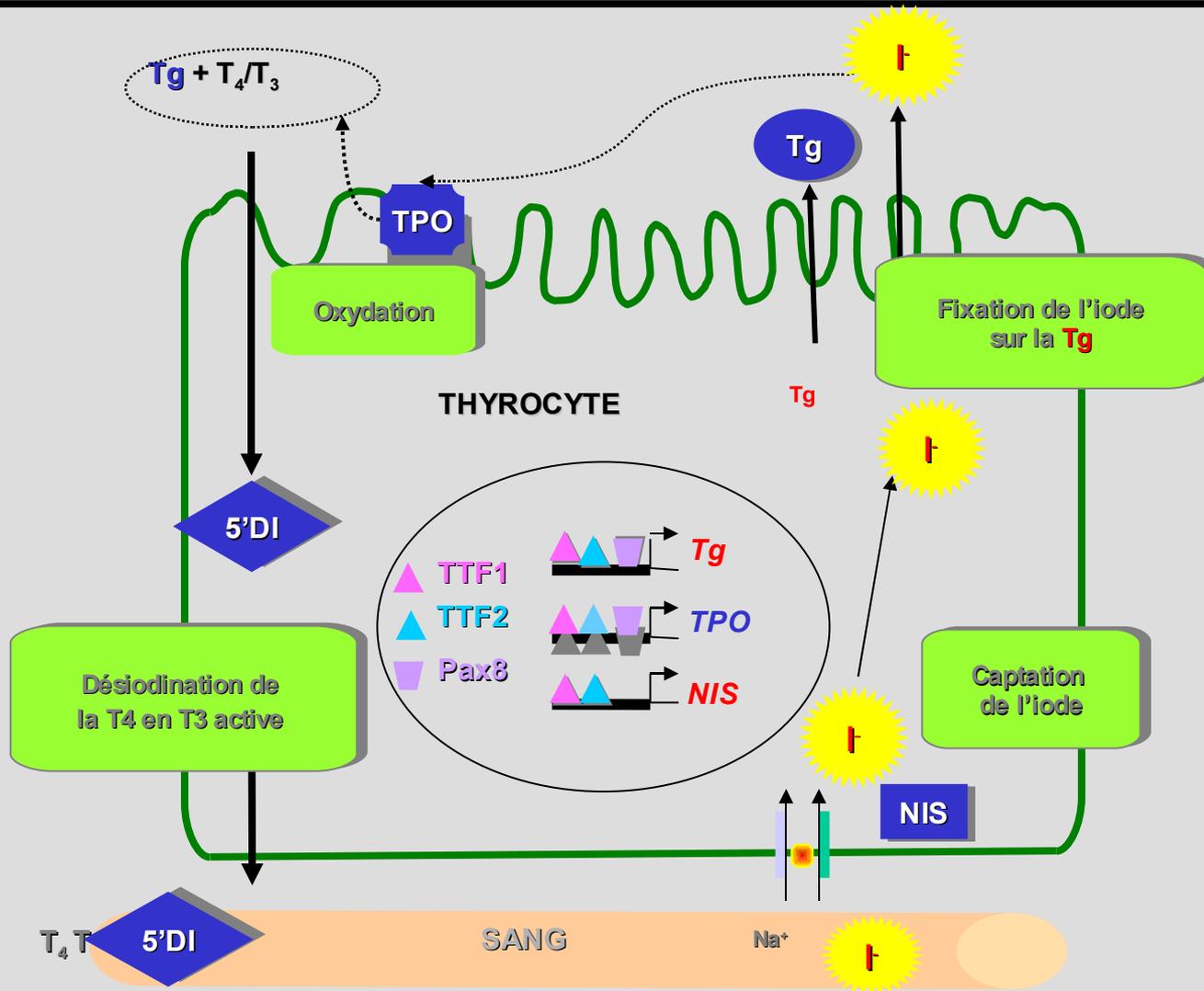

Exemple
Différenciation de la cellule thyroïdienne

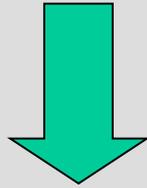
Différenciation de la cellule thyroïdienne



cellule maligne:

altérations des voies de contrôle

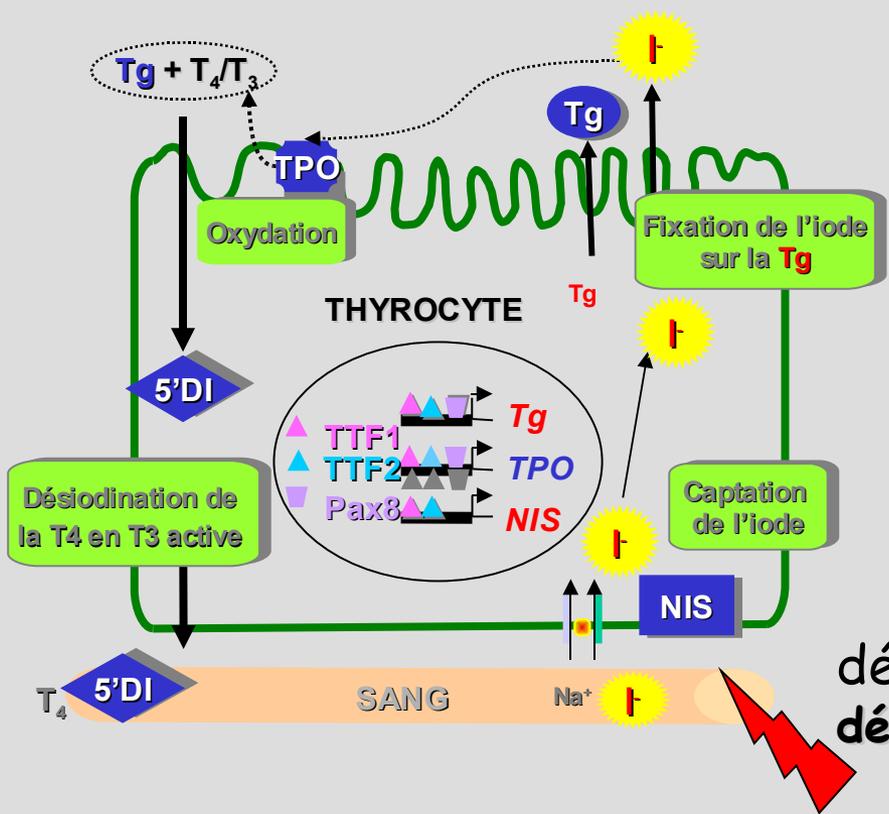
Blocage de la différenciation,
Augmentation de la prolifération
Augmentation de la survie cellulaire



Agents différenciants

Reprise de la différenciation
arrêt de la prolifération
mort cellulaire

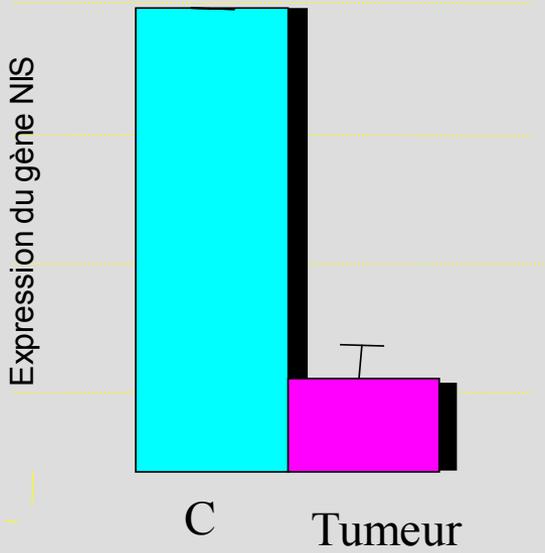
Certaines cellules de cancer thyroïdien ne peuvent pas capter l'iode: blocage de la différenciation:



défaut de captation de l'iode:
défaut d'expression du gène NIS

Certaines cellules de cancer thyroïdien ne peuvent pas capter l'iode: blocage de la différenciation: défaut d'expression des gènes

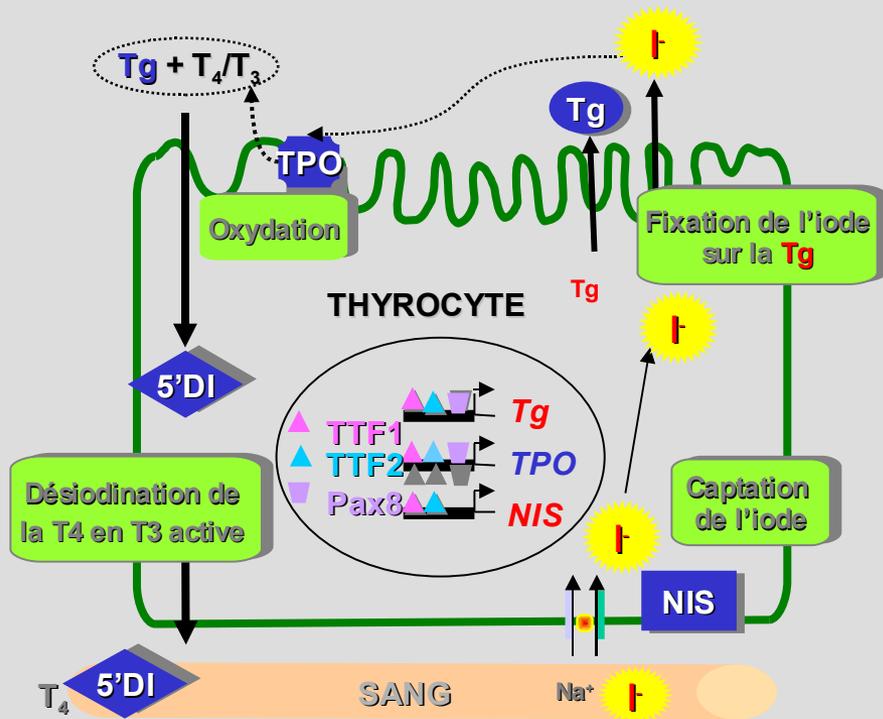
Expression du gène NIS
Mesure du taux d'ARNm par RT-PCR quantitative



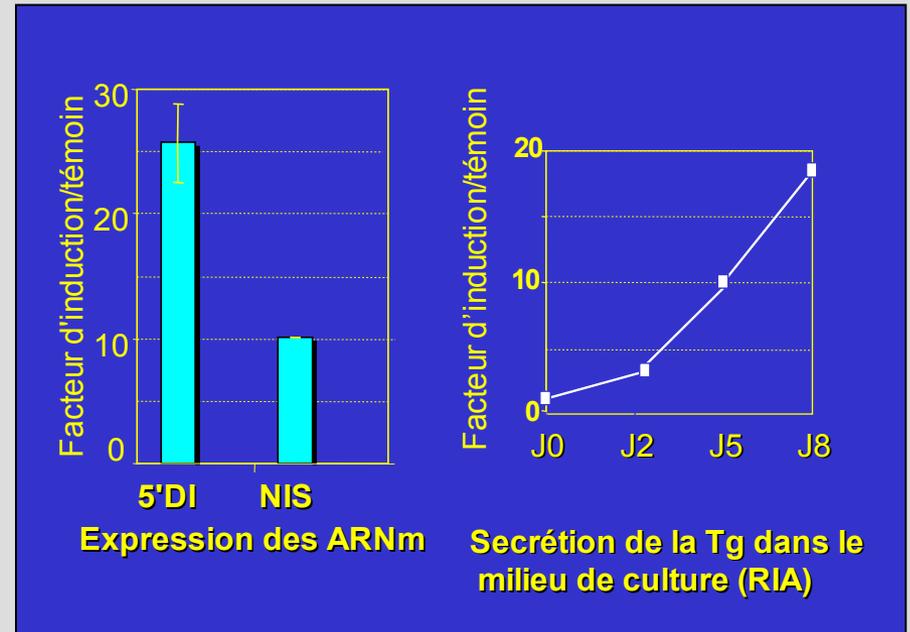
T=24h
(RT-PCR quantitative)

**Différenciation de la cellule cancéreuse thyroïdienne:
mise en évidence
du rôle de l'acide rétinoïque, dérivé de la vitamine A**

Différenciation de la cellule thyroïdienne: mise en évidence du rôle de l'acide rétinoïque, dérivé de la vitamine A



Induction de l'expression des marqueurs de différenciation par l'acide rétinoïque



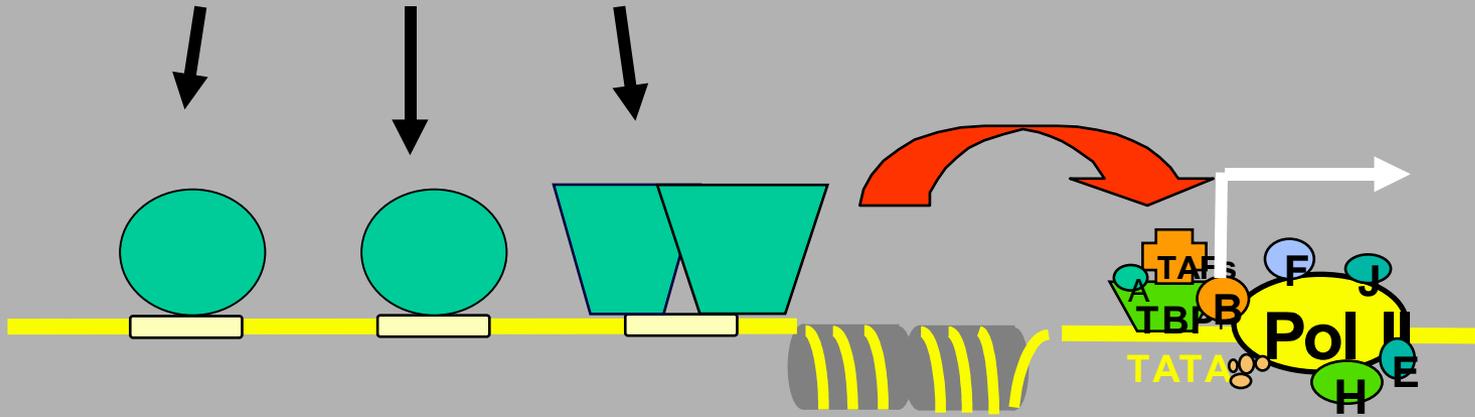
AR augmente les paramètres de la cellule thyroïdienne différenciée

Question:

qu'est-ce qui régule l'augmentation de l'expression des gènes codant pour le NIS et la 5'DI par l'Acide rétinoïque?

Contrôle de l'expression des gènes Au niveau transcriptionnel

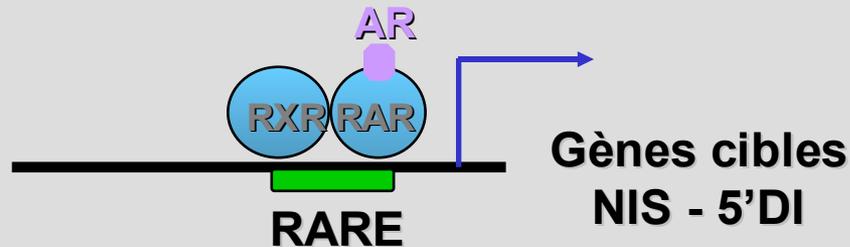
Protéines transcriptionnelles



Déméthylation
des bases nucléotidiques

Acétylation
des histones

- L'acide rétinoïque (AR) agit par l'intermédiaire de protéines transcriptionnelles: les récepteurs de l'AR
- Séquences RARE dans le promoteur des gènes NIS et 5DI



Récepteurs de l'acide rétinoïque:

3 RXR α , β , γ

3 RAR α , β , γ

qui s'assemblent en hétérodimères en fonction de la cellule et du gène

Quels récepteurs sont spécifiques de la cellule thyroïdienne?

Etude de l'expression des différents récepteurs dans la cellule thyroïdienne normale

Thyroïde normale	RAR α	RAR β	RAR γ	RXR α	RXR β	RXR γ
	++	+++	++	+	+	0

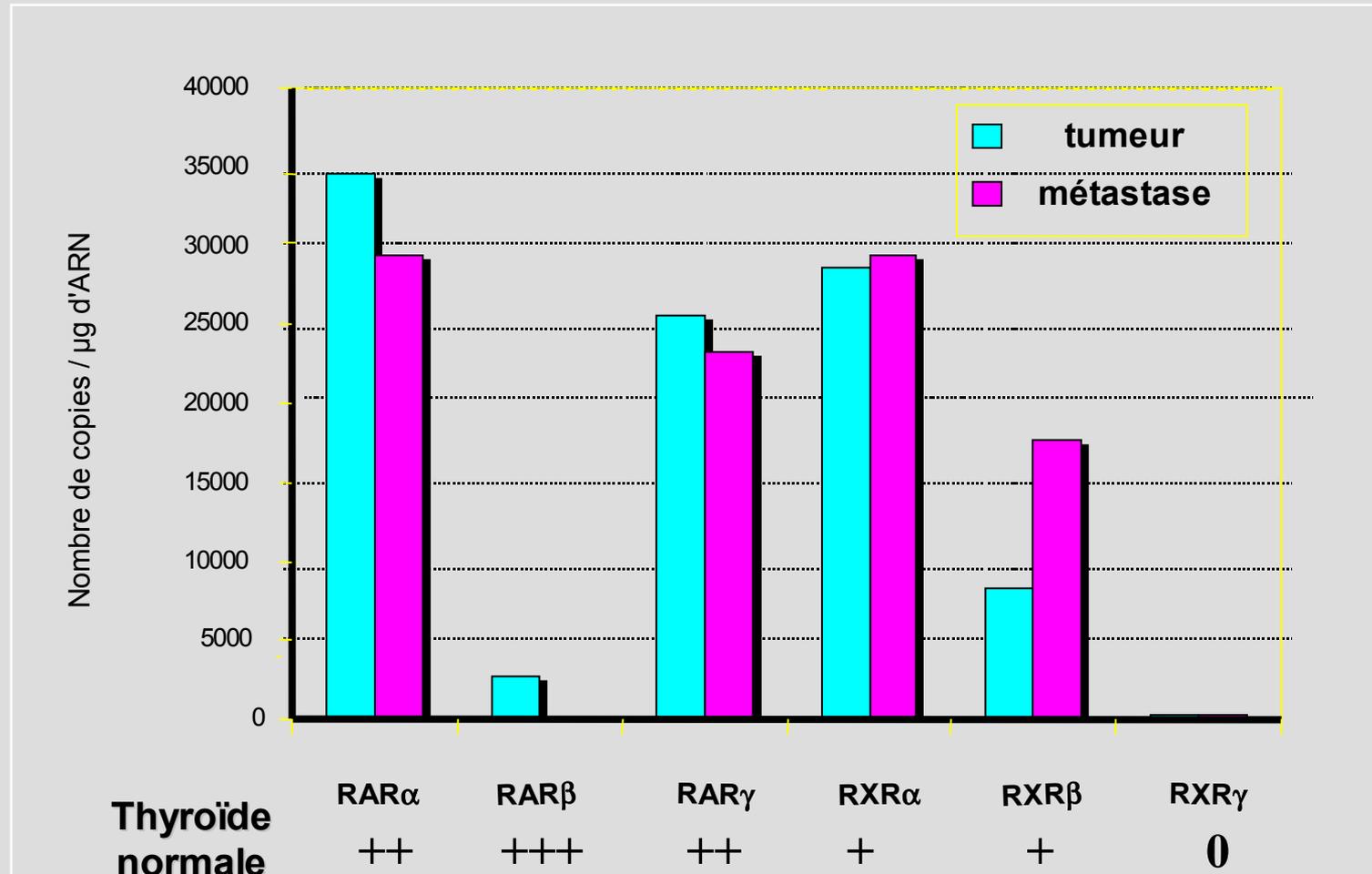


Rôle potentiel de RAR β

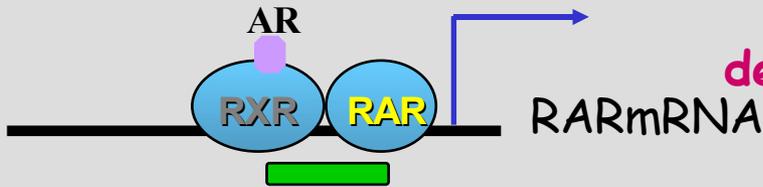
Hétérodimères: RXR α /RAR β RXR β /RAR β

Cancer: Blocage de différenciation

Absence de RAR β dans les Cancers thyroïdiens

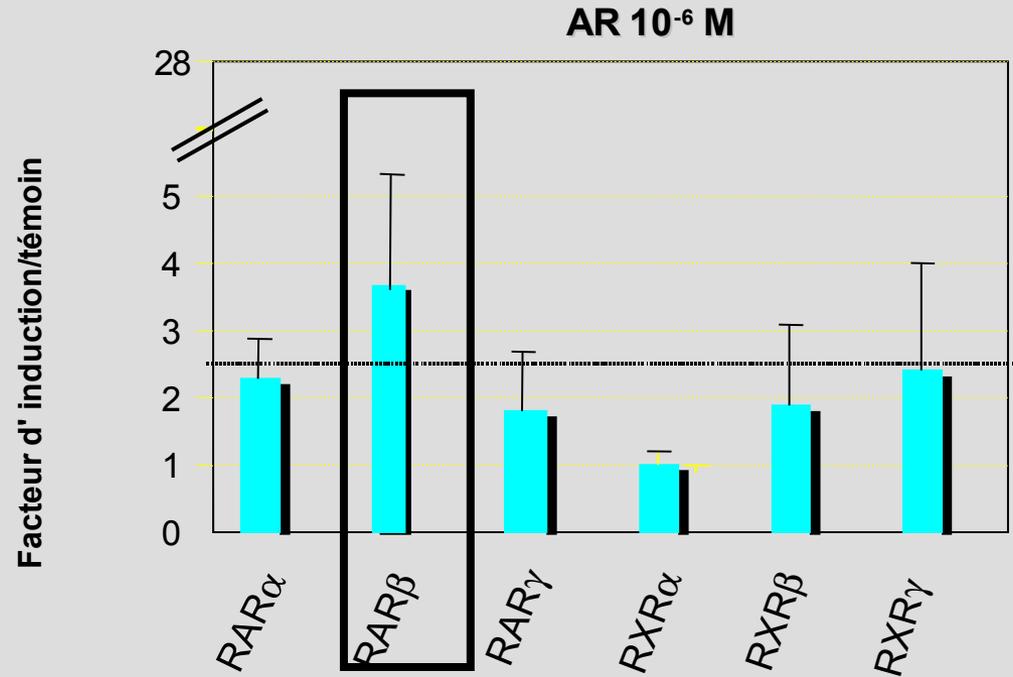


Quels sont les récepteurs de l'acide rétinoïque impliqués dans la différenciation des cellules thyroïdiennes par l'acide rétinoïque

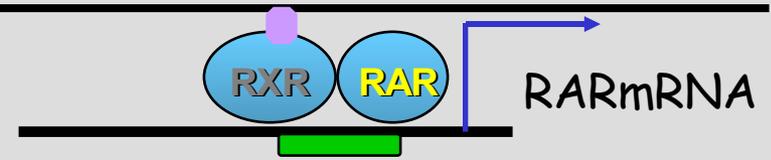


L'AR augmente l'expression des gènes RARs et RXRs surtout RAR β

Technique
Etude de l'expression des gènes par quantification de leurs ARNm après traitement des cellules thyroïdiennes par l'AR



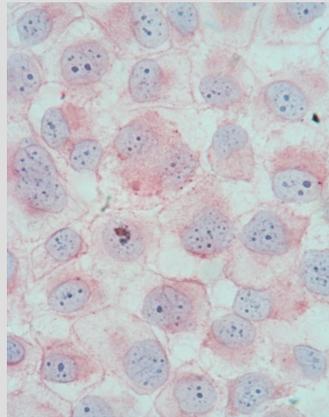
Confirmation de l'induction de RAR β dans les cellules thyroïdiennes traitées par l'acide rétinoïque



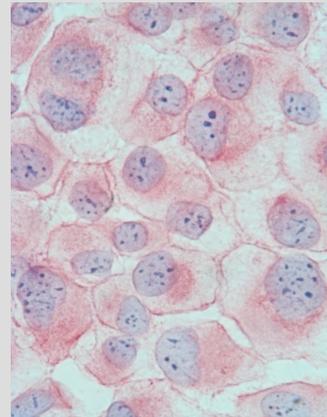
Marquage des cellules avec un anti-corps anti-RAR β

↓
Protéine RAR

Non traitées



Traitées par l'AR



Traitement conventionnel des cancers de la thyroïde
: thyroïdectomie totale + radiothérapie avec iode 131

Surveillance des patients pour détection de métastases
et nécessité d'un nouveau traitement par iode 131

**Perte de la captation de l'iode
15% des patients atteints de
cancer thyroïdien**

Impasse thérapeutique

Rôle potentiel de l'AR dans le
traitement des patients ne
captant plus l'iode

Re-différenciation par les rétinoïdes



Induction de la fixation de l'iode



Reprise du traitement par ^{131}I

Etude clinique (CRIC-DRC 99)

**Service de Médecine Nucléaire
Hôpital Saint-Louis (Dr Toubert)**

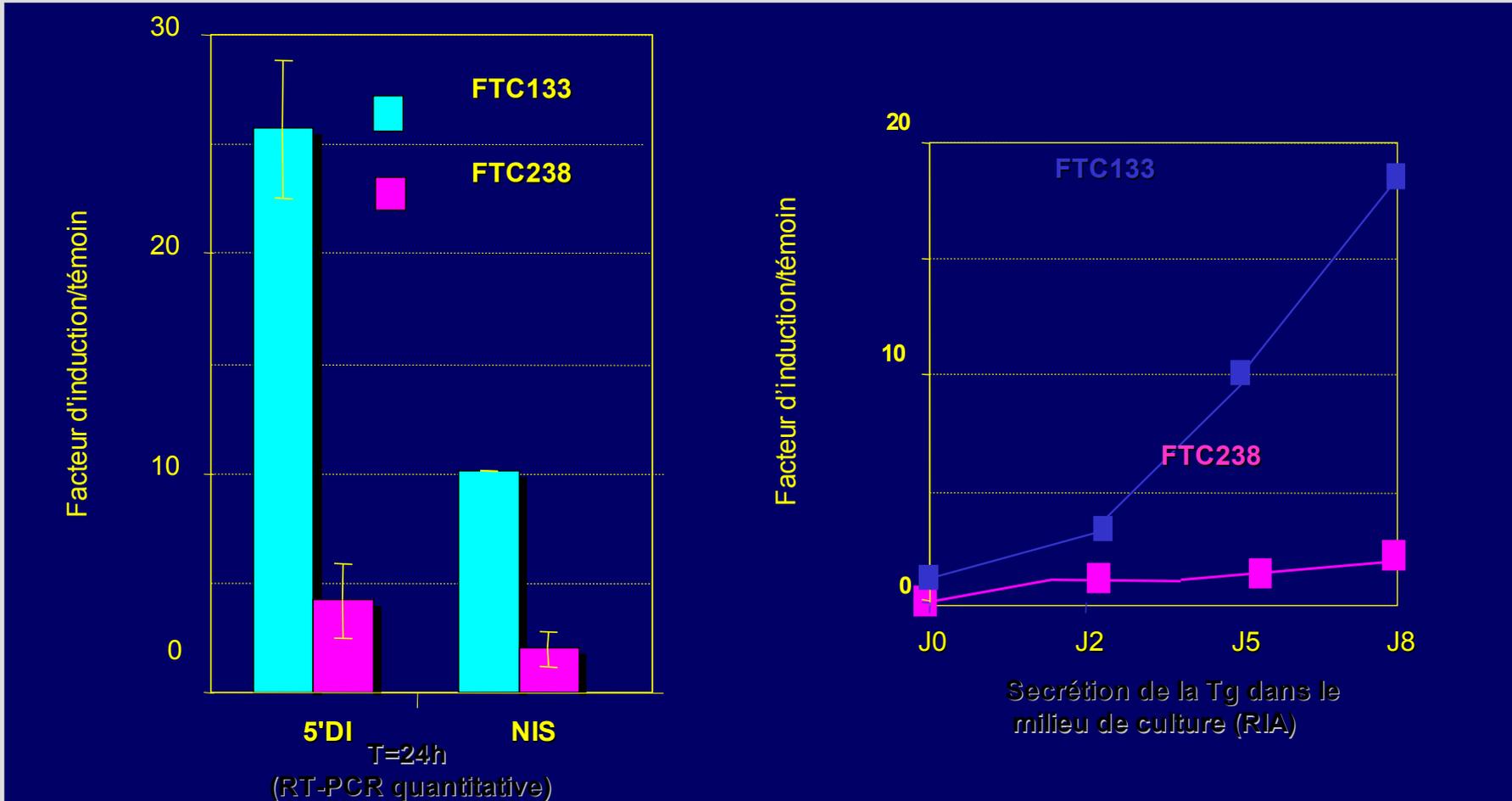
**La ré-induction de la fixation de l' ^{131}I
chez des patients atteints de CTD
après 8 semaines de traitement par rétinoïdes**

AR 13-*cis* 1 mg/kg/j : 7/19 patients (37 %)

Pourquoi 60% des patients ne répondent pas?

Utilité thérapeutique de la différenciation des cancers de thyroïde

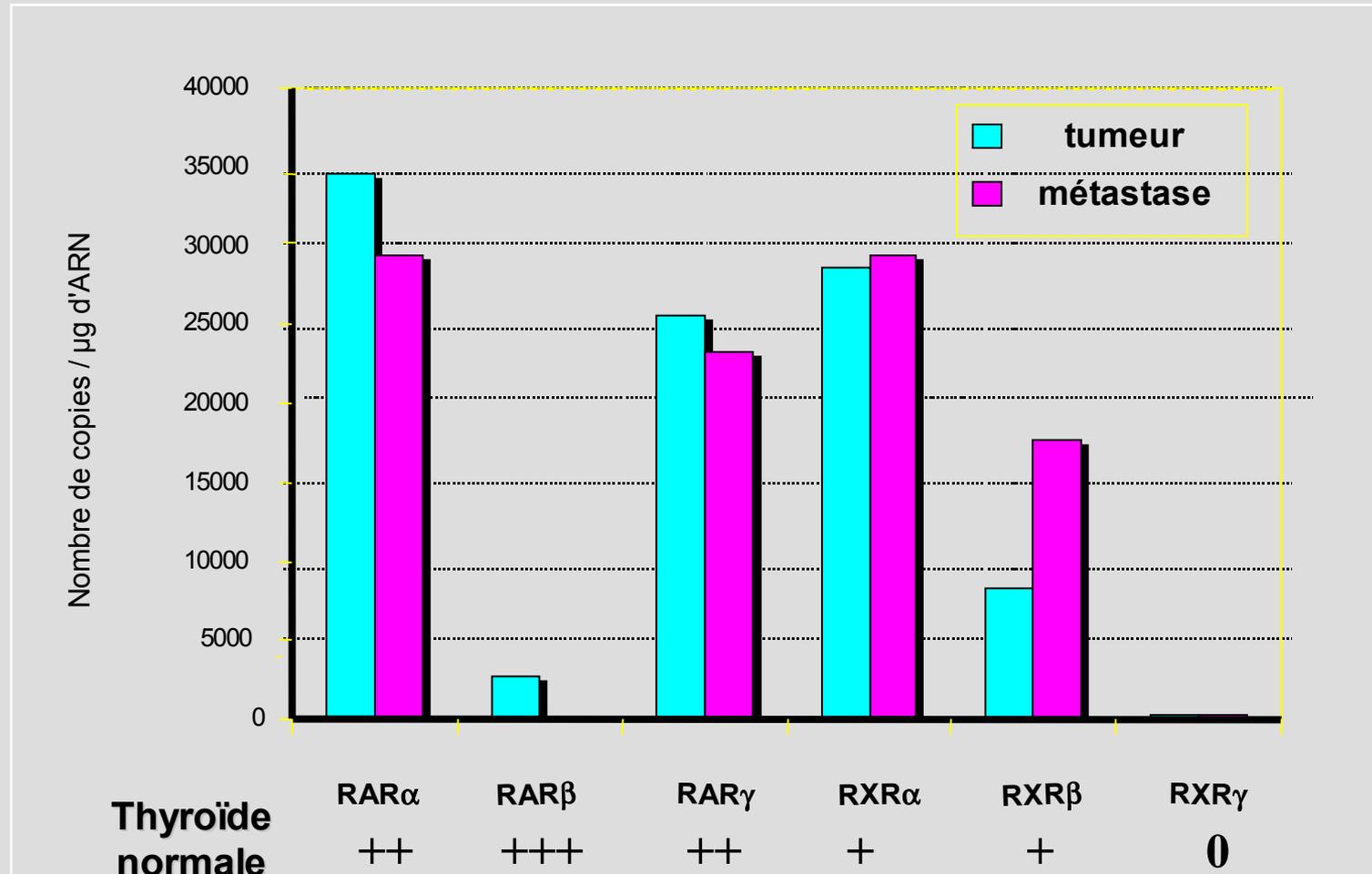
Modèle d'étude: tumeur FTC 133 et métastase FTC 288:

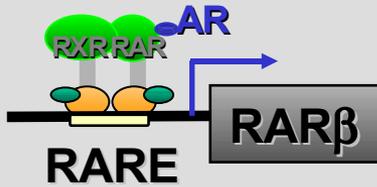


Les cellules FTC238 ne se différencient pas avec l'AR:
pas d'induction de 5DI, NIS ou TG

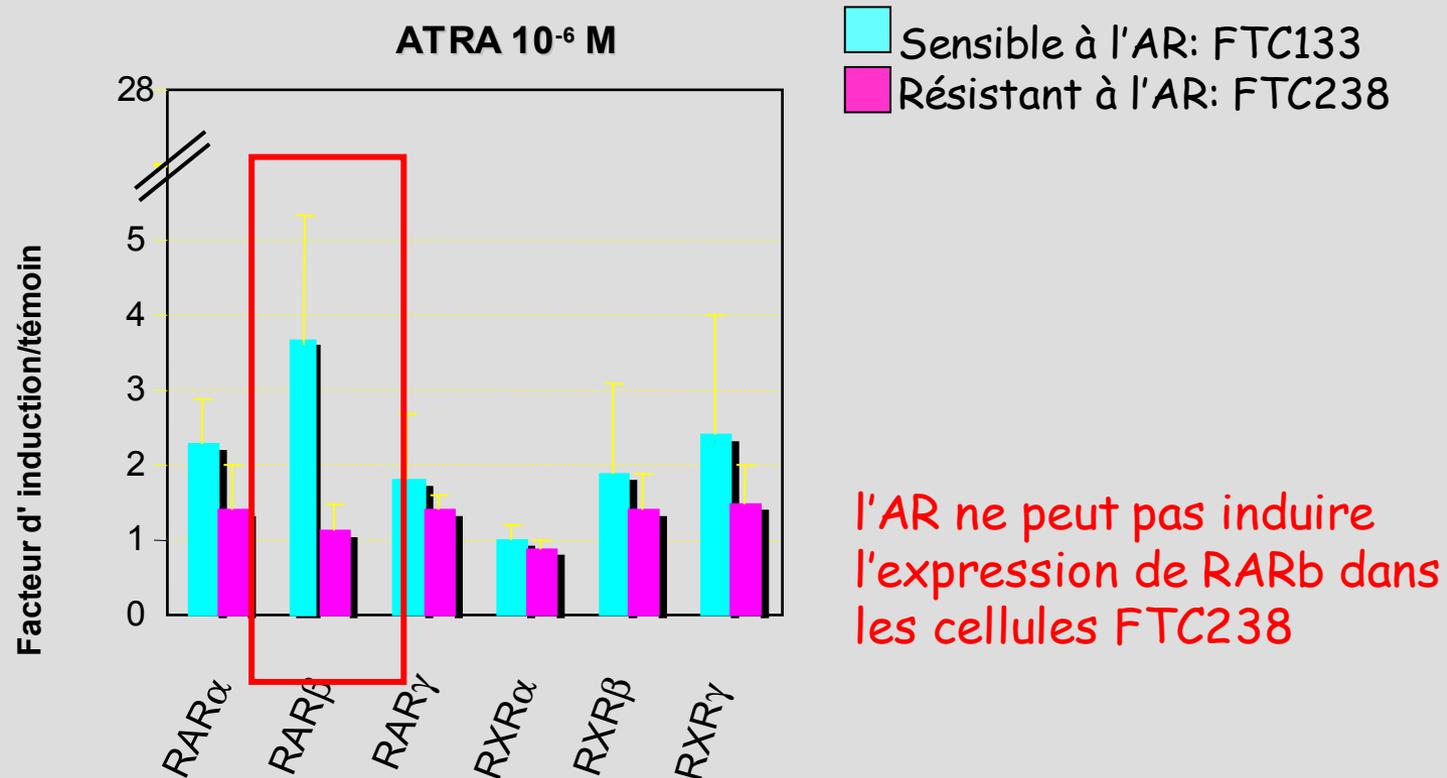
Cancer: Blocage de différenciation

Absence de RAR β dans les Cancers thyroïdiens

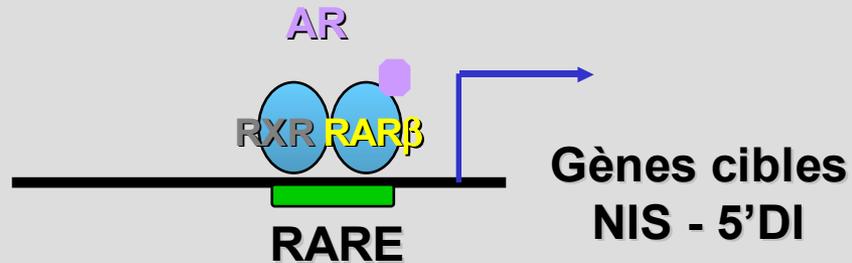




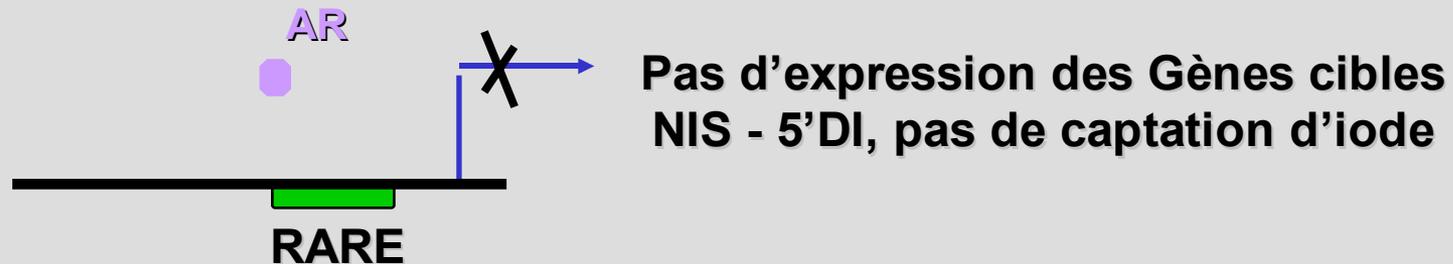
Mécanisme de différenciation :
 Induction de l'expression de RARβ via les récepteurs endogènes de la cellule tumorale



Cellules normales



Cellules cancéreuses: pas de RARβ



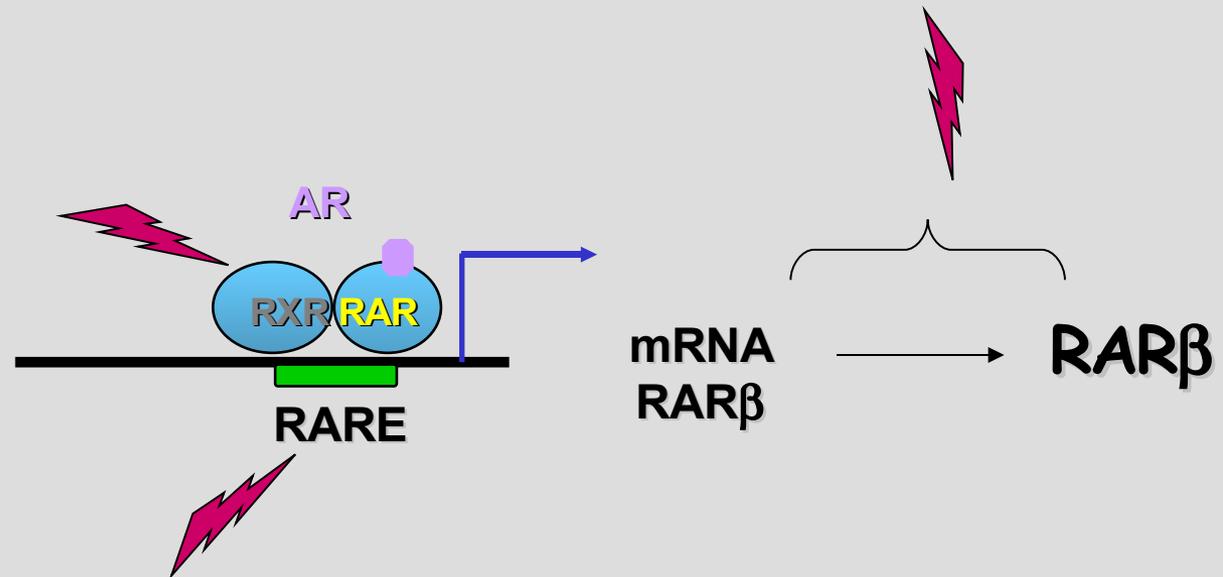
Cellules cancéreuses sensibles à l'AR:

induction de RARb et induction de NIS et 5DI

Cellules cancéreuses résistantes à l'AR:

pas d'induction de RARb et pas de NIS et 5DI

Causes du défaut d'expression de RAR β dans les cellules de métastases FTC238 par l'AR

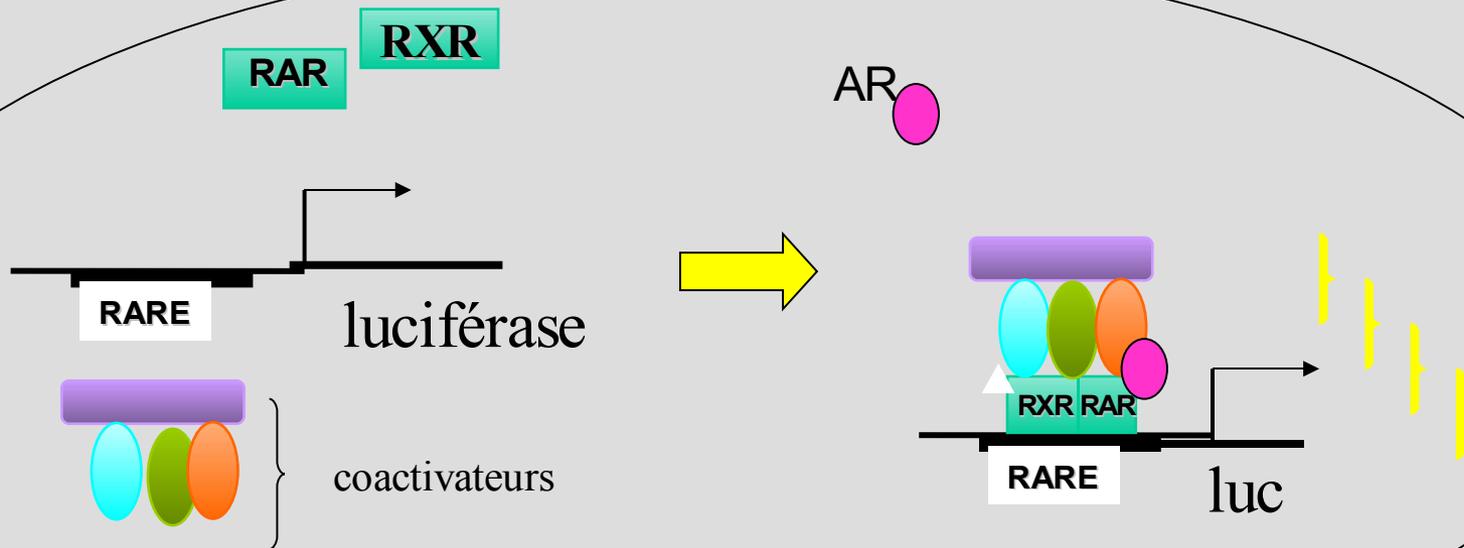


Anomalies de RAR ou RXR endogènes?
Anomalies du promoteur de RAR β ?
Anomalies de synthèse ou durée de vie
du messager ou de la protéine RAR β ?

Etude de la transactivation induite par l'AR dans les cellules FTC 238

Construction d'un gène rapporteur:

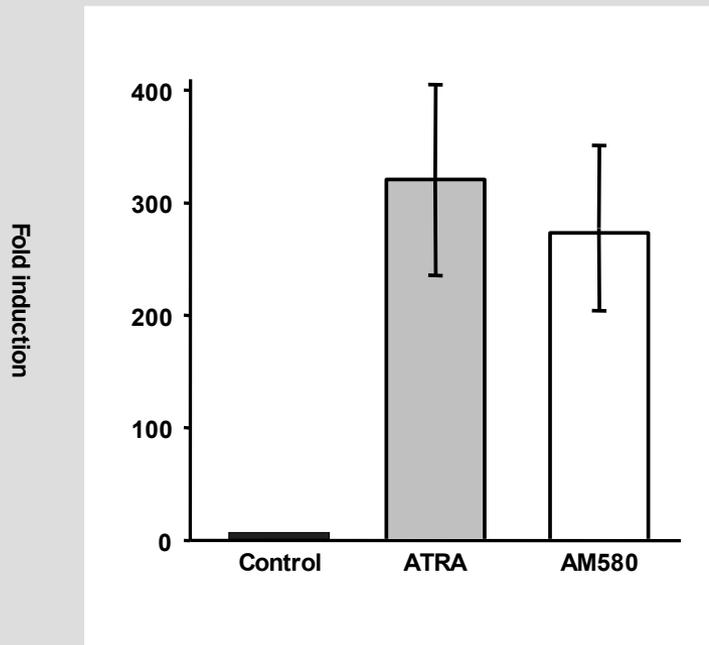
La région codante du gène de la luciférase est sous le contrôle du promoteur RARE



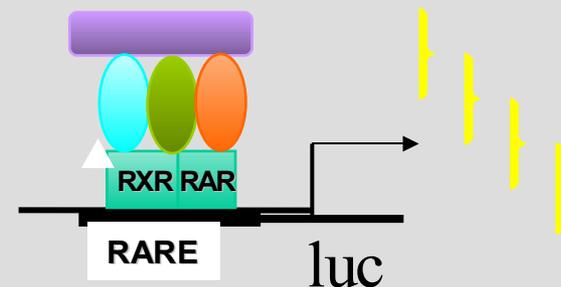
Mesure de la lumière émise = mesure de la transactivation via les récepteurs endogènes

Etude de la voie de transactivation de l'AR dans les cellules résistantes FTC238

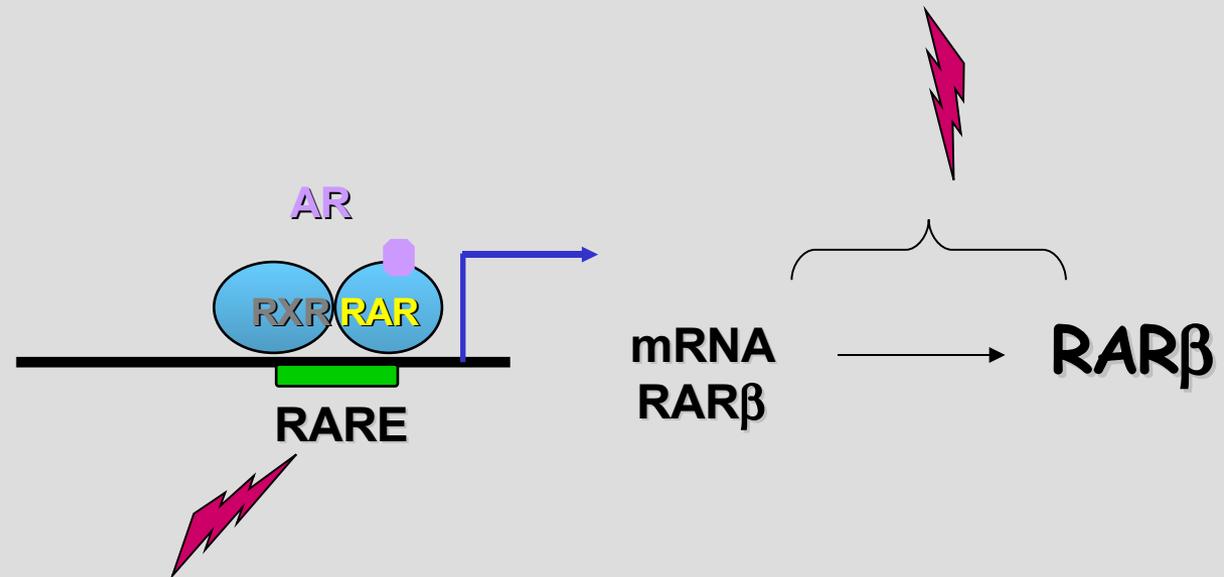
Capacité de transactivation mesurées 16 h après transfection par le RAREbêta-Luc et traitement par l'AR



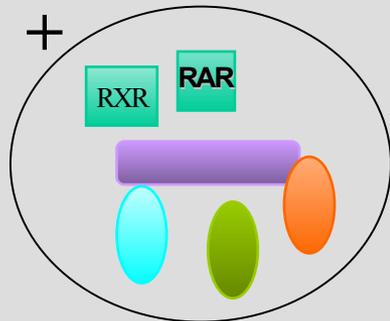
- L'AR et l'AM580 sont capables de transactiver les séquences RARE d'un gène rapporteur
- Donc le complexe transcriptionnel est fonctionnel dans les cellules FTC238



Transactivation efficace avec un gène rapporteur RARE



Pas d'anomalies de RAR ou RXR endogènes?
Anomalies du promoteur de RARβ?
Anomalies de synthèse ou durée de vie
du messenger ou de la protéine RARβ?



Extraits nucléaires
de cellules traitées ▲

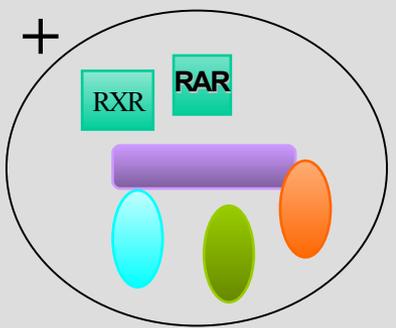
Gel d'électrophorèse des complexes ADN+protéines

permet de déterminer les complexes protéiques liées sur le
promoteur »radioactif »

Si liaison, retard de migration

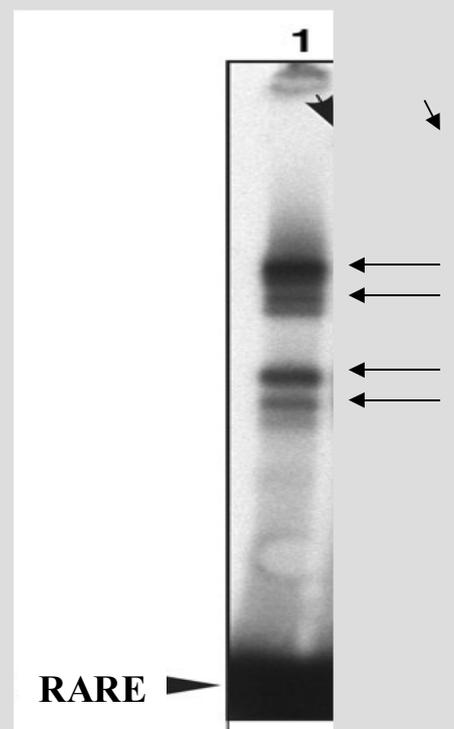
« gel retard »

RARE 



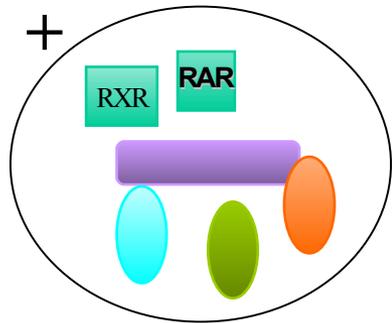
Extraits nucléaires
de cellules traitées ▲

RARE libre →



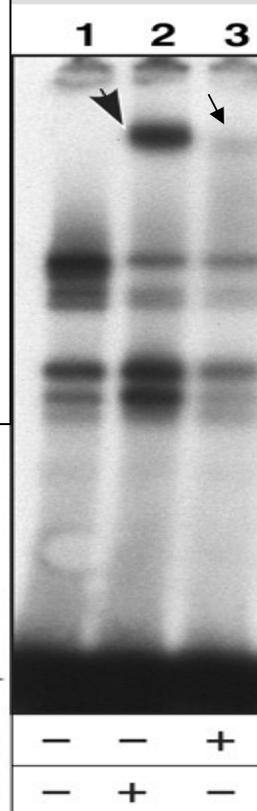
Complexes retardés

RARE 



Extraits nucléaires
de cellules traitées

Anti-RAR



RARE 

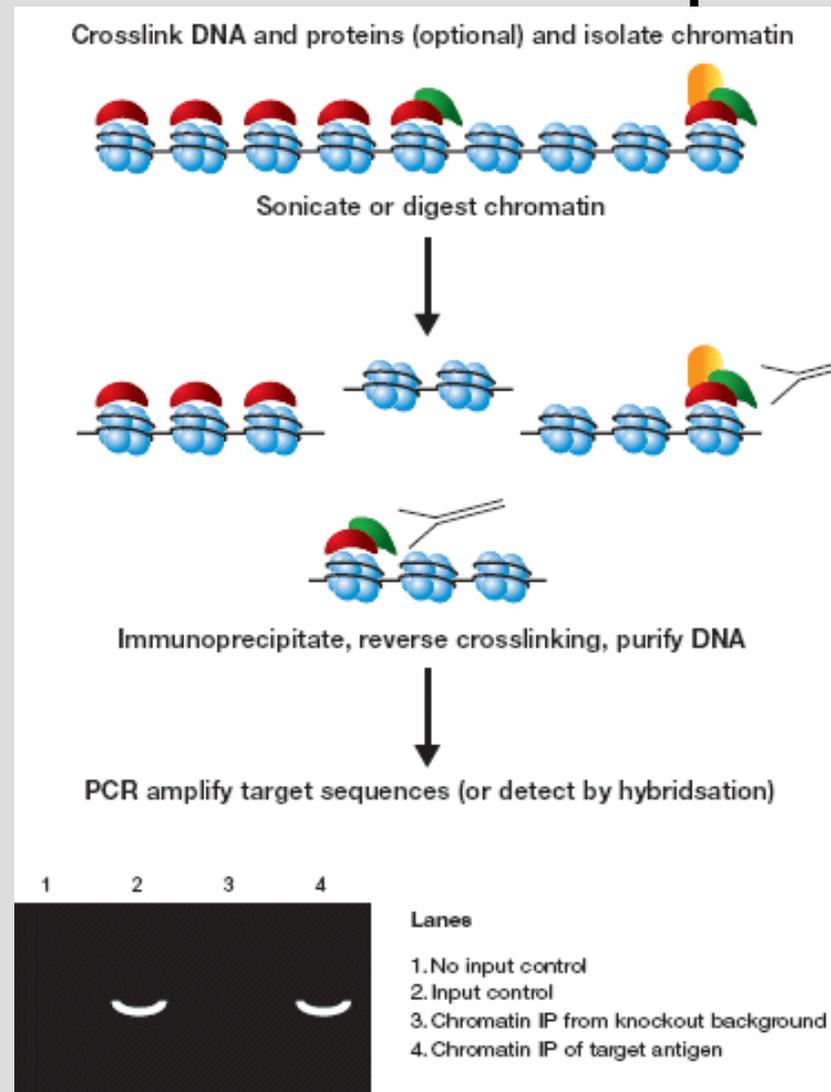
anti-RAR

anti-RXR

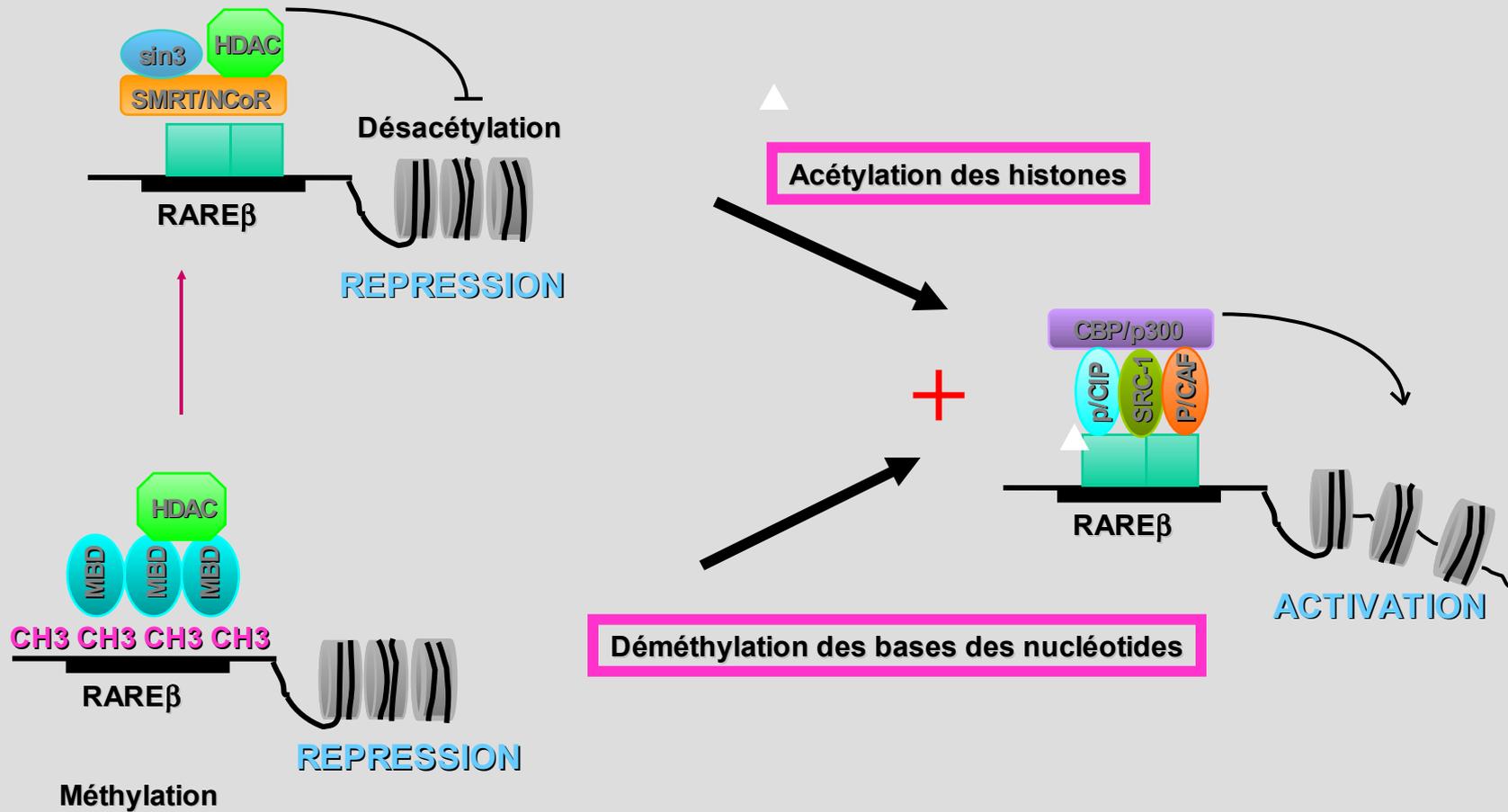
RA (1 μ M)



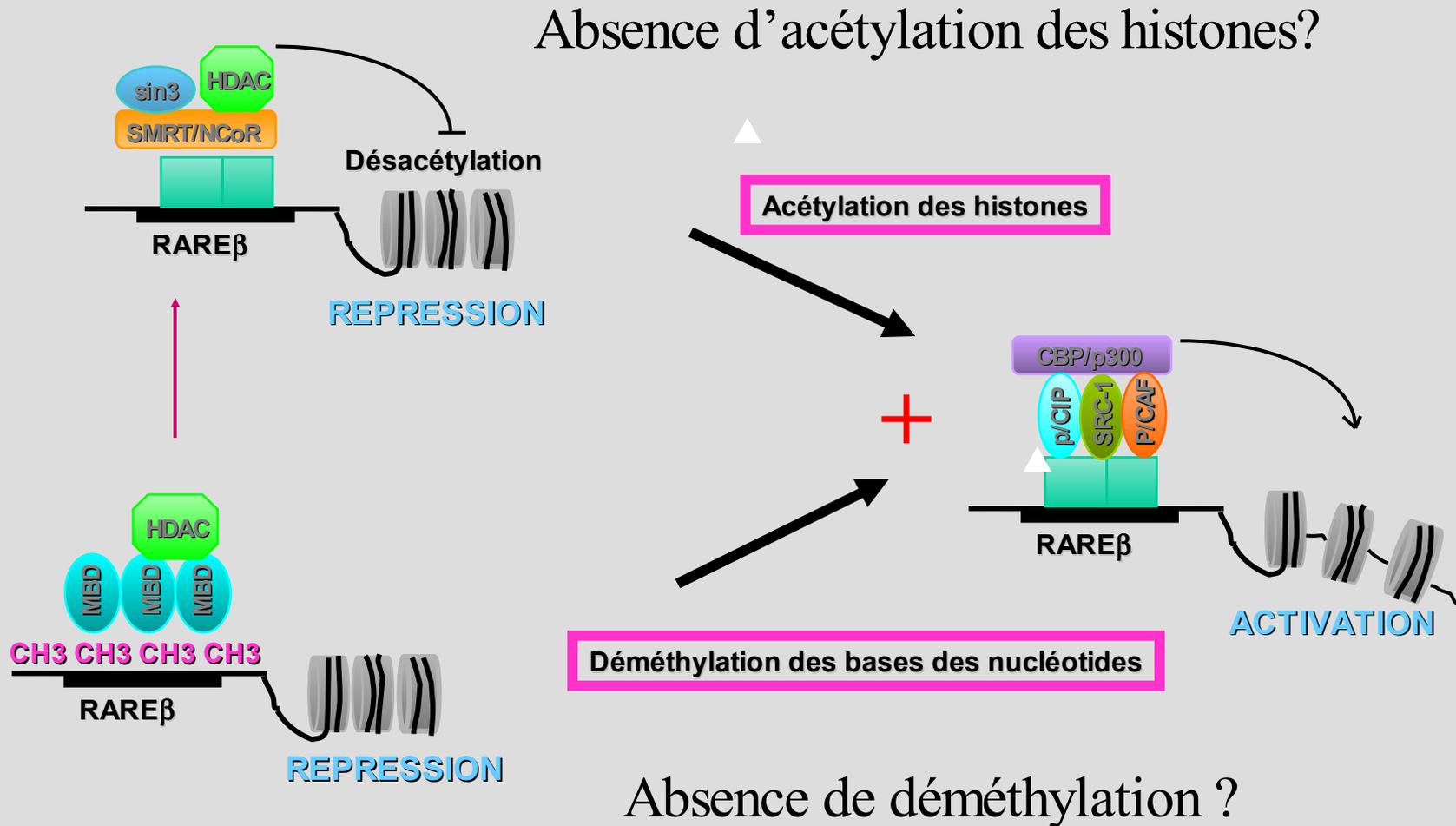
Chip: Chromatine Immuno précipitation



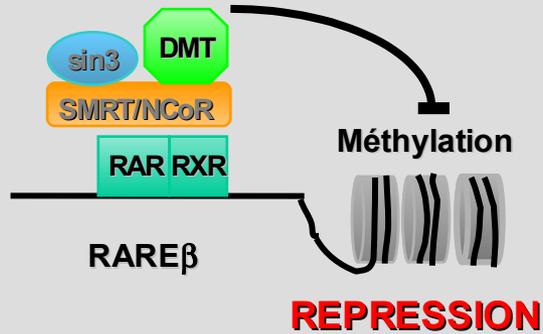
Remodelage de la chromatine: accessibilité du promoteur



Anomalie fonctionnelle du promoteur endogène du gène RAR β



Promoteur RARE n'est pas hyperméthylé

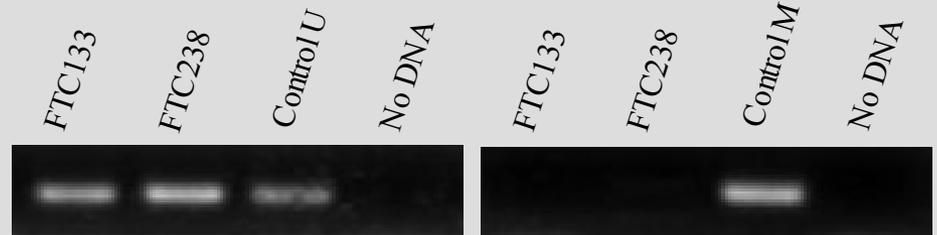


Modèle cellulaire
FTC133 sensibles à l'AR
FTC238 résistants à l'AR



Primers Unmethylated

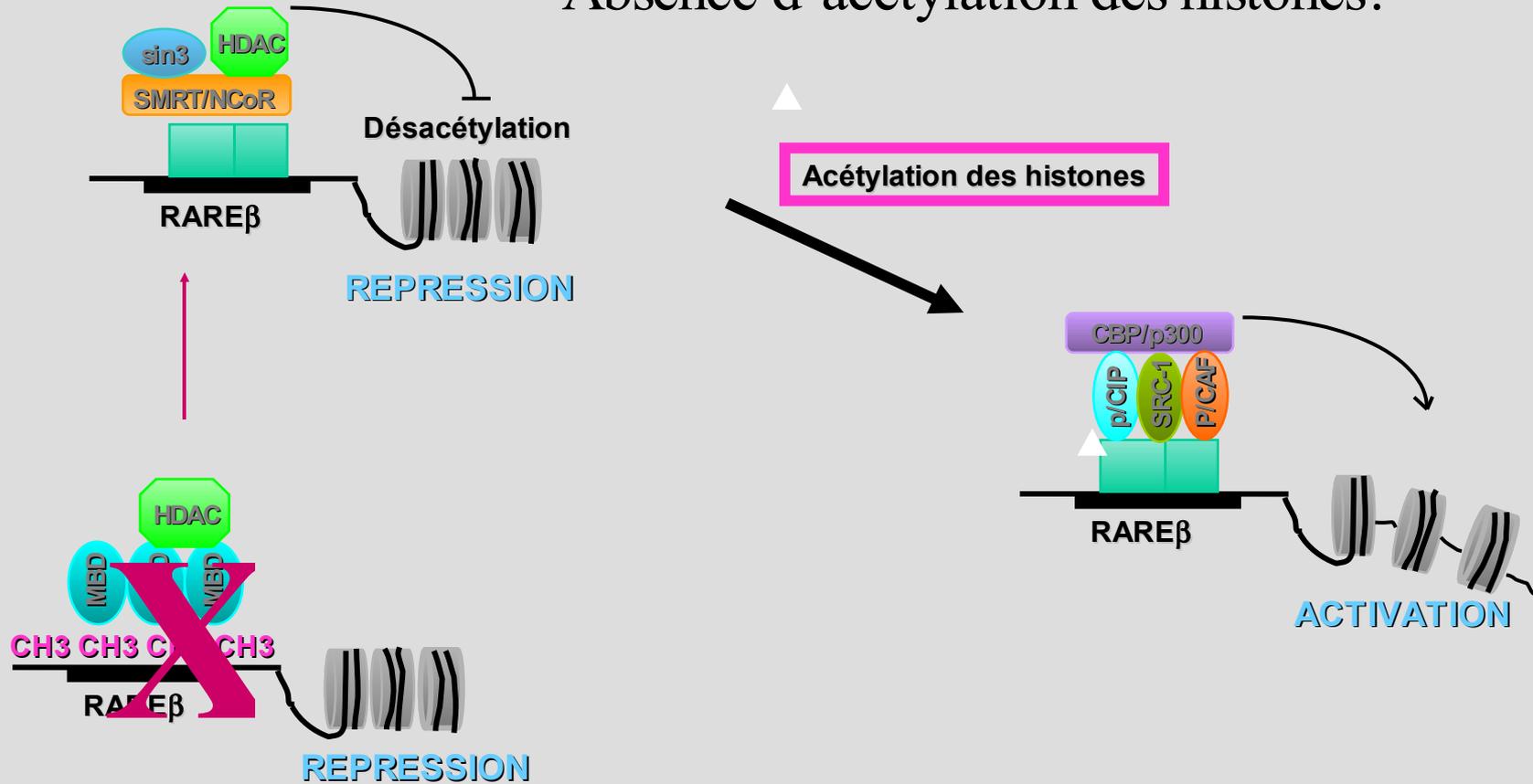
Primers Methylated



Pas d'hyperméthylation du promoteur

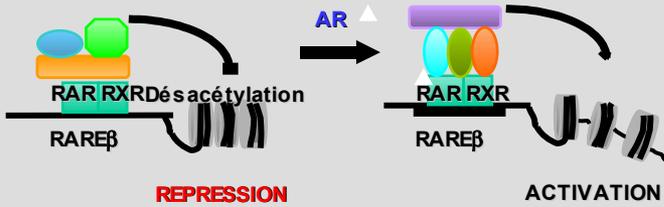
Anomalie fonctionnelle du promoteur endogène du gène RAR β

Absence d'acétylation des histones?



RARE n'est pas réprimé par hyperméthylation

Absence d'acétylation des histones



Acétylation des histones H3 et H4

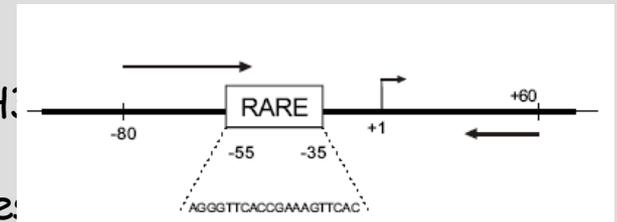
- Etudes des histones acétylés liés au promoteur:
 - Chromatine Immunoprécipitation: ChIP

Chromatine avec protéines fixées

Immunoprécipitation avec anti-corps antiprotéines (anti-H3 ou H4 acétylés)

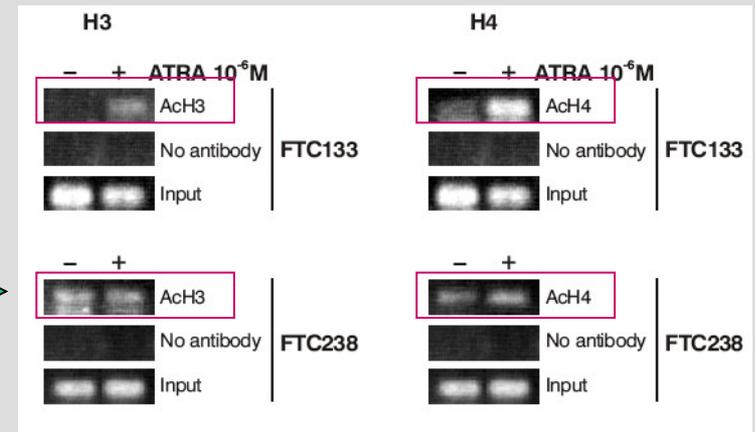
Puis amplification de la région promotrice à l'aide d'amorce spécifiques (RAREβ)

Recruitment of acetylated Histones ChIP

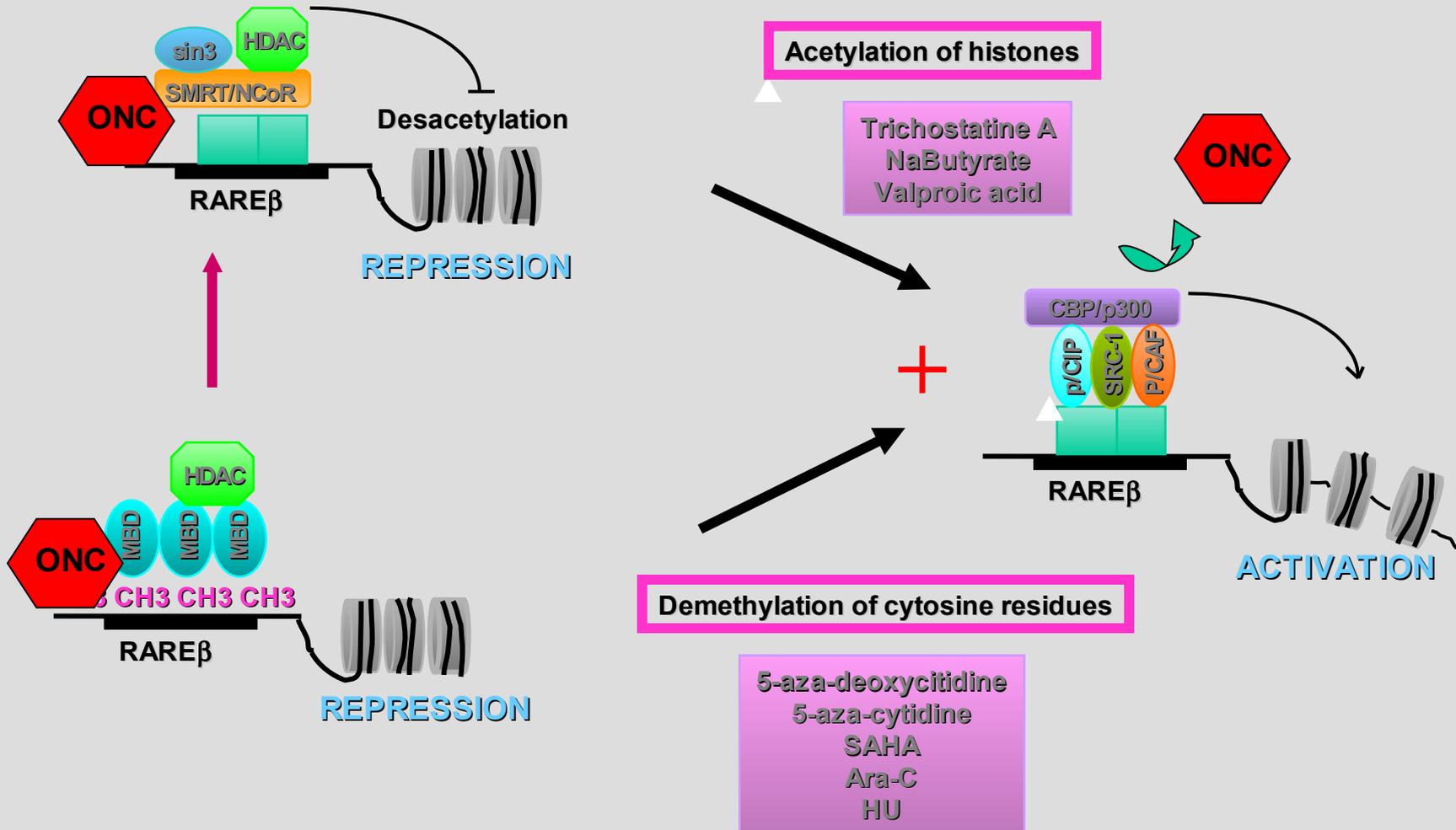


Recrutement normal de H3 et H4 acétylés sur RARE dans les cellules sensibles à l'AR

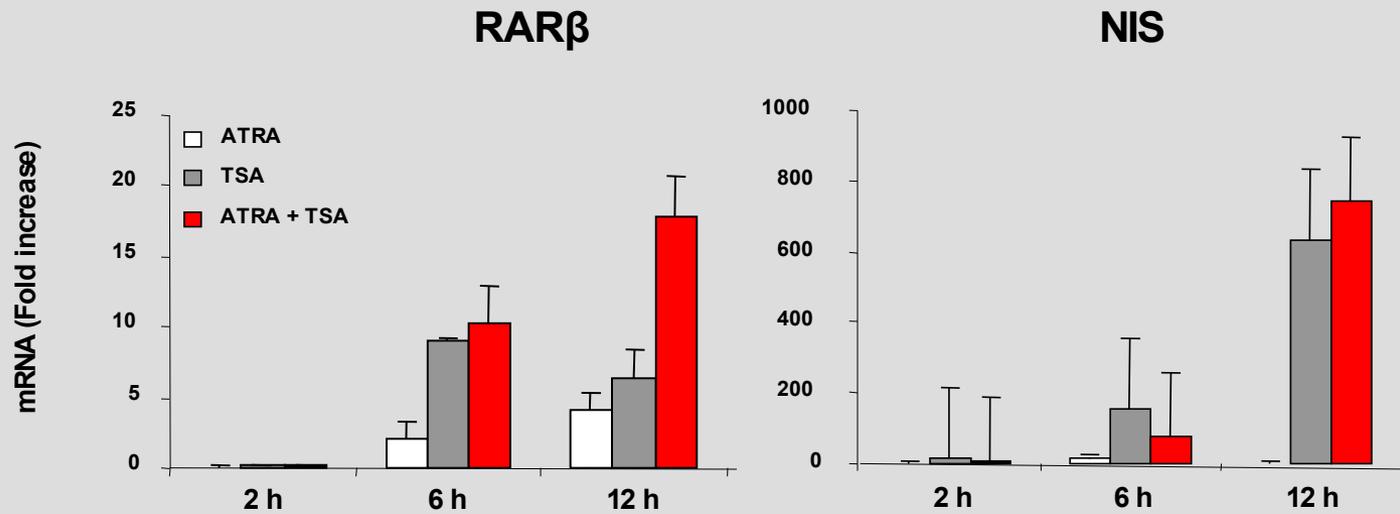
Fixation anormale de H3 et H4 acétylés dans les cellules résistantes à l'AR



Enhancement of RA-differentiation: combination with transcription activating drugs



Intérêt de la combinaison d'une thérapie différenciatrice (AR) et transcriptionnelle (TSA)



Enhancement of RA efficacy in non AML patients Summary of Clinical Results (1980-2007)

DNMTi (LD Ara-C, 5 AZA, 5 AZA-D)	HDACi (NaBU, VPA)	RA (ATRA)	CR (%)
+	-	-	15-30%
+	-	+	25%
+	+	-	30%
+	+	+	50-60%

P2Biolcell 2007

Study Groups: L. Silvermann, S. Castaigne, M. Tallman, S. Gore, G. Garcia-Manero, JP Issa, H. Dombret.....