformationnels, l'hélice 12 recouvrant alors la poche de fixation du ligand, permettant ainsi la fixation de coactivateurs. En présence d'agonistes partiels, et probablement d'antagonistes, la conformation de H12 pourrait permettre la fixation de corépresseurs [169]. Dans les hétérodimères permissifs tels que RXR-PPAR, la liaison d'un agoniste de PPAR entraîne le repositionnement de l'hélice 12 de PPAR et génère un puissant site de recrutement de coactivateurs [221]. Du côté de RXR, la liaison du ligand permet également des changements conformationnels de l'hélice 12 de PPAR, l'amarrant au site de liaison des coactivateurs, PPAR ayant alors une conformation agoniste. Pour les hétérodimères non permissifs, les récepteurs pourraient démasquer les sites de liaison aux corépresseurs de RXR, permettant ainsi la fixation de corépresseurs et une stabilisation de cette conformation. La seule fixation d'un agoniste à RXR ne serait alors pas suffisante pour libérer les corépresseurs [222].

Rôles physiologiques et pathologiques des RXRs

Profils d'expression tissulaire des sous-types de RXRs

L'importante homologie entre les trois sous-types de RXR α , β , γ semble indiquer qu'ils ciblent des gènes communs et qu'ils sont liés aux mêmes ligands. Cependant, leur profil de d'expression diffère selon les tissus [223]. Chez l'individu adulte, RXR α est abondamment exprimé dans le foie, les reins, la rate, le placenta et l'épiderme. RXR β est largement exprimé dans presque tous les tissus. Enfin, l'expression RXR γ est principalement limitée au muscle et au cerveau.

Ligands de RXR

La mise en évidence in vivo de ligands endogènes de RXR reste controversée. L'acide rétinoïque 9-*cis*, l'acide phytanique et l'acide docohexanoïque pourraient constituer des ligands endogènes, mais cela n'a pas été pour le moment clairement démontré.

Développement embryonnaire

Les études d'invalidation des sous-types de RXR ont permis de mettre en évidence leurs rôles dans le développement embryonnaire. RXR α est impliqué dans le développement adipeux, cardiaque, oculaire et placentaire. Son invalidation est létale entre 13,5 et 16,5 jours embryonnaires chez la souris, principalement par défaillance cardiaque [202]. RXR α serait ainsi la principale forme de RXR impliquée dans le développement embryonnaire, la transduction du signal étant assurée par des hétérodimères RXR α /RAR [202].

Par ailleurs, RXR β est impliqué dans le développement cutané et de la lignée germinale, et RXR γ dans le développement thyroïdien, la plasticité synaptique, la mise en place du métabolisme hépatique et le développement prostatique [218].

Rôles des RXRs dans le métabolisme, la différenciation cellulaire et l'apoptose

- *Rôles métaboliques*

Les RXRs jouent un rôle important dans l'homéostasie du myocarde adulte [218, 224]. Son rôle a également été mis en évidence dans le métabolisme musculaire et la sensibilité à l'insuline, par son association à PPAR, mais également en jouant probablement un rôle indépendant et complémentaire [225-227]. Ainsi, les RXRs pourraient être impliqués dans l'insulinorésistance. Les réxinoïdes, en régulant par l'intermédiaire de RXR l'activité de multiples hétérodimères, sont

également impliqués dans l'absorption et le métabolisme du cholestérol, et dans le développement de l'athérosclérose [228].

- *Différenciation de la lignée myéloïde*

Les RARs jouent un rôle crucial dans les processus physiologiques et pathologiques associés à la différenciation de la lignée myéloïde. Les RXRs constituent obligatoirement les partenaires d'hétérodimérisation des RARs dans ces processus. RXR α est la forme dominante dans les cellules myéloïdes [229], mais, la mutation RXR α étant létale, l'étude de la maturation myéloïde n'a pas pu être réalisée [230]. L'inactivation de RXR β entraîne des troubles de la maturation myéloïde [231]. Les études à l'aide de ligands sélectifs des RXRs ont montré qu'ils ont une activité synergique avec celle des RARs sur la différenciation cellulaire et la prolifération, alors que seuls leur action reste relativement modeste [232]. Enfin, les études de Benoît *et al.* suggèrent qu'il existerait, dans certaines lignées cellulaires de leucémie myéloïdes, une voie de signalisation de RXR indépendante de RAR [233].

- *RXR, apoptose et cancérogénèse*

Les RXRs pourraient coopérer avec les RARs pour potentialiser l'induction par les rétinoïdes de la différenciation cellulaire et de l'apoptose. Les activateurs des RXRs semblent avoir néanmoins un effet plus puissant et spécifique sur l'apoptose. En particulier, les RXRs pourraient agir sur l'apoptose par l'intermédiaire de la transglutaminase tissulaire [234], ce qui est en faveur d'une voie spécifique des RXRs dans l'apoptose des cellules myéloïdes. Cette voie des rétinoïdes pourrait ainsi être inhibée par des inhibiteurs spécifiques des RXRs [235].

Le rôle prépondérant des RXRs dans l'apoptose a également été constaté dans des lignées de carcinome embryonnaire [236], de cancer du sein [236] et du pancréas [237]. La sous-localisation cellulaire de RXR α semble par ailleurs influencer sur la réponse aux rétinoïdes. En effet, dans la lignée de carcinome mammaire MDA-MB-231, les cellules sensibles aux rétinoïdes expriment RXR α au niveau du nucléoplasme, alors que dans les cellules résistantes RXR α est exprimé dans le compartiment des facteurs d'épissage [238]. Cette distribution intranucléaire est sous le contrôle de l'extrémité C-terminale de RXR α [238].

Les ligands des RXRs permettent donc d'amplifier les effets des RARs sur l'inhibition de la prolifération, et l'induction de la différenciation cellulaire et de l'apoptose, mais possèdent également un mode d'action spécifique, indépendant des rétinoïdes. Ces effets pourraient donc être

intéressants dans le traitement des cancers, notamment en s'affranchissant des effets secondaires propres aux rétinoïdes acides.

4. Epigénétique et cancérogénèse

4.1 Généralités sur l'épigénétique

L'épigénétique désigne les mécanismes de modification de l'expression des gènes, sans modification de leur séquence nucléotidique. Ces modifications sont transmissibles au cours de la mitose, voire même dans certains cas au cours de la méiose, ces modifications pouvant alors être transmises d'une génération à l'autre [239]. Les principales modifications épigénétiques reconnues sont les modifications covalentes des histones et la méthylation de l'ADN.

De nombreuses modifications covalentes des histones ont été décrites. Les plus étudiées sont l'acétylation et la méthylation des résidus lysine au niveau des extrémités amino-terminales des histones, entraînant des modifications de la structure de la chromatine [239]. L'acétylation est associée à l'activation transcriptionnelle, et la désacétylation à la répression transcriptionnelle. Elle résulte de l'activité des deux familles d'enzymes : les histone-acétyltransférases (HAT) et les histone-désacétylases (HDAC). La méthylation, dépendant d'histone-méthyltransférases (HMT), joue quant à elle un rôle variable selon la position de la lysine méthylée : par exemple, la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 est corrélée à une activation transcriptionnelle, contrairement à celle de la lysine 9 [239].

L'une des modifications épigénétiques les plus importantes consiste en une modification chimique de l'ADN : la méthylation de résidus cytosine de dinucléotides CG. Dans plus de 60% des gènes humains [240], le promoteur et/ou le premier exon comporte(nt) des régions riches en dinucléotides CG, appelées îlots CpG. La méthylation dans la région promotrice d'un gène a pour effet d'en diminuer la transcription. Les enzymes responsables de la mise en place de profils de méthylation sont les méthyltransférases DNMT1, DNMT3a et DNMT3b (DNA methyl transferase) [241]. DNMT3a DNMT3b établiraient les profils de méthylation au cours du développement, tandis que DNMT1 serait responsable du maintien du profil de méthylation, transmettant ainsi ce profil de la cellule-mère aux cellules filles au cours de la réplication de l'ADN. Les CpG méthylés sont reconnus par un motif protéique d'environ 70 acides aminés, appelé MBD (methyl-CpG binding domain). Les protéines à domaine MBD, comme MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3 et MBD4, ont la caractéristique de pouvoir recruter, au niveau des CpG méthylés, des complexes entraînant des modifications covalentes des histones (désacétylation et méthylation), inhibant la transcription par compaction de la chromatine [239] (figure 8).

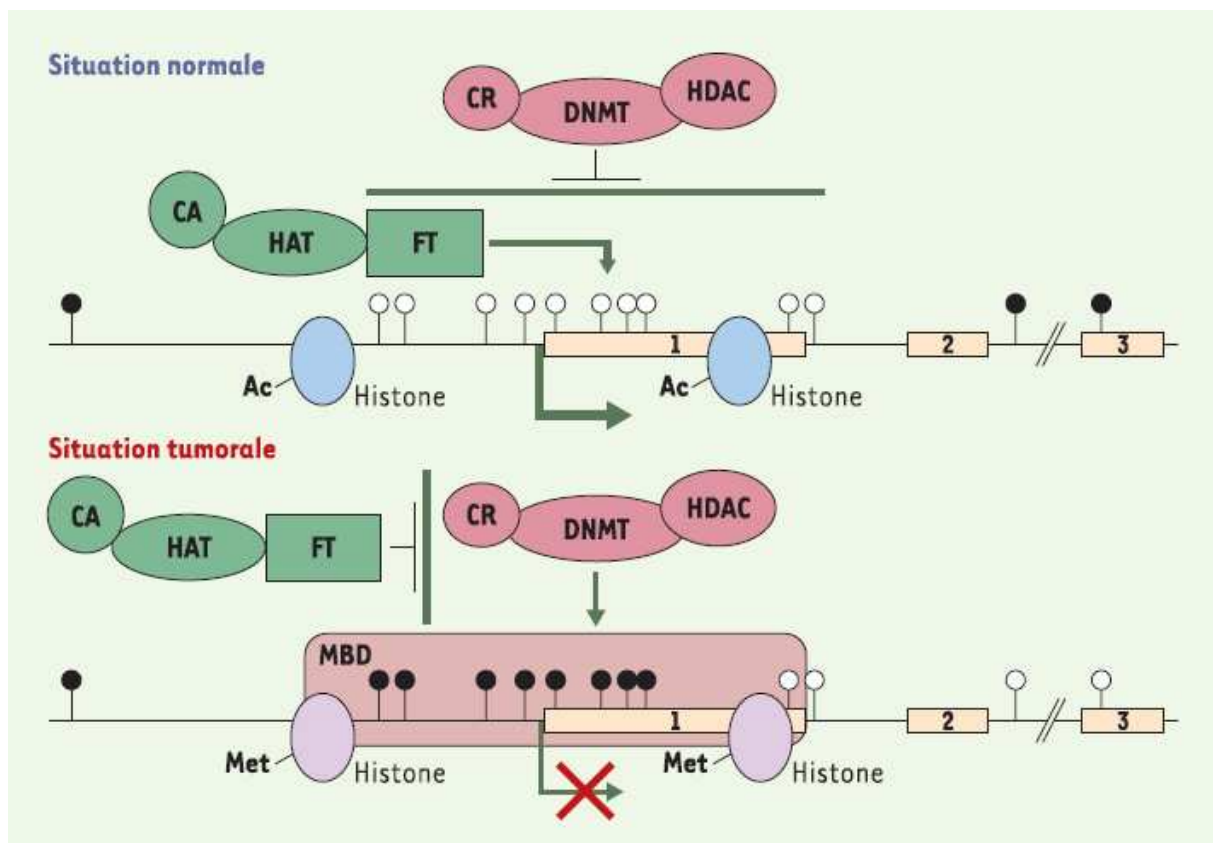


Figure 8. Remodelage de la chromatine au niveau de gènes suppresseurs de tumeur, en situation normale et tumorale. Situation normale : la plupart des CG en dehors des îlots sont méthylés (cercles noirs), tandis que les CG des îlots ne sont pas méthylés (cercles blancs) ; l'acétylation des histones permet de maintenir la chromatine dans un état « décompacté », accessible aux complexes de transcription constitués notamment de facteur de transcription (FT), de protéines acétylant les histones (HAT) et de co-activateurs transcriptionnels (CA). Situation tumorale : hypométhylation des CG répartis le long du génome et dans les régions codantes, et hyperméthylation des îlots CpG au niveau des promoteurs, ceux-ci étant reconnus par des protéines à domaine MBD, responsables du recrutement, des enzymes de modifications post-traductionnelles des histones (HDAC, méthylation), des protéines responsables de la méthylation de l'ADN (DNMT) et des corépresseurs transcriptionnels (CR) (source : [239]).

4.2 Altérations des profils de méthylation de l'ADN dans la cancérogénèse

Hypométhylation globale et hyperméthylation localisée des cellules tumorales

Dès le début des années 1980, une perte de la méthylation au niveau de dinucléotides CG et une diminution globale du taux de méthylcytosine étaient identifiées dans les cellules cancéreuses [242]. Cette hypométhylation globale peut toucher des îlots CpG normalement méthylés dans les tissus sains, et donc aboutir à la réactivation de certains gènes. Surtout, l'hypométhylation est particulièrement importante dans des séquences satellites péricentromériques, ce qui pourrait alors prédisposer l'ADN à des cassures et des remaniements chromosomiques [239]. Au contraire, d'autres

études ont par la suite mis en évidence une hyperméthylation paradoxale du promoteur de gènes suppresseurs de tumeur dans les cellules cancéreuses, corrélée à leur extinction transcriptionnelle [243] (figure 8). Une hyperméthylation des îlots CpG a ainsi été constatée dans des gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, l'apoptose et la réparation des dommages à l'ADN [239]. Les cellules tumorales sont donc caractérisées, sur le plan épigénétique, par une hypométhylation globale, et une hyperméthylation de certains gènes suppresseurs de tumeur.

Hyperméthylation du promoteur de $RAR\beta 2$ dans la cancérogénèse

Différentes études sont en faveur du rôle suppresseur de tumeur du récepteur $RAR\beta 2$. Par exemple, l'utilisation de transgènes antisens pour $RAR\beta 2$ chez la souris induit la formation de tumeurs pulmonaires [244]. De même l'expression de $RAR\beta 2$ par des constructions génétiques dans des cellules HeLa permet d'en inhiber la croissance, et ce d'autant plus que de l'acide rétinoïque tout-*trans* est ajouté au milieu de culture [245]. Des études ont par la suite mis en évidence une diminution de l'expression de $RAR\beta 2$ dans plusieurs types de cancer, en particulier dans les carcinomes pulmonaires [246], de l'endomètre [247], et du sein [248], dans les gliomes [249], dans les tumeurs des glandes salivaires [250] et dans les carcinomes thyroïdiens [251, 252]. L'hyperméthylation du promoteur de $RAR\beta 2$ a été démontrée dans un certain nombre de cas, par exemple dans les cancers de l'endomètre [247], les carcinomes de la tête et du cou [253] et dans les carcinomes de la thyroïde [254-257]. Dans les carcinomes thyroïdiens, de grandes différences sont cependant notées selon les études, les taux d'hyperméthylation rapportés variant de 7 à 52%.

D'autres mécanismes pourraient cependant être impliqués dans la diminution de l'expression de $RAR\beta 2$, comme l'état d'acétylation ou de méthylation des histones [183, 258], ou encore par l'intermédiaire de la voie PI3K/Akt [189].

Autres gènes hyperméthylés dans le cancer thyroïdien

Dans les carcinomes thyroïdiens, de nombreux gènes suppresseurs de tumeurs ou spécifiques du tissu thyroïdien sont la cible d'une méthylation aberrante. Parmi les gènes suppresseurs de tumeurs, en plus de $RAR\beta 2$, il a été décrit une hyperméthylation des promoteurs de *TIMP3* (tissue inhibitor of metalloproteinase-3, impliqué dans la migration et l'invasion), *SLC5A8* (codant pour SMCT-1, sodium-coupled monocarboxylate transporter 1, un symporteur du sodium), *DAPK* (death-associated protein kinase, jouant un rôle dans l'apoptose), *hMLH1* (human mutant L homologue 1, gène de réparation de l'ADN), *RASSF1A* (ras effector homologue, ayant un rôle dans l'interaction et la stabilisation des microtubules), et *PTEN* (phosphate and tensin homologue,

inhibant la voie PI3K/Akt), s'associant alors dans ce dernier cas à des altérations génétiques activatrices de la voie PI3K/Akt [63, 254, 259, 260].

Les méthylations aberrantes de *TIMP3*, *SLC5A8*, *DAPK* et *hMLH1* sont associées à la mutation BRAF ainsi qu'à l'agressivité tumorale dans les carcinomes papillaires de la thyroïde [254]. Au contraire, l'hyperméthylation de *RASSR1A* est inversement associée à la mutation de *BRAF* [259-264], suggérant ainsi que le rôle de *RASSR1A* dans la cancérogenèse serait indépendant de la voie MAPK.

Plusieurs gènes impliqués dans le stockage et le transport de l'iode thyroïdien peuvent également être hyperméthylés dans le cancer thyroïdien, comme *NIS*, *TSHR*, *SLC26A4* et *Tg* [259, 261, 264], pouvant ainsi limiter l'efficacité des thérapeutiques à base d'iode radioactif.

II. Matériel et méthodes

1. Etude immunohistochimique de RAR α , RAR β , RXR α et RXR β

1.1 Sélection du matériel tumoral

69 cancers thyroïdiens sont sélectionnés de façon rétrospective, incluant 38 carcinomes papillaires, 14 carcinomes vésiculaires et 17 carcinomes indifférenciés/anaplasiques. Le tissu tumoral est conservé sous forme de blocs de paraffine, les différents prélèvements ayant été fixés au préalable au moins 16 heures dans du formol tamponné à 4%, puis inclus en paraffine dans un automate. Le diagnostic est vérifié à partir de coupes histologiques de 4 μ m colorées par HES (hématoxyline, éosine et safran). Les blocs tumoraux sélectionnés comportent à la fois du tissu tumoral et le parenchyme thyroïdien non tumoral adjacent, ce dernier pouvant ainsi servir de témoin interne.

1.2 Caractéristiques des anticorps

Les caractéristiques des anticorps primaires sont les suivantes :

- anti-RAR α : anticorps monoclonal de souris 9 α -9A6 (don de Rochette-Egly C. et Chambon P., IGBMC, Illkirch, France), dilution 1/1000^{ème} dans du TNC (Tris HCl pH 7,6 100 mM, NaCl 150 mM, caséine 1%, Tween 20 0,05%)
- anti-RAR β : anticorps polyclonal de lapin RP β (F) (Rochette-Egly C. et Chambon P.), dilution 1/4000^{ème} dans du TNC
- anti-RXR α : anticorps monoclonal de souris 4RX-3A2 (Rochette-Egly C. et Chambon P.), dilution 1/1000^{ème} dans du TNC
- anti-RXR β : anticorps monoclonal de souris 16RX-2E1 (Rochette-Egly C. et Chambon P.), dilution 1/1000^{ème} dans du TNC

Les anticorps utilisés ne permettent pas la discrimination des différentes isoformes.

Les anticorps secondaires sont, selon le type d'anticorps primaire :

- monoclonal : anti-souris biotiné Goat anti-Mouse Immunoglobulins Biotinylated (EO433, Dako, Glostrup, Danemark), dilué au 1/150^{ème} (Antibody Diluant, Dako)
- polyclonal : anti-lapin biotiné Polyclonal Swine anti-Rabbit Immunoglobulins Biotinylated (E353, Dako), dilué au 1/150^{ème}.

1.3 Technique immunohistochimique avec amplification par un conjugué tyramine

Principes généraux de la technique

Les différents récepteurs étant exprimés à un niveau très faible, la technique de détection immunohistochimique standard en 3 couches de type biotine-streptavidine est de sensibilité insuffisante. Nous avons adopté une technique de détection en 5 couches. Les premières étapes de détection sont celles d'une technique immunohistochimique standard, avec dépôts successifs de l'anticorps primaire, de l'anticorps secondaire couplé à la biotine, puis du couple streptavidine-peroxydase. L'amplification complémentaire est basée sur le dépôt d'un complexe tyramine-biotine, l'interaction de ce complexe avec la peroxydase en présence de peroxyde d'hydrogène permettant sa fixation autour du complexe anticorps primaire/secondaire/streptavidine-peroxydase [265] (figure 9), suivie d'une incubation finale dans une solution de streptavidine-peroxydase et la révélation dans une solution de DAB (di-amino-benzidine).

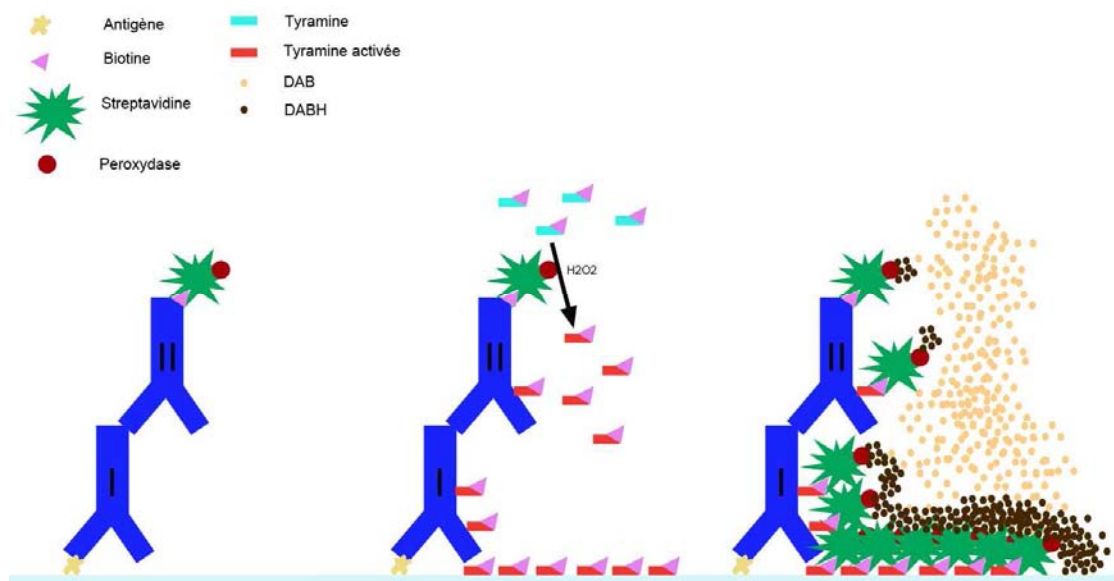


Figure 9. Principe de la technique immunohistochimique avec amplification par un conjugué tyramine (d'après Plénat *et al.* [265]). Les premières étapes (à gauche) sont communes à celles d'une technique immunohistochimique standard, l'anticorps secondaire étant couplé à de la biotine, permettant la liaison au couple streptavidine-peroxydase. Celle-ci interagit avec la tyramine, permettant, en présence d'eau oxygénée, la création de groupes phénols actifs et entraînant ainsi le dépôt in situ de la molécule de tyramine activée, couplée à de la biotine (au milieu). Enfin, l'étape finale de révélation (à droite) repose sur l'ajout de streptavidine-peroxydase et de DAB, créant ainsi un précipité brun autour du complexe.

Protocole

La solution de tyramine-biotine diluée au 1/50^{ème} est préparée selon les étapes suivantes, adaptées d'après Hopman *et al.* [266] :

- diluer 10 mg de tyramine-HCl (Sigma-Aldrich) dans 1 mL de diméthylformamide et additionner 10 µL de triéthylamine 7,2 M
- diluer 10 mg de NHS-LC-biotine (Thermo Scientific Pierce Protein Research Products, Rockford, USA) dans 1 mL de diméthylformamide
- couplage : additionner 1 mL de la solution NHS-LC-biotine et 0,382 mL de tyramine-HCl/triéthylamine, agitation douce 4 heures à l'abri de la lumière
- additionner 8,618 mL d'éthanol absolu, et conserver à -20°C
- diluer extemporanément au 1/100^{ème} dans du tampon Tris/imidazole (Tris HCl pH 8,8 200 mM, imidazole 10 mM)

Des coupes en paraffine de 4 µm sont étalées sur lames. Le démasquage et le déparaffinage sont obtenus en trempant les lames pendant 40 minutes dans une solution à 97°C de Citrate pH 6, comportant, pour 1 L : 125 mL d'acide borique 0,08 M, 90 mL de citrate de sodium 0,1 M, 16 mL d'acide citrique 0,1 M, 0,5 mL de Tween 20 (Sigma-Aldrich Chemia GmbH, Hilden, Germany), 0,5 mL d'Emulloil LN (Procalp SA, Mazamet, France), en complétant avec de l'eau distillée (automate PT Link, Dako). Les lames sont rincées avec du tampon Tris 0,1 M, constitué, pour 10 L, de : 250 mL de Tris 2 M pH 7,6, 300 mL de NaCl 5 M, 5 mL de Tween 20 (Sigma-Aldrich), en complétant avec de l'eau distillée. Après dépôt pendant 10 minutes de 150 µL de TNC, les lames sont égouttées, puis 70 µL de la solution d'anticorps primaire sont déposés entre lame et lamelle, avec une incubation sur la nuit.

Après rinçage dans du tampon Tris 0,1 M, les étapes suivantes se déroulent sur automate Autostainer Plus® (Dako), avec des rinçages dans du tampon Tris 0,1 M :

- 200 µL d'anticorps secondaire, 30 min
- rinçage
- 200 µL de peroxyde d'hydrogène (Peroxidase Blocking Solution, Dako), 5 min
- rinçage
- 200 µL de streptavidine (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) diluée au 1/160^{ème} (tampon Tris 0,1 M, NaCl 0,15 M, albumine bovine 1%, Tween 20 0,1%, Na₃N 0,1%), 30 min
- rinçage
- 200 µL de TNC, 5 min
- 200 µL de solution de tyramine, additionnée de 4 µL de peroxyde d'hydrogène par mL, 10 min

- 200 µL de streptavidine (Roche Diagnostics) diluée au 1/160^{ème}, 30 min

L'étape finale de révélation est effectuée sous contrôle microscopique, après dépôt de 150 µL d'une solution de DAB (CINtec, MTM Laboratories AG, Heidelberg, Germany). Lorsque l'intensité du signal est satisfaisante, la réaction est stoppée par immersion dans le tampon Tris, les lames étant ensuite trempées dans le toluène et montées avec l'Eukitt® (O. Kindler GmbH and Co., Freiburg, Germany).

1.4 Interprétation, recueil des données cliniques et analyse statistique

Le signal immunohistochimique est considéré comme normal (2) s'il est nucléaire et intense, et comme diminué si son expression nucléaire est faible ou absente (1), le tissu thyroïdien sain ou à défaut les cellules de la stroma-réaction servant de référence. On considère également comme significatif un signal cytoplasmique isolé, interprété comme une séquestration cytoplasmique (C) de la protéine. L'évaluation semi-quantitative du signal a été réalisée de façon indépendante par 2 pathologistes (JMV, GG).

Un suivi clinique est disponible pour 33 patients (durée de suivi : de 12 mois à 10 ans et 7 mois, durée moyenne de 8 ans et 5 mois), présentant tous un carcinome bien différencié. Les données sont collectées rétrospectivement, en notant le stade TNM et la survenue de récives locales ou à distance.

L'analyse statistique a pour but de rechercher une corrélation entre les anomalies d'expression et les principaux paramètres clinico-pathologiques (taille tumorale, effraction capsulaire, statut ganglionnaire et métastases à distance, survie). La faible mortalité (2 décès parmi les 33 patients) et le faible nombre de récive (6 récives sur 33) ne permettent pas de corrélation avec la survie globale ou sans récive. On recherche également une différence de profil immunohistochimique entre les différents types de tumeurs thyroïdiennes. Ces différentes analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel R (www.r-project.org). Les données qualitatives font l'objet d'une comparaison par test du Khi2, ou par test de Fisher en cas d'effectifs inférieurs à 3. Les données quantitatives sont comparés à l'aide du test de Student lorsque les effectifs sont supérieurs à 30, ou par test de Wilcoxon dans le cas contraire. Le test est considéré comme significatif si la valeur de p est inférieure à 5%.

Les performances diagnostiques de chaque anticorps sont calculées pour le diagnostic de carcinome vésiculaire, incluant valeur prédictive positive (VPP), valeur prédictive négative (VPN), sensibilité et spécificité, avec un intervalle de confiance à 95% (IC 95%).

2. Détermination du statut de méthylation de *RARβ2*

2.1 Sélection du matériel tumoral

La population étudiée est constituée de 18 adénomes vésiculaires, et de 49 carcinomes, dont 19 carcinomes papillaires, 14 carcinomes vésiculaires et 16 carcinomes indifférenciés/anaplasiques. Dans un cas de carcinome indifférencié/anaplasique, une composante bien différenciée minoritaire de type papillaire est présente, celle-ci faisant également l'objet d'une extraction d'ADN. Le matériel tumoral servant de base à l'extraction des acides nucléiques est constitué de copeaux de tumeur prélevés dans des blocs de paraffine.

Afin de comparer les données obtenues au tissu thyroïdien normal, 10 parenchymes thyroïdiens sains ont fait l'objet d'une extraction d'ADN à partir de bloc de paraffine. Dans tous les cas les lobes analysés sont macroscopiquement et histologiquement normaux.

2.2 Extraction d'ADN et dosage

Déparaffinage et digestion

La première étape consiste à déparaffiner les échantillons à l'aide de toluène : ajouter 1 mL de toluène ; placer les tubes 5 minutes sur agitateur rotatif et centrifuger 5 minutes à 12000 G ; éliminer le surnageant ; répéter 2 fois au total.

Les échantillons sont ensuite rincés et déshydratés : rincer 2 fois dans 1 mL d'alcool absolu, mélanger (vortex), centrifuger 5 minutes à 12000 G ; rincer 1 fois dans 1 mL d'alcool 70 %, mélanger (vortex), centrifuger 5 minutes à 12000 G ; évaporer sous vide 5 à 10 minutes.

La lyse des tissus repose sur l'ajout d'un tampon de lyse et de protéinase K :

- préparer le tampon de lyse : 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 20 mM EDTA (EDTA 0,5 M pH 8, Invitrogen Corporation, Paisley, UK), 1% SDS (SDS 10%, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)
- ajouter au tissu déparaffiné 225 µl de tampon de lyse et 25 µl de protéinase K à 20 mg/ml (*tritirachium album*, Euromedex, Mundolsheim, France), et incubé 2 à 3 jours à 55°C jusqu'à digestion complète (si nécessaire rajouter de la protéinase K).

Extraction sur automate et dosage

L'extraction d'ADN est réalisée sur automate Thermo Scientific KingFisher (Plate forme commune de Biologie Moléculaire, Hôpitaux de Brabois), utilisant une méthode de purification basée

sur des particules magnétiques, à l'aide du kit MagnéSil (Promega, Charbonnières, France), conformément aux instructions. Le dosage de l'ADN repose sur l'utilisation du fluoromètre Qubit (Invitrogen), à l'aide du kit Quant-iT dsDNA BR Assay 2-1000 ng.

2.3 Technique de conversion

Principe de la technique

En présence de bisulfite de sodium, il se produit une désamination des cytosines (C) en uracile (U). La réaction peut-être schématisée ainsi : $C \xrightarrow{1} C-SO_3^- \xrightarrow{2} U-SO_3^- \xrightarrow{3} U$ (figure 10). La réaction 1 consiste en l'addition de bisulfite au niveau de la double liaison 5,6 de la cytosine, la réaction atteignant rapidement un équilibre entre C et $C-SO_3^-$ (5,6-dihydro-6-sulfonate de cytosine). Dans des conditions, l'équilibre de la réaction est déplacé vers $C-SO_3^-$. La réaction 2 correspond à la conversion de $C-SO_3^-$ en $U-SO_3^-$ (5,6-dihydro-6-sulfonate d'uracile) par désamination. La rapidité de la réaction 2 est proportionnelle à la concentration en bisulfite. La réaction 3 est la réaction de désulfonation, permettant en milieu alcalin, la conversion de $U-SO_3^-$ en U. En présence de 5-méthylcytosine, les réactions 1 et 2 sont beaucoup moins efficaces, et quasi-nulles dans les conditions de réaction utilisées. Après le traitement par bisulfite de sodium, si la conversion est complète, on obtient une séquence d'ADN où toutes les cytosines non méthylées sont transformées en uracile (en thymine après amplification), les cytosines méthylées restant inchangées.

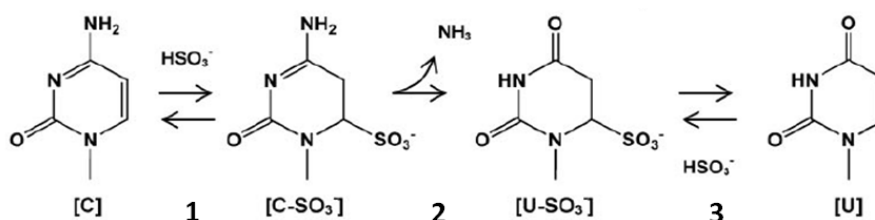


Figure 10. Réaction de conversion de l'ADN par le bisulfite de sodium (d'après [267]).

Protocole classique

Préparation des solutions

Les solutions sont réalisées extemporanément avec de l'eau qualité biologie moléculaire dégazée, avec dissolution par agitation douce (sans vortex), et conservées à l'abri de la lumière. La solution A est préparée en mélangeant 540 μ L d'hydroquinone 200 mM (hydroquinone, USP, Sigma-Aldrich) (220 mg dans 10 mL d'eau) avec 9,36 mL de bisulfite de sodium 3,88 M (sodium hydrogen

sulfite, ACS reagent, Sigma-Aldrich) (3,69 g dans 10 mL). Le pH est ajusté à 5.0 avec une solution de NaOH 6 M.

Réaction de conversion de l'ADN :

La première étape consiste à dénaturer l'ADN :

- diluer 1 µg d'ADN, additionné de 10 µg d'ARNt (yeast tRNA, Gibco/BRL, Gaithersburg, USA) dans une solution de 0,3 M NaOH, soit : 1 µg d'ADN, 10 µg ARNt et 2.5µL de NaOH 3M, compléter jusqu'à 25 µL avec de l'eau
- incuber 30 minutes à 37°C.

Les réactions de bisulfitation de l'ADN et de désulfonation reposent sur les étapes suivantes :

- additionner à la solution d'ADN dénaturé 275 µL de la solution A préchauffée à 50°C ; incuber 6 à 16 h à 50°C à l'abri de la lumière
- préparer une solution 12 M de iodure de sodium en dissolvant 13,5 g de iodure de sodium (sodium iodide, Sigma-Aldrich) dans 7,5 mL d'une solution 2 mM de βmercaptoethanol (obtenue en dissolvant 1 µL de mercaptoethanol dans 20 mL d'H₂O). Ajuster le pH entre 6 et 7 avec de l'acide acétique à 10 % ; additionner 375 µL de cette solution de iodure de sodium aux 300 µL de la réaction de bisulfitation (soit NaI 6M /βmercaptoethanol 1mM finale), mélanger
- additionner 20 µL de EZ-Glassmilk® (Qbiogene, Irvine, USA) à la solution ; incuber 30 minutes à température ambiante en plaçant le tube sur un agitateur rotatif ; centrifuger 10 secondes à 5000 G, éliminer le surnageant
- lavage : additionner 1 mL d'éthanol à 70%, mélanger (vortex), centrifuger 10 secondes à 5000 G et éliminer le surnageant ; effectuer cette étape 3 fois au total ; au terme de cette troisième étape compléter l'élimination du surnageant résiduel par une centrifugation de 3 minutes à 10000 G
- désulfonation : ajouter au pellet 50 µL d'une solution de NaOH 300 mM / éthanol 90% (900 µL éthanol 100% + 100 µL NaOH 3M), mélanger (vortex) et incuber 15 minutes à 37°C ; centrifuger 10 secondes à 5.000 G, éliminer le surnageant
- lavage : ajouter 1 mL d'éthanol à 90%, mélanger (vortex), centrifuger 10 secondes à 5000 G et éliminer le surnageant ; répéter cette étape une fois ; centrifuger à grande vitesse pendant 5 minutes pour éliminer tout surnageant résiduel
- évaporer 20 minutes à l'étuve à 50°C.

Elution de l'ADN :

La dernière étape permet de récupérer l'ADN par élution à partir du EZ-Glassmilk® :

- additionner 25 µL de Tris 1 mM pH 8.0, mélanger (vortex) et incuber 15 minutes à 60°C ; centrifuger 3 minutes à 10000 G et récupérer le surnageant ; répéter l'étape une fois
- passer l'éluat sur filtre (Spin modules and recovery tubes, MP biomedical, Illkirch, France) pour éliminer toute trace de silice (1 minutes à 5000 G) ; stocker en aliquots à -20°C.

Protocole de conversion à haute concentration

Hayatsu *et coll.* ont récemment décrit une technique de bisulfitation reposant sur l'utilisation d'une solution de bisulfite fortement concentrée à 10 M (vs 3,6M) [267], dans le but d'améliorer le taux de conversion de cytosine en uracile, et de limiter ainsi le risque de faux positifs. 14 cas ont fait l'objet d'une bisulfitation par une technique adaptée d'après Hayatsu *et al.*

La solution de bisulfite 10 M est préparée en mélangeant 2,08 g de bisulfite de sodium (NaHSO_3) avec 0,67 g de sulfite d'ammonium ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) dans 5 mL d'une solution de sulfite d'ammonium à 50% (NH_4HSO_3). La solution est mélangée jusqu'à dissolution complète à 90°C.

La dénaturation de l'ADN est réalisée en portant 30 minutes à 37°C une solution constituée de 1 µg d'ADN et 3 µL de NaOH 5 M, en complétant avec de l'eau pour un volume final de 50 µL.

Après ajout de 250 µL de la solution de bisulfite 10 M, la réaction de bisulfitation est réalisée en incubant 40 minutes à 70°C.

Pour la suite de la procédure (lavage, désulfonation et élution), nous avons utilisé le kit Epitect® Bisulfite Kit 48 (Epigenomics, Qiagen GmbH, Hilden, Germany), permettant une purification de l'ADN sur des colonnes. La forte molarité de la solution de bisulfite utilisée rend en effet peu efficaces les lavages à l'éthanol à 70% utilisés dans la procédure standard.

2.4 MS-PCR

Choix des amorces

Les amorces choisies permettent l'amplification sélective soit de l'ADN méthylé, reconnaissant ainsi des séquences où les cytosines situées dans les dinucléotides CG restent inchangées par rapport à la séquence native, soit au contraire de l'ADN non méthylé, toutes les cytosines ayant ainsi été transformées en uracile. Deux paires d'amorces sens et antisens sont choisies dans une région du promoteur de *RARβ2* contenant des dinucléotides CG (Eurogentec, Angers, France) [268], à l'aide du logiciel *Methprimer* (www.urogene.com/methprimer/). Les

1621 AATTC CCCCATGCGAGCTGTTTGAGGACTGGGATGCCGAGAACGCCAGCGATCCGAGCAG
 ||||:|:|:|++||:|||||||:|||||:++|||++++|++||:++||:|
 1621 AATTTTTTTATGCGAGTTGTTTGAGGATTGGGATTGTCGAGAACGCCAGCGATTCGAGTAG
 1621 AATTTTTTTATGTGAGTTGTTTGAGGATTGGGATGTTGAGAATGTGAGTGATTGAGTAG

1681 GGTGTGCTGGGCACCGTCGGGGTAGGATCCGGAACGCATTTCGGAAGGCTTTTTGCAAGC
 |||||:||||:|:++|++| |||||:++|||++: |||++|||:|||||:|:|:
 1681 GGTGTGTTTGGGTATCGTCGGGGTAGGATTCGGAACGTATTTCGGAAGGTTTTTTGTAAGT
 1681 GGTGTGTTTGGGTATTGTCGGGGTAGGATTTGGAATGTATTTCGGAAGGTTTTTTGTAAGT

1741 ATTTACTTGGAAGGAGAACTTGGGATCTTCTGGAACCCCCGCCCGGCTGGATTGGC
 |||||:||||||| |||||:|||:|||||:|:|:++:|:++|:|||||||:|:
 1741 ATTTATTTGGAAGGAGAAATTTGGGATTTTTTTTGGGAATTTTTTCGTTTCGGTTGGATTGGT
 1741 ATTTATTTGGAAGGAGAAATTTGGGATTTTTTTTGGGAATTTTTTGTGTTTGGTTGGATTGGT

1801 CGAGCAAGCCTGGAAAATGGTAAATGATCATTTGGATCAATTACAGGCTTTTAGCTGGCT
 ++||:|||:| ||||| ||||| |||||: |||||: |||||: |||: |||||: |||:|
 1801 CGAGTAAGTTTGGAAAATGGTAAATGATTATTTGGATTAATTATAGGTTTTTAGTTGGTT
 1801 TGAGTAAGTTTGGAAAATGGTAAATGATTATTTGGATTAATTATAGGTTTTTAGTTGGTT

Programme U :

- Démasquage de la Taq polymérase : 15 minutes à 95°C
- 40 cycles dénaturation-hybridation-élongation :
 - o Dénaturation : 45 secondes à 94°C
 - o Hybridation : 45 secondes à 60°C
 - o Elongation : 45 secondes à 72°C
- Elongation finale : 10 minutes à 72°C

Programme M :

- Démasquage de la Taq polymérase : 15 minutes à 95°C
- 40 cycles dénaturation-hybridation-élongation :
 - o Dénaturation : 45 secondes à 94°C
 - o Hybridation : 45 secondes à 55°C
 - o Elongation : 45 secondes à 72°C
- Elongation finale : 10 minutes à 72°C

Electrophorèse et révélation :

Les produits de PCR font l'objet d'une électrophorèse sur gel d'acrylamide à 8% : 2 mL d'acrylamide 40% (acrylamide-bis-acrylamide 19-1 mixture 40%, QBiogene), 1 mL de tampon Tris-Borate-EDTA (TBE 10X, Euromedex), 7mL d'eau, 80 µL de persulfate d'ammonium à 10%, 10 µL de tetramethylethylene-diamine 99% (Sigma-Aldrich Chemia GmbH). Une échelle de poids moléculaire est utilisée (50 bp DNA Step Ladder, Promega), diluée au 1/10^{ème}, ainsi que 3,3 µL de tampon de charge par puits (Blue/orange 6X Loading Dye, Promega). Après migration 1 heure dans une solution de TBE diluée au 1/10^{ème} (TBE 10X, Euromedex), la révélation repose sur une incubation 30 minutes dans une solution au 1/10000^{ème} de SYBR Gold nucleic acid gel stain (Invitrogen, Illkirch, France).

2.5 Pyroséquençage

Principe du pyroséquençage

Contrairement à la MS-PCR, le pyroséquençage permet une approche quantitative du taux de méthylation, sur des dinucléotides CG précis. Cette technique permet également de vérifier le taux de conversion pour chaque échantillon, dans la région séquencée, et évite ainsi les faux positifs. Après fixation de l'amorce de pyroséquençage au brin d'ADN à séquencer, des bases sont injectées selon un ordre prédéfini. L'incorporation d'une base (dans la continuité de l'amorce) entraîne la libération de phosphate, permettant la fabrication d'adénosine triphosphate (ATP) grâce à l'activité

d'une enzyme sulfurylase. L'ATP sert ensuite de substrat à une luciférase, émettant un signal lumineux capté par l'appareil. En cas d'incorporation successive de plusieurs bases, plusieurs phosphates sont libérés, et le signal lumineux est proportionnel à la quantité de bases incorporées. L'excès de bases et les métabolites sont ensuite éliminés, et une nouvelle base est injectée (figure 12). Les différents pics obtenus sont enregistrés et analysés à l'aide d'un logiciel dédié, permettant de déterminer la séquence, et de quantifier d'éventuelles variations de bases ciblées.

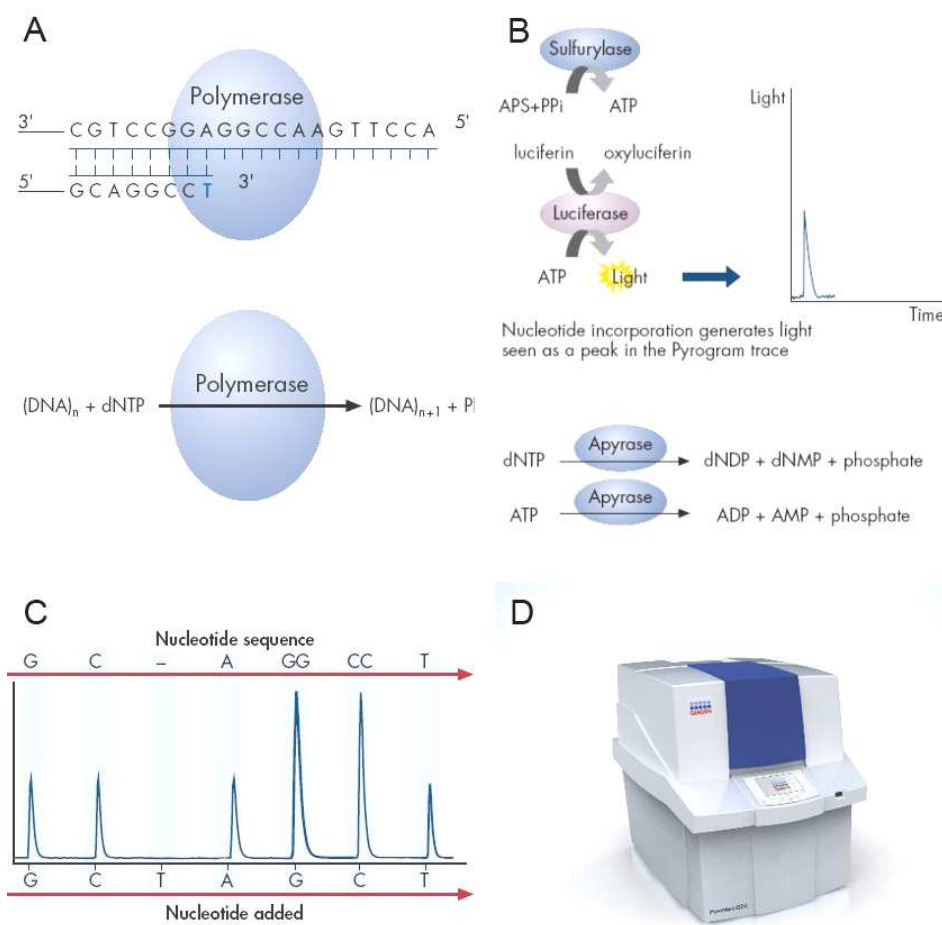


Figure 12. Principe du pyroséquençage. (A) L'incorporation d'une base entraîne la libération de phosphate. (B) Le phosphate permet la synthèse d'ATP grâce à une enzyme à activité sulfurylase. L'ATP sert de substrat à la luciférase, entraînant l'émission d'un pic. (C) La hauteur du pic est proportionnelle à la quantité de base incorporée à chaque injection. (D) Appareil Pyromark Q24 (Qiagen). Source : Qiagen (www.qiagen.com).

Protocole

La première étape, réalisée dans notre laboratoire, consiste à amplifier par PCR la région d'intérêt. Les amorces sens et antisens sont choisies en dehors des dinucléotides CG, afin d'amplifier

1621 AATCCCCCATGCGAGCTGTTTGAGGACTGGGATGCCGAGAACGCGAGCGATCCGAGCAG
 |||:::|++|:|||||||:|||||:++|||++++|++|:++|:|
 1621 AATTTTTTTATGCGAGTTGTTTGAGGATTGGGATGTGCGAGAACGCGAGCGATTTCGAGTAG
 1621 AATTTTTTTATGTGAGTTGTTTGAGGATTGGGATGTTGAGAATGTGAGTGATTGAGTAG
 TTGTTTGAGGATTGGGATGT→
 1681 GGTTTGTCTGGGCACCGTCGGGGTAGGATCCGGAACGCATTTCGGAAGGCTTTTTGCAAGC
 |||||:||||:|++|++|||||||:++|||++:|++||||:||||:|:
 1681 GGTTTGTGTTGGGTATCGTCGGGGTAGGATTTCGGAACGTATTTCGGAAGGTTTTTGTAAAGT
 1681 GGTTTGTGTTGGGTATGTCTGGGGTAGGATTGGAATGTATTGGAAGGTTTTTGTAAAGT
 1741 ATTTACTTGGAAGGAGAACTTGGGATCTTCTGGGAACCCCCGCCCCGGCTGGATTGGC
 ||||:|||||||:|||||:||:|||||::::++::++|:|||||||:
 1741 ATTTATTTGGAAGGAGAATTGGGATTTTTTTGGGAATTTTT**CGTTTCGGTTGGATTGGT**
 1741 ATTTATTTGGAAGGAGAATTGGGATTTTTTTGGGAATTTTT**TGTTTGGTTGGATTGGT**
 1801 CGAGCAAGCCTGGAAAATGGTAAATGATCATTGATCAATTACAGGCTTTTAGCTGGCT
 ++|:|:::|||||||:|||||||:||||:|:|:|:|:|:|:
 1801 **CGAGTA**AGTTTGGAAAATGGTAAATGATTATTGATTAATTATAGGTTTTTAGTTGGTT
 1801 **TGAGTA**AGTTTGGAAAATGGTAAATGATTATTGATTAATTATAGGTTTTTAGTTGGTT
 ←TTCAAACCTTTTACCATTCTACTAATAAAC

La PCR est réalisée à l'aide du kit Pyromark PCR (Qiagen, Courtabeuf, France), conformément aux instructions du constructeur. Les échantillons sont testés sur l'appareil PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Waltham, USA), en utilisant le programme suivant :

- 71

- o Hybridation : 30 secondes à 56°C
- o Elongation : 30 secondes à 72°C
- Elongation finale : 10 minutes à 72°C

A la fin de la PCR, la quantité d'ADN obtenue est évaluée grâce la migration sur un gel d'agarose à 2,5%, en utilisant un marqueur de poids moléculaire (Low DNA Mass Ladder, Invitrogen) et en déposant par puits 4 µL des 30 µL obtenus à la fin de la réaction.

L'amorce de pyroséquençage choisie est la même que l'amorce antisens de PCR, permettant en séquençant 23 bases de contrôler le taux de conversion et d'analyser trois dinucléotides CG (figure 13). La séquence d'injection des nucléotides est optimisée pour permettre la quantification de la conversion et de la méthylation des CG: C-G-A-C-T-A-C-A-G-A-C-A-T-C-A-T-C-A-A-G-A-T-C-A-A-G-A-A-T. La zone séquencée couvre les mêmes dinucléotides CG que l'amorce antisens de MS-PCR.

La suite des techniques est réalisée dans la plate-forme d'oncologie moléculaire InCa (Institut National du Cancer) de Dijon (Pr Piard). L'étape de purification des amplicons repose sur l'utilisation de la solution Pyromark Binding Buffer (Qiagen) et de billes de streptavidine Sepharose High Performance (GE Healthcare, Uppsala, Sweden), après agitation de 10 minutes puis utilisation du système d'aspiration sous vide dédié (Pyromark Vacuum Workstation, Qiagen), suivie de bains successifs de 5 à 10 secondes dans l'éthanol à 70°C, la solution Pyromark Denaturation Solution (Qiagen) et le tampon Pyromark Wash Buffer (Qiagen), conformément aux instructions du constructeur. L'hybridation de l'amorce de pyroséquençage à l'amplicon purifié est obtenue après dénaturation 2 minutes à 80°C, et agitation 5 minutes à température ambiante, en utilisant le tampon Pyromark Annealing Buffer (Qiagen). Après préparation de la cartouche d'injection comportant les enzymes, les substrats et les nucléotides (Pyromark Gold Q24 Reagents, Qiagen), le pyroséquençage est réalisé sur l'appareil PyroMark Q24 (Qiagen). L'analyse des données est réalisée à l'aide du logiciel PyroMark Q24 1.0.10.

L'indice de méthylation est la moyenne des taux mesurés pour chacun des 3 nucléotides CG. Un échantillon est considéré comme méthylé si l'indice est supérieur ou égal à 6%, sous réserve d'un taux de conversion supérieur à 95%.

Mesure du taux de conversion d'une séquence externe au promoteur de RARβ2 avec comparaison des deux techniques de conversion de l'ADN

Afin d'évaluer l'efficacité globale de la conversion et de comparer l'efficacité des deux techniques de conversion de l'ADN (classique [3,6M en bisulfite] vs solution à haute concentration

[10M]), une réaction de PCR a été développée. Elle amplifie une séquence de 63 nucléotides (position 17632946 à 17633008, GRCh37, chromosome 11), dépourvue de dinucléotides CG. Contrairement aux amorces choisies pour la PCR de pyroséquençage pour l'analyse du promoteur de *RARβ2*, les amorces de PCR ne contiennent pas de cytosine dans le brin sens : la PCR est ainsi indépendante de l'efficacité de conversion et de la méthylation. La séquence amplifiée comporte trois répétitions de deux cytosines (hors CG) dont le séquençage permet de quantifier la conversion.

Les amorces utilisées sont les suivantes :

- Amorce sens de PCR : 5' AGATGAGGGATGGGTGG 3'
- Amorce anti-sens de PCR : biotine-CACTCATCCCCAATCCTCT 3'
- Amorce de séquençage : 5' GAGGGATGGGTGGA 3'

Si la conversion de l'ADN est efficace, les 6 cytosines présentes sont converties en uraciles, et sont remplacées par des thymines dans les brins générés après PCR.

Cette technique de vérification du taux de conversion a été réalisée sur 5 échantillons convertis avec les deux techniques. La réaction de PCR est réalisée à partir de 1µL d'ADN converti, à l'aide du kit Pyromark PCR (Qiagen). Le pyroséquençage est réalisé selon le même protocole que pour l'analyse du statut de méthylation, en optimisant la séquence d'injection des nucléotides pour permettre l'analyse de 2 paires de cytosines : T-G-C-T-C-A-T-G-C-T-C-A.

Enfin, l'analyse du statut de méthylation du promoteur de *RARβ2* est réalisée à partir de 7 échantillons (dont deux témoins), convertis chacun selon les deux techniques, afin de comparer les résultats obtenus en pyroséquençage en fonction de la technique de conversion utilisée.

2.4 Analyse statistique

L'analyse statistique est réalisée à l'aide des tests précédemment décrits (cf. 1.4).

3. Analyse de l'exon 15 de *BRAF*

3.1 Sélection du matériel tumoral

La recherche de la mutation T1799A du gène *BRAF* est recherchée dans 33 cas, dont 19 carcinomes papillaires et 14 carcinomes indifférenciés/anaplasiques. A titre de témoin négatif, 10

parenchymes thyroïdiens sains sont également testés. La technique est effectuée avec l'ADN extrait sur bloc de paraffine (cf. II.2.2).

3.2 Séquençage

Le séquençage est réalisé dans le service de Génétique (CHU de Nancy), à l'aide de l'analyseur génétique ABI 3130 (Applied Biosystems, Foster City, USA), en utilisant 0,05 µg d'ADN par échantillon. Ce séquenceur, reposant sur une automatisation de la technique de Sanger, comporte un système d'électrophorèse à 4 capillaires et de détection multicanaux. La réaction de séquençage produite par PCR génère des fragments porteurs de fluorophores terminaux, le rapport entre didésoxyribonucléotides et désoxyribonucléotides étant optimisé de telle façon que statistiquement toutes les copies intermédiaires de la séquence étudiée sont synthétisés. L'intégration de didésoxyribonucléotide empêche en effet la poursuite de la polymérisation, et à chaque type de didésoxyribonucléotide est associé un fluorophore spécifique. Après injection électrocinétique des fragments d'ADN, ces derniers sont soumis à électrophorèse, les différents fragments générés migrant plus ou moins vite en fonction de leur taille. La migration des fragments fluorescents au travers d'une cellule de détection permet au système optique du séquenceur (laser et caméra CCD) de mesurer la fluorescence de chacun de ces fragments et de transmettre ces informations à l'ordinateur.

La première PCR a pour but d'amplifier la région d'intérêt à séquencer, dans l'exon 15 de BRAF, en utilisant les amorces suivantes :

- Amorce sens : 5' TGCTTGCTCTGATAGGAAAATG 3'
- Amorce anti-sens : 5' GTAACCTAGCAGCATCTCAGGG 3'

Le mélange de PCR comporte 0,05 µg d'ADN, 1 U de AmpliTaq Gold (Applied Biosystems), 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de chaque dNTP, 1X de Gold Buffer (Applied Biosystems) et 0,4 µM de chaque amorce. Les paramètres de PCR sont les suivants :

- Démasquage de la Taq polymérase : 10 minutes à 95°C
- 40 cycles dénaturation-hybridation-élongation :
 - o Dénaturation : 30 secondes à 95°C
 - o Hybridation : 30 secondes à 54°C
 - o Elongation : 45 secondes à 72°C
- Elongation finale : 7 minutes à 72°C

Les produits de PCR sont purifiés à l'aide du système Exosap-IT (GE Healthcare), conformément aux instructions. La PCR de séquençage est réalisée avec le kit Big Dye Terminator v1.1 CycleSeq Kit (Applied Biosystems), puis les produits sont purifiés avec le kit Sephadex G50 (GE Healthcare) avant réalisation du séquençage.

La séquence de référence, d'après les recommandations de la HGVS (Human Genome Variation Society), est la suivante : NM_004333.4(BRAF).

3.3 Analyse statistique

L'analyse statistique est réalisée à l'aide des tests précisés plus haut (cf. 1.4). On recherche une corrélation entre la mutation de *BRAF* et les principaux paramètres clinico-pathologiques, les anomalies d'expression immunohistochimique et le statut de méthylation de *RARβ2*.

III. Résultats

1. Etude immunohistochimique de RAR α , RAR β , RXR α et RXR β

Les résultats sont reportés dans le tableau 6 (résultats par type histologique). L'étude immunohistochimique est interprétable dans 89% (77/87) des cas pour RAR α , 98% (85/87) pour RAR β , 97% (84/87) pour RXR α et 89% (77/87) pour RXR β . Dans les cas non analysables, on n'obtient pas de signal significatif dans le parenchyme sain ni dans le stroma tumoral, ne permettant alors pas l'analyse comparative des structures tumorales.

RAR α

Dans le tissu sain, l'expression de RAR α est nucléaire, et s'accompagne fréquemment d'un signal cytoplasmique de faible intensité (figure 15A).

L'expression de RAR α (figure 14) est anormale (expression nucléaire diminuée ou expression cytoplasmique exclusive) dans 61% (11/18) des adénomes, et dans 76% (45/59) des carcinomes (figure 15B), le plus souvent par séquestration cytoplasmique (64% : 38/59). On note un taux significativement plus élevé d'expression anormale dans les carcinomes bien différenciés (papillaires et vésiculaires ; 86% : 38/44) que dans les carcinomes indifférenciés/anaplasiques (47% : 7/15) ($p=0,006$). Il n'y a pas de différence significative entre carcinome papillaire et carcinome vésiculaire ($p=0,13$).

Les anomalies d'expression ne pas sont significativement plus fréquentes dans les carcinomes que les adénomes ($p=0,33$), cependant en limite de significativité pour les carcinomes bien différenciés ($p=0,06$). La présence d'une expression anormale de RAR α a pour le diagnostic de carcinome vésiculaire une VPP de 48%, une VPN de 64%, une sensibilité de 71% et une spécificité de 39%, et pour le diagnostic de carcinome bien différencié une VPP de 78%, une VPN de 54%, une sensibilité de 86% et une spécificité de 39%.

Il n'y a pas de corrélation significative entre les anomalies d'expression de RAR α et la taille de la tumeur ($p=0,48$), la présence de métastase ganglionnaire ($p=0,89$), de métastase viscérale ($p=0,54$) ou d'effraction capsulaire ($p=0,35$).

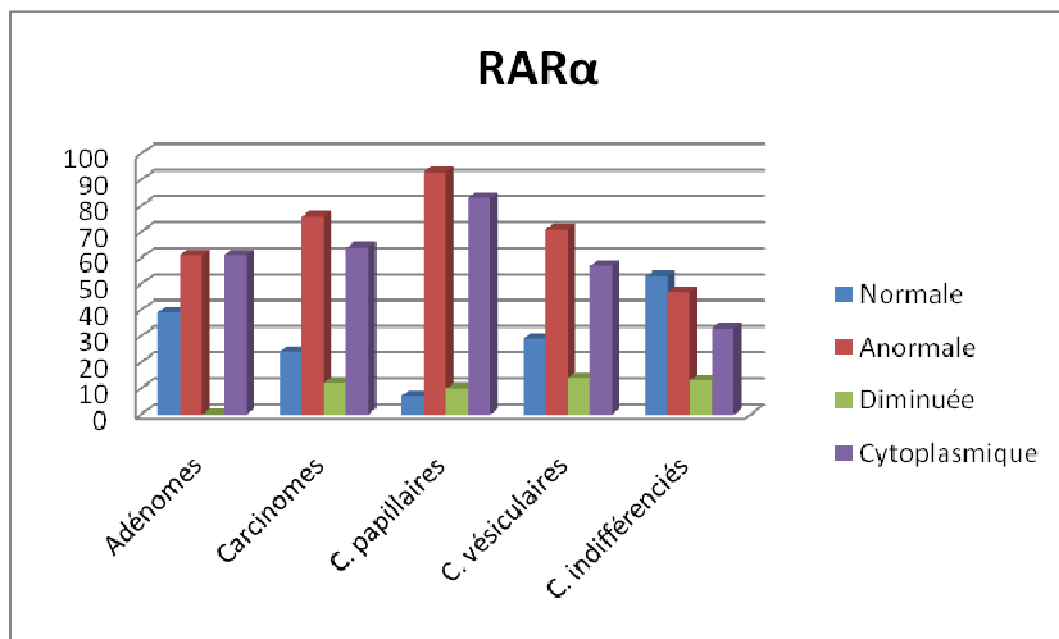


Figure 14. Expression immunohistochimique de RAR α (exprimée en pourcentage rapporté au total des cas analysables).

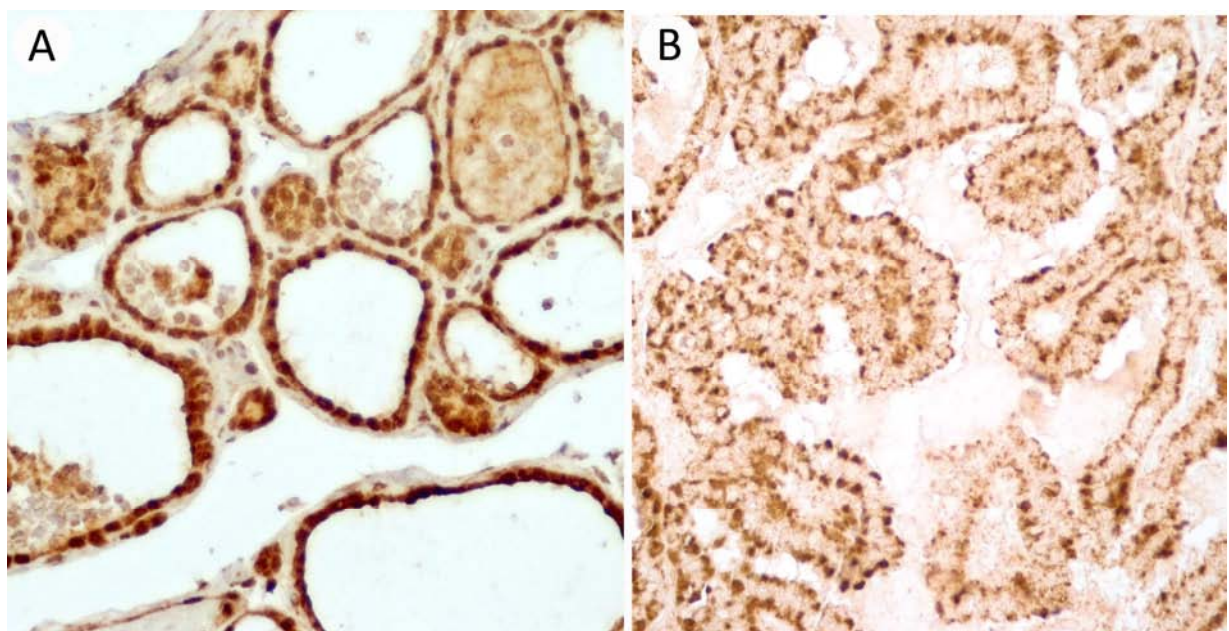


Figure 15. Immunohistochimie, RAR α . (A) Parenchyme normal : expression nucléaire prédominante de RAR α . (B) Carcinome papillaire : expression cytoplasmique de RAR α (immunohistochimie avec amplification tyramine-biotine, x400).

RAR β

Dans le tissu sain, l'expression de RAR β est constamment nucléaire (figure 17A).

On constate un signal normal pour RAR β (figure 16) dans 83% des adénomes (15/18), 2 cas présentant une séquestration cytoplasmique, et un cas une baisse d'expression nucléaire. L'expression de RAR β est anormale dans 67% des carcinomes (45/67) (figure 17B), principalement par diminution de l'expression nucléaire (60% : 40/67).

Le taux d'expression anormale (expression nucléaire diminuée ou expression cytoplasmique exclusive) de RAR β est significativement plus élevé pour les carcinomes bien différenciés (82% : 41/50) que pour les carcinomes indifférenciés/anaplasiques (24% : 4/17) ($p < 0,0001$). Il n'y a pas de différence significative entre carcinome papillaire et carcinome vésiculaire ($p = 0,69$).

Les anomalies d'expression sont significativement plus fréquentes dans les carcinomes que dans les adénomes ($p < 0,0005$), et en particulier dans les carcinomes vésiculaires que dans les adénomes ($p < 0,0001$). La présence d'une expression anormale de RAR β a pour le diagnostic de carcinome vésiculaire une VPP de 81%, une VPN de 94%, une sensibilité de 93% et une spécificité de 83%, et pour le diagnostic de carcinome bien différencié une VPP de 93%, une VPN de 63%, une sensibilité de 82% et une spécificité de 83%.

Il n'y a pas de corrélation significative entre les anomalies d'expression de RAR β et la taille de la tumeur ($p = 0,34$), la présence de métastase ganglionnaire ($p = 0,09$), de métastase viscérale ($p = 0,64$) ou d'effraction capsulaire ($p = 0,09$).

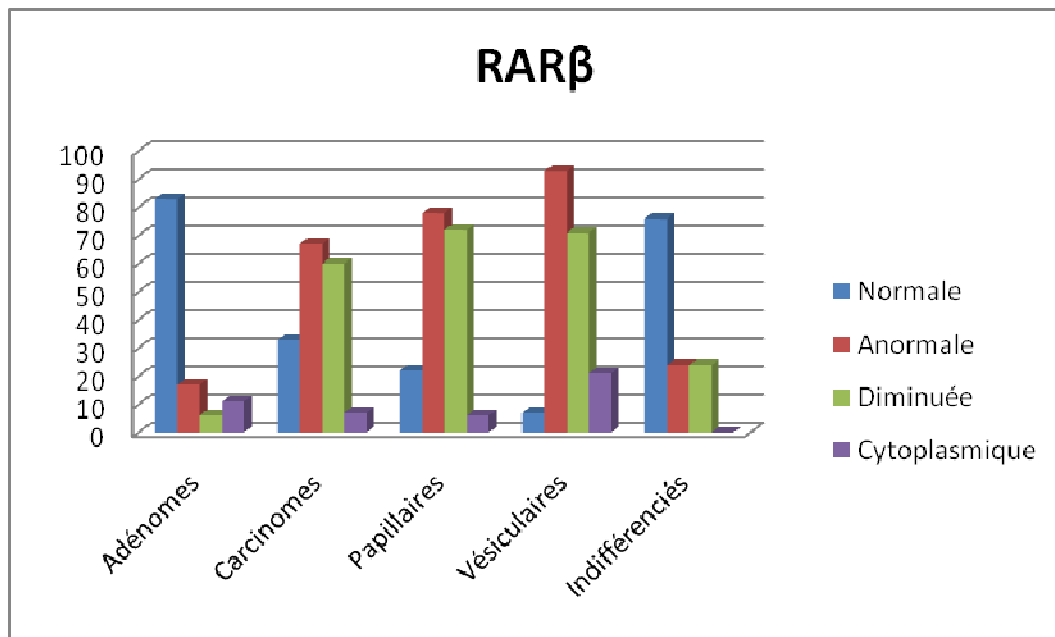


Figure 16. Expression immunohistochimique de RAR β (exprimée en pourcentage rapporté au total des cas analysables).

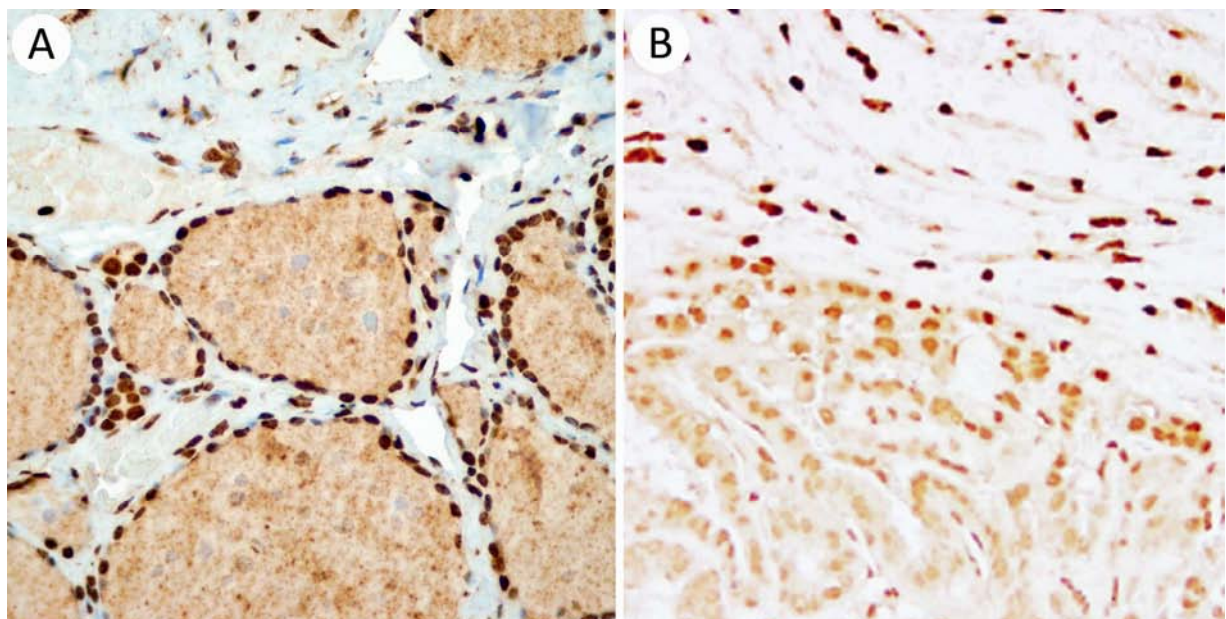


Figure 17. Immunohistochimie, RAR β . (A) Tissue sain : expression nucléaire intense de RAR β (contre-coloration hématoxyline). (B) Carcinome papillaire : baisse de l'expression nucléaire dans les cellules tumorales (en bas), par rapport aux cellules fibroblastiques (en haut). L'absence de contre-coloration facilite l'analyse de l'intensité du signal nucléaire (immunohistochimie avec amplification tyramine-biotine, x400).

RXR α

Dans le tissu sain, l'expression de RXR α est constamment nucléaire.

L'expression de RXR α (figure 18) est normale dans 78% (14/18) des adénomes (figure 19A), et anormale (expression nucléaire diminuée ou expression cytoplasmique exclusive) dans 65% (43/66) des carcinomes (figure 19B), majoritairement par baisse ou absence d'expression nucléaire (54% : 36/66). Il n'y a pas de différence significative entre les différents types de carcinome ($p>0,5$).

Il y a significativement plus d'anomalies d'expression de RXR α dans les carcinomes que dans les adénomes ($p=0,003$), et en particulier dans les carcinomes vésiculaires que dans les adénomes ($p=0,03$). Pour le diagnostic de carcinome vésiculaire, l'expression anormale de RXR α a une VPP de 69%, une VPN de 74%, une sensibilité de 64% et une spécificité de 78%, et pour le diagnostic de carcinome bien différencié une VPP de 89%, une VPN de 45%, une sensibilité de 65% et une spécificité de 78%.

Il n'y a pas de corrélation significative entre les anomalies d'expression de RXR α et la taille de la tumeur ($p=0,8$), la présence de métastase ganglionnaire ($p=0,22$), de métastase viscérale ($p=0,09$) ou d'effraction capsulaire ($p=0,8$).

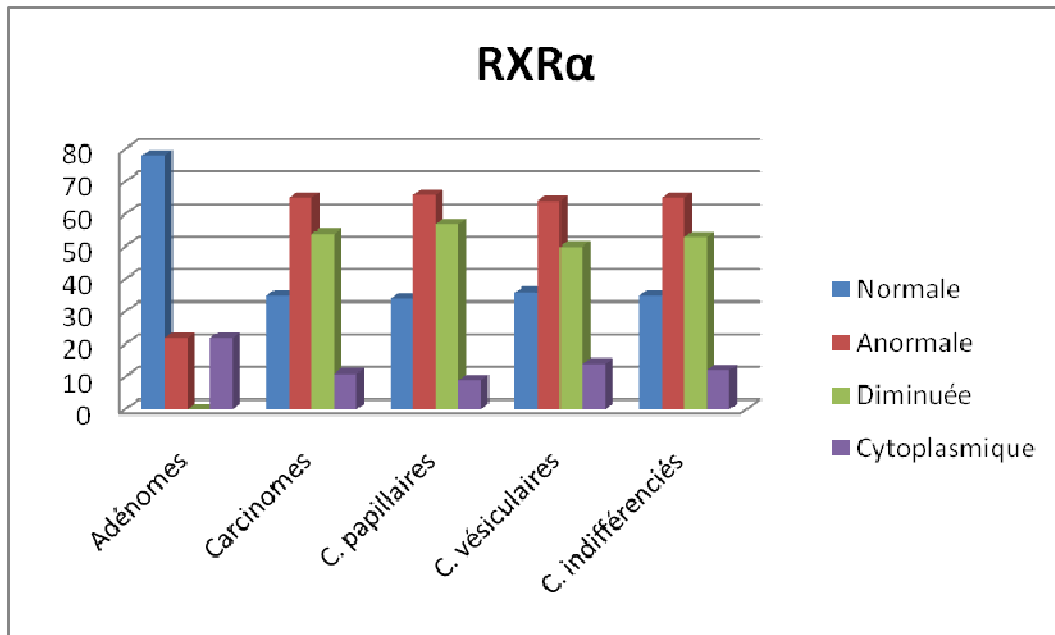


Figure 18. Expression immunohistochimique de RXR α (exprimée en pourcentage rapporté au total des cas analysables).

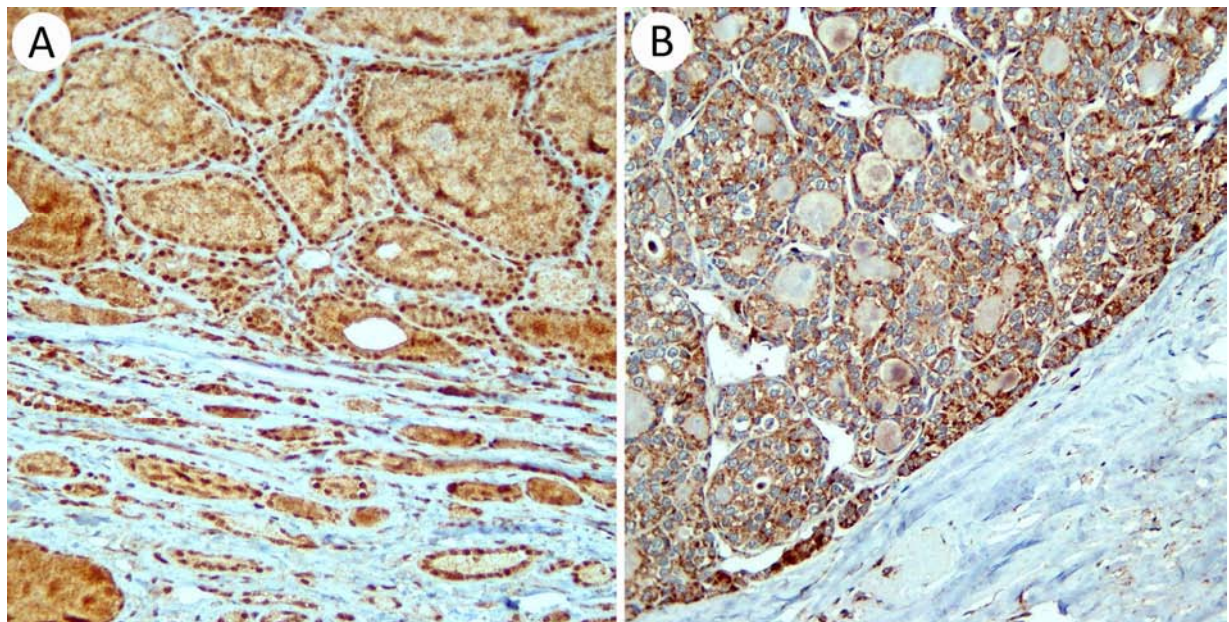


Figure 19. Immunohistochimie, RXR α . (A) Adénome vésiculaire : expression nucléaire conservée de RXR α dans l'adénome (en haut), comparativement au parenchyme normal (en bas). (B) Carcinome vésiculaire : expression cytoplasmique de RXR α dans les cellules tumorales (immunohistochimie avec amplification tyramine-biotine, contre-coloration hématoxyline, x200).

RXR β

Dans le tissu sain, l'expression de RXR β est variable, de type mixte nucléaire et cytoplasmique, ou dans plus de deux tiers des cas exclusivement cytoplasmique.

L'expression de RXR β (figure 20) est anormale dans 83% (15/18) des adénomes (figure 21A), (78% : 14/18), et dans 81% (48/59) des carcinomes, principalement par séquestration cytoplasmique (figure 21B). Il n'y a pas de différence significative entre les différents types de carcinome.

Le taux d'expression anormale de RXR β est significativement plus élevé pour les carcinomes bien différenciés (91% : 41/45) que pour les carcinomes indifférenciés/anaplasiques (46% : 6/13) ($p=0,001$). Il n'y a pas de différence significative entre carcinome papillaire et carcinome vésiculaire ($p=0,09$).

Il n'y a pas de différence significative entre adénome et carcinome ($p=0,09$).

Il n'y a pas de corrélation significative entre les anomalies d'expression de RXR β et la taille de la tumeur ($p=0,21$), la présence de métastase ganglionnaire ($p=0,11$), de métastase viscérale ($p=0,12$) ou d'effraction capsulaire ($p=0,29$). Il y a cependant significativement moins souvent de séquestration cytoplasmique en cas de métastase ganglionnaire ($p=0,025$).

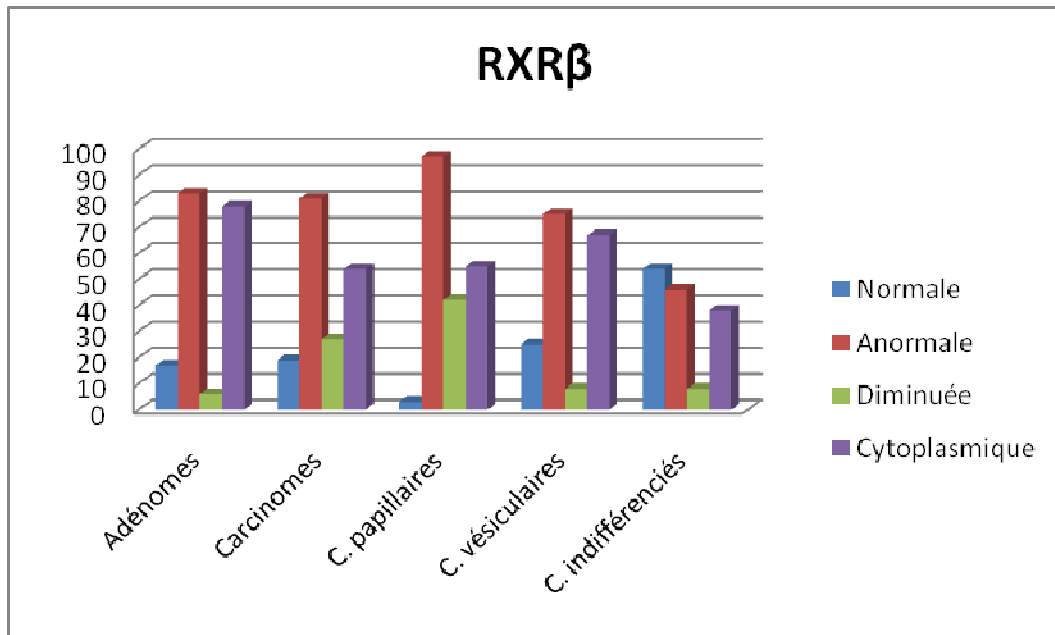


Figure 20. Expression immunohistochimique de RXR β (exprimée en pourcentage rapporté au total des cas analysables).

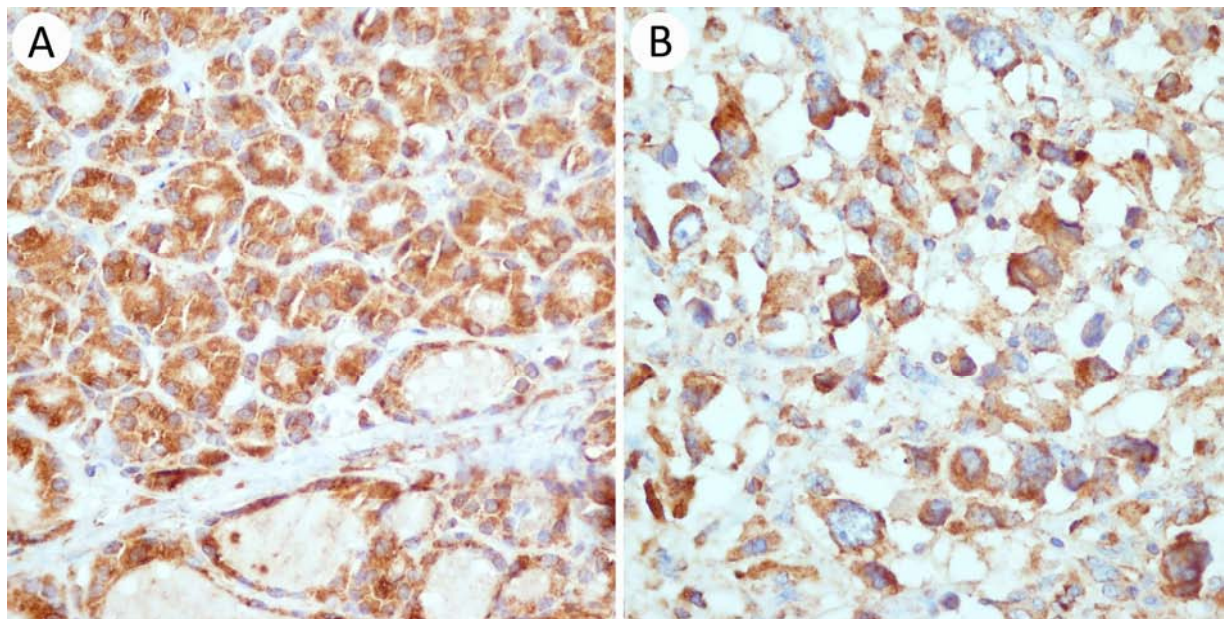


Figure 21. Immunohistochimie, RXR β . (A) Adénome vésiculaire : expression cytoplasmique de RXR β dans l'adénome vésiculaire (en haut), mais également dans le parenchyme normal (en bas). (B) Carcinome indifférencié/anaplasique : signal cytoplasmique (immunohistochimie avec amplification tyramine-biotine, contre-coloration hématoxyline, x400).

Performances diagnostiques de l'utilisation combinée des différents anticorps

Les performances diagnostiques (VPP, VPN, sensibilité, spécificité) des différents anticorps, seuls ou en association, pour le diagnostic de carcinome vésiculaire, de carcinome papillaire et de carcinome bien différencié (papillaire ou vésiculaire) sont rapportés dans les tableaux 3, 4 et 5. En raison de sa très faible spécificité (17%), RXR β n'a pas été pris en compte dans les combinaisons des différents anticorps.

En pratique diagnostique, la meilleure combinaison semble l'utilisation des anticorps anti-RAR β et -RXR α : en retenant comme critère de malignité la présence d'une expression anormale pour au moins un des deux récepteurs, la sensibilité et la spécificité sont respectivement de 100% et 72% pour le diagnostic de carcinome vésiculaire, et de 94% et 72% pour le diagnostic de carcinome bien différencié (papillaire ou vésiculaire).

Performances diagnostiques	RAR α	RAR β	RXR α	RXR β	Combinaison RAR β et RXR α		Combinaison RAR α , RAR β et RXR α		
					1/2	2/2	1/3	2/3	3/3
VPP (IC 95%)	48% (26-70)	81% (54-96)	69% (39-91)	38% (19-59)	74% (49-91)	80% (70-99)	54% (33-73)	71% (42-92)	78% (40-97)
VPN (IC 95%)	64% (31-89)	94% (70-100)	74% (49-91)	50% (12-88)	100% (75-100)	73% (50-89)	100% (54-100)	78% (52-94)	70% (47-87)
Sensibilité (IC 95%)	71% (42-92)	93% (66-100)	64% (35-87)	75% (43-95)	100% (77-100)	57% (29-82)	100% (77-100)	71% (42-92)	50% (23-77)
Spécificité (IC 95%)	39% (17-64)	83% (59-96)	78% (52-94)	17% (4-41)	72% (47-90)	89% (65-99)	33% (13-59)	78% (52-94)	89% (65-99)

Tableau 3. Carcinome vésiculaire. Performances diagnostiques des différents anticorps pour le diagnostic de carcinome vésiculaire, seuls ou en association : une expression anormale (baisse d'expression nucléaire ou séquestration cytoplasmique) est retenue comme critère de malignité. 1/2 : signal anormal constaté pour l'un des deux récepteurs ; 2/2 : pour les deux récepteurs ; 1/3 : pour un récepteur sur trois ; 2/3 : pour deux récepteurs sur trois ; 3/3 : pour les trois récepteurs.

Performances diagnostiques	RAR α	RAR β	RXR α	RXR β	Combinaison RAR β et RXR α		Combinaison RAR α , RAR β et RXR α		
					1/2	2/2	1/3	2/3	3/3
VPP (IC 95%)	72% (55-85)	90% (74-98)	85% (66-96)	68% (53-81)	86% (70-95)	90% (70-99)	68% (50-82)	86% (67-96)	87% (60-98)
VPN (IC 95%)	78% (40-97)	65% (43-84)	54% (33-73)	75% (19-99)	81% (54-96)	55% (36-74)	86% (42-100)	88% (62-98)	55% (36-74)
Sensibilité (IC 95%)	93% (78-99)	78% (61-90)	66% (48-81)	97% (84-100)	91% (76-98)	59% (41-76)	96% (80-100)	92% (75-99)	50% (30-70)
Spécificité (IC 95%)	39% (17-64)	83% (59-96)	78% (52-94)	17% (4-41)	72% (47-90)	89% (65-99)	33% (13-59)	78% (52-94)	89% (65-99)

Tableau 4. Carcinome papillaire. Performances diagnostiques des différents anticorps pour le diagnostic de carcinome papillaire, seuls ou en association : une expression anormale (baisse d'expression nucléaire ou séquestration cytoplasmique) est retenue comme critère de malignité. 1/2 : signal anormal constaté pour l'un des deux récepteurs ; 2/2 : pour les deux récepteurs ; 1/3 : pour un récepteur sur trois ; 2/3 : pour deux récepteurs sur trois ; 3/3 : pour les trois récepteurs.

Performances diagnostiques	RAR α	RAR β	RXR α	RXR β	Combinaison RAR β et RXR α		Combinaison RAR α , RAR β et RXR α		
					1/2	2/2	1/3	2/3	3/3
VPP (IC 95%)	78% (63-88)	93% (81-99)	89% (74-97)	73% (60-84)	90% (78-97)	93% (77-99)	76% (63-87)	89% (75-97)	91% (71-99)
VPN (IC 95%)	54% (25-81)	63% (41-81)	45% (27-64)	43% (4-71)	81% (54-96)	46% (29-63)	86% (42-100)	70% (46-88)	44% (28-62)
Sensibilité (IC 95%)	86% (73-95)	82% (69-91)	65% (50-78)	91% (79-98)	94% (82-99)	59% (43-73)	98% (87-100)	85% (70-94)	50% (34-66)
Spécificité (IC 95%)	39% (17-64)	83% (59-96)	78% (52-94)	17% (4-41)	72% (47-90)	89% (65-99)	33% (13-59)	78% (52-94)	89% (65-99)

Tableau 5. Carcinome bien différencié. Performances diagnostiques des différents anticorps pour le diagnostic de carcinome bien différencié (papillaire ou vésiculaire), seuls ou en association : une expression anormale (baisse d'expression nucléaire ou séquestration cytoplasmique) est retenue comme critère de malignité. 1/2 : signal anormal constaté pour l'un des deux récepteurs ; 2/2 : pour les deux récepteurs ; 1/3 : pour un récepteur sur trois ; 2/3 : pour deux récepteurs sur trois ; 3/3 : pour les trois récepteurs.

Corrélation entre les profils d'expression des différents récepteurs

On constate une corrélation significative entre les anomalies d'expression de RAR β et de RXR α ($p=0,03$), entre RAR α et RXR β ($p=0,001$) et, en limite de significativité, entre RAR α et RAR β ($p=0,05$). Il n'a pas de corrélation significative entre les autres anticorps ($p>0,1$).

Expression	Type	RAR α	RAR β	RXR α	RXR β
Normale	Adénomes	7 (39%)	15 (83%)	14 (78%)	3 (17%)
	Carcinomes	14 (24%)	22 (33%)	23 (35%)	11 (19%)
	Papillaires	2 (7%)	8 (22%)	12 (34%)	1 (3%)
	Vésiculaires	4 (29%)	1 (7%)	5 (36%)	3 (25%)
	Indifférenciés	8 (53%)	13 (76%)	6 (35%)	7 (54%)
Anormale	Adénomes	11 (61%)	3 (17%)	4 (22%)	15 (83%)
	Carcinomes	45 (76%)	45 (67%)	43 (65%)	48 (81%)
	Papillaires	28 (93%)	28 (78%)	23 (66%)	32 (97%)
	Vésiculaires	10 (71%)	13 (93%)	9 (64%)	9 (75%)
	Indifférenciés	7 (47%)	4 (24%)	11 (65%)	6 (46%)
Diminuée	Adénomes	0 (0%)	1 (6%)	0 (0%)	1 (6%)
	Carcinomes	7 (12%)	40 (60%)	36 (54%)	16 (27%)
	Papillaires	3 (10%)	26 (72%)	20 (57%)	14 (42%)
	Vésiculaires	2 (14%)	10 (71%)	7 (50%)	1 (8%)
	Indifférenciés	2 (13%)	4 (24%)	9 (53%)	1 (8%)
Séquestration cytoplasmique	Adénomes	11 (61%)	2 (11%)	4 (22%)	14 (78%)
	Carcinomes	38 (64%)	5 (7%)	7 (11%)	32 (54%)
	Papillaires	25 (83%)	2 (6%)	3 (9%)	18 (55%)
	Vésiculaires	8 (57%)	3 (21%)	2 (14%)	8 (67%)
	Indifférenciés	5 (33%)	0 (0%)	2 (12%)	5 (38%)
Total des cas analysables	Total	77 (89%)	85 (98%)	84 (97%)	77 (89%)
	Adénomes	18 (100%)	18 (100%)	18 (100%)	18 (100%)
	Carcinomes	59 (86%)	67 (97%)	66 (96%)	59 (84%)
	Papillaires	30 (79%)	36 (95%)	35 (92%)	33 (87%)
	Vésiculaires	14 (100%)	14 (100%)	14 (100%)	12 (86%)
	Indifférenciés	15 (88%)	17 (100%)	17 (100%)	13 (77%)

Tableau 6. Expression immunohistochimique de RAR α , RAR β , RXR α et RXR β en fonction du type histologique. Les pourcentages sont rapportés au total des cas analysables.

2. Détermination du statut de méthylation de *RARβ2*

2.1 MS-PCR

Technique classique de conversion

Parmi les 49 cas de carcinomes testés, 47 sont analysables : dans 2 cas, aucune amplification n'est retrouvée au terme de la MS-PCR.

On constate une méthylation du promoteur de *RARβ2* dans 20% (2/10) des parenchymes thyroïdiens sains testés (figure 22), se caractérisant par l'apparition d'une faible bande en M. Une faible bande en M est également mise en évidence dans certains échantillons de parenchyme pulmonaire sain de patient non fumeur, utilisés comme témoin négatif, dans un tiers des séries de MS-PCR. Une méthylation est retrouvée dans l'ensemble des séries pour le témoin positif (carcinome pulmonaire).

Une méthylation du promoteur de *RARβ2* est mise en évidence dans 50% (9/18) des adénomes vésiculaires (figure 22).

Une méthylation du promoteur de *RARβ2* est détectée dans 55% (26/47) des carcinomes (figure 23) :

- Carcinomes papillaires : 56% (10/18)
- Carcinomes vésiculaires : 46% (6/13)
- Carcinomes indifférenciés/anaplasiques : 62% (10/16)

Il n'y a pas de corrélation significative entre le statut de méthylation de *RARβ2* et les anomalies d'expression immunohistochimique de *RARβ* ($p>0,5$).

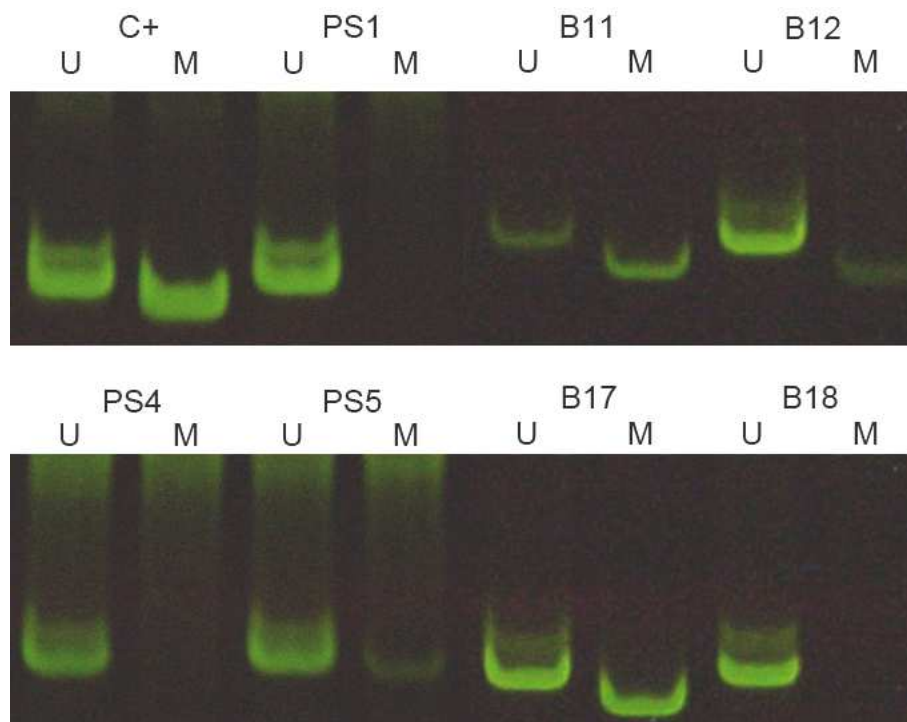


Figure 22. MS-PCR. Tissu thyroïdien sain et adénomes. Présence d'une bande M témoignant d'une méthylation du promoteur de *RARβ2* dans les échantillons PS5, B11, B12 et B17, absence de méthylation pour les autres échantillons. C+ : contrôle positif (carcinome épidermoïde pulmonaire). PS : parenchyme thyroïdien normal. B : adénome vésiculaire. U : amorce non méthylée. M : amorce méthylée.

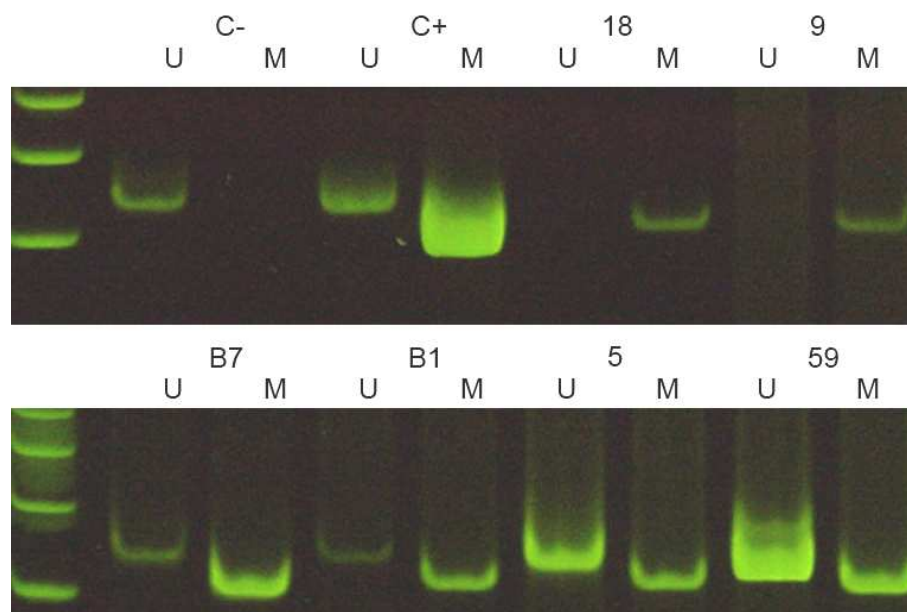


Figure 23. MS-PCR. Carcinomes et adénomes. Présence d'une méthylation du promoteur de *RARβ2* dans les cas 18 (carcinome papillaire), 9 (carcinome papillaire), B7 (adénome vésiculaire), B1 (adénome vésiculaire), 5 (carcinome papillaire) et 59 (carcinome indifférencié/anaplasique). C- : contrôle négatif (parenchyme pulmonaire sain de patient non fumeur). C+ : contrôle positif (carcinome épidermoïde pulmonaire). U : amorce non méthylée. M : amorce méthylée.

Conversion à haute concentration de bisulfite

Dans les deux séries de MS-PCR réalisées, le témoin négatif ne présente pas de bande de méthylation, et le témoin positif présente une hyperméthylation du promoteur de *RARβ2*.

Parmi les 11 carcinomes testés, on constate en MS-PCR une méthylation dans 27% (3/11) des cas :

- Carcinomes papillaires : 50% (2/4)
- Carcinomes vésiculaires : 0% (0/4)
- Carcinomes indifférenciés/anaplasiques : 33% (1/3)

33% (1/3) des adénomes présentent une hyperméthylation de *RARβ2*.

Les 4 cas positifs en MS-PCR avec cette technique de conversion le sont aussi avec la technique classique (tableau 7). Parmi les 10 cas négatifs, 8 comportent une bande de méthylation avec la technique classique de conversion.

Echantillon	Type	Technique classique		Conversion à haute concentration	
		Statut	Intensité	Statut	Intensité
9	pap	M	3	M	3
18	pap	M	3	M	1
31	pap	M	1	U	0
35	pap	M	2	U	0
48	ana	M	3	U	0
51	ves	M	3	U	0
55	ves	M	3	U	0
56	ves	M	2	U	0
60	ana	M	2	M	1
65	ana	M	3	U	0
70	ves	U	0	U	0
B10	adé	U	0	U	0
B13	adé	M	2	U	0
B18	adé	M	2	M	1

Tableau 7. Comparaison des résultats obtenus en MS-PCR en fonction de la technique de conversion utilisée. pap : carcinome papillaire ; ana : carcinome indifférencié/anaplasique ; ves : carcinome vésiculaire ; adé : adénome vésiculaire. M : méthylation. U : absence de méthylation.

2.2 Pyroséquençage

Statut de méthylation de RAR β 2

68 échantillons sont analysables (41 carcinomes, 18 adénomes et 9 tissus sains) : pour les 9 échantillons non analysables (8 carcinomes, 1 tissu sain), la quantité d'ADN est trop faible, ne permettant pas d'obtenir des pics de hauteur suffisante.

Le taux moyen de conversion dans la séquence analysée est de 97% (min : 92%, max : 99%).

Les deux cas de carcinomes pulmonaires testés comme témoins positifs présentent une hyperméthylation du promoteur de *RAR β 2*, au contraire du témoin négatif (figure 24).

On ne constate de méthylation du promoteur de *RAR β 2* dans aucun des tissus sains (0/9) ou des adénomes (0/18).

Seuls 2 (2,5%) des 41 carcinomes analysables en pyroséquençage présentent une méthylation du promoteur de *RAR β 2* (figure 25) :

- Carcinomes papillaires : 0% (0/15)
- Carcinomes vésiculaires : 0% (0/12)
- Carcinomes indifférenciés/anaplasiques : 14% (2/14, cas n°60 et 63)

Le cas n°60 présente un indice de méthylation de 6% (taux de conversion : 96% ; CG : 7%, 3% et 8%), et le cas n°63 un indice de méthylation de 32% (taux de conversion : 98% ; CG : 36%, 27% et 32%).

Il n'y a pas de différence significative entre carcinomes bien différenciés et carcinomes indifférenciés/anaplasiques ($p=0,13$).

Parmi les 35 cas testés en MS-PCR (conversion classique) présentant une bande de méthylation, la méthylation du promoteur de *RAR β 2* n'est confirmée en pyroséquençage que dans 2 cas : le taux de faux positifs en MS-PCR est de 94%, et de faux négatifs de 0% (sensibilité : 100% ; spécificité : 6%). Il n'y a de méthylation que dans un des 4 cas positifs en MS-PCR avec la technique de conversion à haute concentration.

Les 2 cas de carcinome indifférencié/anaplasique avec méthylation du promoteur de *RAR β 2* ne présentent pas de baisse d'expression de *RAR β* en immunohistochimie.

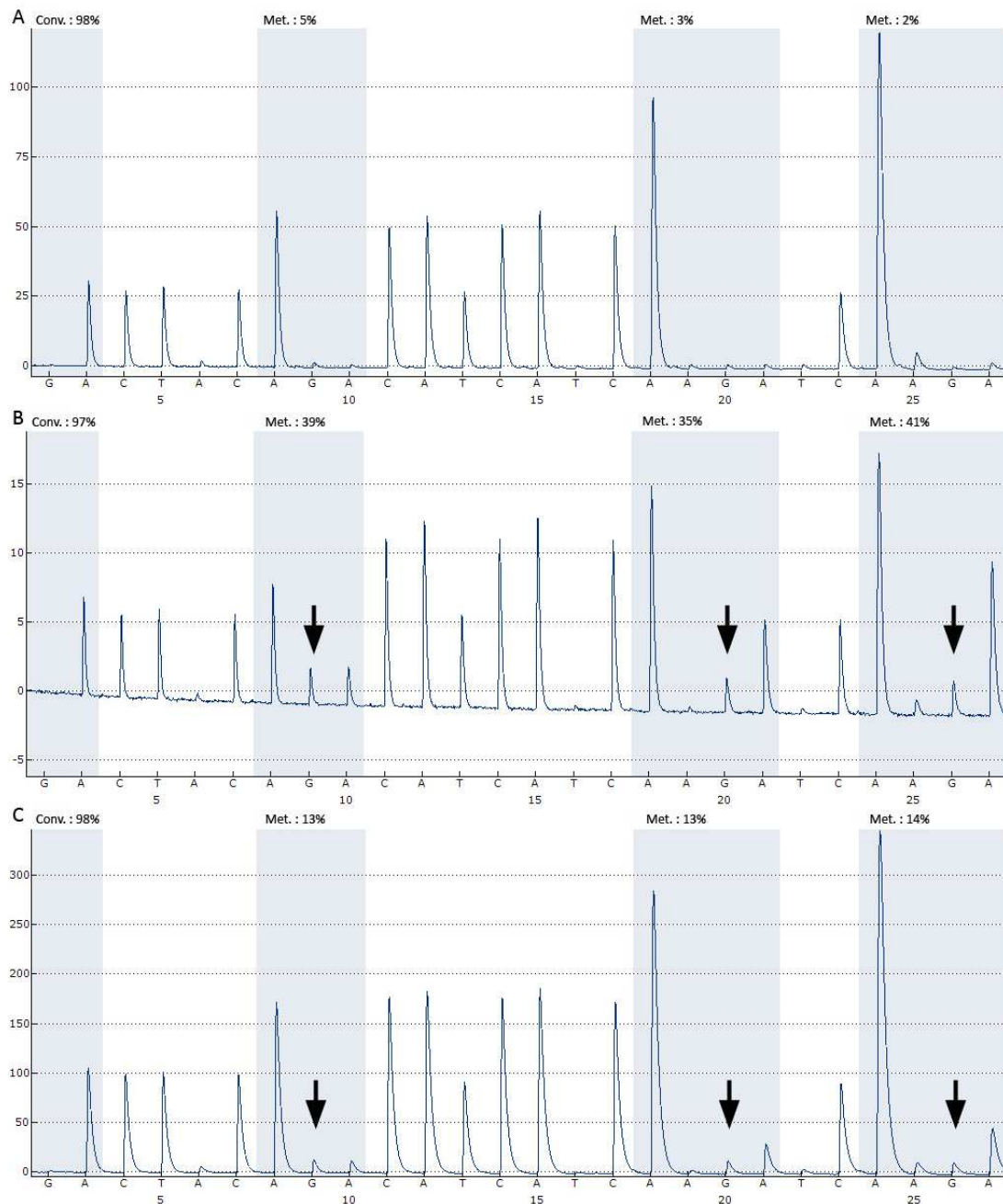


Figure 24. Pyroséquence, témoins. (A) Parenchyme pulmonaire sain : absence de méthylation du promoteur de *RARβ2*. (B) et (C) Carcinomes pulmonaires : méthylation du promoteur de *RARβ2* au niveau de 3 dinucléotides CG, se caractérisant par la présence d'un pic lors de l'injection de G (flèches).

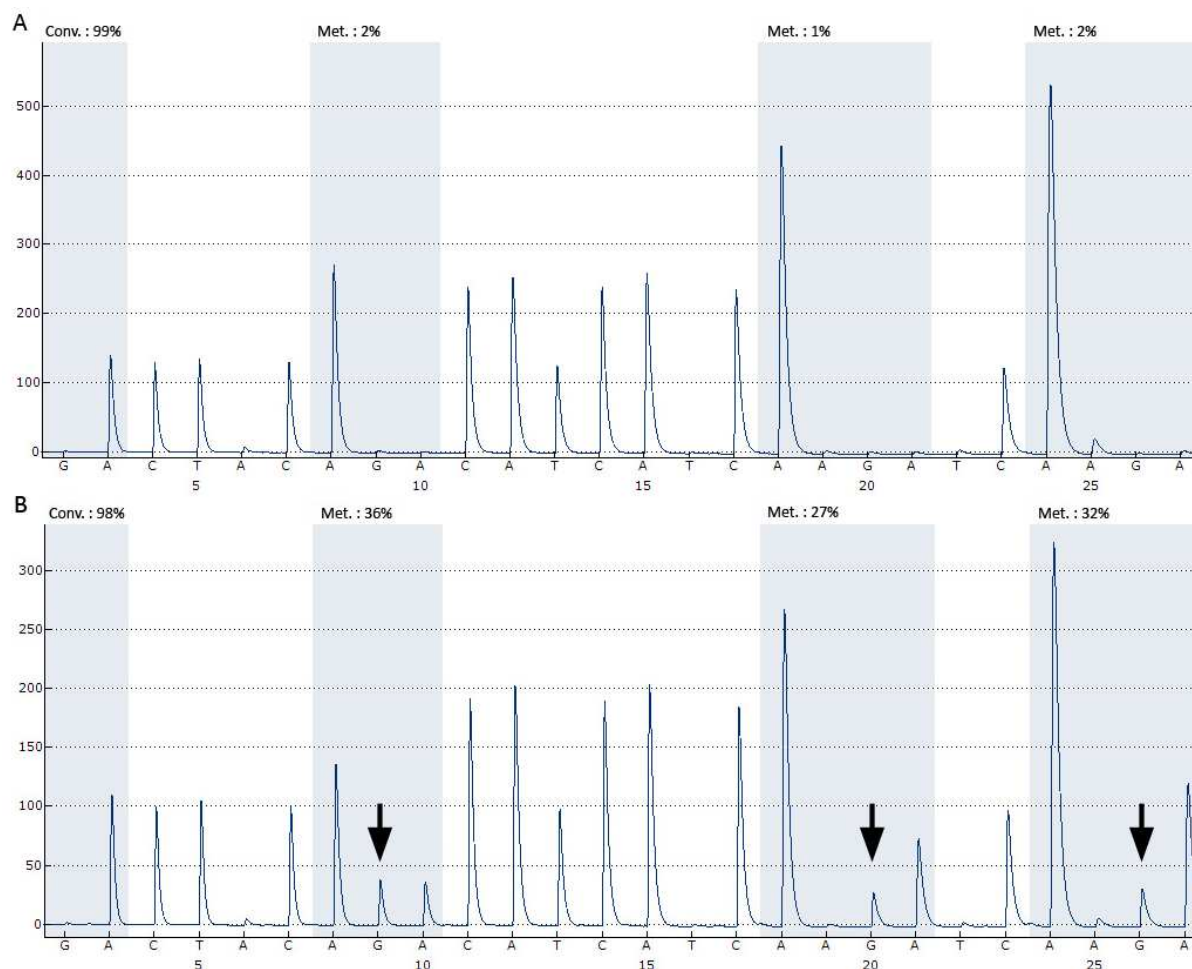


Figure 25. Pyroséquenceur. (A) Carcinome vésiculaire : absence de méthylation du promoteur de *RARβ2* (taux non significatif inférieur à 5%). (B) Carcinome indifférencié/anaplasique : méthylation du promoteur de *RARβ2* (flèches).

Contrôle du taux de conversion de séquences interne et externe au promoteur de *RARβ2* avec comparaison des deux techniques de conversion de l'ADN

Contrôle interne au promoteur de *RARβ2*

L'analyse interne du taux de conversion après réalisation d'une PCR de pyroséquenceur pour l'analyse du promoteur de *RARβ2* retrouve un taux moyen de conversion de 97,1% (95-99) avec la technique classique, et de 97,4% (94-99) avec la technique de conversion à haute concentration (tableau 8). Il n'y a pas de différence significative entre les deux techniques ($p=0,94$).

Contrôle portant sur une région externe au promoteur de *RARβ2* (chromosome 11)

Lors du contrôle externe du taux de conversion (obtenu en amplifiant une zone en dehors du gène *RARβ*), le taux moyen est de 67,5% (29-86) avec la technique classique, et de 98,6% (98-99)

avec la technique de conversion à haute concentration (figure 26). Le taux de conversion est significativement plus élevé avec la technique de conversion à haute concentration ($p=0,017$).

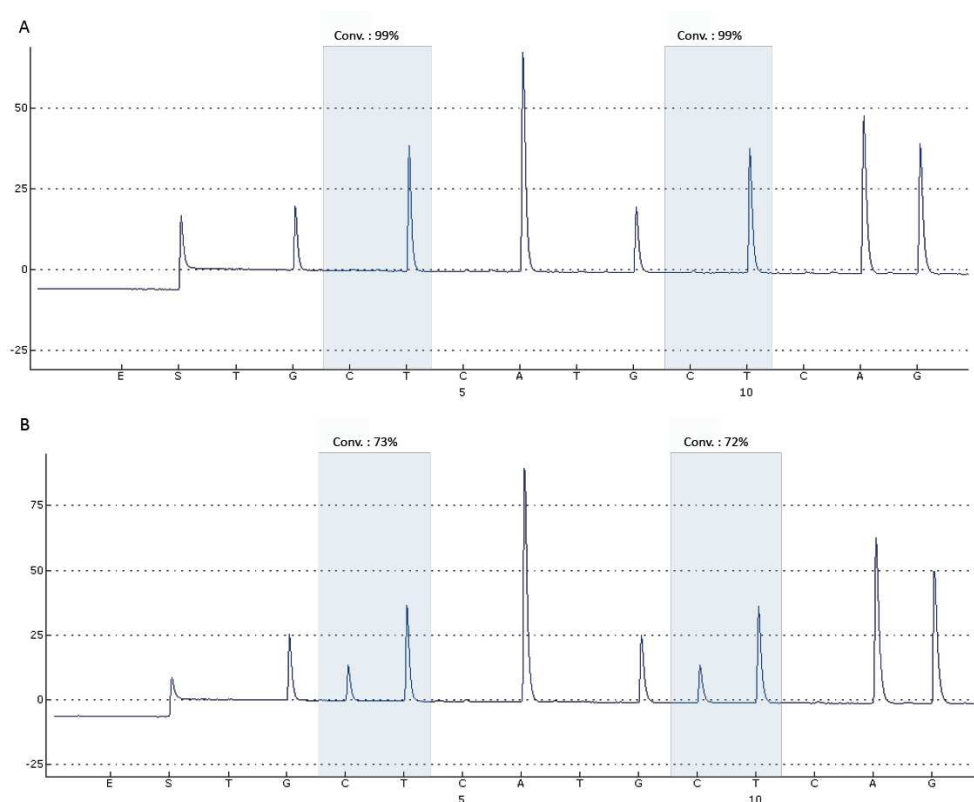


Figure 26. Mesure du taux de conversion d'une séquence de 63 nucléotides, dépourvue de dinucléotides CG, située sur le chromosome 11. Les amorces permettent une amplification indépendante de l'efficacité de la conversion. (A) Protocole de conversion à haute concentration en bisulfite à 10M : taux moyen de 99%. (B) Protocole classique (solution à 3,6M) : taux moyen de 72,5%.

Echantillon	Conversion à haute concentration						Conversion classique					
	Conv.	CG1	CG2	CG3	IM	Int.	Conv.	CG1	CG2	CG3	IM	Int.
T	94	5	3	4	4,0	U	99	2	1	2	1,7	U
S	98	13	13	14	13,3	M	99	18	16	18	17,3	M
35	98	5	3	2	3,3	U	94	6	3	2	3,7	U
70	99	3	1	2	2,0	U	99	2	1	1	1,3	U
55	97	3	4	4	3,7	U	95	7	6	3	5,3	U
56	99	3	2	2	2,3	U	97	5	2	3	3,3	U
65	97	3	4	4	3,7	U	97	6	3	3	4,0	U
Moyenne	97,4	5,0	4,3	4,6	4,6		97,1	6,6	4,6	5,1	5,4	

Tableau 8. Comparaison du taux de conversion et des résultats obtenus en fonction de la technique utilisée. Conv. : taux de conversion. CG1, CG2 et CG3 : taux de méthylation au niveau des 3 dinucléotides CG analysés. IM : indice de méthylation. Int. : interprétation du test (seuil de méthylation : 6%).

3. Analyse de l'exon 15 de *BRAF*

Parmi les 33 cas testés, un cas n'est pas interprétable par absence d'amplification (carcinome papillaire).

Pour les 10 parenchymes thyroïdiens sains testés, on ne retrouve aucune mutation de *BRAF*.

La mutation T1799A (c.1799T>A), entraînant dans la séquence protéique le remplacement d'une valine par un glutamate en position 600 (V600E, ou p.Val600Glu), est présente dans 50% des carcinomes papillaires (9/18) (figure 27).

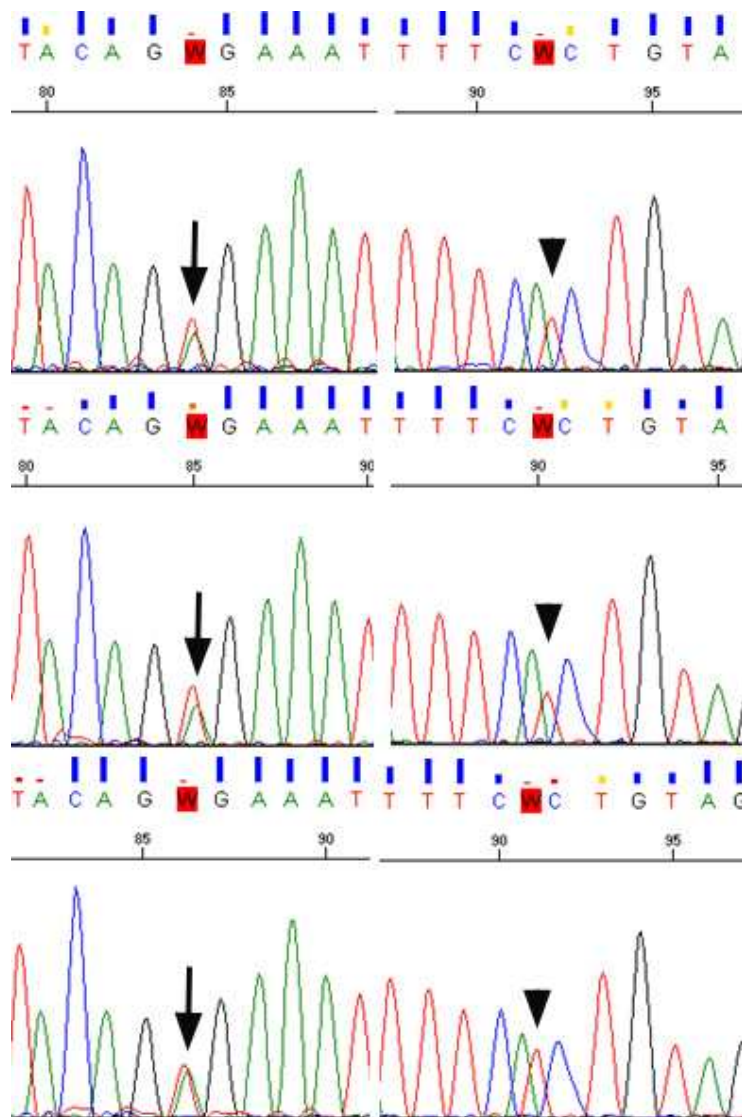


Figure 27. Présence de la mutation T1799A de *BRAF* dans 3 cas de carcinomes papillaires (cas n°24, 28 et 31, de haut en bas), se caractérisant par l'apparition, en position 1799, d'un pic A dans la séquence sens (flèche, pic vert), et T dans la séquence antisens (tête de flèche, pic rouge).

On retrouve également la mutation T1799A dans 7% (IC 95% : 0-20) des carcinomes indifférenciés/anaplasiques (1/14), le seul cas muté étant celui présentant une composante papillaire minoritaire. La mutation de *BRAF* est alors présente dans les 2 contingents (figure 28).

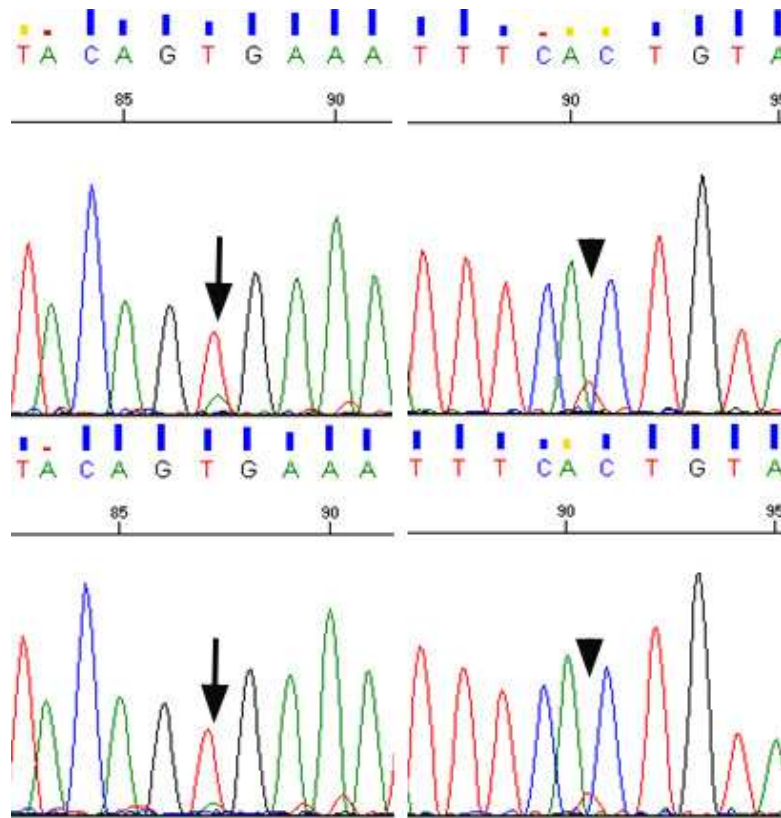


Figure 28. Cas de carcinome indifférencié/anaplasique avec composante papillaire minoritaire. Les deux contingents présentent la mutation T1799A de *BRAF* (en haut : composante papillaire, en bas composante indifférenciée). La mutation est retrouvée dans les séquences sens (flèche, pic vert) et antisens (tête de flèche), la hauteur des pics étant cependant moindre, du fait de la faible proportion de cellules tumorales.

Dans un cas de carcinome indifférencié/anaplasique, comportant également une composante papillaire minoritaire (dont le séquençage est en cours), on constate par ailleurs une duplication du codon 599 (ACA) situé entre les nucléotides 1795 et 1797 (c.1795_1797dup), entraînant sur la séquence protéique l'insertion d'une thréonine en position 599 (T599dup, ou p.Thr599dup) (figure 29).

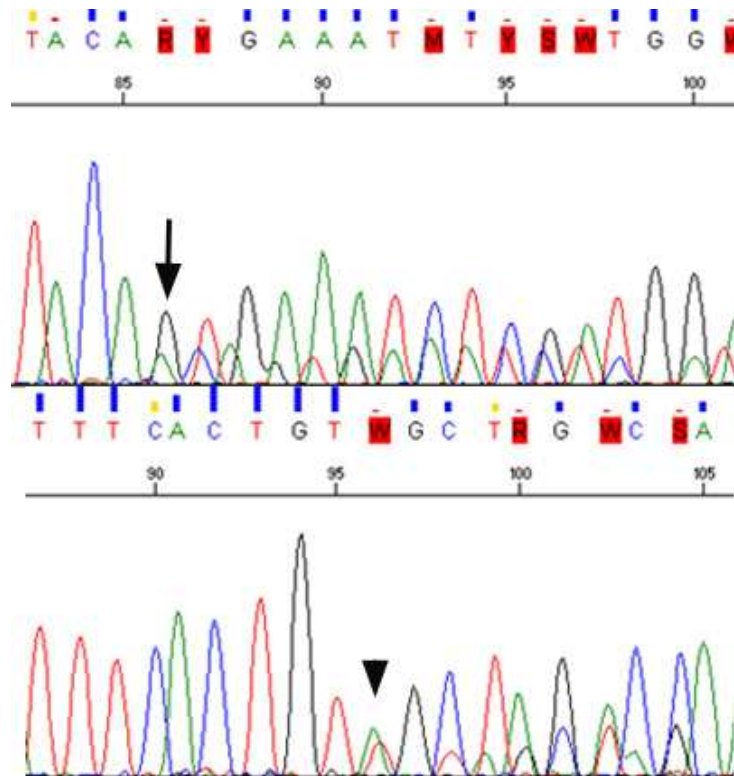


Figure 29. Carcinome indifférencié/anaplasique. Duplication du codon 599 (ACA) du gène *BRAF*, identifiée dans les séquences sens (en haut, flèche) et antisens (en bas, tête de flèche). La duplication n'étant pas présente dans toutes les cellules analysées, elle entraîne un décalage dans la suite de la séquence, deux pics étant ainsi visibles à chaque position.

L'analyse statistique a porté sur les carcinomes papillaires. Il n'y a pas de différence significative entre les groupes sans et avec mutation concernant l'âge, le sexe, la taille des tumeurs, la présence d'une effraction capsulaire ou la survenue de métastases ganglionnaires ou à distance ($p \geq 0,5$).

Il n'y a pas non plus de lien significatif entre la mutation de *BRAF* et les anomalies d'expression immunohistochimique de *RARα* ($p=1$), *RARβ* ($p=0,21$), *RXRα* ($p=0,63$) et *RXRβ* ($p=1$).

N°	Type	Age	Sexe	Taille (cm)	Multifocalité	Effraction capsulaire	Emboles vasculaires	T	N	M	RARα	RARβ	RXRα	RXRβ	RARβ2 (pyro.)	BRAF
1	pap	24	F	1.1	0	0	0	T1b	0	NR	C	2	2	1	NR	NR
2	pap	54	M	0.5	0	0	0	T1a	0	0	2	NI	2	1	U	V600E
3	pap	67	F	1.1	1	0	1	T1b(m)	NR	NR	C	1	NI	1	NR	NR
4	pap	41	F	1.4	0	1	0	T3	NR	NR	C	1	1	C	NR	NR
5	pap	30	F	4.5	0	1	1	T4	0	0	1	1	2	C	U	V600E
6	pap	46	F	2.2	0	0	0	T2	NR	NR	C	1	2	C	NR	V600E
7	pap	40	F	1.4	1	0	0	T1b(m)	1	0	NI	1	1	1	U	NI
8	pap	32	F	1.7	0	0	0	T1b	NR	NR	NI	1	1	1	NR	NR
9	pap	13	F	2.5	0	1	1	T4	1	0	1	1	2	C	U	0
10	pap	71	F	3	1	1	1	T4	0	1	C	1	1	C	U	0
11	pap	41	F	2	1	1	1	NR	NR	NR	2	2	2	1	NR	NR
12	pap	47	F	0.5	0	0	0	T1a	NR	NR	C	1	2	NI	U	NR
13	pap	62	F	0.8	0	0	0	T1a	0	0	C	1	1	C	U	V600E
14	pap	50	M	1.4	1	1	0	T3	1	NR	C	1	2	1	NR	NR
15	pap	60	F	0.8	0	0	0	T1a	NR	NR	0	1	C	C	NR	NR
16	pap	59	F	1	0	0	0	T1a	NR	NR	NI	1	1	C	NR	NR
17	pap	33	F	3.5	0	0	0	T2	1	0	C	2	1	1	U	0
18	pap	25	F	4.5	0	0	0	T3	0	0	C	1	2	1	U	V600E
19	pap	49	F	1	1	0	0	T1a(m)	0	0	NI	1	1	1	NR	NR
20	pap	42	F	1	0	0	0	T1a	NR	NR	C	C	NI	NI	NR	NR
21	pap	61	F	1.8	0	0	0	T1b	0	0	C	1	1	C	U	V600E
22	pap	61	F	1.6	0	1	0	T3	0	0	C	2	NI	C	NR	NR
23	pap	32	F	7	0	0	0	T3	1	1	NI	2	2	1	U	0
24	pap	63	F	1.5	0	1	0	T3	NR	NR	C	1	1	C	NI	V600E
25	pap	32	M	1.5	0	0	0	T1b	0	0	C	1	2	1	NR	NR
26	pap	50	F	0.8	0	0	0	T1a	NR	NR	C	2	C	C	NR	NR
27	pap	16	M	2.5	0	0	0	T2	0	0	C	1	1	NI	U	V600E
28	pap	49	F	0.8	1	0	1	T1a(m)	0	0	C	1	1	C	U	0
29	pap	58	F	3.5	0	0	0	T2	1	0	NI	1	1	C	NR	NR
30	pap	62	F	2.8	1	1	0	T4	0	0	C	2	C	C	NR	NR
31	pap	31	M	1.6	0	0	0	T1b	1	NR	C	1	1	NI	U	V600E
32	pap	20	M	1.5	0	0	0	T1b	NR	NR	NI	NI	2	2	NR	NR
33	pap	70	M	1	1	0	1	T1a(m)	NR	NR	C	2	1	1	U	0
34	pap	64	M	1	0	0	0	T1a	NR	NR	C	1	1	NI	NR	NR
35	pap	71	F	0.8	0	0	0	T1a	NR	1	NI	1	1	C	U	0
36	pap	15	F	2	0	0	0	T1b	0	0	C	1	1	C	U	0
37	pap	47	F	2.5	0	0	0	T2	0	0	C	1	1	C	NR	0
38	ana	47	F	5	0	1	1	T4b	1	NR	NI	2	1	NI	U	0
39	ana	77	M	3.5	1	1	1	T4b	1	NR	2	1	1	C	U	0
40	ana	68	F	6	0	1	1	T4b	1	NR	C	2	1	C	U	0
42	ana	68	F	3.5	0	1	1	T4b	NR	NR	C	2	2	NI	U	T599dup
43	ana	76	F	3	0	1	1	T4b	NR	NR	C	2	1	2	NR	V600E
44	ana	57	F	6	0	1	1	T4b	NR	1	1	2	2	1	NR	NR
45	ana	64	F	4.5	0	0	0	T4a	0	NR	2	1	1	2	U	0
46	ana	63	F	8.5	0	1	1	T4b	1	1	2	2	2	2	U	0
47	ana	66	F	4	0	0	1	T4a	NR	NR	2	1	2	NI	NR	NR
48	ana	68	F	8	0	1	1	T4b	0	NR	2	2	2	2	NR	0
49	ana	72	F	2	0	0	0	T4a	NR	NR	NI	2	2	NI	U	0
50	ves	29	F	3	0	0	1	T2	0	0	C	1	1	C	NR	NR
51	ves	39	F	1.8	0	0	1	T1b	0	0	1	1	1	NI	U	NR
52	ves	25	M	8.5	0	1	1	T4	0	0	2	1	1	NI	NR	NR
53	ves	22	F	5	0	1	1	NR	1	NR	2	1	2	2	NR	NR
54	pap	54	M	1.5	0	0	0	T1b	1	0	C	C	1	1	NR	NR
55	ves	79	F	3.5	0	1	1	T4	1	1	C	1	2	2	U	NR
56	ves	23	M	8	0	1	1	T4	1	1	C	1	2	C	U	NR
57	ves	63	F	3	0	0	1	T2	NR	NR	C	1	1	C	U	NR
58	ves	77	F	4	0	0	1	T2	NR	NR	C	1	1	C	U	NR
59	ves	52	F	0.9	0	0	0	T1a	NR	NR	2	1	2	C	U	NR
60	ana	70	M	7	0	1	0	T4b	NR	NR	2	2	1	2	M	0
61	ves	75	F	3	1	1	1	T4	1	1	1	1	2	2	U	NR
62	ves	55	F	3	0	1	1	NR	1	NR	C	C	1	1	U	NR
63	ana	57	M	NR	0	1	0	T4b	NR	NR	C	2	C	C	M	0
64	ves	71	F	5	0	1	1	T4	0	1	2	2	1	C	U	NR
65	ana	76	M	9	0	1	0	T4b	NR	NR	2	2	1	2	U	0
66	ana	61	F	9.5	0	1	1	T4b	1	NR	1	1	1	C	U	0
67	ana	72	F	4.5	0	1	1	T4b	1	NR	C	2	1	C	U	0
68	ana	84	F	6	0	1	1	T4b	NR	NR	2	2	C	2	U	0
69	ves	74	M	9	0	1	1	NR	NR	NR	C	C	C	C	U	NR
70	ves	77	M	4.5	0	1	1	T3	0	NR	C	C	C	C	U	NR

Tableau 9. Récapitulatif des données cliniques et pronostiques, du profil immunohistochimique, du statut de méthylation de *RARβ2* et du génotype *BRAF*. pap : carcinome papillaire ; ana : carcinome indifférencié/anaplasique ; ves : carcinome vésiculaire. Immunohistochimie : 1 : expression nucléaire diminuée ; 2 : normale ; C : séquestration cytoplasmique. Pyroséquençage (pyro.) : U : absence de méthylation du promoteur de *RARβ2*; M : méthylation. BRAF : 0 : absence de mutation ; V600E : mutation V600E (T1799A). T599dup : duplication T599dup (1795_1797dup). NR : non renseigné. NI : non interprétable.

IV. Discussion

Profils d'expression des récepteurs des rétinoïdes

Le niveau d'expression des récepteurs aux rétinoïdes est faible, et ne permet le plus souvent pas l'obtention d'un signal suffisant en immunohistochimie standard. Nous avons utilisé dans notre étude une amplification basée sur le système tyramine-biotine/streptavidine-peroxydase. Cette technique est dans notre expérience bien corrélée au niveau d'expression constaté par Western Blot. L'expression de ces récepteurs peut également être évaluée par l'étude des transcrits (ARNm) par RT-PCR quantitative (sonde Taqman), mais nécessitant alors l'utilisation de tissu rapidement congelé, ou par hybridation in situ [269, 270].

L'expression des différents récepteurs aux rétinoïdes testés dans notre étude est altérée dans une grande proportion des cas de carcinome thyroïdien. Ces constatations rejoignent celles auparavant décrites dans de rares études [271-273]. Eu égard à la connaissance que nous avons des fonctions physiologiques de la voie des rétinoïdes, ces anomalies d'expression des RARs et des RXRs suggèrent qu'elles pourraient avoir un rôle important dans la cancérogénèse thyroïdienne. Il existe deux principaux types d'altérations selon le récepteur : l'étude de RAR β et RXR α met en évidence une baisse de l'expression nucléaire dans la grande majorité des cas, alors que RAR α et RXR β sont fréquemment séquestrés dans le cytoplasme des cellules tumorales. Ces deux types d'altérations semblent donc témoigner de mécanismes distincts d'inactivation de ces récepteurs. Il faut cependant noter que dans le tissu thyroïdien sain analysé en périphérie des lésions (bénignes ou malignes), l'expression de RXR β est fréquemment purement cytoplasmique, alors qu'il est nucléaire dans les fibroblastes et les cellules endothéliales : l'interprétation des « anomalies » d'expression de RXR β semble donc délicate. La localisation de l'immunomarquage pour RXR β dans les thyrocytes normaux diffère selon les études et les clones utilisés : Takiyama *et al.* constatent un signal nucléaire intense et cytoplasmique faible ou absent [273], alors que Hoftijzer *et al.* décrivent un signal membranaire [271].

La baisse de l'expression nucléaire peut orienter vers un déficit de la transcription par des modifications épigénétiques, d'autant plus qu'aucune mutation de RAR β n'a à ce jour été décrite. Un autre mécanisme pourrait être une perte d'hétérozygotie dans la région de RAR β , comme ceci a été constaté dans les carcinomes broncho-pulmonaires [274]. Par ailleurs, les RARs et les RXRs sont auto-inductibles : un déficit fonctionnel en ligand pourrait donc entraîner une diminution de leur production, et ceci pourrait être favorisé par des déficits d'enzymes intervenant dans le métabolisme des rétinoïdes, comme cela est le cas dans certains cancers [148].

Dans les cas de séquestration cytoplasmique, on s'oriente vers des anomalies des signaux de localisation nucléaire, pouvant être causées en particulier par des modifications covalentes des récepteurs (par exemple, par glycosylation, sumoylation voire ubiquitination) ou par association à une autre protéine (protéines chaperons). Lors de travaux antérieurs sur des carcinomes thyroïdiens réalisés dans le laboratoire, il a été montré par Western Blot que la forme de cytoplasmique de RAR α présente un masse moléculaire plus élevé que la forme nucléaire (51 vs 65 kDa) (figure 31). Cette différence de masse pourrait être secondaire à des modifications post-traductionnelles, ou à un épissage alternatif.

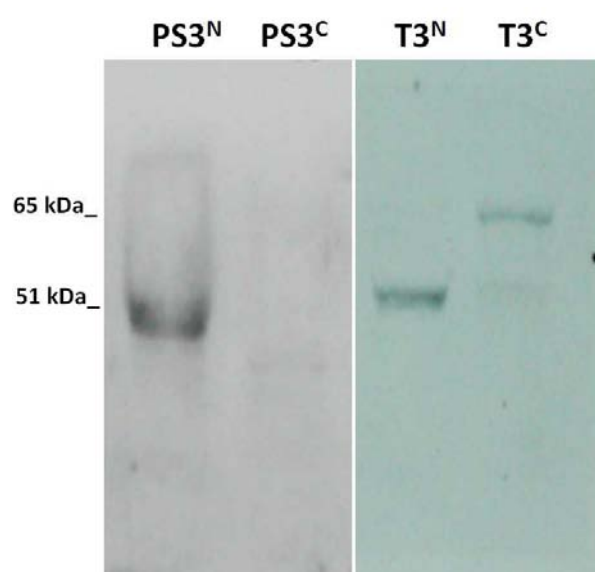


Figure 31. Western Blot, expression cytosolique et nucléaire de RAR α dans un carcinome vésiculaire. PS : tissu thyroïdien sain. T : tumeur. N : extrait nucléaire. C : extrait cytosolique.

Nous constatons une corrélation significative entre les expressions de RAR α et RXR β ($p=0,001$), et entre RAR β et RXR α ($p=0,03$). Ces anomalies d'expression de ces couples de récepteurs pourraient faire supposer qu'ils forment, dans la thyroïde, des hétérodimères fonctionnels RAR α /RXR β et RAR β /RXR α . Ceci serait à confirmer par d'autres études, en particulier par co-immunoprécipitation, à partir d'extraits protéiques issus de tissus congelés.

En pathologie thyroïdienne, le diagnostic différentiel entre adénome vésiculaire et carcinome vésiculaire est parfois très difficile, imposant la réalisation d'un important échantillonnage et la multiplication des niveaux de coupes. Il n'y a pas à ce jour de marqueur permettant en pratique courante de différencier ces deux tumeurs avec de bonnes performances diagnostiques. Selon Hoftijzer *et al.*, l'analyse des récepteurs aux rétinoïdes pourrait aider au diagnostic différentiel entre

pathologie bénigne et maligne [271]. En effet, la combinaison de l'absence de signal membranaire pour RXR β et de la présence d'une expression cytoplasmique de RXR β aurait une haute valeur prédictive positive (98%) pour le diagnostic de carcinome thyroïdien. Nous n'avons cependant dans notre expérience jamais constaté de signal membranaire pour RXR β . Au contraire, la combinaison d'un signal nucléaire pour RXR α et de l'absence de signal cytoplasmique pour RXR β aurait une haute valeur prédictive positive (91%) pour une pathologie bénigne [271]. Cependant, ces performances diagnostiques ont été calculées pour l'ensemble des deux groupes bénin (incluant adénome, goitre et tissu normal) vs malin (incluant carcinome vésiculaire et carcinome papillaire), et sont bien moindres lorsque l'on compare adénome et carcinome vésiculaire. Il n'y a pas à notre connaissance d'autre étude comparant ces profils d'expression entre tumeurs thyroïdiennes bénignes et malignes.

Dans notre étude, l'expression de RAR β et RXR α est le plus souvent normale dans les adénomes, au contraire des carcinomes, et en particulier des carcinomes vésiculaires (RAR β : $p < 0,0001$; RXR α : $p = 0,03$). L'utilisation combinée des anticorps dirigés contre RAR β et RXR α pourrait constituer une aide au diagnostic différentiel entre adénome et carcinome vésiculaire. Ainsi, la présence d'un signal anormal (baisse de l'expression nucléaire ou séquestration cytoplasmique) pour RAR β ou RXR α a pour le diagnostic de carcinome vésiculaire une sensibilité de 100% et une spécificité de 72%. Lorsque l'expression est anormale pour les deux récepteurs, la spécificité est de 89%, mais la sensibilité diminue alors fortement (57%). L'utilisation de l'anticorps anti-RAR α ne permet pas d'améliorer la sensibilité ou la spécificité. L'expression de RXR β est très fréquemment anormale dans les adénomes, par séquestration cytoplasmique, et n'est donc pas non plus discriminante pour le diagnostic de malignité. Une étude incluant davantage d'adénomes et de carcinomes vésiculaires serait souhaitable afin d'apprécier de façon plus précise les performances diagnostiques de ces anticorps. Nous allons également évaluer en immunohistochimie les niveaux d'expression de RAR γ et RXR γ . Par ailleurs, la valeur diagnostique de ces anticorps dans les cytoponctions thyroïdiennes serait à étudier. En effet, celles-ci ne permettent pas, en l'absence de critère nucléaire de carcinome papillaire, de différencier une lésion vésiculaire bénigne d'un carcinome, et la mise en évidence de marqueurs fiables serait très utile. Cette technique immunohistochimique est néanmoins plus difficile à mettre en œuvre sur des préparations cytologiques, en particulier du fait de la faible abondance du matériel.

Hoftijzer *et al.* n'ont pas mis en évidence de corrélation significative entre les anomalies d'expression des RARs et la survie. Nous n'avons pas mis en évidence de corrélation significative entre les anomalies d'expression des récepteurs et les principaux facteurs pronostiques, à l'exception de la séquestration cytoplasmique de RXR β , plus rare en cas de métastase ganglionnaire. La valeur de p est cependant relativement élevée ($p = 0,025$), et il n'est pas exclu que ce résultat soit lié au hasard.

Méthylation du promoteur de *RARβ2*

Les données de la littérature rapportent des taux de méthylation du promoteur de *RARβ2* très variables, de 7 à 52% pour les carcinomes, et de 0 à 32% pour les lésions bénignes [254-257] (tableau 10). Hoque *et al.* décrivent une méthylation aberrante du promoteur de *RARβ2* dans des parenchymes thyroïdiens hyperplasiques et même dans le tissu sain [255]. Hoque *et al.* rapportent néanmoins un taux de méthylation plus élevé dans les carcinomes que dans les tissus bénins ($p<0.05$). Au contraire, Schagdarsurengin *et al.* n'ont retrouvé de méthylation de *RARβ2* dans aucun des adénomes ou des goitres testés [257].

Nous ne constatons de méthylation du promoteur de *RARβ2* que dans 2 cas de carcinome indifférencié/anaplasique. Cette anomalie ne semble donc jouer qu'un rôle marginal dans la diminution d'expression de *RARβ2*, peut-être préférentiellement dans les carcinomes indifférenciés/anaplasiques. L'étude de Schagdarsurengin *et al.* met en évidence un taux plus élevé de méthylation dans les carcinomes indifférenciés/anaplasiques que dans les carcinomes bien différenciés (14 vs 5%), mais sans différence statistiquement significative. Une différence significative de méthylation entre les carcinomes bien différenciés et le carcinome indifférencié/anaplasique est au contraire mise en évidence pour d'autres gènes, comme *TSHR*, *MGMT*, *UCHL1* et *p16*, hyperméthylés dans ce dernier [257].

Hu *et al.* constatent un taux de méthylation pour *RARβ2* plus important dans certaines formes plus agressives de carcinome papillaire, sans significativité statistique. Le rôle de la dérégulation des récepteurs aux rétinoïdes et de la méthylation de *RARβ2* en tant qu'éventuel facteur indépendant de mauvais pronostic n'a néanmoins pas été démontré dans la littérature [254].

Etude	Carcinome				Tissu bénin				Tech.
	Global	Pap.	Vés.	Indiff.	Global	Goitre	Adé.	Tissu sain	
Hoque <i>et al.</i> [255]	22% (5/23)	22% (5/23)	–	–	5% (3/59)	5% (1/20)	4% (1/24)	7% (1/15)	QMSP
Hu <i>et al.</i> [254]	22% (50/231)	22% (0/231)	–	–	–	–	–	–	QMSP
Mohammadi-Asl <i>et al.</i> [256]	52% (13/25)	52% (13/25)	–	–	32% (8/25)	NI	NI	NI	COBRA
Schagdarsurengin <i>et al.</i> [257]	7% (2/29)	8% (1/12)	0% (0/10)	14% (1/7)	0% (0/21)	0% (0/11)	0% (0/10)	–	MSP
Présente étude	55% (26/47)	56% (10/18)	46% (6/13)	62% (10/16)	39% (11/28)	–	50% (9/18)	20% (2/10)	MSP
	5% (2/41)	0% (0/15)	0% (0/12)	14% (2/14)	0% (0/27)	–	0% (0/18)	0% (0/9)	Pyro.

Tableau 10. Variabilité du taux d’hyperméthylation du promoteur de *RARβ2* en fonction des études. Pap. : papillaire. Vés. : vésiculaire. Indiff. : indifférencié/anaplasique. Adé. : adénome vésiculaire. Tech. : technique d’analyse du statut de méthylation. QMSP : real-time quantitative methylation specific polymerase chain reaction. MSP : methylation specific polymerase chain reaction. COBRA : combined bisulfite restriction analysis. Pyro. : pyroséquençage.

Ces importantes variations dans le statut de méthylation du promoteur de *RARβ2* selon les études soulèvent la question de problèmes méthodologiques, ce qui est souligné par la grande discordance de nos résultats entre MS-PCR et pyroséquençage. Le séquençage de l’ADN après conversion par une solution de bisulfite est la méthode de référence pour analyser le statut de méthylation de l’ADN [275]. En effet, le séquençage permet d’analyser précisément chacun des dinucléotides CG ciblés, et il permet de vérifier pour chaque échantillon que le taux de conversion est valide, à condition d’inclure dans la séquence à analyser des cytosines hors CG. Par rapport aux autres techniques de séquençage, le pyroséquençage permet de plus une évaluation quantitative, avec l’avantage d’une technique plus rapide et d’un coût moindre.

L’une des premières hypothèses serait que les faux positifs puissent être consécutifs à une contamination de l’ADN. Ceci ne semble pas être le cas dans notre étude, dans la mesure où aucune des séries de MS-PCR ne présente de signe de contamination dans le puits témoin (puits contenant le mélange des réactifs de PCR, sans ajout d’ADN). Certaines techniques pourraient permettre de limiter le risque de contamination, comme l’utilisation d’UNG (uracile-DNA glycosylase), nécessitant cependant d’adapter la procédure de conversion par bisulfite [276].

Les techniques utilisées dans les autres études sont la MS-PCR, la QMSP (quantitative methylation specific polymerase chain reaction) ou la technique COBRA (combined bisulfite restriction analysis). La MS-PCR ne permet qu’une analyse purement qualitative, et repose sur l’hybridation spécifique des amorces M et U selon que l’ensemble des dinucléotides CG est méthylé ou non. La QMSP est une technique de PCR en temps réel, de principe globalement similaire à celle

de la MS-PCR, mais permettant de plus une approche quantitative, grâce à l'émission de fluorescence au cours de l'amplification et à l'utilisation d'un standard interne. Enfin, la technique COBRA repose sur une amplification initiale de la zone d'intérêt par PCR, puis sur l'action d'enzymes de restriction, clivant les amplicons lorsqu'ils sont méthylés. Les fragments obtenus sont séparés par électrophorèse. Contrairement au séquençage, ces trois méthodes imposent l'utilisation de témoins externes, qui, bien qu'intégrés à chaque série, ne permettent pas de vérifier que le taux de conversion est adéquat pour chaque échantillon. En effet, le taux de conversion peut varier d'un échantillon à l'autre, y compris pour ceux issus d'une même séance de conversion, comme c'est le cas dans notre étude.

Plusieurs publications ont mis en garde sur le risque de faux positifs, en particulier en MS-PCR. Par exemple, Preusser *et al.* rapportent une très mauvaise reproductibilité des résultats de MS-PCR concernant le statut de méthylation du promoteur de *MGMT* dans des tissus cérébraux non tumoraux, les cas positifs ne le restant que dans un cas sur 6 au décours de 4 séries consécutives [277]. Un autre exemple est la méthylation du promoteur du gène *ATM* dans les cancers du sein, variant de 0 à 80% selon les études [278]. Shaw *et al.* ont contrôlé des résultats de MS-PCR par une dernière étape de pyroséquençage : ils rapportent un taux de faux positifs d'environ 10% [279]. La présence de faux positifs pourrait être expliquée par une mauvaise conversion de l'ADN, d'autant plus que la conversion semble dans notre étude moins efficace avec l'ADN extrait à partir de blocs de paraffine. Les auteurs expliquent aussi la présence de faux positifs par la mauvaise spécificité des amorces. Dans notre étude, la technique de conversion à haute concentration, malgré un taux de conversion excellent, expose en MS-PCR à un nombre élevé de faux positifs, bien que moindre qu'avec la conversion classique (celle-ci présentant un taux de conversion médiocre, en particulier pour les échantillons extraits à partir des blocs de paraffine). Le problème de spécificité des amorces de MS-PCR semble donc jouer un rôle important. Le logiciel *Methprimer* (www.urogene.org/methprimer/), que nous avons utilisé pour dessiner les amorces de MS-PCR, pourrait selon Brandes *et al.* exposer à un risque relativement important de faux positifs [278]. Les algorithmes reposent en effet sur des principes généraux de PCR, sans prise en compte suffisante des spécificités liées à l'analyse de la méthylation et à la conversion par le bisulfite. Les auteurs recommandent l'utilisation du logiciel *MSPprimer* (www.mspprimer.org), en respectant plusieurs principes afin de limiter les faux positifs :

- Les amorces de PCR doivent recouvrir des cytosines en dehors de dinucléotides CG, afin d'amplifier spécifiquement l'ADN converti
- Les amorces doivent contenir plusieurs CG pour distinguer de façon spécifique ADN méthylé et ADN non méthylé

- Les amorces conduisant à des produits d'amplification non spécifiques doivent être exclues, ce qui est d'autant plus difficile que l'ADN converti n'est composé majoritairement que de 3 types de bases au lieu de 4
- Enfin, il faut éliminer les amorces formant des structures secondaires ou des paires amorce-dimère, favorisées par la longueur importante des amorces imposée par la richesse relative en AT des amorces spécifiques de l'ADN converti (les liaisons CG étant plus fortes que les liaisons AT).

Par ailleurs, les faux positifs pourraient être favorisés par un nombre élevé de cycles de PCR et une faible concentration d'ADN de départ [279]. L'élaboration d'amorces de MS-PCR ou de QMSP est donc complexe, et l'utilisation de techniques de séquençage avec utilisation d'un témoin interne de conversion semble donc indispensable, malgré un coût plus élevé.

Pour les 2 cas de carcinome présentant une méthylation du promoteur de *RARβ2*, il n'y a pas dans notre étude de baisse d'expression immunohistochimique de *RARβ*. Ceci pourrait être en partie expliqué par le fait qu'un faible taux de méthylation, comme dans le cas n°60, ne s'accompagnerait pas d'une baisse d'expression suffisante pour être appréciée en immunohistochimie. De plus, l'anticorps ne permet pas la distinction des différentes isoformes de *RARβ*, alors que nous n'avons testé que la méthylation de *RARβ2*, ce qui rend difficile la corrélation entre les 2 techniques. *RARβ4* pourrait au contraire favoriser la prolifération tumorale, en inhibant l'action de *RARβ2*, et être surexprimé dans les carcinomes mammaires [280]. Il n'existe pas à notre connaissance d'anticorps permettant en immunohistochimie de différencier *RARβ2* et *RARβ4*. La recherche de transcrits de *RARβ2* et *RARβ4* par RT-PCR pourrait s'avérer intéressante, mais, en raison de la fragilité des ARN messagers, nécessite de disposer de matériel congelé dans des conditions optimales.

La méthylation du promoteur de *RARβ2* ne semble donc pas jouer de rôle significatif dans sa dérégulation. D'autres mécanismes doivent être envisagés. En particulier, une dégradation par ubiquitination est l'un des mécanismes potentiels. Une étude réalisée dans le laboratoire sur une série de carcinome broncho-pulmonaire non à petites cellules montre que le processus d'ubiquitination contribue à contrôler le niveau d'expression de plusieurs RARs et RXRs (publication en cours). Nous souhaiterions donc étudier l'état d'ubiquitination de différents types de RARs et RXRs dans les carcinomes thyroïdiens, l'abondance du matériel congelé (tissus sain et tumoral) nécessaire imposant néanmoins la mise en place de cette étude de façon prospective.

Analyse de l'exon 15 de *BRAF*

Nous retrouvons la mutation T1799A (V600E) de *BRAF* dans la moitié des carcinomes papillaires, et dans un cas de carcinome indifférencié/anaplasique (7%), ces données étant

comparables à celles de la littérature (carcinome papillaire : 29-70% [15, 56-60], carcinome indifférencié/anaplasique : 10-20% [57, 61]). Le seul cas de carcinome indifférencié de notre étude présentant cette mutation V600E comporte une composante minoritaire de carcinome papillaire. Nous retrouvons alors la mutation dans les deux contingents. A l'instar de certaines données de la littérature [57, 62], ceci soutient l'hypothèse selon laquelle les carcinomes indifférenciés avec mutation de *BRAF* seraient des formes dédifférenciées de carcinome papillaire.

Dans les carcinomes papillaires, Hu *et al.* ainsi que Hoque *et al.* ont cherché une corrélation entre la mutation T1799A de *BRAF* et la méthylation du promoteur de *RARβ2* : seuls Hoque *et al.* ont mis en évidence un lien statistiquement significatif [254, 255], avec cependant une valeur de p proche de la limite de significativité ($p < 0,4$).

Dans un cas de carcinome indifférencié/anaplasique, comportant également une composante papillaire minoritaire, nous avons par ailleurs mis en évidence une duplication du codon 599 de *BRAF*, composé de 3 bases ACA, entre les positions 1795 et 1797, entraînant dans la séquence protéique l'ajout d'un acide aminé thréonine (T599dup). Cette duplication du codon 599 du gène *BRAF* n'a jamais à notre connaissance été décrite dans la littérature. De façon similaire, Carta *et al.* ont décrit en 2006, dans un cas de carcinome papillaire, une insertion 1795GTT, entraînant l'ajout d'une valine en position 599 (V599ins) [281]. L'analyse biochimique et moléculaire de cette insertion V599ins a démontré qu'elle entraîne un gain de fonction de *BRAF*, de façon comparable à la mutation V600E, jouant ainsi un rôle important dans l'oncogenèse [59]. Le codon 599 est situé dans une région de *BRAF* impliquée dans son autorégulation négative [59], il est donc probable que cette duplication T599dup, comme l'insertion V599ins et la mutation V600E, entraîne elle aussi un gain de fonction de *BRAF*, mais ceci reste à être démontré.

Perspectives thérapeutiques

Les traitements à base de rétinoïdes pourraient permettre une différenciation des cellules tumorales, en particulier dans les cas de carcinomes thyroïdiens dédifférenciés échappant au traitement par l'iode radioactif [146, 282]. Dans les carcinomes thyroïdiens échappant au traitement par l'iode radioactif, les rétinoïdes permettent en effet une augmentation de la captation d'iode, et dans certains cas une régression ou une stabilisation tumorale [147, 282]. Le carcinome indifférencié/anaplasique présente dans notre étude moins fréquemment d'altération de l'expression des RARs et des RXRs que les carcinomes bien différenciés : ceci pourrait faire présager d'une efficacité particulière des rétinoïdes dans ce type de carcinome, ce qui reste à être vérifié par des études précliniques et cliniques. Il est démontré, sur des lignées cellulaires, que le niveau

d'expression des récepteurs aux rétinoïdes influe sur la réponse des cellules tumorales à ces traitements [283]. Le profil d'expression des RARs et des RXRs, par exemple déterminé par immunohistochimie à partir de prélèvements de tissu tumoral, pourrait ainsi permettre de prédire pour chaque patient la réponse au traitement par des rétinoïdes : cette hypothèse serait à confirmer sur un modèle animal en préalable à des essais thérapeutiques.

Il est également suggéré, par des études sur des lignées de carcinome thyroïdien, qu'une résistance de ces cellules peut être liée à des modifications épigénétiques du promoteur de *RAR β 2*, comme une méthylation des îlots CpG [252], ou une désacétylation des histones [258]. *In vivo*, d'après notre étude, la méthylation du promoteur de *RAR β 2* est un phénomène marginal dans les carcinomes thyroïdiens. L'utilisation adjuvante d'agents déméthylants ne semble donc pas présenter d'intérêt particulier. La recherche d'autres mécanismes de dérégulation des récepteurs aux rétinoïdes est donc nécessaire, afin d'offrir d'éventuelles nouvelles perspectives thérapeutiques.

Conclusion

L'expression des récepteurs aux rétinoïdes est fréquemment altérée dans les carcinomes thyroïdiens, soit par baisse de l'expression nucléaire, soit par séquestration cytoplasmique. Ces anomalies relèvent donc vraisemblablement de multiples mécanismes. Contrairement à certaines données publiées, qui surestiment la fréquence de méthylation du promoteur de *RARβ2* du fait de problèmes méthodologiques, une méthylation aberrante du promoteur de *RARβ2* n'est que rarement retrouvée, dans seulement 5% des carcinomes, et 14% des carcinomes indifférenciés/anaplasiques. D'autres mécanismes de dérégulation sont donc en cause et sont encore à déterminer.

Les carcinomes et les adénomes possèdent des profils d'expression différents pour *RARβ* ($p < 0,0001$) et *RXRα* ($p = 0,003$). L'immunohistochimie pourrait s'avérer utile en pratique diagnostique, permettant en particulier de différencier avec une relativement bonne spécificité adénomes et carcinomes vésiculaires.

Notre étude a par ailleurs permis de mettre en évidence, dans un cas de carcinome indifférencié/anaplasique, une nouvelle altération du gène *BRAF*, consistant en une duplication du codon 599 (T599dup). Cette mutation n'a jamais à ce jour été rapportée dans la littérature, et son probable rôle pro-oncogène reste à être démontré.

Références bibliographiques

1. Hospices Civils de Lyon / Institut de Veille Sanitaire / Institut National du Cancer / Francim / Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale. Projections de l'incidence et de la mortalité par cancer en France pour l'année 2008. *Rapport technique*. 2009, <http://www.invs.sante.fr/surveillance/cancers> (Consulté le 03.05.2010).
2. DeLellis RA and Williams ED. Thyroid and parathyroid tumours: introduction. In: DeLellis RA, et al., eds. World Health Organization classification of tumours: Pathology and genetics of tumours of endocrine organs. Lyon: IARC Press 2004.
3. Colonna M, Bossard N, Guizard AV, Remontet L and Grosclaude P. Descriptive epidemiology of thyroid cancer in France: incidence, mortality and survival. *Ann Endocrinol (Paris)* 2010; 71: 95-101.
4. Colonna M and Guizard AV. Fiche de commentaire thyroïde des estimations nationales d'incidence et de mortalité en France de 1980 à 2005. 2006; Available from: http://www.invs.sante.fr/surveillance/cancers/estimations_cancers/donnees_localisation/thyroide/comment_thyroide.pdf.
5. Chérié-Challine L, Belot A, Caserio-Schönemann C, Colonna M, Lacour B, Lasalle JL *et al.*, Surveillance sanitaire en lien avec l'accident de Tchernobyl en France - Bilan actualisé sur les cancers thyroïdiens et études épidémiologiques en cours en 2006. 2006, Institut National de Veille Sanitaire.
6. Hegedus L. Clinical practice. The thyroid nodule. *N Engl J Med* 2004; 351: 1764-71.
7. Vander JB, Gaston EA and Dawber TR. The significance of nontoxic thyroid nodules. Final report of a 15-year study of the incidence of thyroid malignancy. *Ann Intern Med* 1968; 69: 537-40.
8. Ezzat S, Sarti DA, Cain DR and Braunstein GD. Thyroid incidentalomas. Prevalence by palpation and ultrasonography. *Arch Intern Med* 1994; 154: 1838-40.
9. Tan GH and Gharib H. Thyroid incidentalomas: management approaches to nonpalpable nodules discovered incidentally on thyroid imaging. *Ann Intern Med* 1997; 126: 226-31.
10. Belfiore A, Giuffrida D, La Rosa GL, Ippolito O, Russo G, Fiumara A *et al.* High frequency of cancer in cold thyroid nodules occurring at young age. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1989; 121: 197-202.
11. Filetti S, Durante C and Torlontano M. Nonsurgical approaches to the management of thyroid nodules. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2006; 2: 384-94.
12. Gharib H and Papini E. Thyroid nodules: clinical importance, assessment, and treatment. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2007; 36: 707-35, vi.
13. *Recommandations pour la pratique clinique. La prise en charge diagnostique du nodule thyroïdien*. 1995, Agence Nationale pour le Développement de l'Evaluation Médicale: Paris.
14. Guevara N, Castillo L and Santini J. [Diagnosis of thyroid nodule. Application of evidence-based medicine]. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac* 2004; 121: 350-9.
15. DeLellis RA, Williams ED, LiVolsi VA, Albores-Saavedra J, Asa SL, Baloch ZW *et al.* Papillary carcinoma. In: DeLellis RA, et al., eds. World Health Organization classification of tumours: Pathology and genetics of tumours of endocrine organs. Lyon: IARC Press 2004.
16. Sobrinho-Simões M, Asa SL, Kroll TG, Nikiforov Y, DeLellis R, Farid P *et al.* Follicular carcinoma. In: DeLellis RA, et al., eds. World Health Organization classification of tumours: Pathology and genetics of tumours of endocrine organs. Lyon: IARC Press 2004.
17. Sobrinho-Simões M, Albores-Saavedra J, Tallini G, Santoro M, Volante M, Pilotti S *et al.* Poorly differentiated carcinoma. In: DeLellis RA, et al., eds. World Health Organization classification of tumours: Pathology and genetics of tumours of endocrine organs. Lyon: IARC Press 2004.

18. Volante M, Collini P, Nikiforov YE, Sakamoto A, Kakudo K, Katoh R *et al.* Poorly differentiated thyroid carcinoma: the Turin proposal for the use of uniform diagnostic criteria and an algorithmic diagnostic approach. *Am J Surg Pathol* 2007; 31: 1256-64.
19. Rocha AS, Soares P, Fonseca E, Cameselle-Teijeiro J, Oliveira MC and Sobrinho-Simoes M. E-cadherin loss rather than beta-catenin alterations is a common feature of poorly differentiated thyroid carcinomas. *Histopathology* 2003; 42: 580-7.
20. Dobashi Y, Sakamoto A, Sugimura H, Mernyei M, Mori M, Oyama T *et al.* Overexpression of p53 as a possible prognostic factor in human thyroid carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1993; 17: 375-81.
21. Nishida T, Katayama S, Tsujimoto M, Nakamura J and Matsuda H. Clinicopathological significance of poorly differentiated thyroid carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1999; 23: 205-11.
22. Ordonez N, Baloch Z, Matias-Guiu X, Evans H, Farid NR, Fagin JA *et al.* Undifferentiated (anaplastic) carcinoma. *In:* DeLellis RA, et al., eds. World Health Organization classification of tumours: Pathology and genetics of tumours of endocrine organs. Lyon: IARC Press 2004.
23. Ordonez NG, El-Naggar AK, Hickey RC and Samaan NA. Anaplastic thyroid carcinoma. Immunocytochemical study of 32 cases. *Am J Clin Pathol* 1991; 96: 15-24.
24. Venkatesh YS, Ordonez NG, Schultz PN, Hickey RC, Goepfert H and Samaan NA. Anaplastic carcinoma of the thyroid. A clinicopathologic study of 121 cases. *Cancer* 1990; 66: 321-30.
25. Miettinen M and Franssila KO. Variable expression of keratins and nearly uniform lack of thyroid transcription factor 1 in thyroid anaplastic carcinoma. *Hum Pathol* 2000; 31: 1139-45.
26. Carcangiu ML, Steeper T, Zampi G and Rosai J. Anaplastic thyroid carcinoma. A study of 70 cases. *Am J Clin Pathol* 1985; 83: 135-58.
27. Matias-Guiu X, DeLellis R, Moley JF, Gagel RF, Albores-Saavedra J, Bussolati G *et al.* Medullary thyroid carcinoma. *In:* DeLellis RA, et al., eds. World Health Organization classification of tumours: Pathology and genetics of tumours of endocrine organs. Lyon: IARC Press 2004.
28. Lloyd RV, Sisson JC and Marangos PJ. Calcitonin, carcinoembryonic antigen and neuron-specific enolase in medullary thyroid carcinoma. *Cancer* 1983; 51: 2234-9.
29. Papotti M, Negro F, Carney JA, Bussolati G and Lloyd RV. Mixed medullary-follicular carcinoma of the thyroid. A morphological, immunohistochemical and in situ hybridization analysis of 11 cases. *Virchows Arch* 1997; 430: 397-405.
30. Lam KY and Sakamoto A. Squamous cell carcinoma. *In:* DeLellis RA, et al., eds. World Health Organization classification of tumours: Pathology and genetics of tumours of endocrine organs. Lyon: IARC Press 2004.
31. Cameselle-Teijeiro J, Wenig B, Sobrinho-Simões M and Albores-Saavedra J. Mucoepidermoid carcinoma. *In:* DeLellis RA, et al., eds. World Health Organization classification of tumours: Pathology and genetics of tumours of endocrine organs. Lyon: IARC Press 2004.
32. Chan JKC, LiVolsi VA and Bondeson L. Sclerosing mucoepidermoid carcinoma with eosinophilia. *In:* DeLellis RA, et al., eds. World Health Organization classification of tumours: Pathology and genetics of tumours of endocrine organs. Lyon: IARC Press 2004.
33. Sobrinho-Simões M, Cameselle-Teijeiro J and Harach HR. Mucinous carcinoma. *In:* DeLellis RA, et al., eds. World Health Organization classification of tumours: Pathology and genetics of tumours of endocrine organs. Lyon: IARC Press 2004.
34. Cheuk W, Chan JKC, Dorfman DM and Giordano T. Spindle cell tumour with thymus-like differentiation. *In:* DeLellis RA, et al., eds. World Health Organization classification of tumours: Pathology and genetics of tumours of endocrine organs. Lyon: IARC Press 2004.
35. Cheuk W, Chan JKC, Dorfman DM and Giordano T. Carcinoma showing thymus-like differentiation. *In:* DeLellis RA, et al., eds. World Health Organization classification of tumours: Pathology and genetics of tumours of endocrine organs. Lyon: IARC Press 2004.
36. DeLellis R. Secondary tumours of the thyroid. *In:* DeLellis RA, et al., eds. World Health Organization classification of tumours: Pathology and genetics of tumours of endocrine organs. Lyon: IARC Press 2004.

37. Nakhjavani MK, Gharib H, Goellner JR and van Heerden JA. Metastasis to the thyroid gland. A report of 43 cases. *Cancer* 1997; 79: 574-8.
38. Bongarzone I, Vigneri P, Mariani L, Collini P, Pilotti S and Pierotti MA. RET/NTRK1 rearrangements in thyroid gland tumors of the papillary carcinoma family: correlation with clinicopathological features. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 223-8.
39. Santoro M, Carlomagno F, Hay ID, Herrmann MA, Grieco M, Melillo R *et al.* Ret oncogene activation in human thyroid neoplasms is restricted to the papillary cancer subtype. *J Clin Invest* 1992; 89: 1517-22.
40. Bounacer A, Wicker R, Caillou B, Cailleux AF, Sarasin A, Schlumberger M *et al.* High prevalence of activating ret proto-oncogene rearrangements, in thyroid tumors from patients who had received external radiation. *Oncogene* 1997; 15: 1263-73.
41. Rabes HM, Demidchik EP, Sidorow JD, Lengfelder E, Beimfohr C, Hoelzel D *et al.* Pattern of radiation-induced RET and NTRK1 rearrangements in 191 post-chernobyl papillary thyroid carcinomas: biological, phenotypic, and clinical implications. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1093-103.
42. Grieco M, Santoro M, Berlingieri MT, Melillo RM, Donghi R, Bongarzone I *et al.* PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and is frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas. *Cell* 1990; 60: 557-63.
43. Bongarzone I, Butti MG, Coronelli S, Borrello MG, Santoro M, Mondellini P *et al.* Frequent activation of ret protooncogene by fusion with a new activating gene in papillary thyroid carcinomas. *Cancer Res* 1994; 54: 2979-85.
44. Jhiang SM, Sagartz JE, Tong Q, Parker-Thornburg J, Capen CC, Cho JY *et al.* Targeted expression of the ret/PTC1 oncogene induces papillary thyroid carcinomas. *Endocrinology* 1996; 137: 375-8.
45. Santoro M, Chiappetta G, Cerrato A, Salvatore D, Zhang L, Manzo G *et al.* Development of thyroid papillary carcinomas secondary to tissue-specific expression of the RET/PTC1 oncogene in transgenic mice. *Oncogene* 1996; 12: 1821-6.
46. Nikiforov YE, Rowland JM, Bove KE, Monforte-Munoz H and Fagin JA. Distinct pattern of ret oncogene rearrangements in morphological variants of radiation-induced and sporadic thyroid papillary carcinomas in children. *Cancer Res* 1997; 57: 1690-4.
47. Basolo F, Giannini R, Monaco C, Melillo RM, Carlomagno F, Pancrazi M *et al.* Potent mitogenicity of the RET/PTC3 oncogene correlates with its prevalence in tall-cell variant of papillary thyroid carcinoma. *Am J Pathol* 2002; 160: 247-54.
48. Musholt TJ, Musholt PB, Khaladj N, Schulz D, Scheumann GF and Klemphauer J. Prognostic significance of RET and NTRK1 rearrangements in sporadic papillary thyroid carcinoma. *Surgery* 2000; 128: 984-93.
49. Martin-Zanca D, Hughes SH and Barbacid M. A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences. *Nature* 1986; 319: 743-8.
50. Radice P, Sozzi G, Miozzo M, De Benedetti V, Cariani T, Bongarzone I *et al.* The human tropomyosin gene involved in the generation of the TRK oncogene maps to chromosome 1q31. *Oncogene* 1991; 6: 2145-8.
51. Greco A, Mariani C, Miranda C, Lupas A, Pagliardini S, Pomati M *et al.* The DNA rearrangement that generates the TRK-T3 oncogene involves a novel gene on chromosome 3 whose product has a potential coiled-coil domain. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 6118-27.
52. Beimfohr C, Klugbauer S, Demidchik EP, Lengfelder E and Rabes HM. NTRK1 re-arrangement in papillary thyroid carcinomas of children after the Chernobyl reactor accident. *Int J Cancer* 1999; 80: 842-7.
53. Ezzat S, Zheng L, Kolenda J, Safarian A, Freeman JL and Asa SL. Prevalence of activating ras mutations in morphologically characterized thyroid nodules. *Thyroid* 1996; 6: 409-16.
54. Namba H, Rubin SA and Fagin JA. Point mutations of ras oncogenes are an early event in thyroid tumorigenesis. *Mol Endocrinol* 1990; 4: 1474-9.

55. Hara H, Fulton N, Yashiro T, Ito K, DeGroot LJ and Kaplan EL. N-ras mutation: an independent prognostic factor for aggressiveness of papillary thyroid carcinoma. *Surgery* 1994; 116: 1010-6.
56. Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE and Fagin JA. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res* 2003; 63: 1454-7.
57. Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, Biddinger PW, Knauf JA, Basolo F *et al.* BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 5399-404.
58. Soares P, Trovisco V, Rocha AS, Lima J, Castro P, Preto A *et al.* BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. *Oncogene* 2003; 22: 4578-80.
59. Moretti S, Macchiarulo A, De Falco V, Avenia N, Barbi F, Carta C *et al.* Biochemical and molecular characterization of the novel BRAF(V599Ins) mutation detected in a classic papillary thyroid carcinoma. *Oncogene* 2006; 25: 4235-40.
60. Namba H, Nakashima M, Hayashi T, Hayashida N, Maeda S, Rogounovitch TI *et al.* Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 4393-7.
61. Xing M, Vasko V, Tallini G, Larin A, Wu G, Udelsman R *et al.* BRAF T1796A transversion mutation in various thyroid neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 1365-8.
62. Quiros RM, Ding HG, Gattuso P, Prinz RA and Xu X. Evidence that one subset of anaplastic thyroid carcinomas are derived from papillary carcinomas due to BRAF and p53 mutations. *Cancer* 2005; 103: 2261-8.
63. Guan H, Ji M, Hou P, Liu Z, Wang C, Shan Z *et al.* Hypermethylation of the DNA mismatch repair gene hMLH1 and its association with lymph node metastasis and T1799A BRAF mutation in patients with papillary thyroid cancer. *Cancer* 2008; 113: 247-55.
64. Xu X, Quiros RM, Gattuso P, Ain KB and Prinz RA. High prevalence of BRAF gene mutation in papillary thyroid carcinomas and thyroid tumor cell lines. *Cancer Res* 2003; 63: 4561-7.
65. Xing M, Westra WH, Tufano RP, Cohen Y, Rosenbaum E, Rhoden KJ *et al.* BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 6373-9.
66. Xu B, Yoshimoto K, Miyauchi A, Kuma S, Mizusawa N, Hirokawa M *et al.* Cribriform-morular variant of papillary thyroid carcinoma: a pathological and molecular genetic study with evidence of frequent somatic mutations in exon 3 of the beta-catenin gene. *J Pathol* 2003; 199: 58-67.
67. Uchino S, Noguchi S, Yamashita H, Watanabe S, Ogawa T, Tsuno A *et al.* Mutational analysis of the APC gene in cribriform-morula variant of papillary thyroid carcinoma. *World J Surg* 2006; 30: 775-9.
68. Tung WS, Shevlin DW, Kaleem Z, Tribune DJ, Wells SA, Jr. and Goodfellow PJ. Allelotype of follicular thyroid carcinomas reveals genetic instability consistent with frequent nondisjunctional chromosomal loss. *Genes Chromosomes Cancer* 1997; 19: 43-51.
69. Grebe SK, McIver B, Hay ID, Wu PS, Maciel LM, Drabkin HA *et al.* Frequent loss of heterozygosity on chromosomes 3p and 17p without VHL or p53 mutations suggests involvement of unidentified tumor suppressor genes in follicular thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 3684-91.
70. Roque L, Clode A, Belge G, Pinto A, Bartnitzke S, Santos JR *et al.* Follicular thyroid carcinoma: chromosome analysis of 19 cases. *Genes Chromosomes Cancer* 1998; 21: 250-5.
71. Kitamura Y, Shimizu K, Ito K, Tanaka S and Emi M. Allelotyping of follicular thyroid carcinoma: frequent allelic losses in chromosome arms 7q, 11p, and 22q. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 4268-72.

72. Segev DL, Saji M, Phillips GS, Westra WH, Takiyama Y, Piantadosi S *et al.* Polymerase chain reaction-based microsatellite polymorphism analysis of follicular and Hurthle cell neoplasms of the thyroid. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 2036-42.
73. Frisk T, Kytola S, Wallin G, Zedenius J and Larsson C. Low frequency of numerical chromosomal aberrations in follicular thyroid tumors detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1999; 25: 349-53.
74. Tallini G, Hsueh A, Liu S, Garcia-Rostan G, Speicher MR and Ward DC. Frequent chromosomal DNA unbalance in thyroid oncocytic (Hurthle cell) neoplasms detected by comparative genomic hybridization. *Lab Invest* 1999; 79: 547-55.
75. Maximo V, Soares P, Lima J, Cameselle-Teijeiro J and Sobrinho-Simoes M. Mitochondrial DNA somatic mutations (point mutations and large deletions) and mitochondrial DNA variants in human thyroid pathology: a study with emphasis on Hurthle cell tumors. *Am J Pathol* 2002; 160: 1857-65.
76. Yeh JJ, Lunetta KL, van Orsouw NJ, Moore FD, Jr., Mutter GL, Vijg J *et al.* Somatic mitochondrial DNA (mtDNA) mutations in papillary thyroid carcinomas and differential mtDNA sequence variants in cases with thyroid tumours. *Oncogene* 2000; 19: 2060-6.
77. Dwight T, Thoppe SR, Foukakis T, Lui WO, Wallin G, Hoog A *et al.* Involvement of the PAX8/peroxisome proliferator-activated receptor gamma rearrangement in follicular thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 4440-5.
78. French CA, Alexander EK, Cibas ES, Nose V, Laguette J, Faquin W *et al.* Genetic and biological subgroups of low-stage follicular thyroid cancer. *Am J Pathol* 2003; 162: 1053-60.
79. Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L, Chen CJ, Mueller E, Spiegelman BM *et al.* PAX8-PPARgamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma [corrected]. *Science* 2000; 289: 1357-60.
80. Martelli ML, Iuliano R, Le Pera I, Sama I, Monaco C, Cammarota S *et al.* Inhibitory effects of peroxisome poliferator-activated receptor gamma on thyroid carcinoma cell growth. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 4728-35.
81. Nikiforova MN, Lynch RA, Biddinger PW, Alexander EK, Dorn GW, 2nd, Tallini G *et al.* RAS point mutations and PAX8-PPAR gamma rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 2318-26.
82. Roque L, Castedo S, Clode A and Soares J. Deletion of 3p25-->pter in a primary follicular thyroid carcinoma and its metastasis. *Genes Chromosomes Cancer* 1993; 8: 199-203.
83. Sahin M, Allard BL, Yates M, Powell JG, Wang XL, Hay ID *et al.* PPARgamma staining as a surrogate for PAX8/PPARgamma fusion oncogene expression in follicular neoplasms: clinicopathological correlation and histopathological diagnostic value. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 463-8.
84. Lemoine NR, Mayall ES, Wyllie FS, Williams ED, Goyns M, Stringer B *et al.* High frequency of ras oncogene activation in all stages of human thyroid tumorigenesis. *Oncogene* 1989; 4: 159-64.
85. Lemoine NR, Mayall ES, Wyllie FS, Farr CJ, Hughes D, Padua RA *et al.* Activated ras oncogenes in human thyroid cancers. *Cancer Res* 1988; 48: 4459-63.
86. Donghi R, Longoni A, Pilotti S, Michieli P, Della Porta G and Pierotti MA. Gene p53 mutations are restricted to poorly differentiated and undifferentiated carcinomas of the thyroid gland. *J Clin Invest* 1993; 91: 1753-60.
87. Dahia PL, Marsh DJ, Zheng Z, Zedenius J, Komminoth P, Frisk T *et al.* Somatic deletions and mutations in the Cowden disease gene, PTEN, in sporadic thyroid tumors. *Cancer Res* 1997; 57: 4710-3.
88. Garcia-Rostan G, Camp RL, Herrero A, Carcangiu ML, Rimm DL and Tallini G. Beta-catenin dysregulation in thyroid neoplasms: down-regulation, aberrant nuclear expression, and CTNNB1 exon 3 mutations are markers for aggressive tumor phenotypes and poor prognosis. *Am J Pathol* 2001; 158: 987-96.

89. Wreesmann VB, Ghossein RA, Patel SG, Harris CP, Schnaser EA, Shaha AR *et al.* Genome-wide appraisal of thyroid cancer progression. *Am J Pathol* 2002; 161: 1549-56.
90. Dobashi Y, Sugimura H, Sakamoto A, Mernyei M, Mori M, Oyama T *et al.* Stepwise participation of p53 gene mutation during dedifferentiation of human thyroid carcinomas. *Diagn Mol Pathol* 1994; 3: 9-14.
91. Pilotti S, Collini P, Del Bo R, Cattoretti G, Pierotti MA and Rilke F. A novel panel of antibodies that segregates immunocytochemically poorly differentiated carcinoma from undifferentiated carcinoma of the thyroid gland. *Am J Surg Pathol* 1994; 18: 1054-64.
92. Garcia-Rostan G, Zhao H, Camp RL, Pollan M, Herrero A, Pardo J *et al.* ras mutations are associated with aggressive tumor phenotypes and poor prognosis in thyroid cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21: 3226-35.
93. Santoro M, Papotti M, Chiappetta G, Garcia-Rostan G, Volante M, Johnson C *et al.* RET activation and clinicopathologic features in poorly differentiated thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 370-9.
94. Kadota M, Tamaki Y, Sekimoto M, Fujiwara Y, Aritake N, Hasegawa S *et al.* Loss of heterozygosity on chromosome 16p and 18q in anaplastic thyroid carcinoma. *Oncol Rep* 2003; 10: 35-8.
95. Kitamura Y, Shimizu K, Tanaka S, Ito K and Emi M. Allelotyping of anaplastic thyroid carcinoma: frequent allelic losses on 1q, 9p, 11, 17, 19p, and 22q. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 27: 244-51.
96. Kleer CG, Bryant BR, Giordano TJ, Sobel M and Merino MJ. Genetic Changes in Chromosomes 1p and 17p in Thyroid Cancer Progression. *Endocr Pathol* 2000; 11: 137-43.
97. Wilkens L, Benten D, Tchinda J, Brabant G, Potter E, Dralle H *et al.* Aberrations of chromosomes 5 and 8 as recurrent cytogenetic events in anaplastic carcinoma of the thyroid as detected by fluorescence in situ hybridisation and comparative genomic hybridisation. *Virchows Arch* 2000; 436: 312-8.
98. Hunt JL, Tometsko M, LiVolsi VA, Swalsky P, Finkelstein SD and Barnes EL. Molecular evidence of anaplastic transformation in coexisting well-differentiated and anaplastic carcinomas of the thyroid. *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 1559-64.
99. Hunt JL, Livolsi VA, Baloch ZW, Swalsky PA, Bakker A, Sasatomi E *et al.* A novel microdissection and genotyping of follicular-derived thyroid tumors to predict aggressiveness. *Hum Pathol* 2003; 34: 375-80.
100. Gimm O, Perren A, Weng LP, Marsh DJ, Yeh JJ, Ziebold U *et al.* Differential nuclear and cytoplasmic expression of PTEN in normal thyroid tissue, and benign and malignant epithelial thyroid tumors. *Am J Pathol* 2000; 156: 1693-700.
101. Garcia-Rostan G, Costa AM, Pereira-Castro I, Salvatore G, Hernandez R, Hermsem MJ *et al.* Mutation of the PIK3CA gene in anaplastic thyroid cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 10199-207.
102. Garcia-Rostan G, Tallini G, Herrero A, D'Aquila TG, Carcangiu ML and Rimm DL. Frequent mutation and nuclear localization of beta-catenin in anaplastic thyroid carcinoma. *Cancer Res* 1999; 59: 1811-5.
103. *UICC International Union Against Cancer. TNM classification of malignant tumours.*, Sobin LH, Gospodarowicz MK, and Wittekind C, Editors. 2010, Blackwell Publishing Ltd.
104. Rosai J, LiVolsi VA, Sobrinho-Simoes M and Williams ED. Renaming papillary microcarcinoma of the thyroid gland: the Porto proposal. *Int J Surg Pathol* 2003; 11: 249-51.
105. Grebe SK and Hay ID. Follicular thyroid cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1995; 24: 761-801.
106. Shaha AR, Loree TR and Shah JP. Prognostic factors and risk group analysis in follicular carcinoma of the thyroid. *Surgery* 1995; 118: 1131-6; discussion 6-8.
107. Sugitani I, Kasai N, Fujimoto Y and Yanagisawa A. Prognostic factors and therapeutic strategy for anaplastic carcinoma of the thyroid. *World J Surg* 2001; 25: 617-22.
108. McIver B, Hay ID, Giuffrida DF, Dvorak CE, Grant CS, Thompson GB *et al.* Anaplastic thyroid carcinoma: a 50-year experience at a single institution. *Surgery* 2001; 130: 1028-34.

109. Voutilainen PE, Multanen M, Haapiainen RK, Leppaniemi AK and Sivula AH. Anaplastic thyroid carcinoma survival. *World J Surg* 1999; 23: 975-8; discussion 8-9.
110. Haigh PI, Ituarte PH, Wu HS, Treseler PA, Posner MD, Quivey JM *et al.* Completely resected anaplastic thyroid carcinoma combined with adjuvant chemotherapy and irradiation is associated with prolonged survival. *Cancer* 2001; 91: 2335-42.
111. Recommandations. *Annales d'Endocrinologie* 2007; 68: 57-72.
112. Conférence de consensus : prise en charge des cancers thyroïdiens différenciés de souche vésiculaire. Recommandations. *Annales d'Endocrinologie* 2007; 68: 53-6.
113. Wemeau JL and Do Cao C. [Anaplastic thyroid carcinoma]. *Ann Endocrinol (Paris)* 2008; 69: 174-80.
114. Guillaud JC. Vitamines liposolubles (A, D, E et K). *EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Endocrinologie-Nutrition* 2009: 10-540-A-10.
115. Wolf G. Identification of a membrane receptor for retinol-binding protein functioning in the cellular uptake of retinol. *Nutr Rev* 2007; 65: 385-8.
116. Parisotto M, Brodeur H, Bhat PV and Mader S. [Retinoid metabolism and cancer]. *Med Sci (Paris)* 2006; 22: 1101-6.
117. Napoli JL. Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1440: 139-62.
118. Duester G, Mic FA and Molotkov A. Cytosolic retinoid dehydrogenases govern ubiquitous metabolism of retinol to retinaldehyde followed by tissue-specific metabolism to retinoic acid. *Chem Biol Interact* 2003; 143-144: 201-10.
119. Chambon P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *Faseb J* 1996; 10: 940-54.
120. Ghyselinck NB, Bavik C, Sapin V, Mark M, Bonnier D, Hindelang C *et al.* Cellular retinol-binding protein I is essential for vitamin A homeostasis. *EMBO J* 1999; 18: 4903-14.
121. Lampron C, Rochette-Egly C, Gorry P, Dolle P, Mark M, Lufkin T *et al.* Mice deficient in cellular retinoic acid binding protein II (CRABPII) or in both CRABPI and CRABPII are essentially normal. *Development* 1995; 121: 539-48.
122. Giguere V. Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins: complex interplay in retinoid signaling. *Endocr Rev* 1994; 15: 61-79.
123. Shulman AI, Larson C, Mangelsdorf DJ and Ranganathan R. Structural determinants of allosteric ligand activation in RXR heterodimers. *Cell* 2004; 116: 417-29.
124. Lotan R, Giotto G, Nork E and Nicolson GL. Characterization of the inhibitory effects of retinoids on the in vitro growth of two malignant murine melanomas. *J Natl Cancer Inst* 1978; 60: 1035-41.
125. Lotan R, Ong DE and Chytil F. Comparison of the level of cellular retinoid-binding proteins and susceptibility to retinoid-induced growth inhibition of various neoplastic cell lines. *J Natl Cancer Inst* 1980; 64: 1259-62.
126. Hoffmann S, Rockenstein A, Ramaswamy A, Celik I, Wunderlich A, Lingelbach S *et al.* Retinoic acid inhibits angiogenesis and tumor growth of thyroid cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 264: 74-81.
127. Paez Pereda M, Missale C, Grubler Y, Arzt E, Schaaf L and Stalla GK. Nerve growth factor and retinoic acid inhibit proliferation and invasion in thyroid tumor cells. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 167: 99-106.
128. Schmutzler C, Hoang-Vu C, Ruger B and Kohrle J. Human thyroid carcinoma cell lines show different retinoic acid receptor repertoires and retinoid responses. *Eur J Endocrinol* 2004; 150: 547-56.
129. Gumireddy K, Sutton LN, Phillips PC and Reddy CD. All-trans-retinoic acid-induced apoptosis in human medulloblastoma: activation of caspase-3/poly(ADP-ribose) polymerase 1 pathway. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 4052-9.

130. Xu XC, Liu X, Tahara E, Lippman SM and Lotan R. Expression and up-regulation of retinoic acid receptor-beta is associated with retinoid sensitivity and colony formation in esophageal cancer cell lines. *Cancer Res* 1999; 59: 2477-83.
131. Mangiarotti R, Danova M, Alberici R and Pellicciari C. All-trans retinoic acid (ATRA)-induced apoptosis is preceded by G1 arrest in human MCF-7 breast cancer cells. *Br J Cancer* 1998; 77: 186-91.
132. Ohta A, Louie JS and Uitto J. Retinoid modulation of collagenase production by adherent human mononuclear cells in culture. *Ann Rheum Dis* 1987; 46: 357-62.
133. Brinckerhoff CE and Auble DT. Regulation of collagenase gene expression in synovial fibroblasts. *Ann N Y Acad Sci* 1990; 580: 355-74.
134. Clark SD, Kobayashi DK and Welgus HG. Regulation of the expression of tissue inhibitor of metalloproteinases and collagenase by retinoids and glucocorticoids in human fibroblasts. *J Clin Invest* 1987; 80: 1280-8.
135. Breitman TR, Selonick SE and Collins SJ. Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980; 77: 2936-40.
136. Haugen BR, Larson LL, Pugazhenth U, Hays WR, Kloppe JP, Kramer CA *et al.* Retinoic acid and retinoid X receptors are differentially expressed in thyroid cancer and thyroid carcinoma cell lines and predict response to treatment with retinoids. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 272-80.
137. Hicks RM, Turton JA, Chowaniec J, Tomlinson CN, Gwynne J, Nandra K *et al.* Modulation of carcinogenesis in the urinary bladder by retinoids. *Ciba Found Symp* 1985; 113: 168-90.
138. Armstrong JL, Redfern CP and Veal GJ. 13-cis retinoic acid and isomerisation in paediatric oncology--is changing shape the key to success? *Biochem Pharmacol* 2005; 69: 1299-306.
139. Freemantle SJ, Spinella MJ and Dmitrovsky E. Retinoids in cancer therapy and chemoprevention: promise meets resistance. *Oncogene* 2003; 22: 7305-15.
140. Kelly K, Kittelson J, Franklin WA, Kennedy TC, Klein CE, Keith RL *et al.* A randomized phase II chemoprevention trial of 13-CIS retinoic acid with or without alpha tocopherol or observation in subjects at high risk for lung cancer. *Cancer Prev Res (Phila Pa)* 2009; 2: 440-9.
141. Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, Glass A *et al.* Risk factors for lung cancer and for intervention effects in CARET, the Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1550-9.
142. Bonanni B and Lazzeroni M. Retinoids and breast cancer prevention. *Recent Results Cancer Res* 2009; 181: 77-82.
143. Schreck R, Schnieders F, Schmutzler C and Kohrle J. Retinoids stimulate type I iodothyronine 5'-deiodinase activity in human follicular thyroid carcinoma cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 791-8.
144. Grunwald F, Pakos E, Bender H, Menzel C, Otte R, Palmedo H *et al.* Redifferentiation therapy with retinoic acid in follicular thyroid cancer. *J Nucl Med* 1998; 39: 1555-8.
145. Coelho SM, Vaisman M and Carvalho DP. Tumour re-differentiation effect of retinoic acid: a novel therapeutic approach for advanced thyroid cancer. *Curr Pharm Des* 2005; 11: 2525-31.
146. Zhang Y, Jia S, Liu Y, Li B, Wang Z, Lu H *et al.* A clinical study of all-trans-retinoid-induced differentiation therapy of advanced thyroid cancer. *Nucl Med Commun* 2007; 28: 251-5.
147. Fernandez CA, Puig-Domingo M, Lomena F, Estorch M, Camacho Marti V, Bittini AL *et al.* Effectiveness of retinoic acid treatment for redifferentiation of thyroid cancer in relation to recovery of radioiodine uptake. *J Endocrinol Invest* 2009; 32: 228-33.
148. Miller WH, Jr. The emerging role of retinoids and retinoic acid metabolism blocking agents in the treatment of cancer. *Cancer* 1998; 83: 1471-82.
149. Armstrong JL, Ruiz M, Boddy AV, Redfern CP, Pearson AD and Veal GJ. Increasing the intracellular availability of all-trans retinoic acid in neuroblastoma cells. *Br J Cancer* 2005; 92: 696-704.

150. Hayden LJ and Satre MA. Alterations in cellular retinol metabolism contribute to differential retinoid responsiveness in normal human mammary epithelial cells versus breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2002; 72: 95-105.
151. Farias EF, Ong DE, Ghyselinck NB, Nakajo S, Kuppumbatti YS and Mira y Lopez R. Cellular retinol-binding protein I, a regulator of breast epithelial retinoic acid receptor activity, cell differentiation, and tumorigenicity. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 21-9.
152. Mira YLR, Zheng WL, Kuppumbatti YS, Rexer B, Jing Y and Ong DE. Retinol conversion to retinoic acid is impaired in breast cancer cell lines relative to normal cells. *J Cell Physiol* 2000; 185: 302-9.
153. Paik J, Blaner WS and Swisshelm K. Cis-retinol dehydrogenase: 9-cis-retinol metabolism and its effect on proliferation of human MCF7 breast cancer cells. *Exp Cell Res* 2005; 303: 183-96.
154. Rexer BN, Zheng WL and Ong DE. Retinoic acid biosynthesis by normal human breast epithelium is via aldehyde dehydrogenase 6, absent in MCF-7 cells. *Cancer Res* 2001; 61: 7065-70.
155. Kim H, Lapointe J, Kaygusuz G, Ong DE, Li C, van de Rijn M *et al.* The retinoic acid synthesis gene ALDH1a2 is a candidate tumor suppressor in prostate cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 8118-24.
156. Dragani TA, Falvella FS, Manenti G, Pierotti MA and Gambetta RA. Downexpression of aldehyde dehydrogenase 1 in murine lung tumors. *Mol Carcinog* 1996; 16: 123-5.
157. Jette C, Peterson PW, Sandoval IT, Manos EJ, Hadley E, Ireland CM *et al.* The tumor suppressor adenomatous polyposis coli and caudal related homeodomain protein regulate expression of retinol dehydrogenase L. *J Biol Chem* 2004; 279: 34397-405.
158. Cain JM, Zaino R, Shearer D, Bennett RA, Olt G and Weisz J. Expression of a retinol dehydrogenase (hRoDH-4), a member of the retinol/steroid dehydrogenase family implicated in retinoic acid biosynthesis, in normal and neoplastic endometria. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186: 675-83.
159. Rochette-Egly C and Germain P. Dynamic and combinatorial control of gene expression by nuclear retinoic acid receptors (RARs). *Nucl Recept Signal* 2009; 7: e005.
160. Zechel C, Shen XQ, Chen JY, Chen ZP, Chambon P and Gronemeyer H. The dimerization interfaces formed between the DNA binding domains of RXR, RAR and TR determine the binding specificity and polarity of the full-length receptors to direct repeats. *EMBO J* 1994; 13: 1425-33.
161. de The H, Vivanco-Ruiz MM, Tiollais P, Stunnenberg H and Dejean A. Identification of a retinoic acid responsive element in the retinoic acid receptor beta gene. *Nature* 1990; 343: 177-80.
162. Loudig O, Babichuk C, White J, Abu-Abed S, Mueller C and Petkovich M. Cytochrome P450RAI(CYP26) promoter: a distinct composite retinoic acid response element underlies the complex regulation of retinoic acid metabolism. *Mol Endocrinol* 2000; 14: 1483-97.
163. Dupe V, Davenne M, Brocard J, Dolle P, Mark M, Dierich A *et al.* In vivo functional analysis of the Hoxa-1 3' retinoic acid response element (3'RARE). *Development* 1997; 124: 399-410.
164. Qian A, Cai Y, Magee TR and Wan YJ. Identification of retinoic acid-responsive elements on the HNF1alpha and HNF4alpha genes. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 276: 837-42.
165. Durand B, Saunders M, Leroy P, Leid M and Chambon P. All-trans and 9-cis retinoic acid induction of CRABP II transcription is mediated by RAR-RXR heterodimers bound to DR1 and DR2 repeated motifs. *Cell* 1992; 71: 73-85.
166. Smith WC, Nakshatri H, Leroy P, Rees J and Chambon P. A retinoic acid response element is present in the mouse cellular retinol binding protein I (mCRBPI) promoter. *EMBO J* 1991; 10: 2223-30.
167. Mangelsdorf DJ and Evans RM. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 1995; 83: 841-50.
168. Germain P, Kammerer S, Perez E, Peluso-Ilitis C, Tortolani D, Zusi FC *et al.* Rational design of RAR-selective ligands revealed by RARbeta crystal structure. *EMBO Rep* 2004; 5: 877-82.

169. Bourguet W, Vivat V, Wurtz JM, Chambon P, Gronemeyer H and Moras D. Crystal structure of a heterodimeric complex of RAR and RXR ligand-binding domains. *Mol Cell* 2000; 5: 289-98.
170. Pogenberg V, Guichou JF, Vivat-Hannah V, Kammerer S, Perez E, Germain P *et al.* Characterization of the interaction between retinoic acid receptor/retinoid X receptor (RAR/RXR) heterodimers and transcriptional coactivators through structural and fluorescence anisotropy studies. *J Biol Chem* 2005; 280: 1625-33.
171. Brelivet Y, Kammerer S, Rochel N, Poch O and Moras D. Signature of the oligomeric behaviour of nuclear receptors at the sequence and structural level. *EMBO Rep* 2004; 5: 423-9.
172. Nagpal S, Friant S, Nakshatri H and Chambon P. RARs and RXRs: evidence for two autonomous transactivation functions (AF-1 and AF-2) and heterodimerization in vivo. *EMBO J* 1993; 12: 2349-60.
173. Farboud B and Privalsky ML. Retinoic acid receptor-alpha is stabilized in a repressive state by its C-terminal, isotype-specific F domain. *Mol Endocrinol* 2004; 18: 2839-53.
174. Poon MM and Chen L. Retinoic acid-gated sequence-specific translational control by RARalpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 20303-8.
175. Privalsky ML. The role of corepressors in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors. *Annu Rev Physiol* 2004; 66: 315-60.
176. Glass CK and Rosenfeld MG. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* 2000; 14: 121-41.
177. Altucci L, Leibowitz MD, Ogilvie KM, de Lera AR and Gronemeyer H. RAR and RXR modulation in cancer and metabolic disease. *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6: 793-810.
178. Masia S, Alvarez S, de Lera AR and Baretino D. Rapid, nongenomic actions of retinoic acid on phosphatidylinositol-3-kinase signaling pathway mediated by the retinoic acid receptor. *Mol Endocrinol* 2007; 21: 2391-402.
179. Bruck N, Vitoux D, Ferry C, Duong V, Bauer A, de The H *et al.* A coordinated phosphorylation cascade initiated by p38MAPK/MSK1 directs RARalpha to target promoters. *EMBO J* 2009; 28: 34-47.
180. Gianni M, Parrella E, Raska I, Jr., Gaillard E, Nigro EA, Gaudon C *et al.* P38MAPK-dependent phosphorylation and degradation of SRC-3/AIB1 and RARalpha-mediated transcription. *EMBO J* 2006; 25: 739-51.
181. Perissi V, Scafoglio C, Zhang J, Ohgi KA, Rose DW, Glass CK *et al.* TBL1 and TBLR1 phosphorylation on regulated gene promoters overcomes dual CtBP and NCoR/SMRT transcriptional repression checkpoints. *Mol Cell* 2008; 29: 755-66.
182. Gianni M, Bauer A, Garattini E, Chambon P and Rochette-Egly C. Phosphorylation by p38MAPK and recruitment of SUG-1 are required for RA-induced RAR gamma degradation and transactivation. *EMBO J* 2002; 21: 3760-9.
183. Huq MD, Tsai NP, Khan SA and Wei LN. Lysine trimethylation of retinoic acid receptor-alpha: a novel means to regulate receptor function. *Mol Cell Proteomics* 2007; 6: 677-88.
184. Huq MD, Ha SG and Wei LN. Modulation of retinoic acid receptor alpha activity by lysine methylation in the DNA binding domain. *J Proteome Res* 2008; 7: 4538-45.
185. Sun K, Montana V, Chellappa K, Brelivet Y, Moras D, Maeda Y *et al.* Phosphorylation of a conserved serine in the deoxyribonucleic acid binding domain of nuclear receptors alters intracellular localization. *Mol Endocrinol* 2007; 21: 1297-311.
186. Delmotte MH, Tahayato A, Formstecher P and Lefebvre P. Serine 157, a retinoic acid receptor alpha residue phosphorylated by protein kinase C in vitro, is involved in RXR.RARalpha heterodimerization and transcriptional activity. *J Biol Chem* 1999; 274: 38225-31.
187. Srinivas H, Juroske DM, Kalyankrishna S, Cody DD, Price RE, Xu XC *et al.* c-Jun N-terminal kinase contributes to aberrant retinoid signaling in lung cancer cells by phosphorylating and inducing proteasomal degradation of retinoic acid receptor alpha. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 1054-69.

188. Srinivas H, Xia D, Moore NL, Uray IP, Kim H, Ma L *et al.* Akt phosphorylates and suppresses the transactivation of retinoic acid receptor alpha. *Biochem J* 2006; 395: 653-62.
189. Lefebvre B, Brand C, Flajollet S and Lefebvre P. Down-regulation of the tumor suppressor gene retinoic acid receptor beta2 through the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway. *Mol Endocrinol* 2006; 20: 2109-21.
190. Kopf E, Plassat JL, Vivat V, de The H, Chambon P and Rochette-Egly C. Dimerization with retinoid X receptors and phosphorylation modulate the retinoic acid-induced degradation of retinoic acid receptors alpha and gamma through the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* 2000; 275: 33280-8.
191. Pickart CM and Cohen RE. Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5: 177-87.
192. Bour G, Lalevee S and Rochette-Egly C. Protein kinases and the proteasome join in the combinatorial control of transcription by nuclear retinoic acid receptors. *Trends Cell Biol* 2007; 17: 302-9.
193. Tansey WP. Transcriptional activation: risky business. *Genes Dev* 2001; 15: 1045-50.
194. Collins GA and Tansey WP. The proteasome: a utility tool for transcription? *Curr Opin Genet Dev* 2006; 16: 197-202.
195. Lee D, Ezhkova E, Li B, Pattenden SG, Tansey WP and Workman JL. The proteasome regulatory particle alters the SAGA coactivator to enhance its interactions with transcriptional activators. *Cell* 2005; 123: 423-36.
196. Ezhkova E and Tansey WP. Proteasomal ATPases link ubiquitylation of histone H2B to methylation of histone H3. *Mol Cell* 2004; 13: 435-42.
197. Lefebvre P, Martin PJ, Flajollet S, Dedieu S, Billaut X and Lefebvre B. Transcriptional activities of retinoic acid receptors. *Vitam Horm* 2005; 70: 199-264.
198. De-Castro Arce J, Soto U, van Riggelen J, Schwarz E, Hausen HZ and Rosl F. Ectopic expression of nonliganded retinoic acid receptor beta abrogates AP-1 activity by selective degradation of c-Jun in cervical carcinoma cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 45408-16.
199. Dedieu S and Lefebvre P. Retinoids interfere with the AP1 signalling pathway in human breast cancer cells. *Cell Signal* 2006; 18: 889-98.
200. Karamouzis MV and Papavassiliou AG. Retinoid receptor cross-talk in respiratory epithelium cancer chemoprevention. *Trends Mol Med* 2005; 11: 10-6.
201. Altucci L and Gronemeyer H. The promise of retinoids to fight against cancer. *Nat Rev Cancer* 2001; 1: 181-93.
202. Mark M, Ghyselinck NB and Chambon P. Function of retinoic acid receptors during embryonic development. *Nucl Recept Signal* 2009; 7: e002.
203. Subbarayan V, Kastner P, Mark M, Dierich A, Gorry P and Chambon P. Limited specificity and large overlap of the functions of the mouse RAR gamma 1 and RAR gamma 2 isoforms. *Mech Dev* 1997; 66: 131-42.
204. Wendling O, Ghyselinck NB, Chambon P and Mark M. Roles of retinoic acid receptors in early embryonic morphogenesis and hindbrain patterning. *Development* 2001; 128: 2031-8.
205. Matt N, Dupe V, Garnier JM, Dennefeld C, Chambon P, Mark M *et al.* Retinoic acid-dependent eye morphogenesis is orchestrated by neural crest cells. *Development* 2005; 132: 4789-800.
206. Mark M, Ghyselinck NB and Chambon P. Function of retinoid nuclear receptors: lessons from genetic and pharmacological dissections of the retinoic acid signaling pathway during mouse embryogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2006; 46: 451-80.
207. Lammer EJ, Chen DT, Hoar RM, Agnish ND, Benke PJ, Braun JT *et al.* Retinoic acid embryopathy. *N Engl J Med* 1985; 313: 837-41.
208. Elmazar MM, Ruhl R, Reichert U, Shroot B and Nau H. RARalpha-mediated teratogenicity in mice is potentiated by an RXR agonist and reduced by an RAR antagonist: dissection of retinoid receptor-induced pathways. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997; 146: 21-8.

209. de The H, Marchio A, Tiollais P and Dejean A. Differential expression and ligand regulation of the retinoic acid receptor alpha and beta genes. *EMBO J* 1989; 8: 429-33.
210. Gopalan C, Venkatachalam PS and Bhavani B. Studies of vitamin A deficiency in children. *Am J Clin Nutr* 1960; 8: 833-40.
211. Dzhagalov I, Chambon P and He YW. Regulation of CD8+ T lymphocyte effector function and macrophage inflammatory cytokine production by retinoic acid receptor gamma. *J Immunol* 2007; 178: 2113-21.
212. Kastner P, Lawrence HJ, Waltzinger C, Ghyselinck NB, Chambon P and Chan S. Positive and negative regulation of granulopoiesis by endogenous RARalpha. *Blood* 2001; 97: 1314-20.
213. Szondy Z, Reichert U and Fesus L. Retinoic acids regulate apoptosis of T lymphocytes through an interplay between RAR and RXR receptors. *Cell Death Differ* 1998; 5: 4-10.
214. Chapellier B, Mark M, Messaddeq N, Calleja C, Warot X, Brocard J *et al.* Physiological and retinoid-induced proliferations of epidermis basal keratinocytes are differently controlled. *EMBO J* 2002; 21: 3402-13.
215. Akmal KM, Dufour JM and Kim KH. Retinoic acid receptor alpha gene expression in the rat testis: potential role during the prophase of meiosis and in the transition from round to elongating spermatids. *Biol Reprod* 1997; 56: 549-56.
216. Vernet N, Dennefeld C, Rochette-Egly C, Oulad-Abdelghani M, Chambon P, Ghyselinck NB *et al.* Retinoic acid metabolism and signaling pathways in the adult and developing mouse testis. *Endocrinology* 2006; 147: 96-110.
217. A IJ, Tan NS, Gelman L, Kersten S, Seydoux J, Xu J *et al.* In vivo activation of PPAR target genes by RXR homodimers. *EMBO J* 2004; 23: 2083-91.
218. Szanto A, Narkar V, Shen Q, Uray IP, Davies PJ and Nagy L. Retinoid X receptors: X-ploring their (patho)physiological functions. *Cell Death Differ* 2004; 11 Suppl 2: S126-43.
219. A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell* 1999; 97: 161-3.
220. Egea PF, Rochel N, Birck C, Vachette P, Timmins PA and Moras D. Effects of ligand binding on the association properties and conformation in solution of retinoic acid receptors RXR and RAR. *J Mol Biol* 2001; 307: 557-76.
221. Westin S, Kurokawa R, Nolte RT, Wisely GB, Mclnerney EM, Rose DW *et al.* Interactions controlling the assembly of nuclear-receptor heterodimers and co-activators. *Nature* 1998; 395: 199-202.
222. Zhang J, Hu X and Lazar MA. A novel role for helix 12 of retinoid X receptor in regulating repression. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 6448-57.
223. Mangelsdorf DJ, Borgmeyer U, Heyman RA, Zhou JY, Ong ES, Oro AE *et al.* Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes Dev* 1992; 6: 329-44.
224. Huss JM, Levy FH and Kelly DP. Hypoxia inhibits the peroxisome proliferator-activated receptor alpha/retinoid X receptor gene regulatory pathway in cardiac myocytes: a mechanism for O₂-dependent modulation of mitochondrial fatty acid oxidation. *J Biol Chem* 2001; 276: 27605-12.
225. Singh Ahuja H, Liu S, Crombie DL, Boehm M, Leibowitz MD, Heyman RA *et al.* Differential effects of rexinoids and thiazolidinediones on metabolic gene expression in diabetic rodents. *Mol Pharmacol* 2001; 59: 765-73.
226. Mukherjee R, Davies PJ, Crombie DL, Bischoff ED, Cesario RM, Jow L *et al.* Sensitization of diabetic and obese mice to insulin by retinoid X receptor agonists. *Nature* 1997; 386: 407-10.
227. Cha BS, Ciaraldi TP, Carter L, Nikoulina SE, Mudaliar S, Mukherjee R *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma and retinoid X receptor (RXR) agonists have complementary effects on glucose and lipid metabolism in human skeletal muscle. *Diabetologia* 2001; 44: 444-52.
228. Claudel T, Leibowitz MD, Fievet C, Tailleux A, Wagner B, Repa JJ *et al.* Reduction of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice by activation of the retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 2610-5.

229. Defacque H, Commes T, Legouffe E, Sevilla C, Rossi JF, Rochette-Egly C *et al.* Expression of Retinoid X Receptor alpha is increased upon monocytic cell differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 220: 315-22.
230. Sucov HM, Dyson E, Gumeringer CL, Price J, Chien KR and Evans RM. RXR alpha mutant mice establish a genetic basis for vitamin A signaling in heart morphogenesis. *Genes Dev* 1994; 8: 1007-18.
231. Sunaga S, Maki K, Lagasse E, Blanco JC, Ozato K, Miyazaki J *et al.* Myeloid differentiation is impaired in transgenic mice with targeted expression of a dominant negative form of retinoid X receptor beta. *Br J Haematol* 1997; 96: 19-30.
232. Shiohara M, Dawson MI, Hobbs PD, Sawai N, Higuchi T, Koike K *et al.* Effects of novel RAR- and RXR-selective retinoids on myeloid leukemic proliferation and differentiation in vitro. *Blood* 1999; 93: 2057-66.
233. Benoit G, Altucci L, Flexor M, Ruchaud S, Lillehaug J, Raffelsberger W *et al.* RAR-independent RXR signaling induces t(15;17) leukemia cell maturation. *EMBO J* 1999; 18: 7011-8.
234. Nagy L, Thomazy VA, Chandraratna RA, Heyman RA and Davies PJ. Retinoid-regulated expression of BCL-2 and tissue transglutaminase during the differentiation and apoptosis of human myeloid leukemia (HL-60) cells. *Leuk Res* 1996; 20: 499-505.
235. Benoit GR, Flexor M, Besancon F, Altucci L, Rossin A, Hillion J *et al.* Autonomous rexinoid death signaling is suppressed by converging signaling pathways in immature leukemia cells. *Mol Endocrinol* 2001; 15: 1154-69.
236. Clifford J, Chiba H, Sobieszczuk D, Metzger D and Chambon P. RXRalpha-null F9 embryonal carcinoma cells are resistant to the differentiation, anti-proliferative and apoptotic effects of retinoids. *EMBO J* 1996; 15: 4142-55.
237. Balasubramanian S, Chandraratna RA and Eckert RL. Suppression of human pancreatic cancer cell proliferation by AGN194204, an RXR-selective retinoid. *Carcinogenesis* 2004; 25: 1377-85.
238. Tanaka T, Dancheck BL, Trifiletti LC, Birnkrant RE, Taylor BJ, Garfield SH *et al.* Altered localization of retinoid X receptor alpha coincides with loss of retinoid responsiveness in human breast cancer MDA-MB-231 cells. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 3972-82.
239. Deltour S, Chopin V and Leprince D. [Epigenetics and cancer]. *Med Sci (Paris)* 2005; 21: 405-11.
240. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002; 16: 6-21.
241. Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 2395-402.
242. Feinberg AP and Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 143-53.
243. Herman JG and Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003; 349: 2042-54.
244. Berard J, Laboune F, Mukuna M, Masse S, Kothary R and Bradley WE. Lung tumors in mice expressing an antisense RARbeta2 transgene. *Faseb J* 1996; 10: 1091-7.
245. Si SP, Lee X, Tsou HC, Buchsbaum R, Tibaduiza E and Peacocke M. RAR beta 2-mediated growth inhibition in HeLa cells. *Exp Cell Res* 1996; 223: 102-11.
246. Kim JS, Lee H, Kim H, Shim YM, Han J, Park J *et al.* Promoter methylation of retinoic acid receptor beta 2 and the development of second primary lung cancers in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22: 3443-50.
247. Li R, Saito T, Tanaka R, Satohisa S, Adachi K, Horie M *et al.* Hypermethylation in promoter region of retinoic acid receptor-beta gene and immunohistochemical findings on retinoic acid receptors in carcinogenesis of endometrium. *Cancer Lett* 2005; 219: 33-40.
248. Bovenzi V, Le NL, Cote S, Sinnott D, Momparler LF and Momparler RL. DNA methylation of retinoic acid receptor beta in breast cancer and possible therapeutic role of 5-aza-2'-deoxycytidine. *Anticancer Drugs* 1999; 10: 471-6.

249. Klein O, Grignon Y, Civit T, Auque J and Marchal JC. [Methylation status of RARbeta gene promoter in low and high grade cerebral glioma. Comparison with normal tissue. Immunohistochemical study of nuclear RARbeta expression in low and high grade cerebral glioma cells. Comparison with normal cells. 48 tumors]. *Neurochirurgie* 2005; 51: 147-54.
250. Lee ES, Issa JP, Roberts DB, Williams MD, Weber RS, Kies MS *et al.* Quantitative promoter hypermethylation analysis of cancer-related genes in salivary gland carcinomas: comparison with methylation-specific PCR technique and clinical significance. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 2664-72.
251. Koh CS, Ku JL, Park SY, Kim KH, Choi JS, Kim IJ *et al.* Establishment and characterization of cell lines from three human thyroid carcinomas: responses to all-trans-retinoic acid and mutations in the BRAF gene. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 264: 118-27.
252. Miasaki FY, Vivaldi A, Ciampi R, Agate L, Collecchi P, Capodanno A *et al.* Retinoic acid receptor beta2 re-expression and growth inhibition in thyroid carcinoma cell lines after 5-aza-2'-deoxycytidine treatment. *J Endocrinol Invest* 2008; 31: 724-30.
253. Youssef EM, Lotan D, Issa JP, Wakasa K, Fan YH, Mao L *et al.* Hypermethylation of the retinoic acid receptor-beta(2) gene in head and neck carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 1733-42.
254. Hu S, Liu D, Tufano RP, Carson KA, Rosenbaum E, Cohen Y *et al.* Association of aberrant methylation of tumor suppressor genes with tumor aggressiveness and BRAF mutation in papillary thyroid cancer. *Int J Cancer* 2006; 119: 2322-9.
255. Hoque MO, Rosenbaum E, Westra WH, Xing M, Ladenson P, Zeiger MA *et al.* Quantitative assessment of promoter methylation profiles in thyroid neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 4011-8.
256. Mohammadi-Asl J, Larijani B, Khorgami Z, Tavangar SM, Haghpanah V, Kheirollahi M *et al.* Qualitative and quantitative promoter hypermethylation patterns of the P16, TSHR, RASSF1A and RARbeta2 genes in papillary thyroid carcinoma. *Med Oncol* 2010: 2010/06/11.
257. Schagdarsurengin U, Gimm O, Dralle H, Hoang-Vu C and Dammann R. CpG island methylation of tumor-related promoters occurs preferentially in undifferentiated carcinoma. *Thyroid* 2006; 16: 633-42.
258. Cras A, Darsin-Bettinger D, Balitrand N, Cassinat B, Soulie A, Toubert ME *et al.* Epigenetic patterns of the retinoic acid receptor beta2 promoter in retinoic acid-resistant thyroid cancer cells. *Oncogene* 2007; 26: 4018-24.
259. Hou P, Ji M and Xing M. Association of PTEN gene methylation with genetic alterations in the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway in thyroid tumors. *Cancer* 2008; 113: 2440-7.
260. Xing M, Cohen Y, Mambo E, Tallini G, Udelsman R, Ladenson PW *et al.* Early occurrence of RASSF1A hypermethylation and its mutual exclusion with BRAF mutation in thyroid tumorigenesis. *Cancer Res* 2004; 64: 1664-8.
261. Xing M, Usadel H, Cohen Y, Tokumaru Y, Guo Z, Westra WB *et al.* Methylation of the thyroid-stimulating hormone receptor gene in epithelial thyroid tumors: a marker of malignancy and a cause of gene silencing. *Cancer Res* 2003; 63: 2316-21.
262. Xing M, Tokumaru Y, Wu G, Westra WB, Ladenson PW and Sidransky D. Hypermethylation of the Pendred syndrome gene SLC26A4 is an early event in thyroid tumorigenesis. *Cancer Res* 2003; 63: 2312-5.
263. Berlingieri MT, Musti AM, Avvedimento VE, Di Lauro R, Di Fiore PP and Fusco A. The block of thyroglobulin synthesis, which occurs upon transformation of rat thyroid epithelial cells, is at the transcriptional level and it is associated with methylation of the 5' flanking region of the gene. *Exp Cell Res* 1989; 183: 277-83.
264. Venkataraman GM, Yatin M, Marcinek R and Ain KB. Restoration of iodide uptake in dedifferentiated thyroid carcinoma: relationship to human Na⁺/I⁻-symporter gene methylation status. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 2449-57.

265. Plenat F, Picard E, Antunes L, Vignaud JM, Marie B, Chalabreysse P *et al.* [Amplification of immunologic reactions using catalytic deposition at the reaction sites of tyramine derivatives. A decisive gain in sensitivity in immunohistochemistry and in situ hybridization]. *Ann Pathol* 1997; 17: 17-23.
266. Hopman AH, Ramaekers FC and Speel EJ. Rapid synthesis of biotin-, digoxigenin-, trinitrophenyl-, and fluorochrome-labeled tyramides and their application for In situ hybridization using CARD amplification. *J Histochem Cytochem* 1998; 46: 771-7.
267. Hayatsu H, Shiraishi M and Negishi K. Bisulfite modification for analysis of DNA methylation. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem* 2008; Chapter 6: Unit 6 10.
268. Cote S, Sinnott D and Momparler RL. Demethylation by 5-aza-2'-deoxycytidine of specific 5-methylcytosine sites in the promoter region of the retinoic acid receptor beta gene in human colon carcinoma cells. *Anticancer Drugs* 1998; 9: 743-50.
269. Xu XC. Detection of altered retinoic acid receptor expression in tissue sections using in situ hybridization. *Histol Histopathol* 2001; 16: 205-12.
270. Poulain S, Lacomme S, Battaglia-Hsu SF, du Manoir S, Brochin L, Vignaud JM *et al.* Signalling with retinoids in the human lung: validation of new tools for the expression study of retinoid receptors. *BMC Cancer* 2009; 9: 423.
271. Hoftijzer HC, Liu YY, Morreau H, van Wezel T, Pereira AM, Corssmit EP *et al.* Retinoic acid receptor and retinoid X receptor subtype expression for the differential diagnosis of thyroid neoplasms. *Eur J Endocrinol* 2009; 160: 631-8.
272. Rochaix P, Monteil-Onteniente S, Rochette-Egly C, Caratero C, Voigt JJ and Jozan S. Reduced expression of retinoic acid receptor beta protein (RAR beta) in human papillary thyroid carcinoma: immunohistochemical and western blot study. *Histopathology* 1998; 33: 337-43.
273. Takiyama Y, Miyokawa N, Sugawara A, Kato S, Ito K, Sato K *et al.* Decreased expression of retinoid X receptor isoforms in human thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 5851-61.
274. Martinet N, Alla F, Farre G, Labib T, Drouot H, Vidili R *et al.* Retinoic acid receptor and retinoid X receptor alterations in lung cancer precursor lesions. *Cancer Res* 2000; 60: 2869-75.
275. Fazzari MJ and Greally JM. Introduction to epigenomics and epigenome-wide analysis. *Methods Mol Biol*; 620: 243-65.
276. Tetzner R. Prevention of PCR cross-contamination by UNG treatment of bisulfite-treated DNA. *Methods Mol Biol* 2009; 507: 357-70.
277. Preusser M, Elezi L and Hainfellner JA. Reliability and reproducibility of PCR-based testing of O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene (MGMT) promoter methylation status in formalin-fixed and paraffin-embedded neurosurgical biopsy specimens. *Clin Neuropathol* 2008; 27: 388-90.
278. Brandes JC, Carraway H and Herman JG. Optimal primer design using the novel primer design program: MSPprimer provides accurate methylation analysis of the ATM promoter. *Oncogene* 2007; 26: 6229-37.
279. Shaw RJ, Akufo-Tetteh EK, Risk JM, Field JK and Liloglou T. Methylation enrichment pyrosequencing: combining the specificity of MSP with validation by pyrosequencing. *Nucleic Acids Res* 2006; 34: e78.
280. Hayashi K, Goodison S, Urquidí V, Tarin D, Lotan R and Tahara E. Differential effects of retinoic acid on the growth of isogenic metastatic and non-metastatic breast cancer cell lines and their association with distinct expression of retinoic acid receptor beta isoforms 2 and 4. *Int J Oncol* 2003; 22: 623-9.
281. Carta C, Moretti S, Passeri L, Barbi F, Avenia N, Cavaliere A *et al.* Genotyping of an Italian papillary thyroid carcinoma cohort revealed high prevalence of BRAF mutations, absence of RAS mutations and allowed the detection of a new mutation of BRAF oncoprotein (BRAF(V599Ins)). *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; 64: 105-9.

282. Simon D, Kohrle J, Schmutzler C, Mainz K, Reiners C and Roher HD. Redifferentiation therapy of differentiated thyroid carcinoma with retinoic acid: basics and first clinical results. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1996; 104 Suppl 4: 13-5.
283. Schlumberger M, Pacini F, Wiersinga WM, Toft A, Smit JW, Sanchez Franco F *et al.* Follow-up and management of differentiated thyroid carcinoma: a European perspective in clinical practice. *Eur J Endocrinol* 2004; 151: 539-48.

VU

NANCY, le 10 septembre 2010
Le Président de Thèse

Professeur J.M. VIGNAUD

NANCY, le 14 septembre 2010
Le Doyen de la Faculté de Médecine
Par délégation,

Mme le Professeur M.C. BÉNÉ

AUTORISE À SOUTENIR ET À IMPRIMER LA THÈSE

NANCY, le 21 septembre 2010

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY 1
Par délégation

Madame C. CAPDEVILLE-ATKINSON

RÉSUMÉ DE LA THÈSE

Introduction. Les rétinoïdes jouent d'importants rôles dans le développement, la différenciation cellulaire, la prolifération et l'apoptose. Ils agissent par l'intermédiaire de deux familles de récepteurs nucléaires : les récepteurs de l'acide rétinoïque (RARs) et les récepteurs aux rétinoïdes X (RXRs). Le but de cette étude est d'analyser le niveau d'expression de RAR α , RAR β , RXR α et RXR β dans les carcinomes thyroïdiens, ainsi que le profil de méthylation du promoteur de *RAR β 2*.

Matériels et méthodes. L'étude immunohistochimique de RAR α , RAR β , RXR α et RXR β est réalisée dans 18 adénomes vésiculaires et 69 carcinomes thyroïdiens. La détermination du statut de méthylation du promoteur de *RAR β 2* porte sur 18 adénomes vésiculaires, et 41 carcinomes thyroïdiens. Le séquençage de l'exon 15 de *BRAF* est réalisé dans 33 cas.

Résultats. L'expression des récepteurs aux rétinoïdes est plus fréquemment anormale dans les carcinomes que les adénomes, à l'exception de RXR β : les expressions de RAR α , RAR β , RXR α et RXR β sont respectivement anormales dans 76%, 67%, 65% et 81% des carcinomes, et 61%, 17%, 22% et 83% des adénomes. Les anomalies majoritairement constatées sont une baisse de l'expression nucléaire (RAR β , RXR α), ou une séquestration cytoplasmique (RAR α , RXR β). Le pyroséquençage met en évidence une méthylation du promoteur de *RAR β 2* dans 5% des carcinomes (carcinomes indifférenciés/anaplasiques : 2/14), et dans 0% des adénomes. La mutation V600E de *BRAF* est détectée dans 50% des carcinomes vésiculaires et dans un cas (7%) de carcinome indifférencié/anaplasique avec composante papillaire minoritaire, et une nouvelle mutation (T599dup) est détectée un cas (7%) de carcinome indifférencié/anaplasique.

Conclusion. L'expression des récepteurs aux rétinoïdes est fréquemment altérée dans les carcinomes thyroïdiens. Une méthylation aberrante du promoteur de *RAR β 2* n'est retrouvée que dans 5% des carcinomes. D'autres mécanismes de dérégulation sont en cause et restent à être explorés.

TITRE EN ANGLAIS

Expression of acid retinoids and retinoids X receptors, α and β , and analysis of *RAR β 2* promotor methylation in thyroid carcinomas

THÈSE : MÉDECINE SPÉCIALISÉE – ANNÉE 2010

MOTS CLEFS : RAR ; RXR ; RAR β 2 ; méthylation ; BRAF ; thyroïde ; cancer ; carcinome ; adénome

INTITULÉ ET ADRESSE DE L'U.F.R. :

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY-1

Faculté de Médecine de Nancy

9, avenue de la Forêt de Haye

54505 VANDOEUVRE LES NANCY Cedex
