

UNIVERSITE PARIS DESCARTES
U.F.R de Pharmacie
Ecole doctorale du Médicament
4, Avenue de l'observatoire
75006 Paris

INSTITUT GUSTAVE ROUSSY
CNRS FRE 2939 « Génomes & Cancers »
Pavillons de Recherche 1
39, rue Camille Desmoulins
94805 Villejuif



THESE DE DOCTORAT

de l'Université Paris Descartes
Discipline: Biologie - Option : pharmacologie-cancérologie



Présentée par : Mlle Nabahet AMEUR

Analyse génomique des Cancers Médullaires de la Thyroïde appliquée à l'étude comparative de l'oncogenèse humaine et murine

Soutenue le 30 janvier 2008

Jury

Président : Pr. Michel VIDAL

Rapporteur : Pr. Jacques YOUNG

Rapporteur : Dr. Sylvie CHEVILLARD

Examineur : Pr. Jacques Emile DUMONT

Examineur : Pr. Martin SCHLUMBERGER

Directeur de thèse : Pr. Jean-Michel BIDART

Sommaire

Abréviations.....	1
Introduction.....	4
1. Les systèmes neuro-endocrinien et thyroïdien.....	6
1.1. Le Système Neuro-endocrine.....	6
1.1.1. Les Tumeurs Neuro-endocrines (TNE).....	6
1.1.2. Bases moléculaires de l'oncogénèse des tumeurs neuro-endocrines.....	7
1.1.3. Marqueurs biologiques des tumeurs neuro-endocrines.....	9
1.1.4. Traitement et pronostic des tumeurs neuro-endocrines.....	9
1.2. Le système endocrine thyroïdien.....	10
1.2.1. Aspects anatomiques et fonctionnels de la thyroïde.....	10
1.2.2. Les tumeurs de la thyroïde.....	12
1.3. Oncogénèse des cellules C et cancer médullaire de la thyroïde.....	15
1.3.1. Oncogénèse des cellules C.....	15
1.3.2. Bases anatomo-cliniques du cancer médullaire de la thyroïde.....	16
1.3.3. Marqueurs biologiques du cancer médullaire de la thyroïde.....	19
1.3.4. Traitement et pronostic du cancer médullaire de la thyroïde.....	21
1.3.5. Bases moléculaires de l'oncogénèse du cancer médullaire de la thyroïde.....	23
2. Analyse du Statut Mutationnel des Tumeurs Endocrines.....	33
2.1. Introduction.....	33
2.2. Résultats & Discussion.....	35
3. Etude de l'Expression Génique dans les Cancers Médullaires de la Thyroïde.....	38
3.1. Introduction.....	38
3.2. Objectif & Méthodes.....	41
3.2.1. Objectif.....	41
3.2.2. Méthodes.....	41
3.3. Discussion.....	43
4. Etude Chromosomique et Génomique des Tumeurs des Cellules C dans des Modèles Murins.....	46
4.1. Modèles murins.....	46
4.1.1. Modèles basés sur des mutations du gène <i>RET</i>	48
4.1.2. Modèles basés sur d'autres altérations géniques.....	49
4.2. Etude chromosomique et génique des tumeurs <i>RET</i> ⁶³⁴	50
4.2.1. Objectifs et Méthodes.....	50
4.2.2. Résultats.....	52
- Suivi de la tumorigénèse des souris <i>RET</i> ⁶³⁴	52
- Collection fissulaire et préparation des acides nucléiques.....	57
- Analyse chromosomique par la technique de CGH (Comparative Genomic Hybridization).....	57
- Analyse transcriptomique par la technique de puce à ADN.....	61
- Etude comparative des tumeurs <i>RET</i> ⁶³⁴ selon deux méthodes de microarray.....	66
4.2.3. Discussion.....	66

4.3. Etude d'un nouveau modèle de cancer médullaire de la thyroïde.....	72
4.3.1. <i>Introduction.....</i>	72
4.3.2. <i>Objectifs et Méthodes.....</i>	73
4.3.3. <i>Résultats et Discussion.....</i>	75
5. Discussion Générale.....	77
6. Perspectives.....	85
7. Annexes.....	88
ANNEXE 1: Dosage de la calcitonine des souris RET⁶³⁴.....	88
ANNEXE 2: Immunohistochimie et Extraction d'Acides nucléiques.....	89
ANNEXE 3: Analyse chromosomique et transcriptomique comparative des différents stades de la tumorigénèse des cellules C développées par les souris RET⁶³⁴.....	90
ANNEXE 4: Etude transcriptomique comparative des tumeurs des souris RET⁶³⁴ et des souris ^{PLR}-/-.....	92
ANNEXE 5: Les étapes de synthèse et hybridation des sondes.....	94
ANNEXE 6: Caractéristiques des souris RET⁶³⁴ utilisées pour les études de CGH.....	95
ANNEXE 7: Caractéristiques des souris RET⁶³⁴ utilisées pour les études de transcriptome.....	96
ANNEXE 8: Liste des 960 gènes avec leur variation quantitative obtenus suite à l'analyse transcriptomique comparative des différents stades de la progression tumorale chez les souris RET⁶³⁴.....	97
8. Références Bibliographiques.....	121

Résumé

Les tumeurs endocrines sont des tumeurs rares, regroupant essentiellement les tumeurs neuro-endocrines (TNE) et les cancers de la thyroïde. Parmi ces derniers, le cancer médullaire de la thyroïde (CMT) représente 5 à 8 % des cancers de la thyroïde. Il se développe aux dépens des cellules C de la thyroïde et survient dans un contexte familial ou sporadique. Les formes familiales et environ 40% des formes sporadiques sont dues à des mutations activatrices de l'oncogène *RET*. Sur un plan cognitif, les altérations géniques du CMT demeurent mal connues et leur identification est essentielle pour la compréhension des différents phénotypes observés, et des mécanismes impliqués dans la genèse et la progression de la maladie. Dans ce contexte, ce travail de thèse a porté sur l'analyse des altérations géniques dans les tumeurs endocrines, et en particulier à celles associées au développement du CMT.

Dans un premier temps, une analyse des mutations récemment décrites dans les tumeurs solides a été réalisée dans une collection de tumeurs neuro-endocrines, et en particulier de CMT, avec pour objectif d'étudier leur fréquence et de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques. Cette analyse a permis de confirmer la présence de la mutation « hot-spot » du gène *BRAF* (V600E) dans 50% des cancers papillaires de la thyroïde et dans une faible proportion de TNE gastro-intestinales. Elle a également mis en évidence l'absence de mutations les plus fréquentes des gènes *JAKS*, *EGFR* et *PIKCA* dans ces tumeurs, indiquant ainsi que sur un plan thérapeutique, hormis *BRAF*, les gènes analysés ne semblent pas être de bons candidats pour le développement de thérapies moléculaires dans ces tumeurs.

Dans un second temps, une analyse génomique des CMT humains a été effectuée par une technique à haut-débit sur puce à oligonucléotides. Des profils géniques associés aux différents types de CMT ont été caractérisés, et en particulier permettant de distinguer les formes agressives de la maladie. Ces derniers se caractérisent par l'expression de gènes impliqués dans la prolifération et/ou l'invasion (*PTN*, *ESM1*, *CEACAM6*) ou bien dans le remodelage de la matrice extracellulaire (*COL1A1*, *COL1A2*, *COMP*). Dans un modèle cellulaire humain, la lignée TT, l'inhibition du transcript *RET* par siRNA confirme l'implication de certains gènes dans les voies de signalisation médies par *RET*.

Enfin, une analyse moléculaire de cancers médullaires développés par deux modèles murins (*RET*⁶³⁴ et *PRLR*^{-/-}) a permis de caractériser les altérations géniques et chromosomiques au cours de la progression de ces tumeurs. Elle a également mis en évidence une forte synergie entre les altérations observées chez l'homme et chez la souris. En particulier, la délétion du chromosome 4 (1p chez l'homme) semble être un événement précoce dans l'oncogénèse: un schéma du développement tumoral est proposé. Ces modèles animaux sont donc de bons outils pour la compréhension de la progression tumorale, de la tumeur bénigne ou hyperplasie à la forme maligne ou carcinome, ainsi que pour l'évaluation de nouveaux traitements pour le cancer médullaire de la thyroïde.

Mots clés: tumeur neuro-endocrine, cancer médullaire de la thyroïde, CMT, *RET*, altération génique, expression génique, aberration chromosomique.