

Introduction à la biologie moléculaire

L'exemple de la
pathologie thyroïde

Laboratoire de Pathologie Clinique et Expérimentale, Hôpital Pasteur
Inserm ERI21, Faculté de Médecine de Nice

Biologie moléculaire

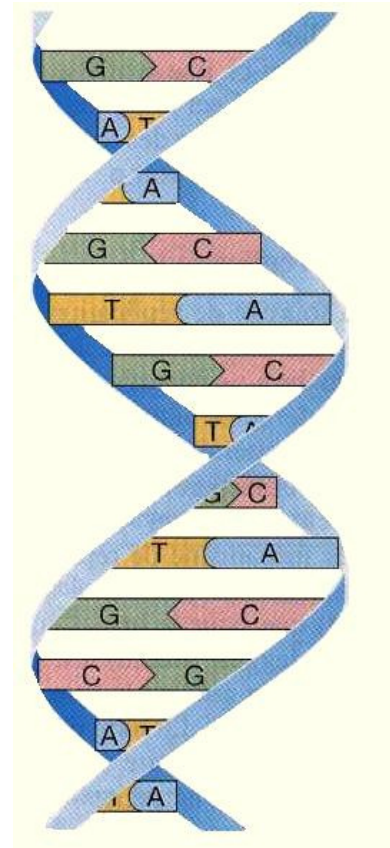
Définition

- compréhension des mécanismes de fonctionnement de la cellule au niveau moléculaire.
- ensemble des techniques de manipulations d'acides nucléiques (ADN, ARN).

ADN

Acide desoxyribonucléique

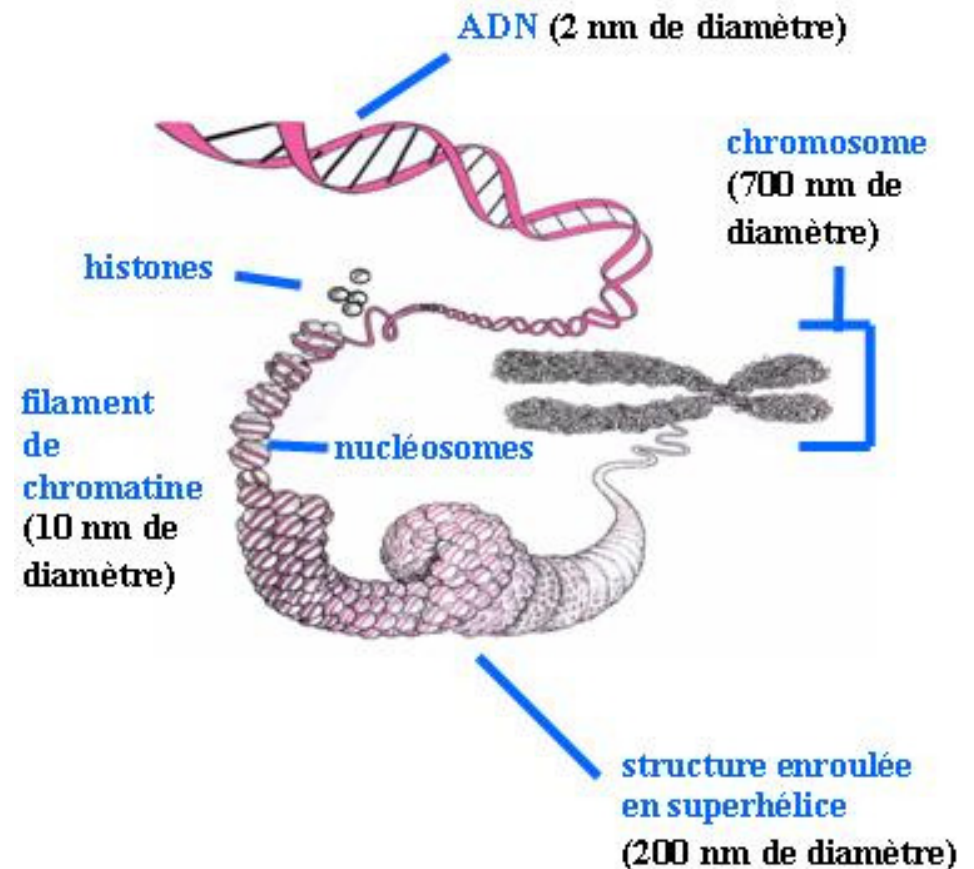
- Molécule double brin présente dans toutes les cellules
- Formé par 4 nucléotides
 - adénosine (A)
 - cytosine (C)
 - guanine (G)
 - thymine (T)
- ordre d'enchaînement des nucléotides précis
 - correspond à l'information génétique.



ADN

Acide desoxyribonucléique

- l'ADN forme des pelotes, les **nucléosomes**, où l'ADN est associé à des protéines, les **histones**.
- Le tout est bien enroulé et compacté sous la forme de **chromosomes**, localisés dans le noyau des cellules.



ADN

Acide desoxyribonucléique

- L'ADN est le support de l'information génétique, sous la forme de **succession de nucléotides**.
- Le code génétique associe chaque triplet de bases (**codon**) à un **acide aminé** particulier.
 - gène codant pour des protéines
 - morceaux d'ADN codant pour des ARN, pour des séquences régulatrices de l'expression des gènes...

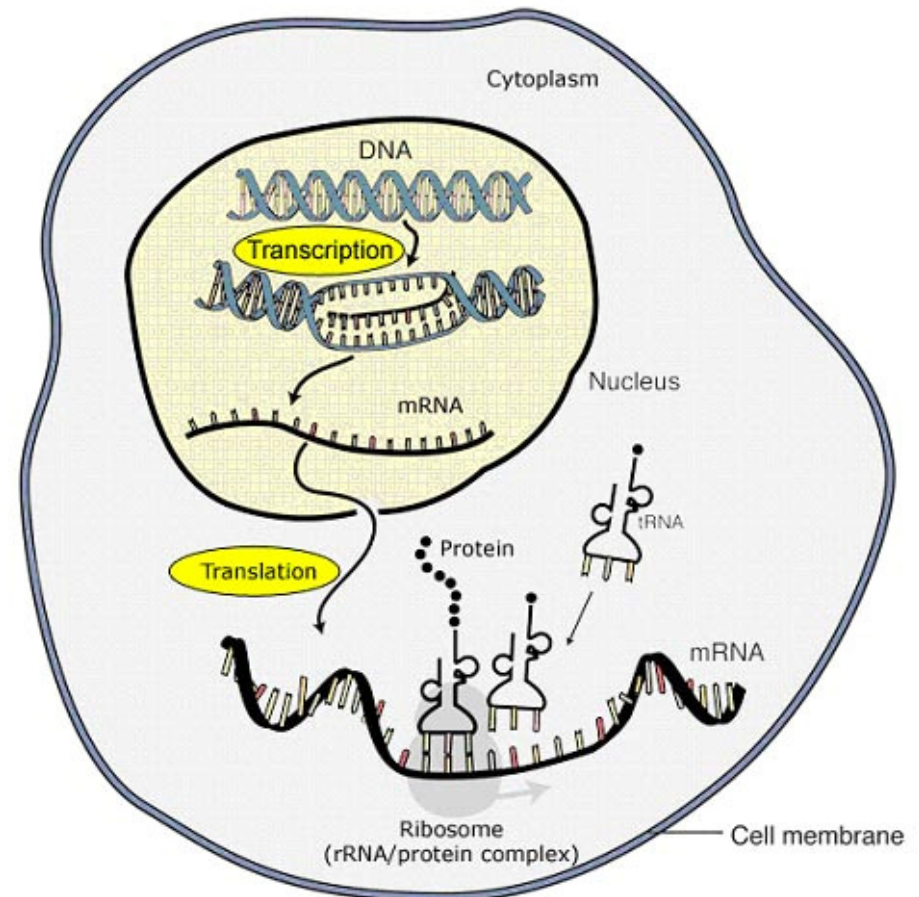
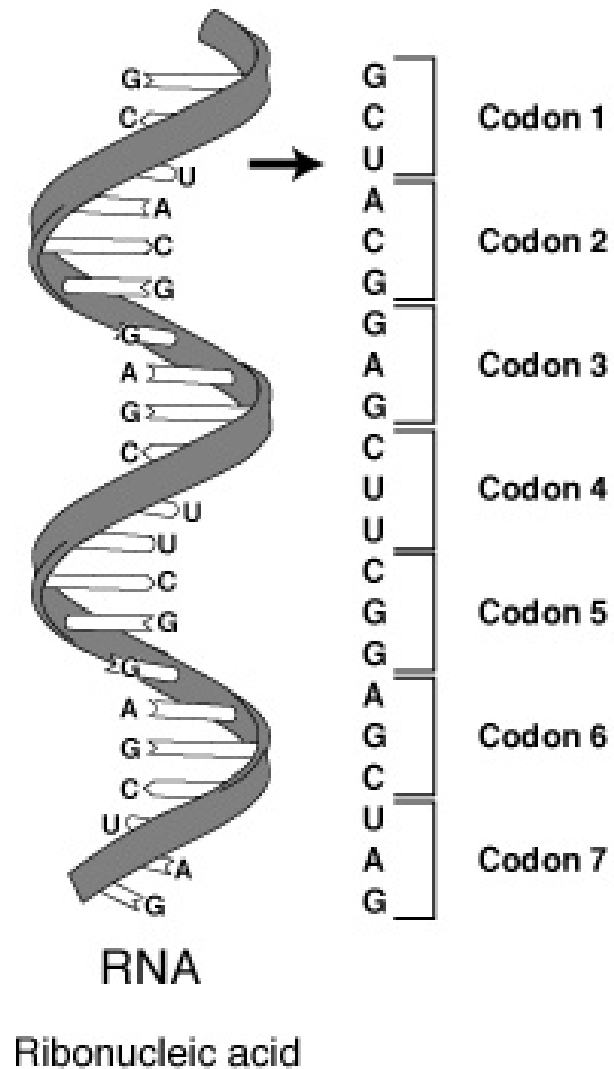


Image adapted from: National Human Genome Research Institute.

ARN

Acide ribonucléique

- Molécule formée d'un enchaînement de ribonucléotides
 - Adénine
 - Cytosine
 - Guanine
 - Uracile
- Issu de la transcription de l'ADN par l'enzyme ARN polymérase
- Plusieurs conformations possible (simple brin, tige boucle...)
- Plusieurs fonctions
 - ARN messagers (ARNm) servant de matrice pour la synthèse des protéines



Second Letter

		Second Letter					
		U	C	A	G		
1st letter	U	UUU Phe UUC UUA Leu UUG	UCU UCC Ser UCA UCG	UAU Tyr UAC UAA Stop UAG Stop	UGU Cys UGC UGA Stop UGG Trp	U C A G	
	C	CUU Leu CUC CUA CUG	CCU CCC Pro CCA CCG	CAU His CAC CAA Gln CAG	CGU CGC Arg CGA CGG	U C A G	
	A	AUU Ile AUC AUA AUG Met	ACU ACC Thr ACA ACG	AAU Asn AAC AAA Lys AAG	AGU Ser AGC AGA Arg AGG	U C A G	
	G	GUU Val GUC GUA GUG	GCU GCC Ala GCA GCG	GAU Asp GAC GAA Glu GAG	GGU GGC Gly GGA GGG	U C A G	

3rd
letter

L'exemple de la
pathologie thyroïdienne

Pathologie de la thyroïde

fonctions

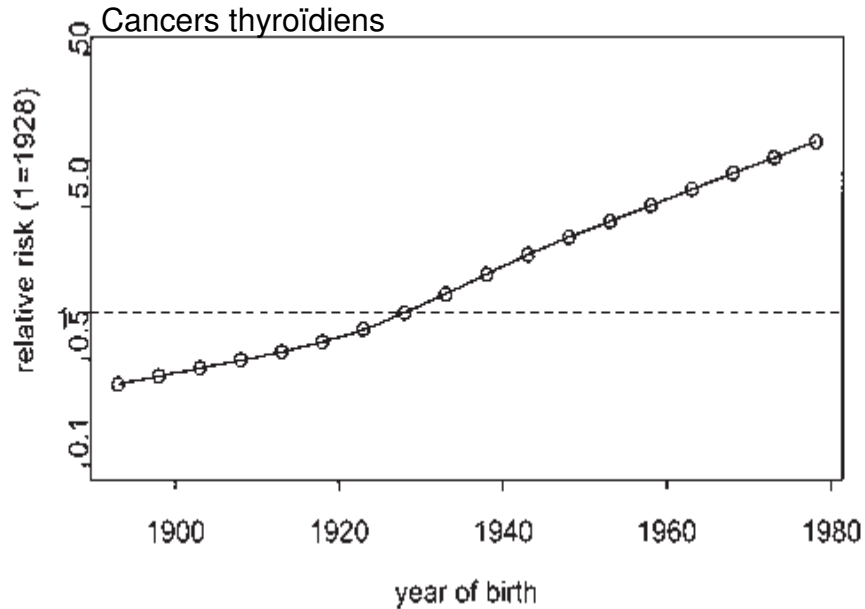
T3 et T4

- influent sur toutes les cellules de l'organisme
- Régulent leur métabolisme
 - Régulation thermique
 - Fréquence cardiaque
 - Dvpmt du système nerveux
- Sécrétion régulée par la TSH

Calcitonine

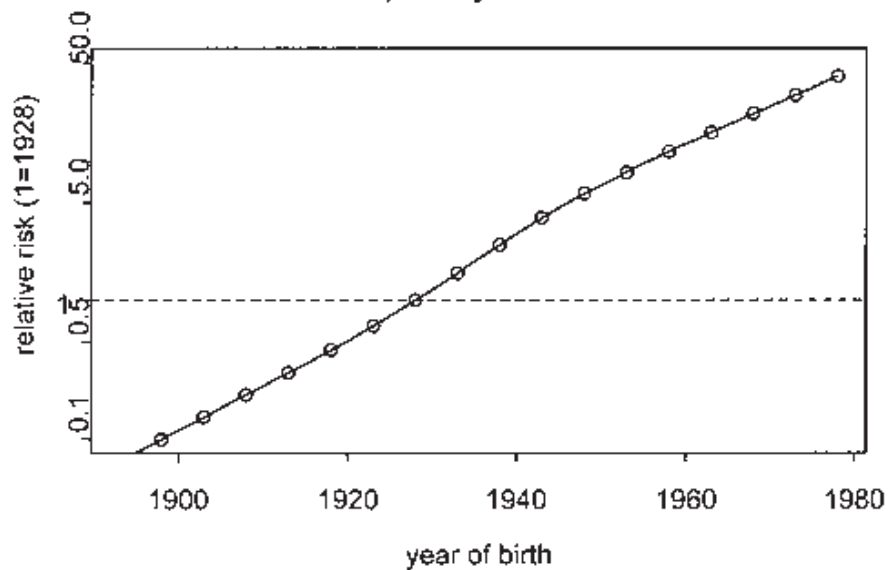
- Régule le taux de calcium sanguin (avec la parathormone)
- Sécrétion dépend uniquement du taux de calcium sanguin (et pas des hormones hypophysaires)

Pathologie de la thyroïde



Incidence en augmentation

Pronostic généralement très bon
(mortalité < 2% à 25 ans)

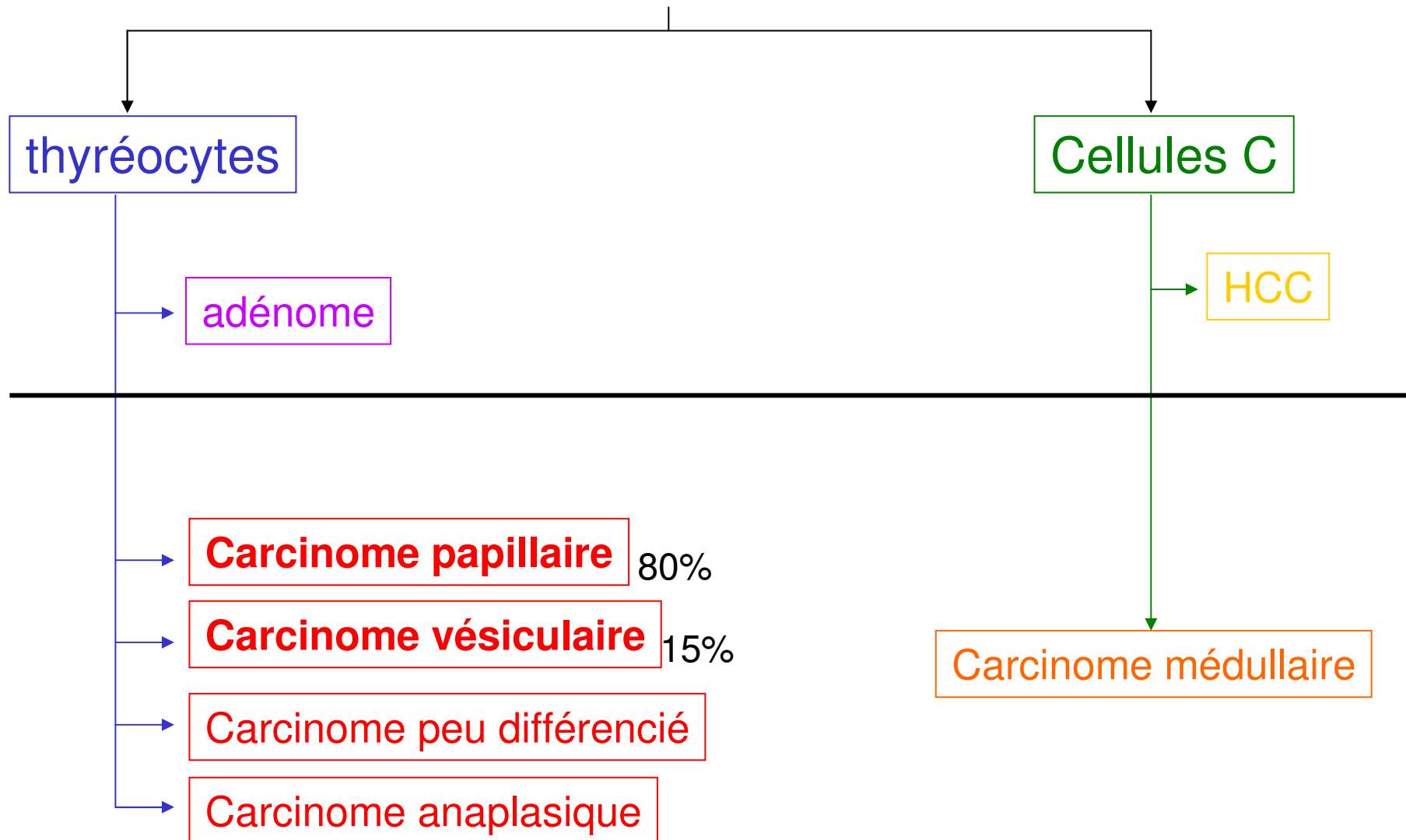


Mais 15% agressifs,
avec métastases.

Pathologie de la thyroïde

Histopathologie

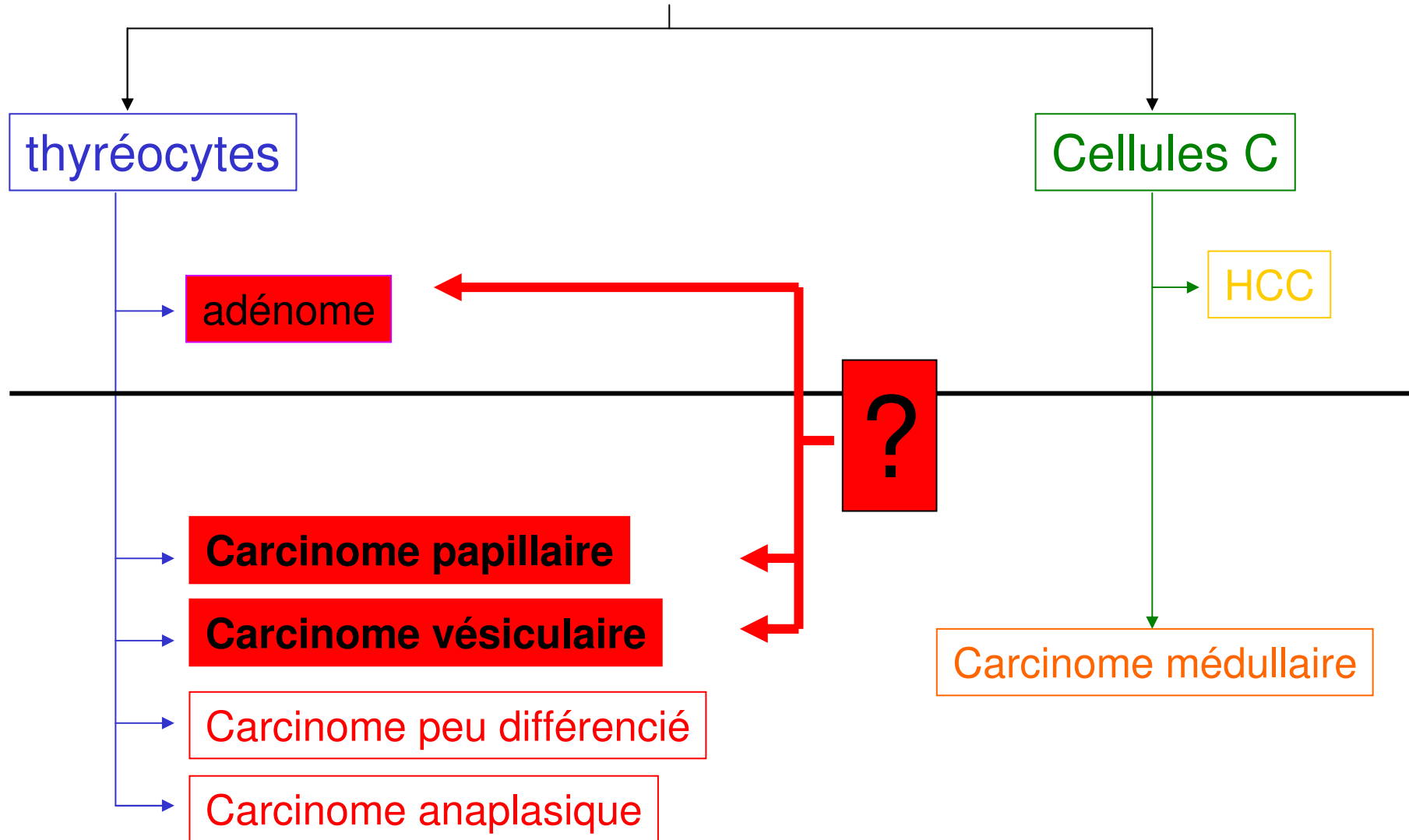
THYROÏDE



Pathologie de la thyroïde

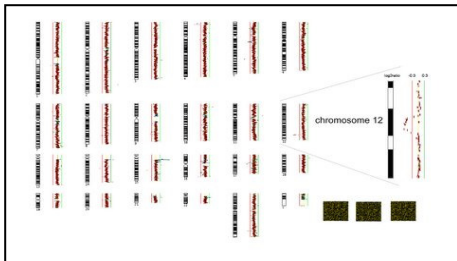
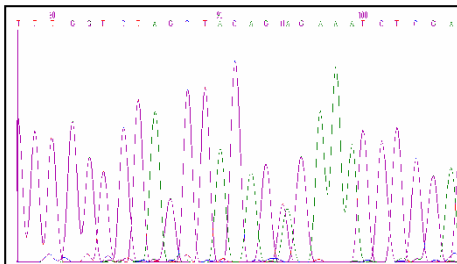
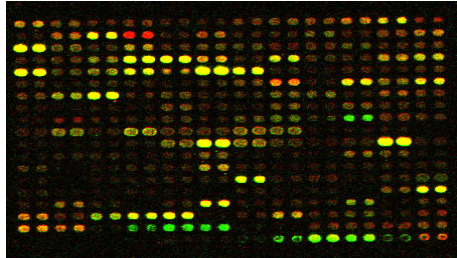
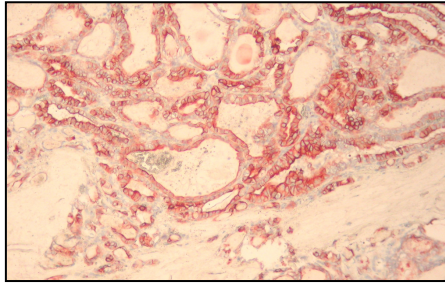
Histopathologie

THYROÏDE



Pathologie de la thyroïde

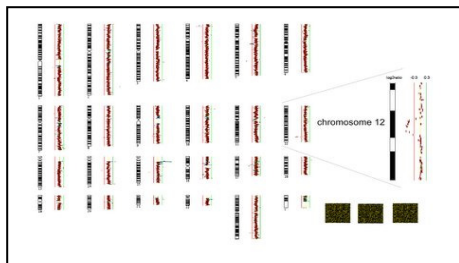
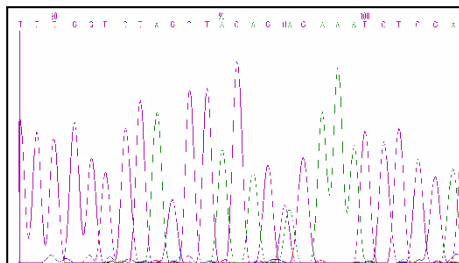
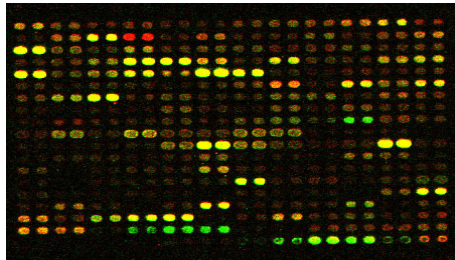
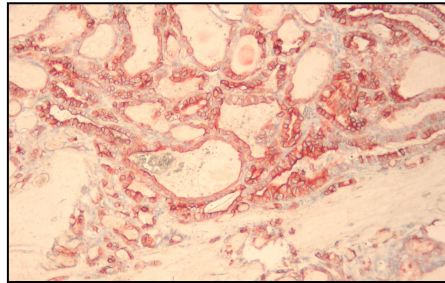
Biomarqueurs



- Immunohistochimie
- Mutations et réarrangements somatiques
- Profil transcriptomique
- Cytogénétique

Pathologie de la thyroïde

Biomarqueurs



- Immunohistochimie

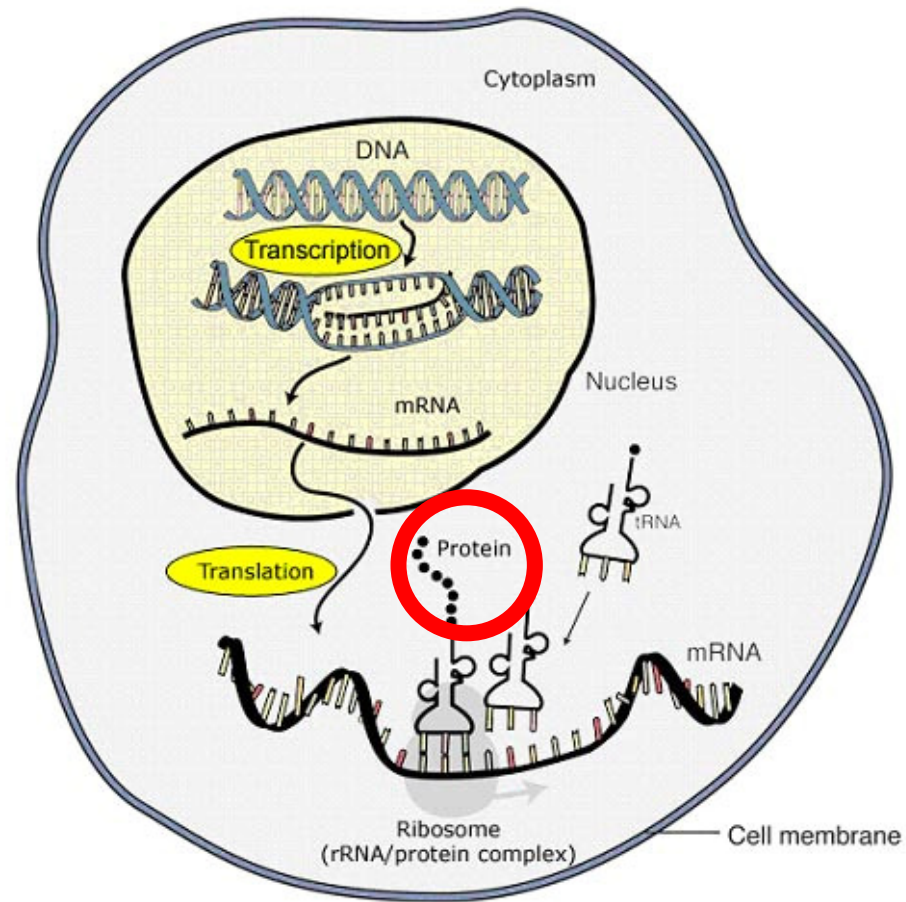
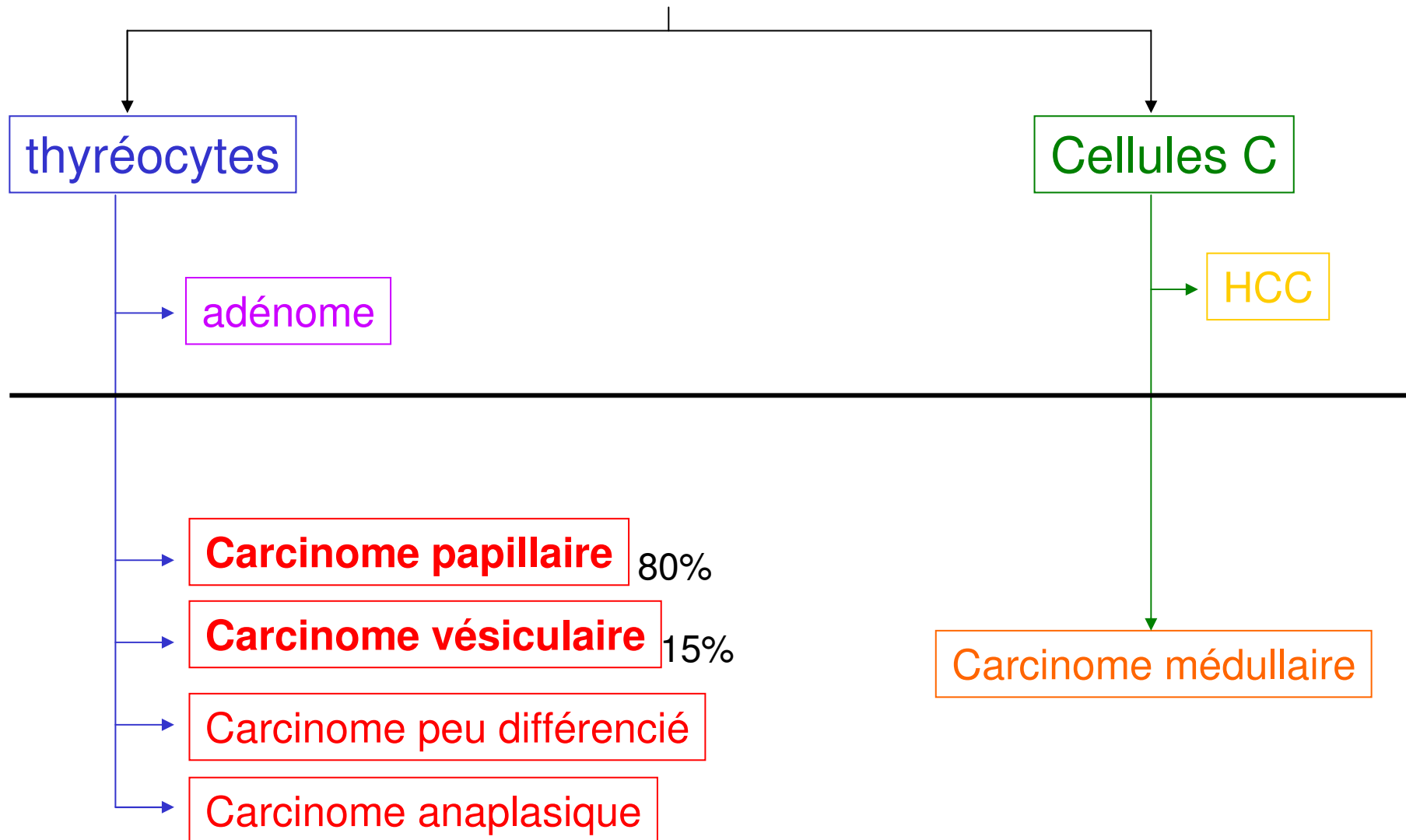


Image adapted from: National Human Genome Research Institute.

Pathologie de la thyroïde

Histopathologie

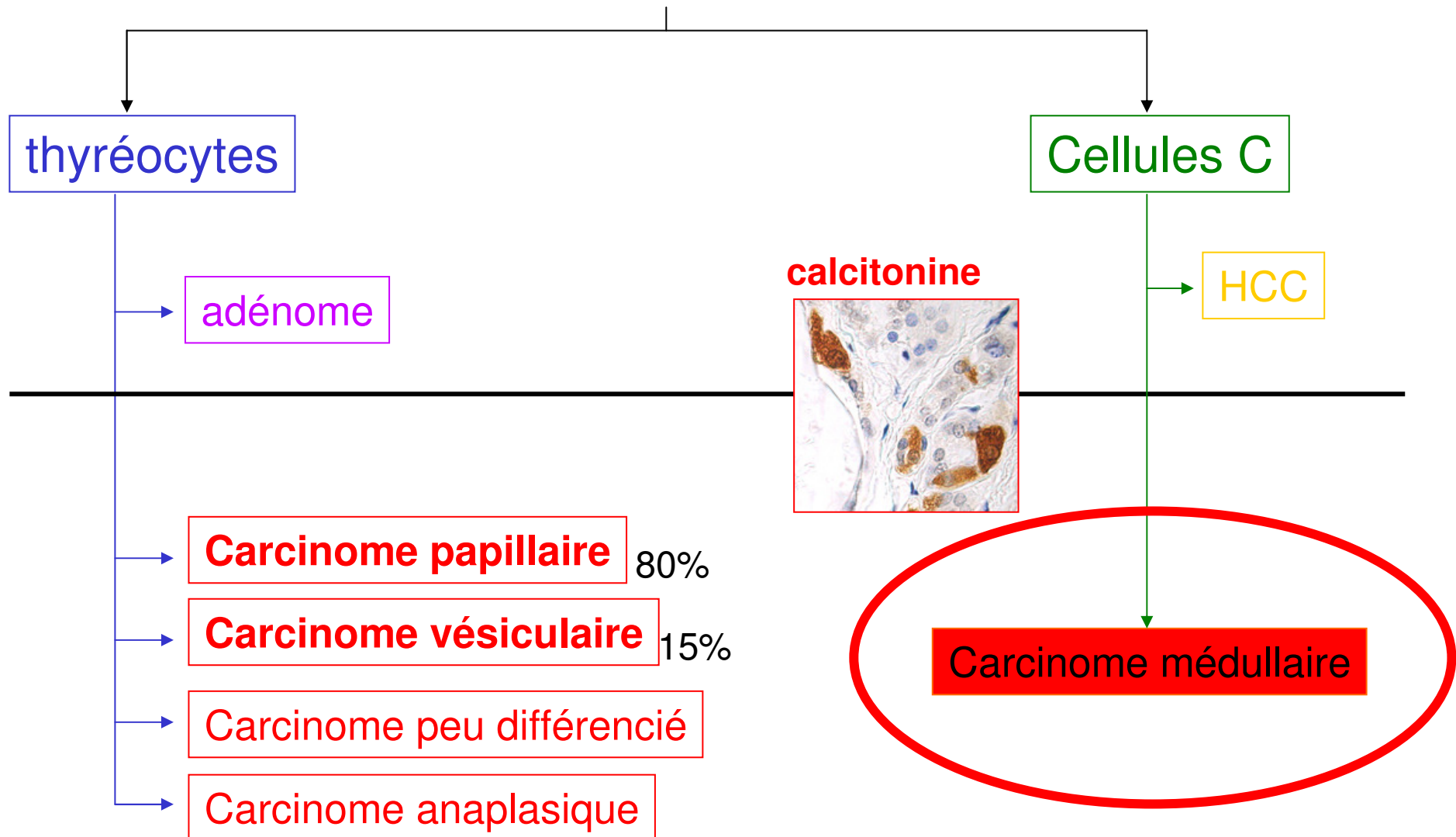
THYROÏDE



Pathologie de la thyroïde

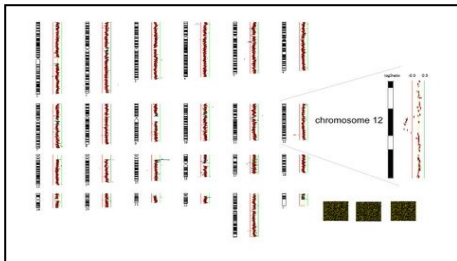
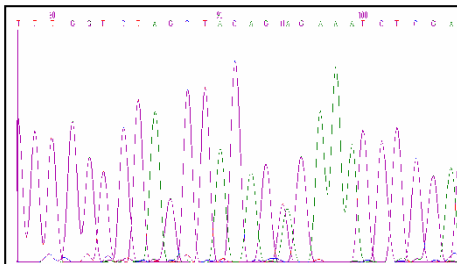
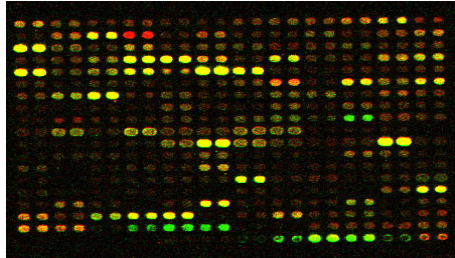
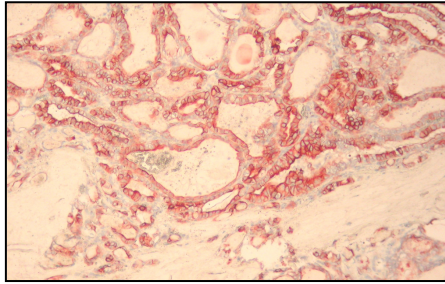
Histopathologie

THYROÏDE



Pathologie de la thyroïde

Biomarqueurs

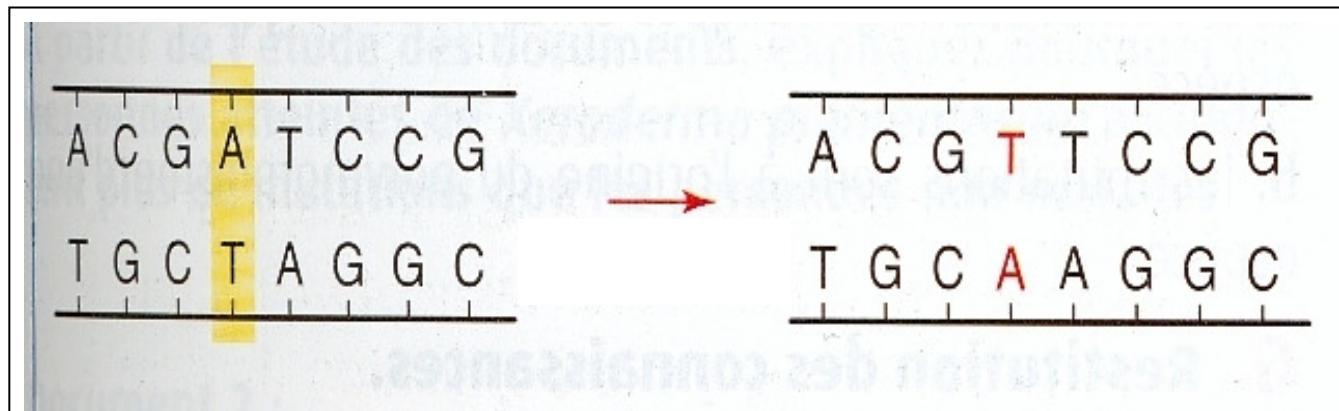


- Immunohistochimie
- **Mutations et réarrangements somatiques**
- Profil transcriptomique
- Cytogénétique

Mutations génétiques

Définitions

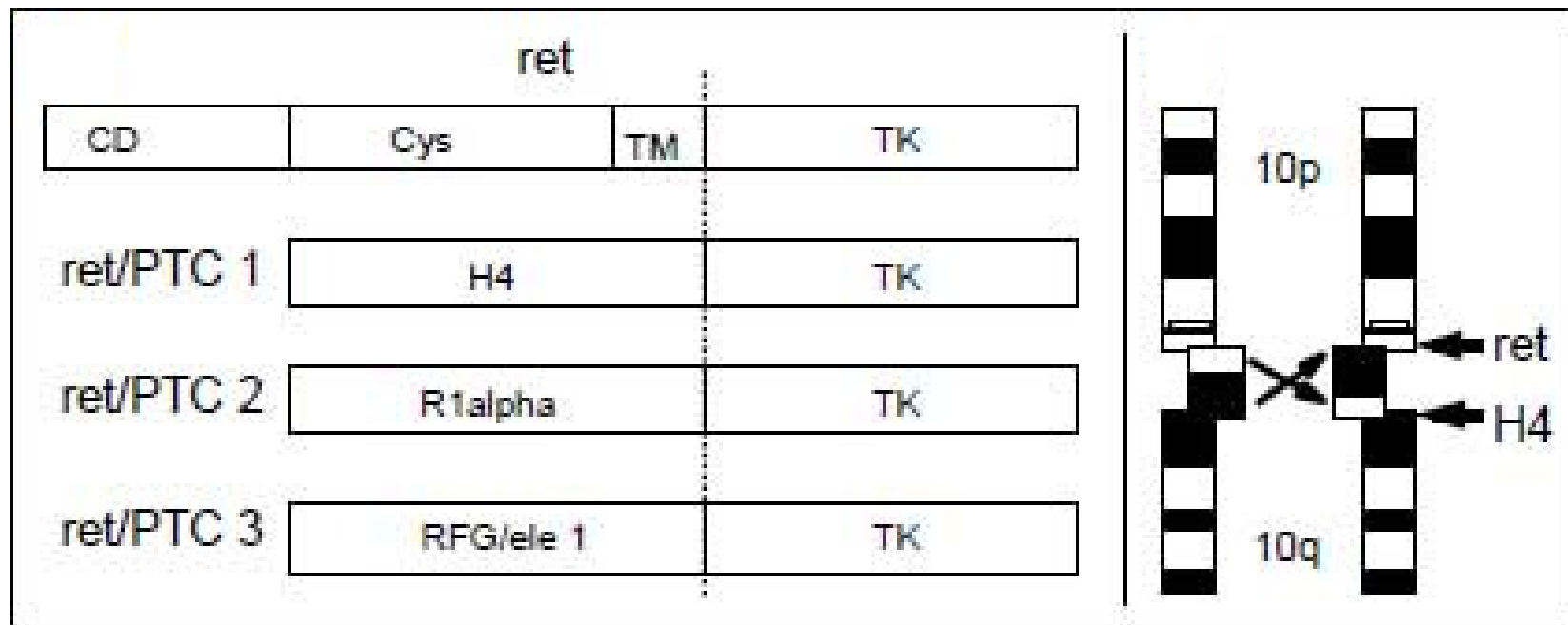
- modification de l'information génétique dans le génome d'une cellule
- Une mutation est dite **ponctuelle** quand elle ne touche qu'un seul nucléotide dans l'ADN
- Facteurs favorisants
 - Phases de réplication de l'ADN (division cellulaire)
 - Agents mutationnels exogènes



Réarrangements chromosomiques

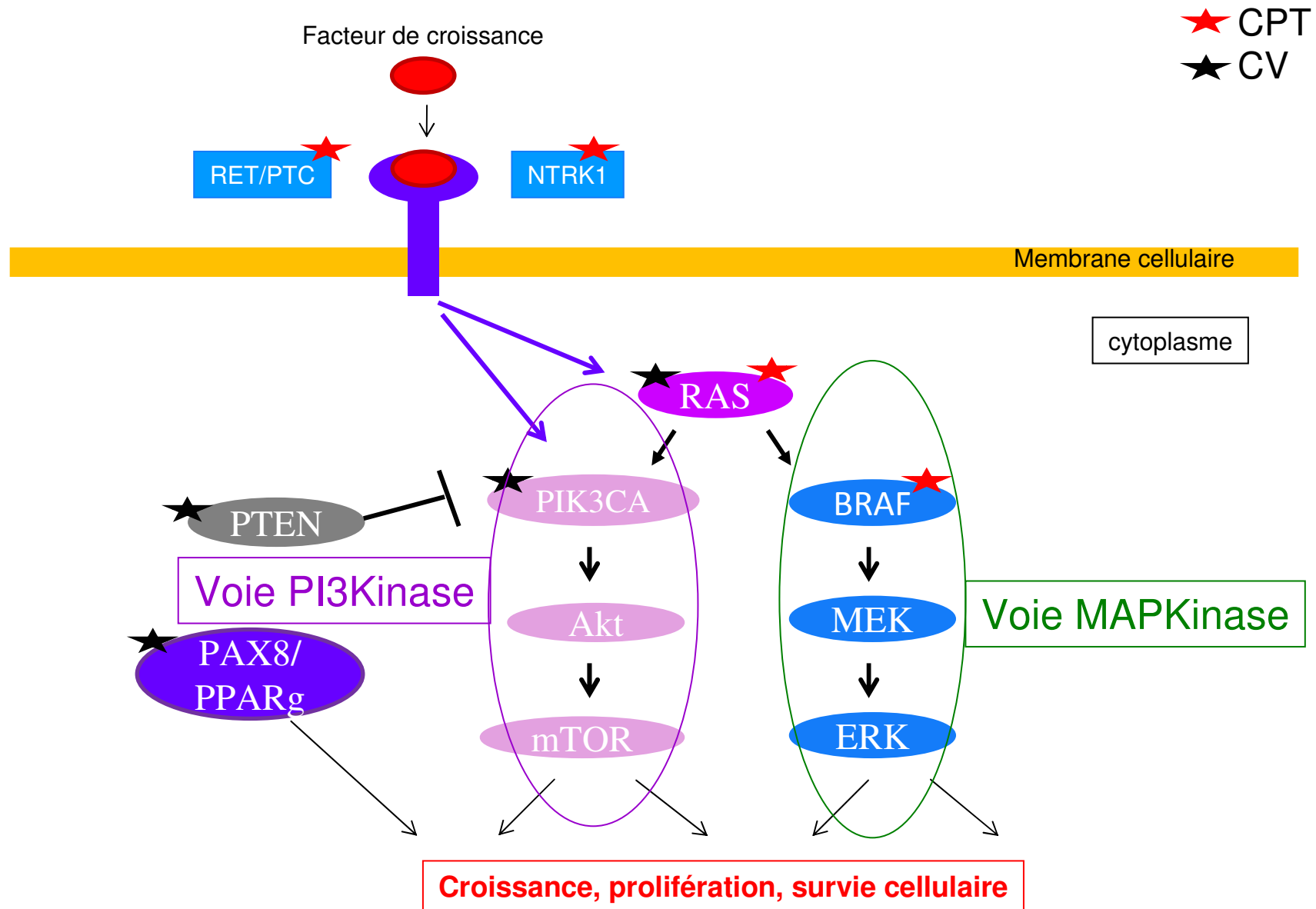
Définitions

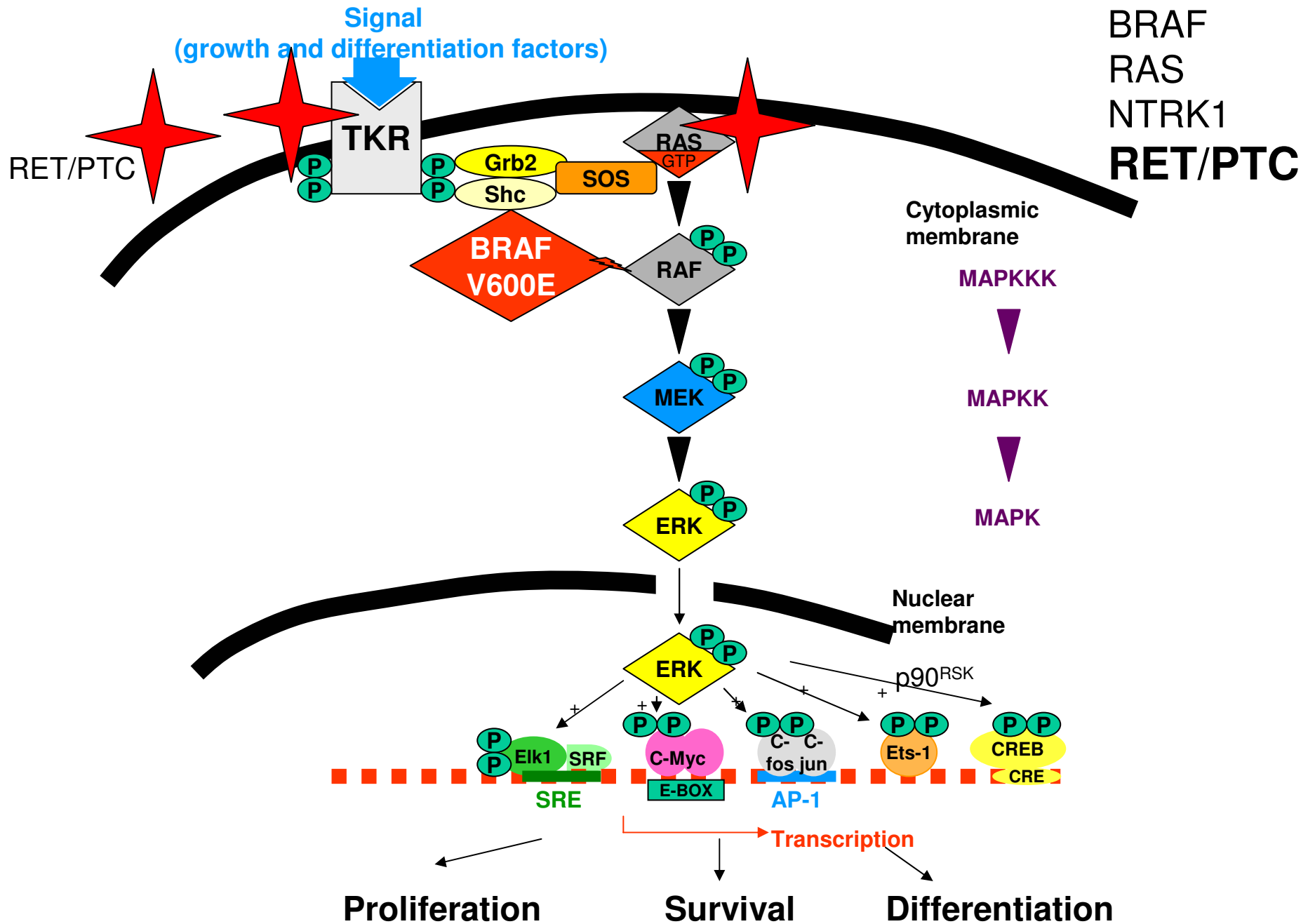
Remaniements chromosomiques caractérisés par des pertes, des multiplications ou des déplacements de certains segments d'ADN



Pathologie de la thyroïde

mutations/réarrangements somatiques





Pathologie de la thyroïde

mutations/réarrangements somatiques

Mutations ponctuelles

- *BRAF*
 - Codon 600
- *RAS*

Réarrangements

- RET/PTC
- NTRK1
- PAX8/PPAR γ
 - PI3Kinase

Pathologie de la thyroïde

mutations/réarrangements somatiques

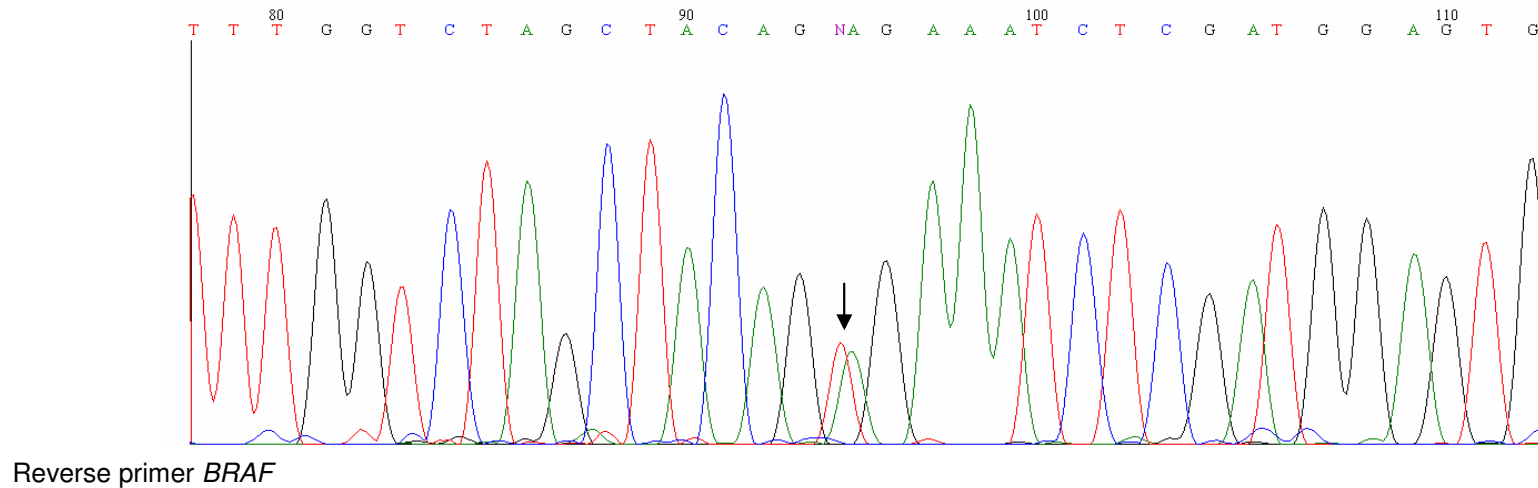
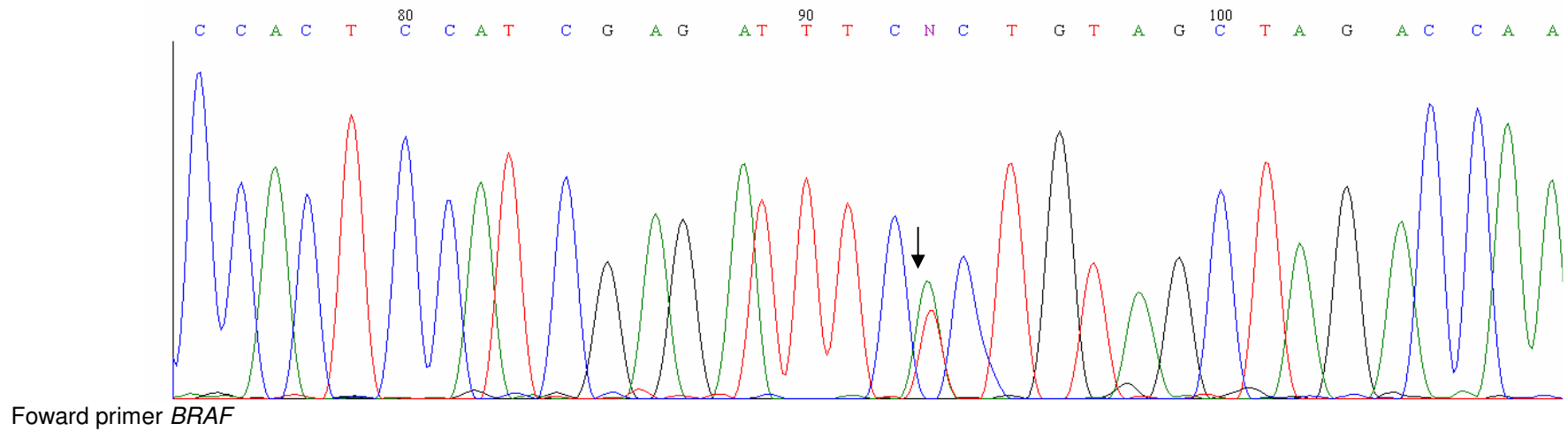
Tumeur	Prévalence (%)
Carcinome papillaire	
BRAF	45
RET/PTC	20
RAS	10
TRK	<5
Carcinome vésiculaire	
RAS	45
PAX8/PPAR γ	35
PIK3CA	<10
PTEN	<10

(d'après Nikiforova and Nikiforov. 2009 *Thyroid* 19: 1361-1361).

Pathologie de la thyroïde

techniques

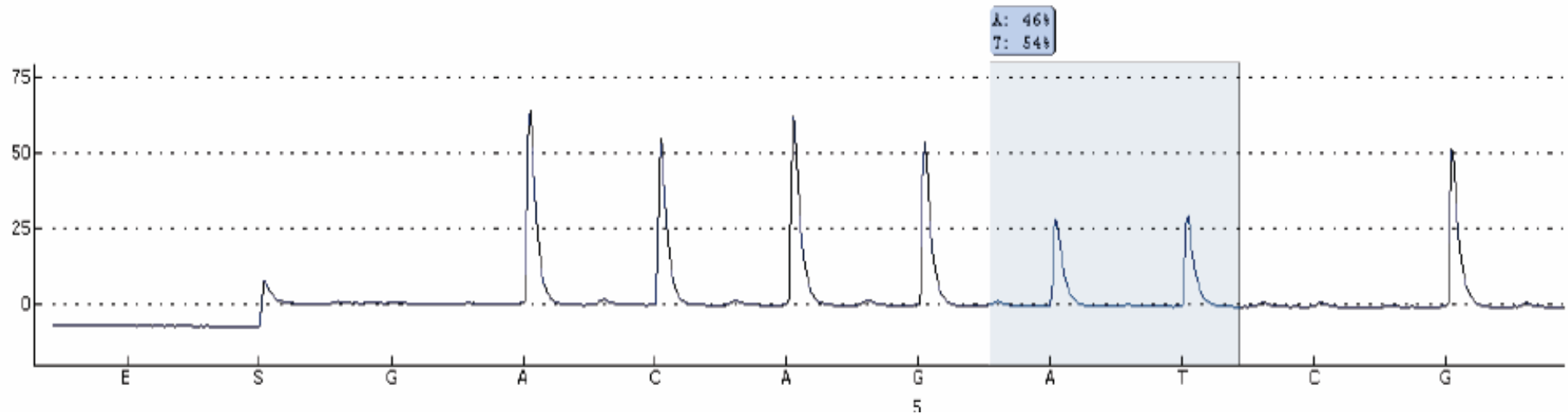
BRAF: séquençage direct



Pathologie de la thyroïde

techniques

BRAFV600E: pyroséquençage



Pathologie de la thyroïde

mutations/réarrangements somatiques

M A I S

Seules les mutations de ***BRAF*** sont spécifiques et exclusivement retrouvées dans le **Carcinome Papillaire**

Les autres mutations / réarrangements peuvent aussi être retrouvés au niveau des Adénomes (bénins).

Pathologie de la thyroïde

mutations/réarrangements somatiques

Intérêt de la biologie moléculaire en thyroïde?

Pathologie de la thyroïde

Intérêt de la biologie moléculaire

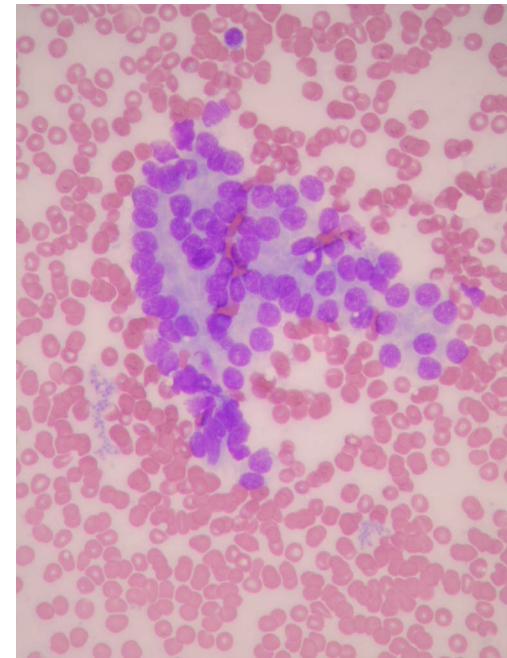
Diagnostic

BRAF sur matériel de cytoponction

Pronostic

BRAF } mauvais pronostic
RAS }

RET/PTC bon pronostic?



Pathologie de la thyroïde

Intérêt de la biologie moléculaire

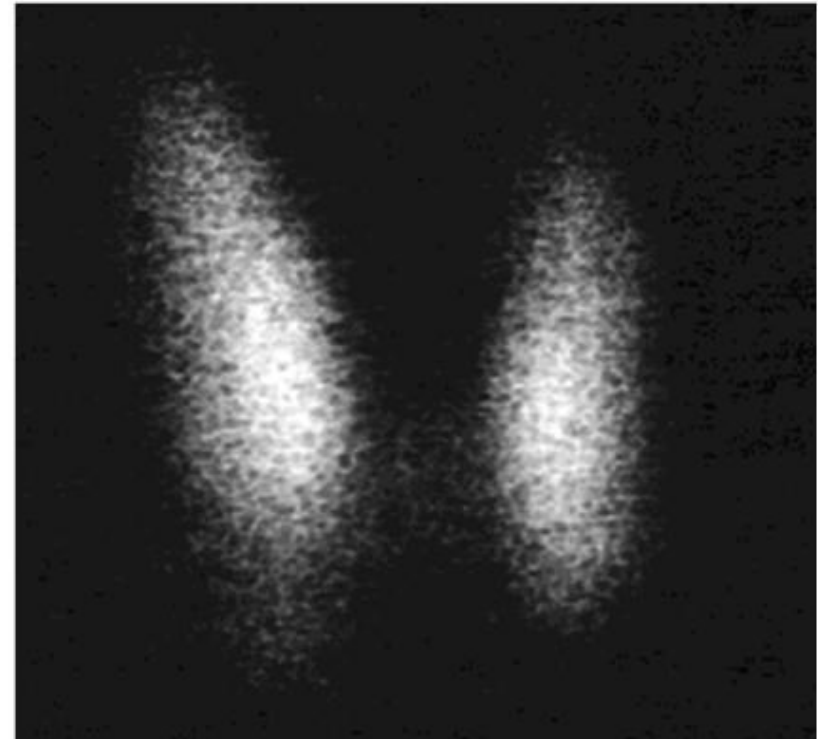
Thérapies

Chirurgie ++++

^{131}I +++ (cancers de souche vésiculaire)

Chimiothérapies conventionnelles

Radiothérapie externe



scintigraphie

Cible thérapie ciblée

Molécules thérapeutiques « anti-BRAF »

Pathologie de la thyroïde

Intérêt de la biologie moléculaire

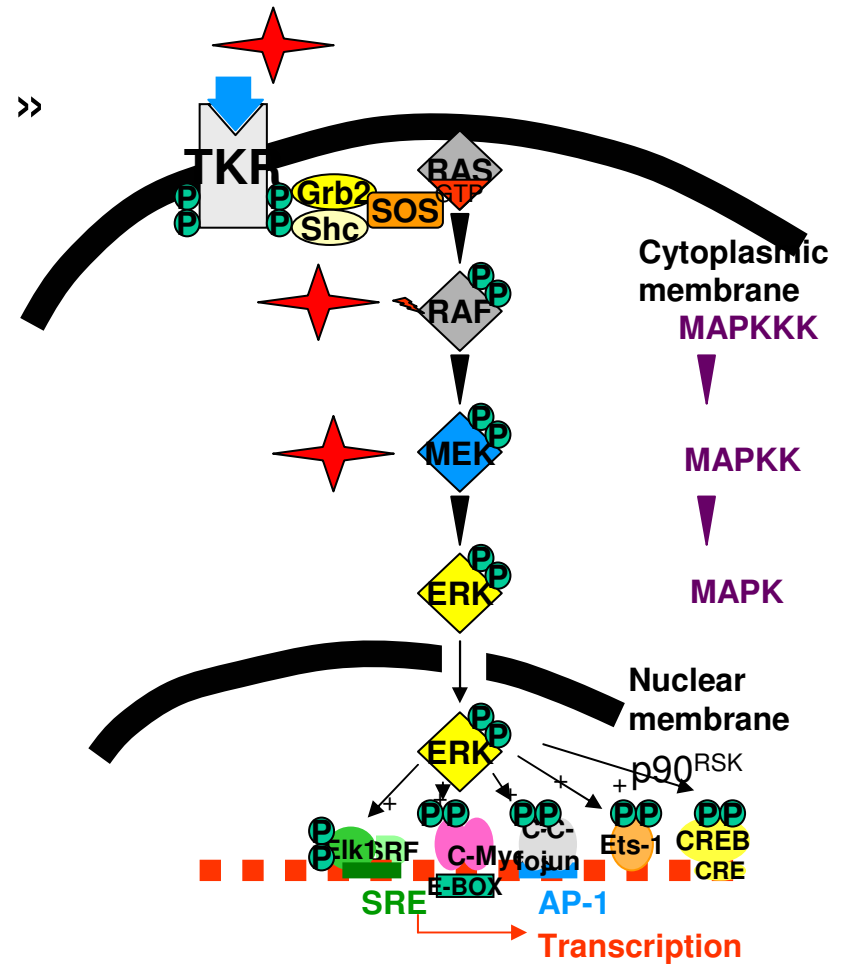
Cible thérapie ciblée

Molécules thérapeutiques « TKI »

- « anti-BRAF »
- « anti-MEK 1/2 »
- autres ...

Essais thérapeutiques

- qq résultats
- effets secondaires



Pathologie de la thyroïde

biologie moléculaire

Quels échantillons?

Pathologie de la thyroïde

quels échantillons?

PIECES OPERATOIRES

Réarrangements
RET/PTC; PAX8/PPARg



ARN



Tissu congelé

Mutations



ADN



Tissu congelé/fixé

CYTOPONCTIONS

Conclusions

- Mutation *BRAFV600E*
 - oncogène
 - spécifique du carcinome papillaire thyroïdien
- Intérêts
 - diagnostic (cytoponction++)
 - pronostic
 - Thérapeutique?