



# Données Bibliographiques



# Matériels et methodes



# Résultats et discussion



# Conclusion





# Références bibliographiques

A decorative border with a Greek key pattern surrounds the page. The top and bottom borders feature a repeating square Greek key motif, while the left and right borders feature a repeating square Greek key motif.

# Annexe

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche scientifique

Université Saad Dahlab De Blida

Faculté des sciences Agro-vétérinaire et Biologie

**Département de Biologie**

# MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

En vue de l'obtention du diplôme de MASTER

En biologie

Option : Bio signalisation Cellulaire et Moléculaire, Immunologie

**THÈME :**

**RÔLE DU D2-40 DANS LA DÉTECTION DES EMOLES  
LYMPHATIQUES DANS LES CANCERS THYROÏDIENS**

Présenté par : Mlle BENKHEIRA Manel

Date de Soutenance : 17 Décembre 2013

Jury :

Mme GUESSAIBIA. N	Présidente	USDB	MCB
Mme BENAZOUZ	Examinatrice	USDB	Maitre Assistante B
Mme HARKET	Examinatrice	USDB	Maitre Assistante B
Professeur OUAHIOUNE	Promotrice	EHS Douera	Chef de service d'anatomie pathologique
Docteur MOULAÏ	Encadreur	EHS Douera	Maitre Assistante

**Promotion 2012/2013**



## REMERCIEMENTS :

*Je remercie Dieu Tout Puissant, qui m'a accordé la santé, le courage et la patience nécessaire afin d'achever ce travail dans les meilleures conditions.*

*J'exprime toute ma reconnaissance à Madame Professeur OUAHIOUNE, ma promotrice et chef du service d'anatomie pathologique au niveau de l'EHS DOUERA, qui m'a accueillie au sein de son laboratoire, pour ses prodigieux conseils et sa grande patience.*

*J'adresse mes sincères remerciements aux membres du jury :*

*Madame GUESSAIBIA pour l'honneur et l'amabilité d'avoir bien voulu présider mon jury.*

*Madame BENAZOUZ pour l'honneur qu'elle m'a fait d'avoir bien voulu accepter d'être mon examinatrice.*

*Madame HARKET pour l'honneur qu'elle m'a fait d'avoir bien voulu accepter d'examiner mon travail.*

*J'adresse également mes remerciements à tous mes enseignants, qui m'ont donné les bases de la science tout au long de mon cursus.*

*Je remercie également : Docteurs, personnel, techniciens et techniciennes du laboratoire d'anatomie pathologique pour m'avoir accueillie tout au long de ce travail, spécialement : Docteur BAICHE, Docteur MOULAI, Docteur BENMOULOU, Monsieur ZITOUNI, Monsieur Saoudi, et Melle Halima.*

*J'exprime également toute ma reconnaissance à tous ceux qui ont contribué de loin ou de près, à l'aboutissement de ce travail.*

*Merci.*

## Dédicace

*Je dédie ce modeste travail de ma gratitude et mes profonds remerciements à ceux qui m'ont soutenue, et m'ont suivi dans mes études, mes parents. Qu'Allah vous accorde une longue vie pour que ne puissions toujours bénéficier de vos conseils.*

*A mes adorables et chères frères et sœurs : Sarah, et Ibrahim.*

*Le chemin qui mène à la réussite est long et semé d'embûches, qu'Allah vous accorde le courage nécessaire pour y parvenir.*

*A mon très cher oncle Karim, et ma tante Djamila, pour leur aide, et surtout pour leurs encouragements.*

*A toute la famille : BENKHEIRA.*

*A mes amis*

*Merci pour votre si belle amitié.*

*A tous les étudiants de ma promotion.*

*A tous ceux que je connais sans exception.*

*Manel.*

## Résumé

L'invasion lymphatique est un facteur prédictif de métastases ganglionnaires dans les cancers thyroïdiens. Cependant, le diagnostic de l'invasion lymphatique est parfois difficile par la technique de routine l'hématoxyline-éosine (H & E). L'immunohistochimie utilisant le D2-40 a été réalisée pour étudier la distribution des vaisseaux lymphatiques et l'invasion lymphatique dans une série de 23 carcinomes papillaires thyroïdiens. Le D2-40 a présenté une expression spécifique des vaisseaux lymphatiques, mais pas pour les vaisseaux sanguins. L'étude immunohistochimie utilisant le D2-40 réalisée sur l'ensemble des cas (23 cas) n'a pas mis en évidence de nouvelles angioinvasions dans les cas qui n'ont pas présenté d'angioinvasions à l'H&E. Elle a toutefois permis de bien individualiser la paroi des micro-vaisseaux lymphatiques intra tumoraux. Tous les vaisseaux lymphatiques ont montrés un marquage positif (marron allant au brun foncé).

**Mots clés :** Cancers thyroïdiens, vaisseaux lymphatiques, D2-40, immunohistochimie

## ملخص

سرطان الحنجرة هو ورم خبيث من جسم الغدة الدرقية. الغزو اللمفاوي هو مؤشر الانبثاث للعقد اللمفاوية في سرطانات الغدة الدرقية. لكن ، في بعض الأحيان يصعب التشخيص لغزو اللمفاوية بأسلوب روتيني الهيماتوكسيلين ويوزين (H & E). الدراسة الكيميوونسيجية باستخدام D2-40 لدراسة توزيع الأوعية الليمفاوية والغزو اللمفاوي استعملت في سلسلة من 23 سرطان الغدة الدرقية الحليمية، أظهرت التعبير محددة من الأوعية اللمفاوية، ولكن ليس الأوعية الدموية. الدراسة الكيميوونسيجية باستخدام D2-40 أكدت تقارير لدراسة الروتينية في عدم وجود اي غزو في الحالات التي لم تثبت غزو للأوعية خلال الدراسة النسيجية (20) ، ولكن اظهرت لنا عدة اوعية لمفاوية في النسيج السرطاني خاصة في الحالات التي تم تقرير عن جود العديد من الانبثاث للعقد اللمفاوية (3). كل الاوعية اظهرت لونا بني داكن يدل على استجابة الخلايا اللمفاوية لـ D2-40 .

الدراسة النسيجية و الدراسة الكيميوونسيجية تقنيتان متكاملتان التي تساعد على تشخيص سرطان الغدة الدرقية المختلفة وإيجاد العلاج الأكثر فعالية لمرضاها.

**كلمات مفتاح:**سرطان الحنجرة، الأوعية الليمفاوية الجسم المضاد D2-40، الدراسة الكيميوونسيجية المناعية

## ABSTRACT

Lymphatic invasion is a predictor of lymph node metastasis in thyroid cancers. However, the diagnosis of lymphatic invasion is sometimes difficult for the technical routine hematoxylin- eosin ( H & E). Immunohistochemistry using D2 -40 was performed to study the distribution of the lymph vessels and lymphatic invasion in a series of 23 papillary thyroid carcinomas . The D2 -40 showed specific expression of lymphatic vessels , but not in blood vessels . Immunohistochemical study using the D2 -40 performed on all cases ( 23 cases ) did not reveal any new angioinvasions in cases that did not angioinvasions presented to the H & E. However, it has well individualize the wall of the lymphatic microvessels within tumor . All lymphatics showed positive staining ( brown up to dark brown ) .

Histology and immunohistochemistry are two complementary techniques that help us diagnose different cancers of the thyroid and find the most effective therapy for our patients .

**Keywords :** thyroid carcinoma, D2-40, Immunohistochemistry



## Listes des figures :

**Figure 1 : Follicules thyroïdiens de taille moyenne, épithélium cubique, noyaux réguliers et colloïde homogène.**

**Figure 2: Tissu thyroïdien normal : immunomarquage anti-TG intra cytoplasmique et au niveau de la colloïde**

**Figure 3 : Cellules C détectés par immunomarquage anti-calcitonine CT en position inter et intra-vésiculaire**

**Figure 4 : Formation de T3 et T4.**

**Figure 5 : les différentes molécules impliqués dans la lymphangiogénèse,**

**Figure 6 : La focal adhésion kinase**

**Figure 7 : CV : Hématoxyline & Eosine (H&E) G: X200**

**Figure 10: CP : noyaux en verre dépoli H&E G : X100**

**Figure 15: Aspect histologique d'un carcinome thyroïdien peu différencié avec ses différents aspects**

**Figure 16 : Aspect microscopique d'un carcinome indifférencié (anaplasique) H&E G : x200**

**Figure 18: Aspect histologique d'un carcinome médullaire, a : G : X160, b : G : X1000 H&E**

**Figure 20 : Expression du D2-40 dans le carcinome papillaire thyroïdien. G X100**

**Figure 21 : Les vaisseaux Lymphatiques et les vaisseaux sanguins dans les lésions folliculaires (vésiculaires) de la thyroïde(a-u)**

**Figure 22 : Expression du D2-40 dans les tumeurs primaires (A, C à I) et coloration a l'hématoxyline et éosine (B). G : A, B, D, F, G à I X300; C X200; EX100.**

**Figure 23 : Répartition des cas selon l'âge**

**Figure 24 : Répartition des cas selon le sexe .**

**Figure 25 : Répartition des cas selon le type histologique du cancer de la thyroïde.**

**Figure 26 : Répartition des patients selon les variantes histologiques du carcinome papillaire**

**Figure 27 : Répartition en pourcentage selon les critères d'invasions et d'atteintes ganglionnaires des carcinomes papillaires thyroïdiens.**

**Figure 28 : aspect histologique de la variante classique du carcinome papillaire ; coloration à L'H&E ; G : X 10.**

**Figure 29 : Effraction de la capsule thyroïdienne (C) et formation des emboles vasculaires (E) envahis par les cellules tumorales du carcinome papillaire thyroïdien, coloration à L'H&E, a : G X20**

**Figure 30 : Expression du D2-40 dans les carcinomes papillaires thyroïdiens, a : GX20 ; b : GX10**

## Liste des abréviations

**Ac: Anticorps.**

**ACE : L'antigène carcino-embryonnaire.**

**Ag : Antigène.**

**AIT : Apical Iodide Transporter.**

**CA : Carcinome anaplasique.**

**CGA: Chromogranine.**

**CK19: Cytokeratine 19.**

**CK20: Cytokeratine 20.**

**CK7 : Cytokeratine 7.**

**CM : Carcinome médullaire.**

**CP : Carcinome papillaire.**

**CV : Carcinome vésiculaire.**

**DAB : Chromogène diaminobenzidine.**

**G : Grossissement.**

**GDNF: Glial-Driven-Nerve Growth Factor.**

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Hydroxyde d'Hydrogène.**

**HCG : Hormone chorionique gonadotrophique.**

**HE: Hématoxyline-Eosine.**

**I: Ion iodures.**

**IHC: Immunohistochimie.**

**MAPK: Mitogène Activated Protein Kinase.**

**MCP: Micro carcinoma papillaire.**

**MIT : Mono Iodo Tyrosine.**

**PAP : Peroxydase Anti – Peroxydase.**

**PBS : Phosphate Buffered Saline.**

**TBS : Totally Burned Synapses.**

**Tg : Thyroglobuline.**

**TGB : Thyroxin Binding Globulin.**

**TRH: Tyrotropine Stimulating Hormon.**

**TSH: Thyrotropine Stimulating Hormon.**

**TTF1: Facteur de Transcription  
Thyroïdien.**

**EGF : Epidermal Growth Factor.**

**TPO : Thyroperoxydase.**

**NIS: Symporteur Iodure, Sodium.**

**HMG-COA - reductase: Hydroxy Methyl  
Glutaryl Reductase.**

## SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b>	<b>10</b>
<b>I. Les Données Bibliographiques</b>	
<b>I.1.</b> Anatomie Histologique de la glande thyroïde	11
<b>I.2.</b> Immunomarquage des cellules thyroïdiennes	14
<b>I.3.</b> Gènes impliqués dans le développement de la glande thyroïde	14
<b>I.4.</b> Hormonogénèse thyroïdienne	14
<b>I.5.</b> Régulation de l'hormonogénèse et des cellules thyroïdiennes	16
<b>I.6.</b> Voies de signalisation principales impliquées dans la prolifération thyroïdienne normale	17
<b>I.7.</b> Tumeurs malignes Epithéliales	20
<i>I.7.1. Classification des cancers thyroïdiens</i>	20
<i>I.7.2. Facteurs de risques</i>	20
<i>I.7.3. Carcinomes vésiculaires (Folliculaires) CV</i>	21
<i>I.7.4. Carcinome papillaire CP</i>	23
<i>I.7.5. Carcinome peu différencié (carcinome insulaire) CPD</i>	25
<i>I.7.6. Carcinome anaplasique, indifférencié CA</i>	27
<i>I.7.7. Carcinome médullaire CM</i>	29
<b>I.8.</b> Les voies et mécanismes de dissémination métastatique	32
<b>I.9.</b> Podoplanine (D2-40)	35
<b>II. Matériels et méthodes</b>	
<b>II.1.</b> Matériel	41
<i>II.1.1 Population d'étude</i>	41
<i>II.1.2. Matériel non biologique</i>	42
<i>II.1.3. Matériel histologique</i>	43
<b>II.2.</b> Méthodes	43
<i>II.2.1. Technique de coloration HE (Hématoxyline, Eosine)</i>	43
<i>II.2.2 Technique d'immunohistochimie (IHC)</i>	45

### **III. Résultats et Discussion**

<b>III.I. Résultats</b>	<b>49</b>
<i>III.1.1 Paramètres cliniques</i>	<i>49</i>
<i>III.1.2 Etude Histopathologique</i>	<i>50</i>
<i>III.1.3 Etude Immunohistochimique</i>	<i>55</i>
<b>III.II. Discussion</b>	<b>58</b>
<b>CONCLUSION</b>	<b>62</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>63</b>

### **Annexe**

- A. Hormonogenèse thyroïdienne, régulation de l'hormonogenèse et classification des cancers thyroïdiens**
- B. Appareillage, Matériel et Réactifs.**
- C. Données sur les patients**

## Introduction

Les cancers thyroïdiens représentent environ 1% des tumeurs malignes (Erdem H et al ; 2011). Ils sont responsables du plus grand nombre de décès par cancers endocriniens (Erdem H et al ; 2011). Un diagnostic précoce et un traitement rapide du cancer de la thyroïde permet de prolonger le temps de survie des patients. Le diagnostic du cancer de la thyroïde nécessite essentiellement une étude histologique qui selon les résultats, sera suivie ou non d'une technique immunohistochimique, par le biais d'utilisation de marqueurs spécifiques et très évocateurs pour chaque cancer.

Le Carcinome papillaire (CP) est la variété la plus fréquente des cancers de la thyroïde, représentant 75 à 85 % de tous les cancers thyroïdiens (Erdem H et al ; 2011). Il provient des cellules folliculaires de la thyroïde.

Le CP donne lieu souvent à des métastases ganglionnaires via les vaisseaux lymphatiques. Les métastases se produisent chez 20% des patients. Il s'en suit une atteinte pulmonaire, osseuse, hépatique et cérébrale (Lei Gong et al ; 2012).

Le développement des cancers thyroïdiens est influencé par de nombreux facteurs, y compris les mutations génétiques, les facteurs de croissance et les agents physiques tels que les rayonnements.

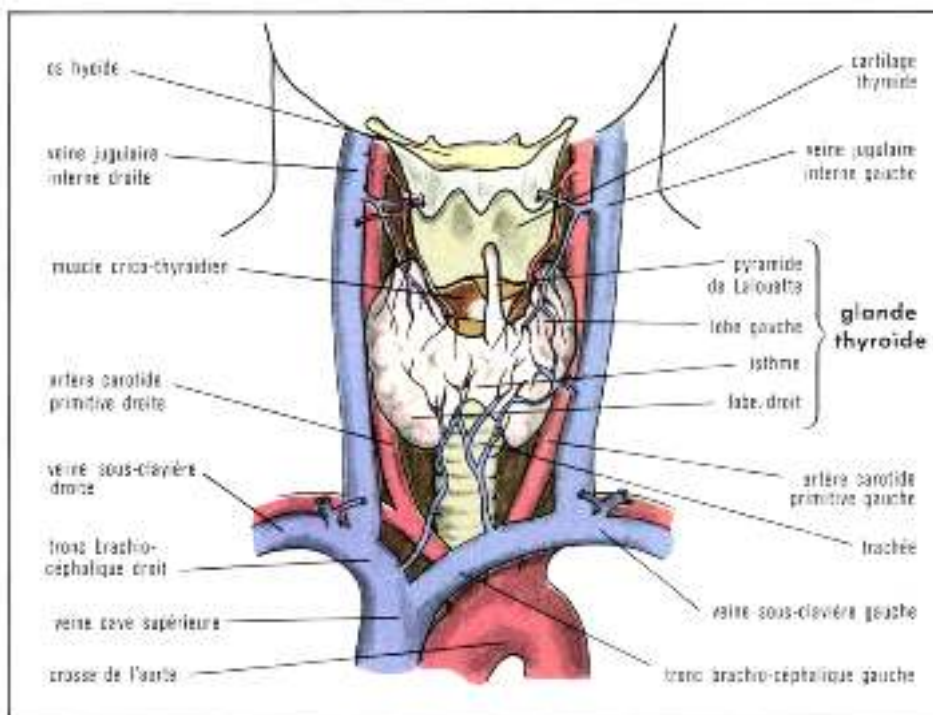
Les facteurs pronostiques sont nécessaires pour déterminer le comportement biologique et fournir une évaluation initiale. Ces biomarqueurs, tels que le D2 – 40, offrent une amélioration significative dans le diagnostic des cancers thyroïdiens (Lei Gong et al ; 2012).

La détection immunohistochimique de la Podoplanine/D2-40 dans les cellules endothéliales lymphatiques a été utilisée dans de nombreuses études pour rechercher des invasions micro vasculaires lymphatiques dans les zones péri tumorales et intra tumorales. Le but de cette recherche est de prévenir la survenue d'éventuelles métastases d'abord ganglionnaire puis viscérale.

### I.1 Anatomie Histologique de la glande thyroïde :

La thyroïde est une glande endocrine de 10 à 20 grammes, constituée de deux lobes unis par un isthme médian, située à la base de la partie antérieure du cou. La thyroïde est faite de lobules, Les lobules sont constitués de follicules , Les lobules sont inclus dans une capsule qui définit la loge thyroïdienne. La consistance de la glande est élastique et souple ; sa couleur est rougeâtre.(Ryndak-Swieserc A.;2010). Le corps de la thyroïde est en contact avec le nerf laryngé récurrent. Concernant la vascularisation de la glande (Figure 1) ; on a vascularisation artérielle (L'artère thyroïdienne supérieure et inférieure), vascularisation veineuse (veines thyroïdiennes supérieure, moyenne et inférieure), vascularisation lymphatique( Le compartiment central ; comprenant les ganglions sus et sous-isthmiques, récurrentiels et médiastinaux supérieurs et le compartiment latéral avec les chaînes jugulaires internes et spinales) .Le drainage lymphatique est très important à connaître, soit 70% des cancers thyroïdiens papillaires sont lymphophiles et s'accompagnent d'une atteinte ganglionnaire (Ryndak-Swiercz ; 2010). Les vaisseaux lymphatiques sont satellites des veines thyroïdiennes.

Chez l'adulte, la glande thyroïde régule le métabolisme systémique par l'intermédiaire des hormones thyroïdiennes. Chez le fœtus et chez l'enfant, la glande thyroïde joue un rôle important dans le développement du système nerveux et du squelette (Leux C, 2012).

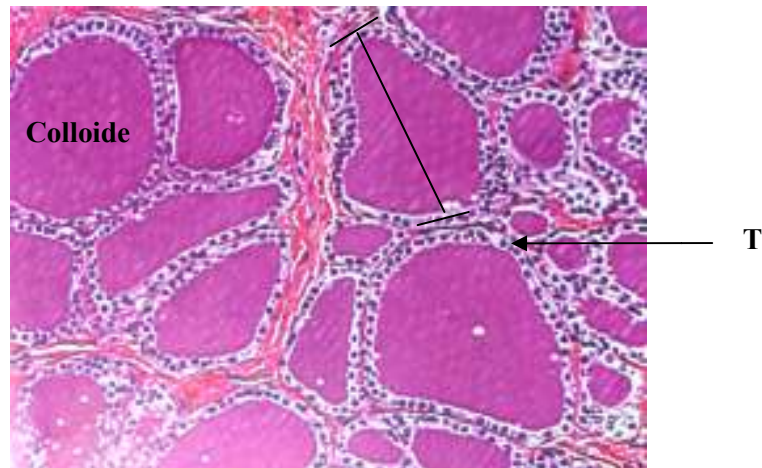


**Figure 1 : Anatomie de la glande thyroïde**

L'unité fonctionnelle de la thyroïde est le follicule (Figure 2), constituée principalement de thyrocytes appelés aussi cellules folliculaires ou vésiculaires (70% des cellules de la thyroïde) qui sont des cellules cubiques avec un noyau arrondi, entourant une lumière contenant la colloïde. Les thyrocytes sont polarisés, avec un pôle apical en contact avec la colloïde, et un pôle basal en contact avec les capillaires sanguins là où se fera la sécrétion des hormones thyroïdiennes dans la circulation sanguine. Le principal constituant de cette colloïde est une glycoprotéine iodée appelée thyroglobuline (TG), elle est dimérique et de haut poids moléculaires 660Kda (Guliana et Calmette ; 1993), constituée de deux sous-unités identiques, la TG est le précurseur des hormones thyroïdiennes  $T_3$  (tri-iodothyronine) et  $T_4$  (tétra-iodothyronine ou thyroxine).  $T_4$  est l'hormone inactive et peut être désiodée en  $T_3$ , l'hormone active ou en  $rT_3$ , inactive, selon les besoins de l'organisme. Les hormones thyroïdiennes sont nécessaires à la croissance, au développement de tous les tissus (squelette, système nerveux et cardiovasculaire,...). Elles participent également au métabolisme des glucides et des lipides et stimulent les fonctions végétatives et le métabolisme général de l'organisme.

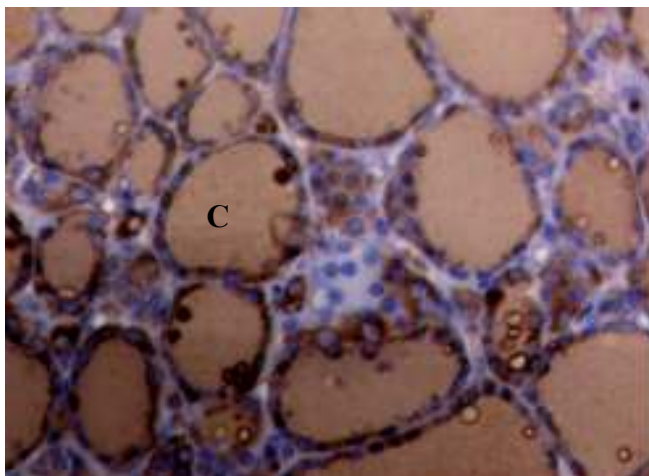
Outre les thyrocytes, la thyroïde est aussi constituée de cellules C ou parafolliculaires qui font partie du SED (Système Endocrinien Diffus) (Figure 4) qui produisent la calcitonine, de cellules endothéliales formant la paroi des vaisseaux et de fibroblastes. (Borda N et al ; 2010)





**Figure 2 : Follicules thyroïdiens de taille moyenne, épithélium cubique, noyaux réguliers et colloïde homogène.**

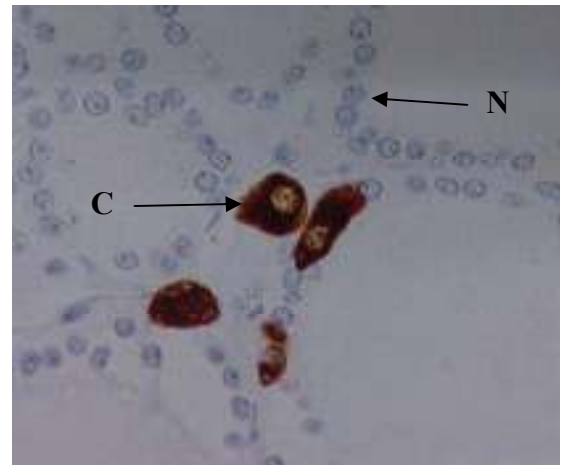
→ T, Thyrocytes contenant les noyaux sombres. ( Borda N et al ; 2010)  
 ┌───┐ Follicule thyroïdien



**Figure 3: Tissu thyroïdien normal : immunomarquage anti-TG intra cytoplasmique et au niveau de la colloïde.**

( Borda N et al ; 2010)

C, colloïde.



**Figure 4 : Cellules C détectés par immunomarquage anti-calcitonine CT en position inter et intra-vésiculaire.**

( Borda N et al ; 2010)

→ C, Cellule C/ N, noyau

**I.2. Immunomarquage des cellules thyroïdiennes :**

En IHC, les cellules vésiculaires normales expriment la thyroglobuline TG ( marquage cytoplasmique et de la colloïde) ( Figure 3 ) ainsi que le TTF-1 ( Thyroid Transcription Factor 1) et le TTF-2 (Thyroid Transcription Factor 2) et le PAX8 ( Paired box gene 8) ( marquages nucléaires). Les cellules C normales ne sont pas visibles en microscopie optique avec les colorations usuelles, elles nécessitent l'IHC avec les marqueurs généraux de toutes les cellules du SED ainsi que l'immunomarquage spécifique à l'anti-calcitonine (CT) (Figure 4). ( Borda N et al ; 2010)

**I.3. Gènes impliqués dans le développement de la glande thyroïde :**

Généralement, cette catégories des gènes est celle qui code pour des facteurs de transcription et qui joue un rôle majeure dans l'organogénèse et la différenciation de la thyroïde, c'est gènes sont le TTF-1, le PAX8 et le TTF2.ces gènes sont exprimé au cours de la vie intra-utérine dans les cellules de l'ébauche médiane embryologique.

TTF-1 et PAX8 sont nécessaires pour le développement et l'incorporation des cellules C dans la thyroïde. D'autres gènes comme la thyroglobuline TG, la thyroperoxydase TPO et le Symporteur sodium-iodure NIS seront impliqués dans les phases futures du développement de la thyroïde. (Mansouri A et al ; 1998)

**I.4. Hormonogénèse thyroïdienne :**

L'hormonogénèse est la synthèse des hormones thyroïdiennes, triiodothyronine 3 et thyroxine ainsi que la calcitonine et la thyroglobuline, T3 et T4 possèdent une structure organique unique commune : la thyronine, dérivant de l'acide aminé tyrosine. La synthèse des hormones thyroïdiennes peut être divisée en trois grandes étapes : (D'après : Ryndak – swiercz, 2010) (Figure 1, Annexe A)

<i>Étapes de L'hormonogenèse</i>	<i>Principales actions</i>
<b>Captation et organification de l'iodure (I<sup>-</sup>)</b>	<p>*I<sup>-</sup> est capté dans la membrane basal du thyrocyte via le symporteur Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> (NIS) (Transport actif).</p> <p>*I<sup>-</sup> sera transporté du cytoplasme a la lumière via la membrane apical par la pendrine et L'AIT (Transport passif).</p>
<b>Iodation de la thyroglobuline (TG)( Figure 4)</b>	<p>*I<sup>-</sup> sera oxydé par TPO en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est produit dans la membrane apical par deux NADPH oxydases THOX1 et THOX2).</p> <p>* I<sup>-</sup> oxydés vas se fixé sur les résidus tyrosine de la TG et forment ainsi les dérivés diiodés DIT et monoiodés MIT.</p> <p>* les couplages catalysés par la TPO auront alors lieu : DIT+DIT= hormone T<sub>4</sub> / MIT+DIT= T<sub>3</sub></p>
<b>Libération des hormones thyroïdiennes</b>	<p>*TG chargée d'hormones T<sub>3</sub> et T<sub>4</sub> est endocytée par micropinocytose et la fusion avec des lysosomes mène au clivage protéolytique de la thyroglobuline libérant T<sub>3</sub> et T<sub>4</sub>,</p> <p>*La DIT et la MIT sont libérées dans le cytoplasme et seront désiodées par une iodotyrosine désiodase ; toute fois ; cette enzyme ne s'attaque pas aux thyronines iodé T<sub>3</sub> et T<sub>4</sub>.</p>

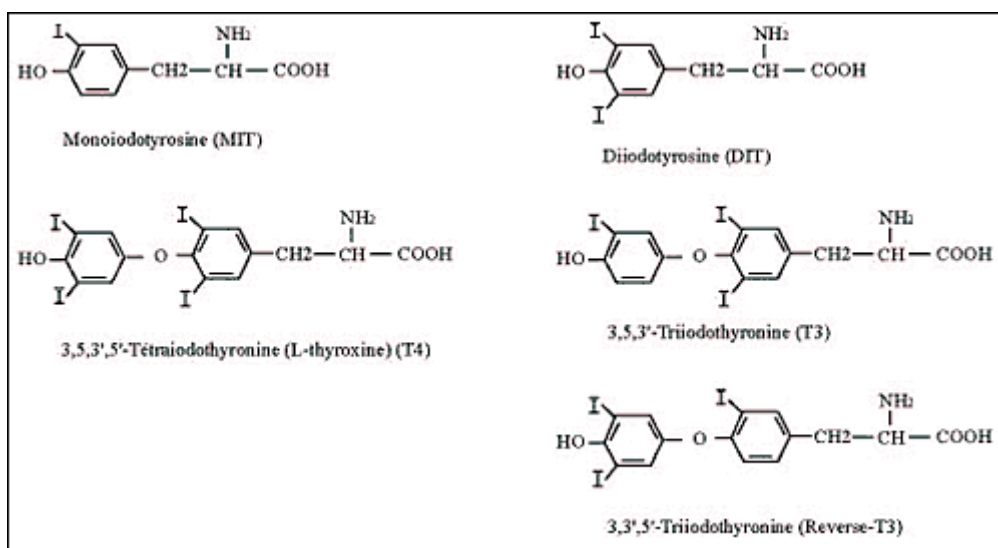


Figure 5 : Formation de T<sub>3</sub> et T<sub>4</sub>.

**Remarque :** T<sub>3</sub> et T<sub>4</sub> sont sécrétées dans le flux sanguin. Les T<sub>4</sub> sont désiodées en T<sub>3</sub> en fonction de la nutrition et l'état fonctionnel de l'organisme et l'iodure est recyclé. En cas de déficience en iode, une augmentation relative de la synthèse de T<sub>3</sub> par rapport à T<sub>4</sub> est observée.

### 1.5. Régulation de l'hormonogénèse et des cellules thyroïdiennes

La fonction et la croissance de la thyroïde sont régulées par la TSH est produite par l'hypophyse en réponse à la TRH produite par l'hypothalamus. La sécrétion des hormones thyroïdiennes et leur régulation sont contrôlées par un mécanisme de rétro-contrôle négatif. Lorsque la concentration sanguine d'hormones thyroïdiennes diminue, l'hypothalamus libère de la TRH qui va stimuler l'hypophyse entraînant la libération de la TSH. Cette dernière va induire la production d'hormones thyroïdiennes. Au contraire, lorsque les hormones sont abondantes dans le sang, elles inhibent la production de la TRH par l'hypothalamus et de la TSH par l'hypophyse ce qui interrompt la stimulation thyroïdienne et mène à l'arrêt de la sécrétion de T<sub>3</sub> et T<sub>4</sub>. L'effet positif de la TRH d'une part et l'effet négatif des hormones d'autre part ont pour conséquence une grande stabilité du taux de TSH sanguin, et donc aussi des hormones thyroïdiennes. Un niveau anormal de TSH indique généralement la présence d'un désordre thyroïdien. En revanche, la sécrétion de la Calcitonine est réglée directement par le niveau plasmatique de calcium, toute augmentation du calcium plasmatique stimule la sécrétion, mais par contre sa diminution l'inhibe. (Figure 2, Annexe A) (Borda N et al ; 2010)

#### ❖ La désiodation de la T<sub>3</sub> et T<sub>4</sub> ou effet Wolff-Chaikoff :

Wolff et Chaikoff rapportent que la production thyroïdienne s'accroît puis se réduit lorsque la concentration plasmatique en ions iodures s'élève. Cette inhibition de la fonction thyroïdienne consécutive au blocage de l'organification de l'iode et dénommée effet Wolff-Chaikoff, l'iode est capable de contrôler la sécrétion thyroïdienne indépendamment de l'action de la TSH par plusieurs mécanismes : diminution de la sensibilité à l'action de la TSH, inhibition du captage de l'iodure, de la transcription du gène de la thyroperoxydase et de la génération de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Ryndak-Swieserc A.,2010).

### 1.6. Voies de signalisation principales impliquées dans la prolifération thyroïdienne normale.

La fonction thyroïdienne implique principalement quatre cascades de signalisation: la cascade de l'AMPc, la cascade des inositols phosphates, la cascade des MAPK et la cascade des PI3K . Leur stimulation par des signaux extracellulaires comme les hormones, les facteurs

de croissance ou les neurotransmetteurs va initier une série de réponses en se liant à des récepteurs membranaires spécifiques et activer un ensemble de gènes spécifiques du stimulus. La majorité de ces gènes sont des facteurs de transcription qui déclenchent alors l'expression de nouveaux gènes.

#### Cascade de l'AMPc

L'activation de la cascade de l'AMPc stimule la prolifération et la différenciation des thyrocytes. La TSH active cette cascade de signalisation tout comme la forskoline (en activant l'adénylate cyclase), la choléra toxine (en activant la protéine G<sub>s</sub>) et les analogues de l'AMPc. La présence d'insuline ou d'IGF-I avec la TSH est requise pour un effet mitogénique. (Roger P et al; 1988). La TSH induit l'expression de gènes de différenciation spécifiques de la thyroïde tels que Tg, TPO, NIS, TSHR, THOX1 et THOX2. La transcription de ces gènes de différenciation est régulée essentiellement par trois facteurs de transcription: TTF1, TTF2 et PAX8 qui agissent de manière coordonnée.

Le récepteur de la TSH (TSHR) est un récepteur à sept domaines transmembranaires. Lorsque la TSH se lie au récepteur, celui-ci, par l'intermédiaire de la sous-unité  $\alpha$  de la petite protéine G<sub>s</sub> (G<sub>as</sub>) catalysant le remplacement du GDP par du GTP, active l'adénylate cyclase, provoquant une augmentation du taux intracellulaire d'AMPc. L'AMPc se lie à la sous-unité régulatrice de la protéine kinase A (PKA). La sous-unité catalytique de PKA entre dans le noyau et phosphoryle des protéines nucléaires spécifiques. L'AMPc active également EPAC (Exchange Proteins directly Activated by AMPc) et par conséquent la petite protéine G, Rap1. La cascade de l'AMPc est aussi contrôlée par de nombreux rétro-contrôles négatifs, parmi lesquels les phosphodiesterases qui hydrolysent l'AMPc en ATP, induisant ainsi l'arrêt du signal.

#### Cascade des inositols phosphates (IP)

L'activation de la cascade des IP induit également la prolifération mais inhibe l'expression de la différenciation des thyrocytes. Celle-ci est activée des agents comme le carbachol ou la TSH qui nécessite cependant une concentration 10 fois plus élevée que pour l'activation de la cascade de l'AMPc. (Laurent E et al ;1987)

L'interaction du ligand avec son récepteur provoque la stimulation de la phospholipase C (PLC) par l'intermédiaire de la sous-unité  $\alpha$  de la protéine G<sub>q</sub> (G<sub>aq</sub>) catalysant le remplacement du GDP par du GTP. La PLC hydrolyse le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP<sub>2</sub>) situé dans la membrane plasmique, en inositol 1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>) et en diacylglycérol (DAG). L'IP<sub>3</sub> peut alors se lier à un récepteur spécifique du réticulum endoplasmique et entraîner la libération de Ca<sup>2+</sup>. Le DAG active la protéine kinase C (PKC) qui à son tour va phosphoryler spécifiquement des protéines en aval. La PKC peut également être activée directement par les esters de phorbol et les analogues du diacylglycérol.

#### Cascade MAPK

La cascade des MAPK est généralement exprimée dans tous les types cellulaires et induit la prolifération, l'apoptose, la survie, la migration et le développement. Dans les thyrocytes, la

cascade des MAPK (ERK1/2) est activée par les facteurs de croissance comme l'EGF et l'HGF, et son activation induit la prolifération et inhibe l'expression de la différenciation des thyrocytes. Comme dans le cas de la TSH, la combinaison d'insuline ou d'IGF-1 et d'EGF est requise pour un effet mitogène. L'HGF, par contre, ne requiert pas d'insuline ou d'IGF-1 pour exercer son effet mitogène. Les thyrocytes stimulés avec de l'EGF présentent une morphologie fusiforme, similaire à des fibroblastes. (Vandeput F et al ; 2003)

La liaison d'un facteur de croissance à son récepteur conduit à la dimérisation puis à l'autophosphorylation de résidus tyrosine du récepteur et ensuite au recrutement de protéines adaptatrices. Ce complexe active la protéine Ras (en catalysant le remplacement du GDP par du GTP) qui recrute à son tour la sérine thréonine kinase Raf (ou MAPKKK) près de la membrane. Raf phosphoryle les MAPKK (ou MEK) qui phosphorylent à leur tour les MAPK (ERK1/2) qui migrent dans le noyau pour activer des facteurs de transcription spécifiques comme Elk-1, c-Jun et ATF-2.

Trois sous-familles de protéines MAPK ont été caractérisées chez les vertébrés (Raman M et al ; 2007):

- les protéines ERK (Extracellular signal-Regulated Kinases), qui sont phosphorylées par MEK1 et MEK2 sur la séquence Thr-Glu-Tyr. Elles sont activées par les facteurs de croissance, le sérum, les phorbol esters et cytokines.
- les protéines JNK (Jun N-terminal Kinases) (JNK1/2), qui sont phosphorylées par MEK4 et MEK7 sur la séquence Thr-Pro-Tyr. Elles sont activées par les cytokines et l'exposition à un stress environnemental comme les radiations ionisantes, le stress oxydatif et le dommage à l'ADN.
- les protéines p38 qui sont phosphorylées par MEK3, MEK6 et MEK7 sur la séquence Thr-Gly-Tyr. Elles sont activées par l'exposition à un stress cellulaire comme la radiation aux UV, le choc osmotique, l'hypoxie et les cytokines.

#### Cascade des PI3K/Akt

Les facteurs de croissance à récepteurs tyrosines kinases stimulent cette cascade en activant la PI3K directement ou via RAS.

La PI3K activée convertit le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP2) situé dans la membrane plasmique, en phosphatidylinositol 4,5-triphosphate (PIP3). PIP3 recrute et active la PDK1 (phosphatidylinositol-dépendent kinase 1). PDK1 phosphoryle et active la protéine kinase B (PKB ou Akt) qui, à son tour phosphoryle différents substrats. La phosphatase (PTEN (tumor-suppressor phosphatase with tensin homology), un suppresseur de tumeur, régule négativement la cascade PI3K en déphosphorylant PIP3 en PIP2.

#### Conclusion

Les cascades de l'AMPC, des MAPK et PI3K induisent la prolifération des thyrocytes. Toute mutation dans une de ces cascades peut donc avoir comme conséquence une prolifération anormale des thyrocytes et entraîner la tumorigénèse.

## **I.7. Tumeurs malignes Epithéliales :**

### **I.7.1. Classification des cancers thyroïdiens :**

la classification des tumeurs malignes de la thyroïde repose essentiellement sur la classification OMS ( Annexe A ; le tableau OMS) établie en 1986 et en 2004 par OMS) ( Dellelis Ra LR et al 2004)

Selon l’OMS, Tumeur maligne épithéliales se distinguent en différenciés et peu différenciés et indifférenciés. Les tumeurs non épithéliales ou dites mésenchymateuse sont les lymphomes et les sarcomes.

### **I.7.2. Facteurs de risques :**

Plusieurs facteurs augmenteraient le risque de survenue de cancers on note :

L’exposition aux rayons ionisants notamment chez les enfants surtout avants l’âge de 15ans, une irradiation de la région cervical supérieur a 100mGy augmenterait le taux de cancers Radio-induits tels que le cancer papillaire. L’influence des facteurs environnementaux comme par exemple les facteurs hormonaux et reproductifs chez la femme reste débattues. L’iode (I131) et sa charge dans l’alimentation pourrait avoir un impact sur la distribution des variétés histologiques ; une carence en iode semble favoriser la survenue de cancers folliculaires (vésiculaires) tandis que les cancers papillaires sont plus fréquents dans les régions a régime alimentaire richement iodés (I131) (Leux C ;2012). L’hérédité et les antécédents familiaux jouent un rôle dans la formation des cancers thyroïdiens, 5% des cancers papillaires surviennent chez plusieurs membres d’une même famille, ( Wemeau JI ; 2010)

Les événements oncogéniques et les facteurs génétiques favorisent la survenue de cancers thyroïdiens, les gènes qui sont concernés qui sont en cours d’études sont généralement impliqués dans : la régulation du cycle cellulaire, les voies de signalisations kinase dépendante, les voies de réparation de L’ADN, le métabolisme des Hormones thyroïdiennes . Le gène APC et certains réarrangements somatiques du gène RET (rearranged –during-transfection) favorisent les cancers papillaires alors que les mutations germinales du même gène constituent les tumeurs endocriniennes multiples dont le cancers médullaire thyroïdiens. ( Wemeau JI ; 2010)

Des produits chimiques de l’environnement peuvent favoriser les processus néoplasiques au niveau de la thyroïde par l’intermédiaire d’une perturbation du fonctionnement de la glande thyroïde. Ces perturbations peuvent s’exercer au niveau de l’axe hypothalamo-hypophysaire, en interférant avec la production ou la libération de la thyrostimuline (TSH) ; au niveau de la thyroïde en perturbant la synthèse ou la libération des hormones thyroïdiennes (T3 et T4) ; ou encore à un niveau périphérique en perturbant le transport, l’action et/ou le catabolisme des hormones thyroïdiennes.(Leux C ; 2012)

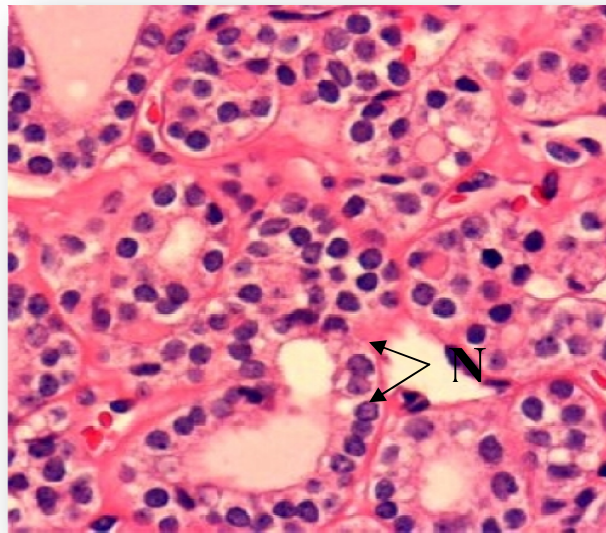


### I.7.3. Carcinomes vésiculaires (Folliculaires), CV :

Ces tumeurs proviennent des cellules vésiculaires, elles représentent 10 à 20% des carcinomes thyroïdiens. Ces tumeurs touchent toutes les tranches d'âge mais plus particulièrement les 50 à 60 ans (Riesco-Eizaguirre G;2007).

La survenue de CV est essentiellement liée à une carence alimentaire en iode en association avec des facteurs génétiques. Le rôle de l'iode est expliqué par la stimulation cellulaire induite par augmentation de la TSH dans les situations de carence. Les radiations ionisantes sont moins impliquées dans les CV. Les métastases à distance siègent dans les poumons et les os (Schlumberger M ; 2007).

L'architecture du CV ressemble à celle d'un adénome ; les cellules sont proches des cellules normales, elles sont cubiques avec un cytoplasme abondant, faiblement éosinophiles, le noyau est petit ou légèrement augmenté de taille, rond, à contours réguliers (Borda N et al ; 2010) (Davanzo et Al ; 2004)). La chromatine est régulièrement répartie en poussière dans les noyaux, leur donnant un aspect laqué (Caillou ; 1998) (Figure 6).



**Figure 6: CV : Hématoxyline & Eosine (H&E) G: X200, (Gheriani H, 2006)**

→ N : noyaux

#### ***Les critères de malignité sont :***

- l'invasion vasculaire qui est une colonisation de la lumière d'un vaisseau par extension directe à travers sa paroi ou présence de matériel tumoral dans ce vaisseau.
- l'invasion capsulaire qui est la pénétration des cellules tumorales dans toute l'épaisseur de la capsule du nodule tumoral (Ramzi et al ; 2000).



**Immunohistochimie :**

Les marqueurs utilisés pour affirmer l'origine thyroïdienne d'une localisation métastatique et pour confirmer le diagnostic d'une tumeur métastatique sont la thyroglobuline TG et le TTF-1. L'anticorps dirigé contre la thyroglobuline TG est positif dans l'ensemble des lésions thyroïdiennes vésiculaires bénignes et malignes et l'est très fortement dans le carcinome vésiculaire (Vielh et al 2006).

Le facteur de transcription thyroïdienne TTF-1, facteur de transcription nucléaire dans la thyroïde est le premier facteur exprimé dans les cellules folliculaires (Lazarro et al ; 1991) mais aussi dans les cellules C. Il contrôle l'expression de la TG, de la TPO et du récepteur TSH (TSHR) ainsi que la désiodase ( Greben et al ,1997)(Francis lang et al ;1992).

Les marqueurs de malignité HBME-1, galectine3 et CK19 (Cytokératine) sont aussi utilisés. D'autres marqueurs plus spécifiques du CV mais sont peu utilisés en raison de leurs résultats divergents ; l'anti – PPAR $\gamma$  qui met en évidence l'expression de la protéine PPAR $\gamma$  responsable du réarrangement Pax8/ PPAR $\gamma$ . (Nikiforov Mn et al ; 2009).

D'autres marqueurs de cellules endothéliales sont utilisés pour affirmer la position intra vasculaire des foyers tumoraux tels que le CD31 et CD34. Pour différencier les embolies veineuses des embolies lymphatiques, on utilise l'anticorps D2-40 (Lin X et al, 2010) qui est exprimé par les cellules des vaisseaux lymphatiques.

**Evolution tumorale et métastase :** la croissance du CV se fait par rupture de la capsule et extension au sein de la glande. Cette extension est hautement agressive. La dissémination du CV se fait par voie veineuse avec des sites de métastases préférentiels, le poumon et les os (Lin X et al, 2010).

**Variantes du carcinome vésiculaire :**

- Variante oncocytaire (à cellules de Hürthle)
- Variante à cellules claires

**Altérations moléculaires :**

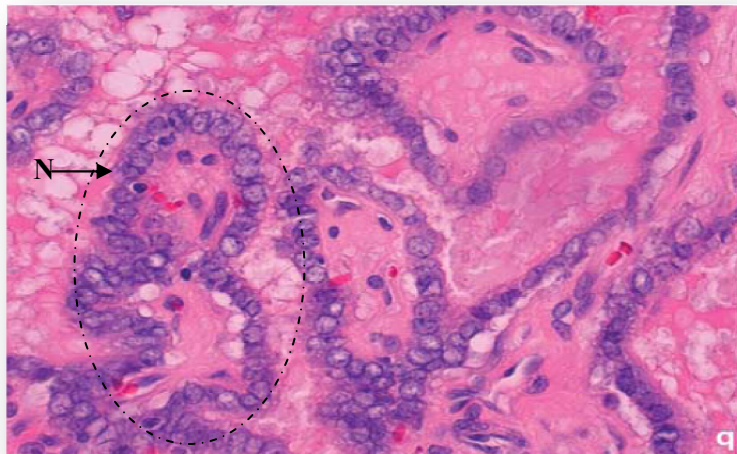
Les carcinomes folliculaires sont principalement caractérisés par des mutations RAS, intéressant les codons 12,13, 61 et correspondant aux trois gènes humains ; N-RAS, H-RAS, K-RAS. Ces mutations entraînent une activation de la voie MAP Kinase (Mitogène-Activated-Protein-Kinase). Dans sa forme inactive, la protéine RAS est liée au Guanosine-Di-Phosphate (GDP) ; après l'activation, la protéine RAS se dissocie de la GDP et se lie au GTP (Guanosine-tri-phosphate) activant ainsi la voie PI3K par exemple. Les mutations dans ces gènes agiraient soit : en augmentant l'affinité de la protéine RAS-GTP pour le GTP ( mutations des codons 12 et 13) ou bien en inactivant la fonction auto catalytique GTPase ( mutations du codon 61), ainsi la protéine RAS se retrouve activée de façon continue et permanente et stimulerait ainsi de façon chronique les cibles situées en aval. En pathologie

thyroïdienne, les mutations qui touchent le codon 61 sont les plus fréquentes (Hofman P ; 2011).

#### I.7.4.Carcinome papillaire (CP):

Le CP est une tumeur épithéliale représentant 85 à 90% des carcinomes thyroïdiens. Il a un bon pronostic avec un taux de survie de 80 à 90% sur 5-10 ans. Il touche toutes les tranches d'âge mais plus particulièrement les 30 à 40 ans avec prédominance féminine (Gimm O ; 2001). Plusieurs facteurs induisent le CP, il fait partie des carcinomes radio- induits dus aux radiations ionisantes ainsi que les irradiations thérapeutiques, les régimes iodés ; le cancer papillaire se répond de plus en plus dans les régions riches en iode, il survient aussi lors d'une exposition à une pathologie thyroïdienne préexistante, et pour finir les facteurs hormonaux et héréditaires.

Le CP se présente dans la majorité des cas comme un nodule solitaire Il se caractérise par l'existence de formations papillaires associées à des altérations nucléaires caractéristiques. Les cellules du CP sont cylindriques ou cubiques plus grandes que la normale avec un cytoplasme abondant pale. Les noyaux des cellules du CP sont caractéristiques (noyau en verre dépoli) (Leenhardt et al ; 2005) et représentent le seul critère de diagnostic pour ce type tumoral. Le noyau apparait ainsi volumineux, rond et vide. La clarification du noyau résulte de la dispersion de la chromatine en périphérie contre la membrane nucléaire (Borda N et al , 2010) ( Figure 7). Les papilles sont des structures ramifiées en doigt de gants, comportant un axe conjonctif centré par un vaisseau et tapissé par un revêtement uni stratifié. Le stroma fibreux est souvent abondant et on note aussi la présence de cellules géantes multi nucléées et de macrophages au sein de la lumière des vésicules tumorales (Schlumberger M ; 2007).



**Figure 7: CP : noyaux en verre dépoli H&E G : X100, (Livolsi V ; 2011)**

—→ N : noyau / - - - - - papille

**Immunohistochimie :**

Comme toute tumeur de souche folliculaire différenciée, le CP exprime la TG et le TTF-1, le marquage à l'anticorps anti-TG et au TTF-1 est indispensable pour affirmer l'origine thyroïdienne d'une localisation métastatique. Les marqueurs de malignité sont : L'HBME-1, CK19 et la galectine-3. La galectine -3 est exprimée par la plus part des CP classiques mais elle l'est moins dans la variante vésiculaire du CP (Prasad et al ; 2005). Le marquage à l'anticorps anti-Cytokératine 19 dans les CP présente une sensibilité approximative de 90% avec une spécificité allant jusqu'à 95% (Khurana et al ; 2003). L'HBME-1 est de loin le marqueur le plus spécifique car il est positif dans presque tous les CP.

**Evolution et métastase :** (Borda N et al ,2010)

Le CP se présente souvent comme une lésion infiltrante dès ces premiers stades avec une extension extra-glandulaire fréquente. Les envahissements ganglionnaires sont fréquents et retrouvés dans 50% des CP lors du diagnostic. La dissémination du cancer se fait par voie lymphatique ; les ganglions atteints sont les ganglions régionaux, les métastases par voie veineuse sont rares de 6 à 14% et se situent principalement au niveau du poumon 70% et l'os 20% (Schlumberger MJ et al ; 2003).

**Variantes du carcinome papillaire :**

- |  |                             |
|--|-----------------------------|
| ➤ Micro carcinome papillaire MCP                 | ➤ CP solide ou trabéculaire |
| ➤ Variante vésiculaire (folliculaire) CPV        | ➤ CP oncocytaire            |
| ➤ Variante à cellules hautes (tall cell variant) | ➤ CP à cellules fusiformes  |
| ➤ CP à cellules cylindriques                     | ➤ CP cribriforme            |
| ➤ CP sclérosante diffuse                         | ➤ CP à cellules géantes     |

**Altérations moléculaires :**

Pour les CP, les altérations moléculaires sont de deux types, on a soit ; le réarrangement chromosomique (RET/TRK), ou les mutations ponctuelles touchant l'oncogène spécifique BRAF et RAS. Ces deux altérations ne s'associent jamais. Elles ont un point en commun qui est l'activation de la voie MAP Kinase.

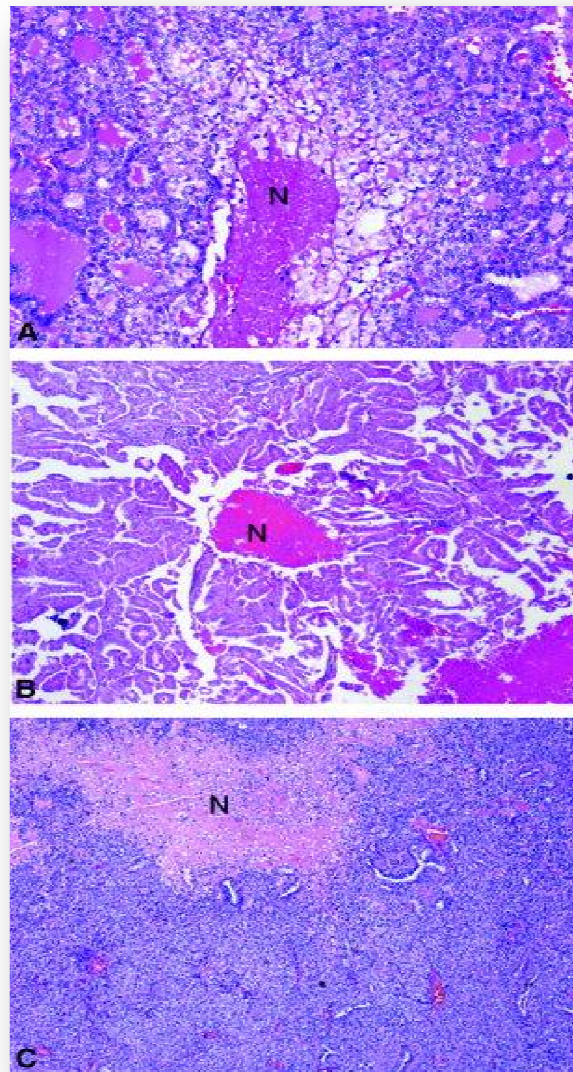
**I.7.5. Carcinome peu différencié (carcinome insulaire) CPD :**

C'est un carcinome de souche vésiculaire qui occupe une position intermédiaire entre le carcinome différencié (papillaire et vésiculaire) et le carcinome indifférencié (anaplasique). Il représente 4% des cancers thyroïdiens et touche les deux sexes de 50 à 60 ans. La taille du CPD est supérieure à celle du carcinome différencié, mesurant 3 à 5 cm et occupant la plus part du temps toute la surface du lobe. L'encapsulation est variable, l'extension extra-thyroïdienne est fréquente, les embolus veineux sont retrouvés dans 90% des cas.

Microscopiquement, le CPD présente une architecture solide à trabéculaire ; les noyaux sont dépourvus des critères du carcinome différencié. Le CPD présente trois critères importants (Borda N et al ; 2010)

- Noyaux convolutés (petits, ronds et hyper chromatiques, donc ils apparaissent plus sombres au microscope).

- Index mitotique  $> 3 \times 10\text{HPF}$
- Nécrose tumorale (Figure 8).



**Figure 8: Aspect histologique d'un carcinome thyroïdien peu différencié avec ses différents aspects /A. Variante vésiculaire avec nécrose tumorale (N), les noyaux sont sombres et ronds / B. variante papillaire avec nécrose tumorale (N)/C. Le CPD avec son aspect solide et une grande zone de nécrose (N) (Katharina Binz et al ; 2008).**

#### ***Immunohistochimie :***

L'immunomarquage est utile pour confirmer l'origine vésiculaire du CPD. Le CPD exprime le TTF-1, et les Cytokératines AE1/AE3 et la CK7.( Borda N et al ;2010)

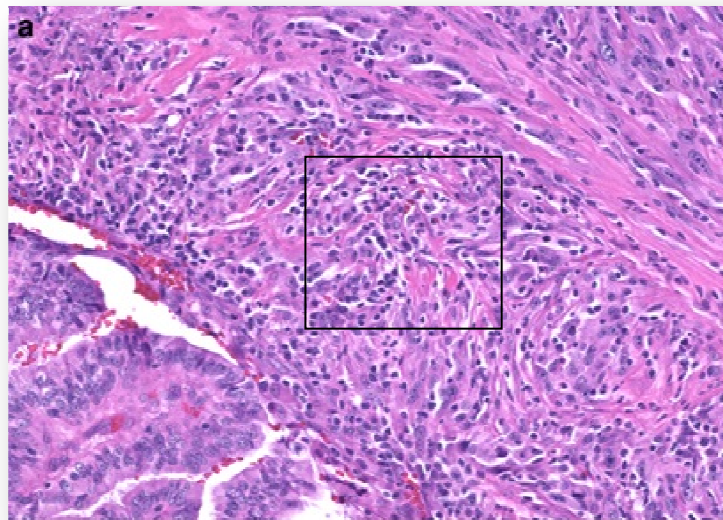
**Altérations moléculaires :**

Deux groupes de mutations interviennent dans le CPD : les mutations du carcinome différencié BRAF et RAS, et les mutations du carcinomes indifférencié TP53 et  $\beta$ -caténine.

La mutation RAS est observée dans 35% des cas le plus souvent touchant NRAS aboutissant à la formation d'un CPD associé à un carcinome vésiculaire. La mutation BRAF est observée dans 15% des cas de type V600E BRAF, dans ce cas le CPD est associé à un carcinome papillaire. La mutation TP53 est caractéristique du carcinome anaplasique et survient dans 35% des cas. Le gène TP53 code pour un facteur de transcription essentiel dans le control du cycle cellulaire. La mutation  $\beta$ -caténine, touchant le gène de la  $\beta$ -caténine CTNNB1 survient dans 25% des cas, cette protéine cytoplasmique intervient dans l'adhésion cellulaire (Borda N et al ; 2010)

**I.7.6.Carcinome anaplasique, indifférencié (CA):**

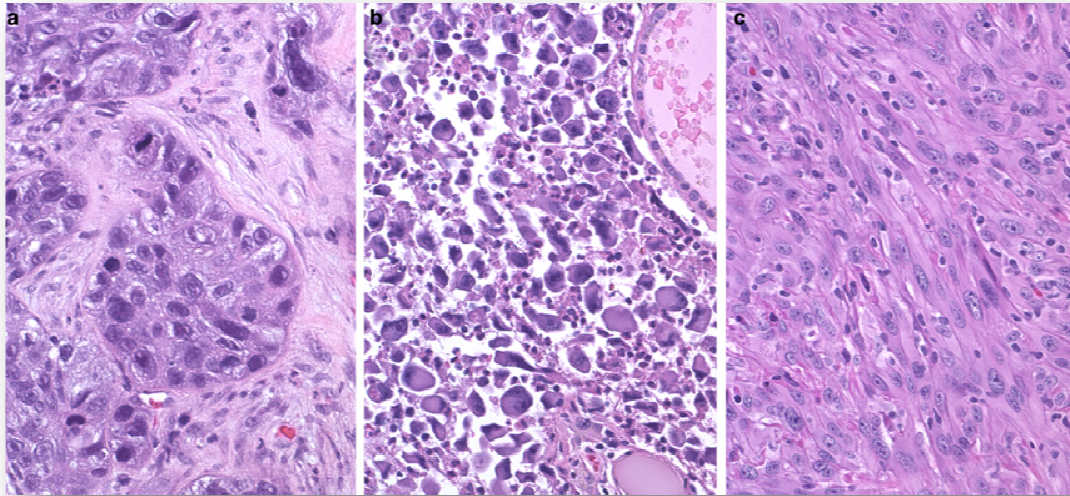
Le CA est une tumeur thyroïdienne maligne hautement agressive de souche folliculaire. Il constitue 2% de l'ensemble des cancers thyroïdiens avec une prédominance chez les sujets âgés et une incidence plus élevée dans les zones de carence iodée (Wemeau et Do cao ; 2008). Le principal facteur étiologique est une pathologie thyroïdienne préexistante. Le CA est une lésion volumineuse de malignité évidente, plus ou moins nécrosée et hémorragique. Il atteint tout le corps thyroïde ou un lobe, la limitation tumorale est pratiquement inexistante. Les métastases à distance sont plus ou moins précoces mais souvent l'évolution locale entraîne la mort par compression (Borda N et al ; 2010) (Figure 9).



**Figure 9 : Aspect microscopique d'un carcinome indifférencié (anaplasique) H&E G : x200, (Leenhardt et al ; 2005)**



Microscopiquement le CA peut être constitué de plusieurs types de cellules fusiformes, géantes ou épithélioïdes (Figure 10). Ces cellules sont généralement organisées en amas. (Leenhardt et al ; 2005)



**Figure 10 : Différents aspects du carcinome anaplasique , H&E, G : X250**

(Shahnaz Begum et al ; 2004),

CA à cellules épithélioïdes/ B. CA à cellules géantes/ C. CA à cellules fusiformes.

#### **Immunohistochimie :**

Les marqueurs épithéliaux, les marqueurs de cellules de souches vésiculaires tels que la thyroglobuline et le TTF-1 sont négatifs dans les zones des CA et positifs dans les zones de carcinomes différenciés résiduels. (Wemeau et Do Cao ; 2008).

L'expression de la P53 a été retrouvée dans 40% à 100% des cas. L'index de prolifération mesuré par l'immunomarquage anti-Ki67(MIB1) est de 50% en moyenne (Wemeau et Do Cao ; 2008).

#### **Altérations moléculaires :**

Les mutations survenant dans le CA sont (Borda N et al ; 2010) :

- Les altérations communes au CA et aux carcinomes différenciés : mutations RAS (NRAS et HRAS) dans 30% des cas, mutations BRAF dans 20% des cas.
- Altérations spécifiques observées dans le carcinome anaplasique : mutations du gène TP53 présentes dans 80% des cas. Ce gène est localisé sur le bras court du chromosome 17 codant pour un facteur de transcription et suppresseur de tumeur P53. Son activité transcriptionnelle est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose, la réparation de l'ADN, mais aussi en réponse à un grand nombre de stress

cellulaires (agent endommageant, déficit en nucléotides, activation oncogénique inappropriée).

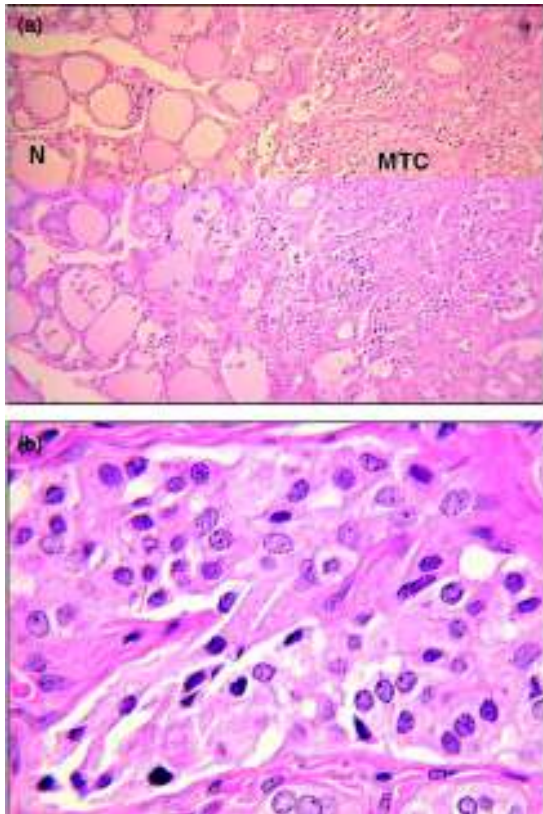
- Mutations du gène CTNNB-1 de la  $\beta$ -caténine situé sur le chromosome 3p22-21.3. Son principal rôle concerne l'adhésion intercellulaire ; les mutations touchent généralement le codon 3 du gène CTNNB-1 dans 65% des cas.
- Mutations au niveau de la voie de signalisation PIK3/PTEN/AKT dans 18-39% des cas. Cette voie de Phosphatidylinositol-3 Kinase dont l'effecteur est une sérine-thréonine-kinase AKT, PTEN est un gène suppresseur de la croissance tumorale dont le produit est un antagoniste du PIK3 car il bloque la signalisation en aval par le biais de l'AKT.

### **I.7.7.Carcinome médullaire (CM) :**

Le CM est une tumeur maligne provenant des cellules C parafolliculaires. Son incidence est de 5 à 10%, il se présente sous forme sporadique (65% des cas) par mutations somatiques acquises, ou sous forme héréditaire (30 à 35% des cas). Il présente une légère prédominance féminine. Les cellules C naissent de la crête neurale et migrent pour ensuite s'incorporer dans le corps thyroïde. (Wemeau et Do Cao ; 2008)( Leenhardt et al ; 2005)

La tumeur est de taille variable, mesurant 2 à 3cm en moyenne, souvent bien limitée à contours arrondis mais n'est pas entourée d'une capsule nette.

Microscopiquement, le CM est caractérisé par un grand polymorphisme cytologique et architectural, ce qui est responsable d'un nombre élevé de variante. L'architecture est solide, lobulaire (insulaire) ou trabéculaire. Les cellules sont de taille variable (9 à 16  $\mu$ m), ronde, polygonale, fusiforme ou ovale. Le cytoplasme est faiblement éosinophile, abondant et pale. Le noyau est arrondi ou ovalaire, avec une chromatine poussiéreuse, les mitoses sont rares ou absentes (<1 mitose sur 10 champs au fort grossissement). Les calcifications sont nombreuses mais la nécrose et les remaniements hémorragiques sont peu fréquents (Figure 11). (Borda N et al ;2010)



a : MTC: carcinome médullaire thyroïdien; N: tissu thyroïdien normal

b :MTC avec des cellules tumorales polygonales disposées dans des plaques solides dans un stroma fibreux

**Figure 11: Aspect histologique d'un carcinome médullaire, a : G : X160, b : G : X1000 H&E (D Zenaty et al ; 2009)**

Contrairement au CP, la limitation du CM est souvent assez nette, la tumeur dispose de contours bien arrondis, mais malgré leurs bonnes limitations, les CM peuvent émettre des massifs tumoraux et des embolies à distance du foyer primitif.

L'évolution tumorale est dominée par l'extension extra-thyroïdienne et l'envahissement ganglionnaire.

***Altérations moléculaires*** (Sheikh HA et al ; 2004):

Les CM héréditaires sont dus à une mutation germinale du proto-oncogène RET qui code pour un récepteur membranaire à activité tyrosine kinase. Ce gène qui possède 21 exons est localisé dans la partie péri-centromérique du chromosome 10 (10q12.2) ; cette mutation est responsable de la néoplasie endocrinienne multiple (NEM) de type 2.

Les CM sporadiques sont touchés par les mutations somatiques de RET et ont été observés dans 30 à 66% des cas de CM ; ces mutations consistent en le remplacement d'une méthionine au codon 918 (Met918Thr). (Borda N et al ;2010)



**Immunohistochimie :**

Les cellules C expriment les marqueurs neuroendocriniens : Chromogranine A, Synaptophysine et la calcitonine. Elles expriment aussi l'antigène carcino-embryonnaire ACE et le TTF-1. L'ACE permet le suivi des carcinomes : une élévation du taux d'ACE est associée à une agressivité de la tumeur et à l'apparition de métastases (Martinez et al ; 2000).

**Variantes du CM :**

- Microcarcinome médullaire
- Variante à cellules fusiformes
- Variante à cellules géantes.

**I.8. Les voies et mécanismes de dissémination métastatique :**

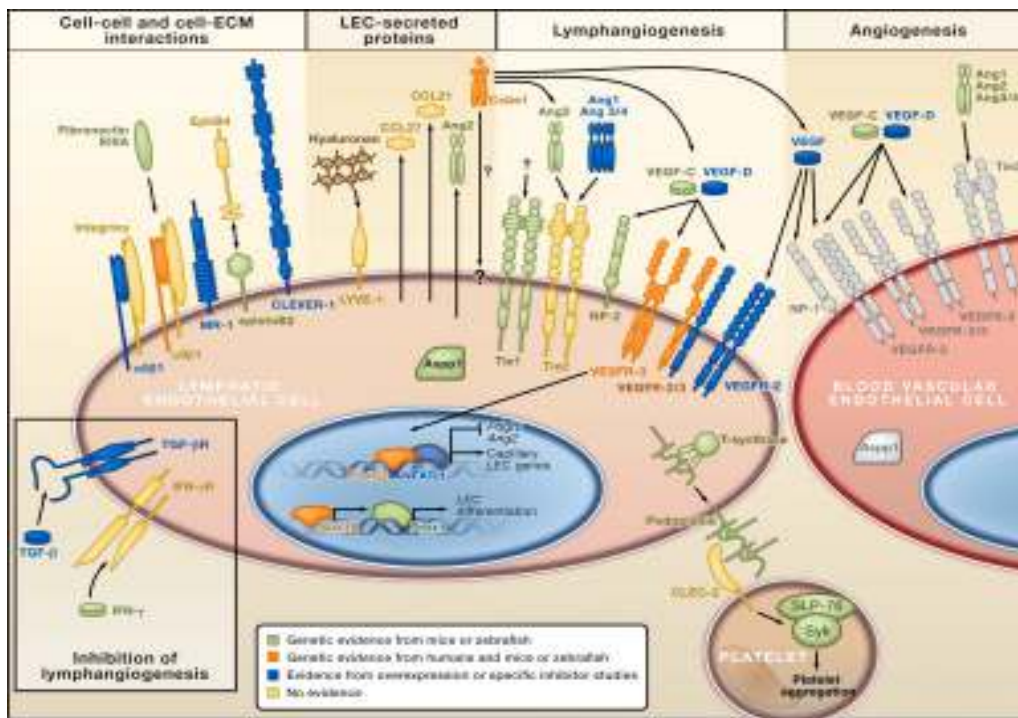
La dissémination des cellules cancéreuses dans les organes cibles est responsable de la mort dans la plupart des cancers et emprunte différentes voies dont l'invasion locale des tissus, la voie des vaisseaux sanguins et celle des vaisseaux lymphatiques. La dissémination métastatique s'effectue soit par les vaisseaux lymphatiques préexistants, soit par la formation de néocapillaires lymphatiques ou lymphangiogenèse. Certains cancers, comme ceux du sein, de la thyroïde, du poumon, de la peau, des testicules, du col de l'utérus, ainsi que les tumeurs gastriques, ont un mode de dissémination métastatique qui s'effectue préférentiellement par l'intermédiaire des vaisseaux lymphatiques.

L'invasion par les cellules tumorales du ganglion satellite proximal de la tumeur représente souvent la première étape de la formation de métastases (Wissmann C et al ; 2006). Ceci résulte de plusieurs caractéristiques structurales de l'endothélium des capillaires lymphatiques qui favorisent le processus. En effet, les capillaires lymphatiques sont dépourvus de lame basale ainsi que de jonctions serrées. Ils présentent des jonctions intercellulaires beaucoup plus lâches que l'endothélium sanguin, facilitant ainsi le passage des cellules tumorales à l'intérieur du vaisseau. De plus, le flux à l'intérieur des vaisseaux lymphatiques est significativement plus faible que celui du système sanguin et la différence de pression en résultant pourrait favoriser la pénétration à l'intérieur du réseau lymphatique.

Si de nombreuses études ont permis de mieux préciser les mécanismes contrôlant l'angiogenèse tumorale, les facteurs régulant la lymphangiogenèse restent encore mal connus. Parmi les facteurs impliqués dans la lymphangiogenèse ( Figure 12 ), la famille des VEGF principalement reconnue comme puissant mitogène des cellules endothéliales: les VEGFC et VEGFD, le VEGFR3 ( récepteur à activité tyrosine kinase). Le *fibroblast growth factor 2* (FGF2) induit également la lymphangiogenèse, PROX1 est un facteur de transcription impliqué dans la croissance et l'élongation des bourgeons lymphatiques au cours de l'embryogenèse. Son expression persiste sur les vaisseaux lymphatiques adultes. LYVE1 est distribuée également sur la surface luminale et abluminale des vaisseaux lymphatiques. La

podoplanine, glycoprotéine membranaire découverte sur les podocytes rénaux. Elle est surtout présente sur les petits vaisseaux lymphatiques. (Tuomas Tammela and Kari Alitalo ; 2010).

L'angiogénèse est la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir du réseau vasculaire préexistant, elle assure la prolifération et le développement de la tumeur (apport en oxygène et en nutriments proportionnels et élimination des déchets du métabolisme (Shchors K et al ; 2007). Parmi les facteurs angiogéniques on a : le facteur de croissance endothélial vasculaire A (VEGF-A), le facteur de croissance des fibroblastes-2 (FGF-2), le facteur de croissance TGF-a, TGF-b, les facteurs de croissance des hépatocytes, le facteur de nécrose tumorale (TNF), et l'interleukine 8. (Shchors K et al ; 2007)



**Figure 12 : les différentes molécules impliqués dans la lymphangiogénèse,**  
(Tuomas Tammela1 and Kari Alitalo ; 2010)

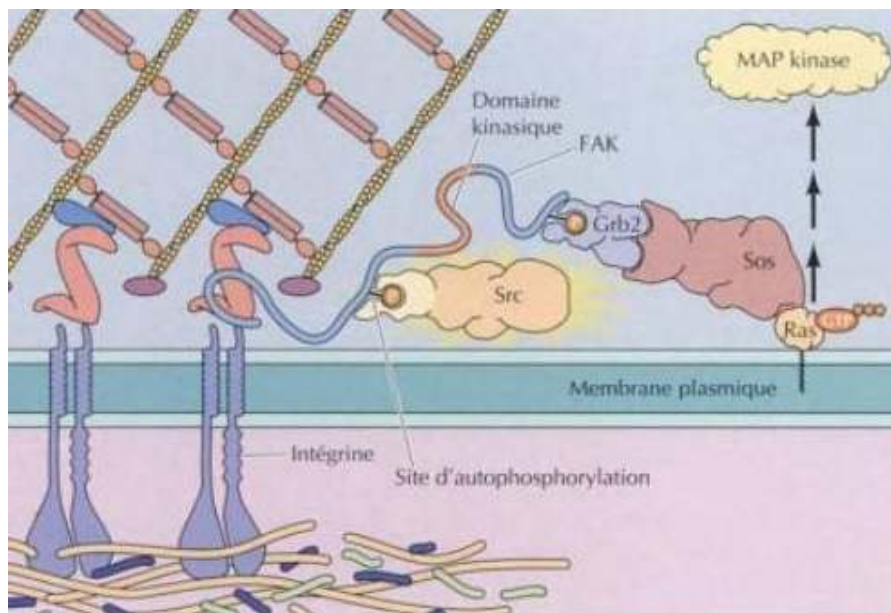
Dans la circulation (hématogène ou lymphatique), les cellules tumorales ne prolifèrent pas. Pour résister aux agressions mécaniques (pression sanguine) et à la lyse par les cellules du système immunitaire, les cellules tumorales ont tendance à s'agréger. Ces agrégats constituent les embolus néoplasiques.

Invasion cellulaire, la migration et la prolifération ne dépendent pas exclusivement des facteurs angio-lymphangiogéniques, les facteurs de croissance et leurs récepteurs sont également médiés par les molécules d'adhésion cellulaire. Afin d'initier le processus, les cellules endothéliales devraient dissocier les cellules environnantes avant de pouvoir envahir les tissus adjacents. Pendant toute la durée de l'invasion et de migration, l'interaction des cellules endothéliales avec la matrice extracellulaire est médiée par L'Intégrine. Dans la

néovascularisation, des molécules d'adhésion cellulaire sont impliqués, tels que: les sélectines, les immunoglobulines, superantigens, cadhérines et intégrines (Piccioli A et al ; 1996)

La focal adhesion kinase (Fak) fait partie de la famille des kinases de l'adhérence focale, qui sont des protéines riche en prolines. C'est une protéine ubiquitaire, se trouve dans le cytoplasme des cellules au niveau du complexe d'adhérence, situé près des intégrines (Figure 13). Le gène codant cette protéine se situe sur le chromosome 8. Son poids est de 125 .Elle possède trois domaines : amino-terminal, central qui porte l'activité catalytique , carboxy-terminal riche en proline possède une région que l'on nomme FAT pour Focal Adhesion Targeting.( Thomas Parsons J ; et al ; 2008)

Fak est activée par les intégrines de la membrane plasmique, par des facteurs de croissance ou par des hormones. FAK ne possède pas de récepteurs membranaires son activité dépend du facteur qui l'active, chaque facteur interagit avec l'un de ces trois domaines, intégrines active le domaine carboxy-terminal de Fak , facteurs de croissance, activent le domaine amino-terminal.



**Figure 13 : La focal adhesion kinase (Fak)**( Geoffrey M. Cooper ; 1997)

À cause de son rôle dans la migration et la prolifération cellulaire, FAK pourrait jouer un rôle dans le développement de cancer. On sait que cette protéine est particulièrement augmentée dans des cancers du sein, de la prostate, du côlon, de la glande thyroïde, du mésenchyme et des ovaires. On soupçonne aussi FAK de participer à la formation de métastases par la migration cellulaire. Certains facteurs de croissance, comme l'EGF (epidermal growth factor), peuvent stimuler la déphosphorylation de FAK au lieu de l'activer. Cette désactivation occasionnerait une perte de l'adhérence et une augmentation de la migration cellulaire. En bref, l'EGF (*epidermal growth factor*), en déphosphorylant FAK, favoriserait l'invasion tumorale. (Thomas Parsons J ; et al ; 2008)

## I. 9. PODOPLANINE (D2-40)

Dans la dernière décennie, de nombreuses données ont été générées concernant les mécanismes moléculaires de la lymphangiogenèse et son importance dans des conditions pathologiques. Cela était principalement en raison de la découverte des marqueurs spécifiques des cellules endothéliales lymphatiques (LEC) tels que le facteur de croissance endothéliale vasculaire récepteur-3 (VEGFR-3), LYVE-1, Prox-1 et Podoplanine.

De récents marqueurs des vaisseaux lymphatiques ont été élaborés parmi eux : le D2-40. Il s'agit d'un Anticorps monoclonal, récemment découvert et définit comme étant le marqueur le plus sensible et le spécifique pour l'endothélium des vaisseaux lymphatiques, utile non seulement pour la détection des vaisseaux lymphatiques, mais aussi pour démontrer les invasions lympho-vasculaires.

### *Rappels sur le D2-40 :*

L'AC monoclonal D2-40 (isotype IgG1, Kappa des souris) réagit à l'origine avec les sialoglycoprotéines O-liés, parmi eux, la glycoprotéine Podoplanine membranaire appelée aussi gp36, Aggrus, T1A-2. C'est un marqueur établi pour les vaisseaux lymphatiques dans différents types de tumeurs primitives et est également exprimé dans une variété de cellules normales y compris les cellules dendritiques folliculaires (CDF) (Hiroaki Yokomori et al ;2010) (Marsee DK et al ;2009).

Cet anticorps reconnaît aussi l'antigène M2A oncofoetal, qui est une sialoglycoprotéine O-lié, de 40Kda, exprimée sur la membrane des cellules de l'endothélium lymphatique, des gonocytes fœtaux, et certaines lignées de cellules germinales. La réaction D2-40/M2A est un marqueur utile pour les cellules d'origine mésothéliale (Larisa V Debelenko et al ; 2005).

La Podoplanine, appartient à la famille des glycoprotéines type transmembranaires-sialomucine-like. L'expression de la Podoplanine est induite et régulée par le gène Prox-1, elle se compose de 162 acides aminés, avec un domaine extracellulaire riche en sérine -thréonine, et un seul résidu transmembranaire, et une courte queue cytoplasmique, avec des sites pour les protéines kinase C et de la phosphorylation de l'AMPc (Marius Raica et al ; 2008).

### *Fonctions de Podoplanine dans les conditions normales :*

Bien qu'elle soit spécifique aux endothéliums vasculaires lymphatiques (LV), la Podoplanine est exprimée dans une grande variété de cellules normales et tumorales La Podoplanine joue un rôle important dans l'adhérence cellulaire et est impliquée dans le maintien de la perméabilité glomérulaire, étant donné qu'elle est aussi présente à la base sur la membrane des podocytes (Breiteneder-Geleff S et al ; 1997). En outre, la Podoplanine est impliquée dans la forme vasculaire lymphatique et n'intervient pas dans la forme des vaisseaux sanguins (Harvey N et al ; 2003).

Le segment PLAG (platelet aggregation-stimulating domaine) du domaine extracellulaire, est important pour l'activité de la Podoplanine. La Podoplanine possède une structure disialyl-

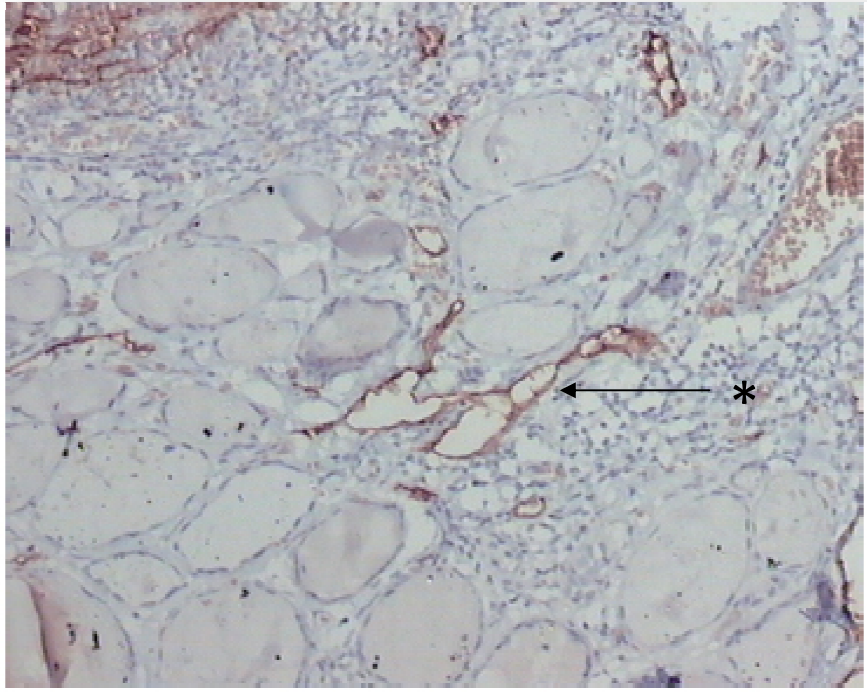
core1 dans son domaine PLAG, qui est nécessaire à la liaison de la Podoplanine à son récepteur particulier : le récepteur lectine type 2 CLEC-2 (C-type lectin receptor *CLEC-2*) a été identifié comme récepteur de Podoplanine sur les plaquettes ( Figure 12) ( Katsue Suzuki-Inoue et al ; 2007), ce segment intervient dans l'agrégation plaquettaire, lors d'une lésion vasculaire. (Kato Y et al ; 2003). In Vitro, chez les souris Knock-out avec un déficit dans la Podoplanine, des défauts lymphatiques sont apparus ; en effet le transport lymphatique a diminué, avec présence de lymphœdème congénital et dilatation des vaisseaux lymphatiques (Breiteneder-Geleff S et al ,1999).

#### ***Détection immunohistochimique :***

La liaison antigène/anticorps Podoplanine/D2-40 a été utilisée dans de nombreuses études pour évaluer la densité des micro vaisseaux lymphatiques : densité micro vasculaire (LVMD) dans le domaine péri tumoral et en intra tumorale, et de corrélérer LVMD avec le statut ganglionnaire et pronostique. La présence et la surexpression de la glycoprotéine Podoplanine augmente significativement la détection des invasions lympho-vasculaires dans différents types de tumeurs malignes. Le marquage Podoplanin/D2-40 est utile non seulement à évaluer la densité des vaisseaux lymphatiques , mais aussi pour démontrer l'invasion lympho-vasculaire, qui a une valeur pronostique importante et exprime un risque élevé de métastases ganglionnaires. (Lei Gong et al ; 2012)

L'expression de la Podoplanine a été trouvée dans les cellules tumorales de différents types du cancer, telles que les tumeurs vasculaires, et les tumeurs malignes primitives. Cette expression dans des cellules tumorales est utile pour le diagnostic pathologique et la Podoplanine semble être exprimée par les tumeurs agressives, avec invasion et à potentiel métastatique. Il a été démontré que l'invasion lympho-vasculaire a été détectée dans 13,8 à 16% des cas de cancer du sein invasif sur des lames colorées à l'HE.

L'immunomarquage D2-40 /Podoplanine, a permis la détection de 28,5% de cas dans la même série. En outre, l'invasion lympho-vasculaire identifiée par l'AC D2-40 est en corrélation avec les métastases ganglionnaires. (Braun M et al ; 2007).

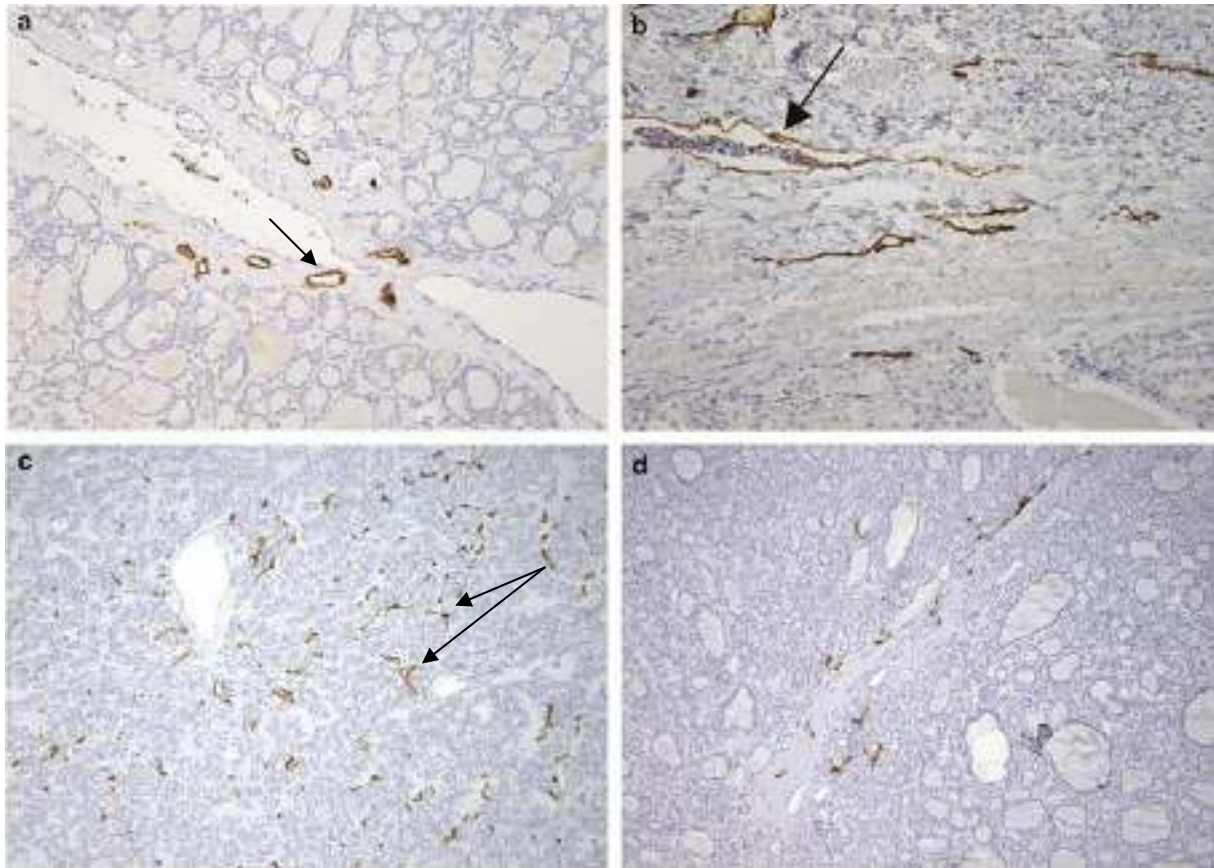


**Figure 14: Expression du D2-40 dans le carcinome papillaire thyroïdien. G X100 (Lei Gong et al ; 2012)**

—→ \* Expression du D2-40 en coloration brun foncé

En pathologie thyroïdienne, le D2-40 joue un rôle clé dans la détection des endothéliums vasculaires lymphatiques dans les lésions tumorales malignes. La plupart des invasions sont lymphatiques responsables de métastases ganglionnaires. Cependant, certaines variantes des carcinomes thyroïdiens comme le carcinome vésiculaire, choisissent préférentiellement l'extension hématogène de ce fait le marquage au D2-40 devient de faible affinité. CD31 et CD34 sont plus utiles dans ce cas.





**Figure 15 : Les vaisseaux Lymphatiques et les vaisseaux sanguins dans les lésions folliculaires (vésiculaires) de la thyroïde(a-u),( Tamar A Giorgadze et al ;2005)**

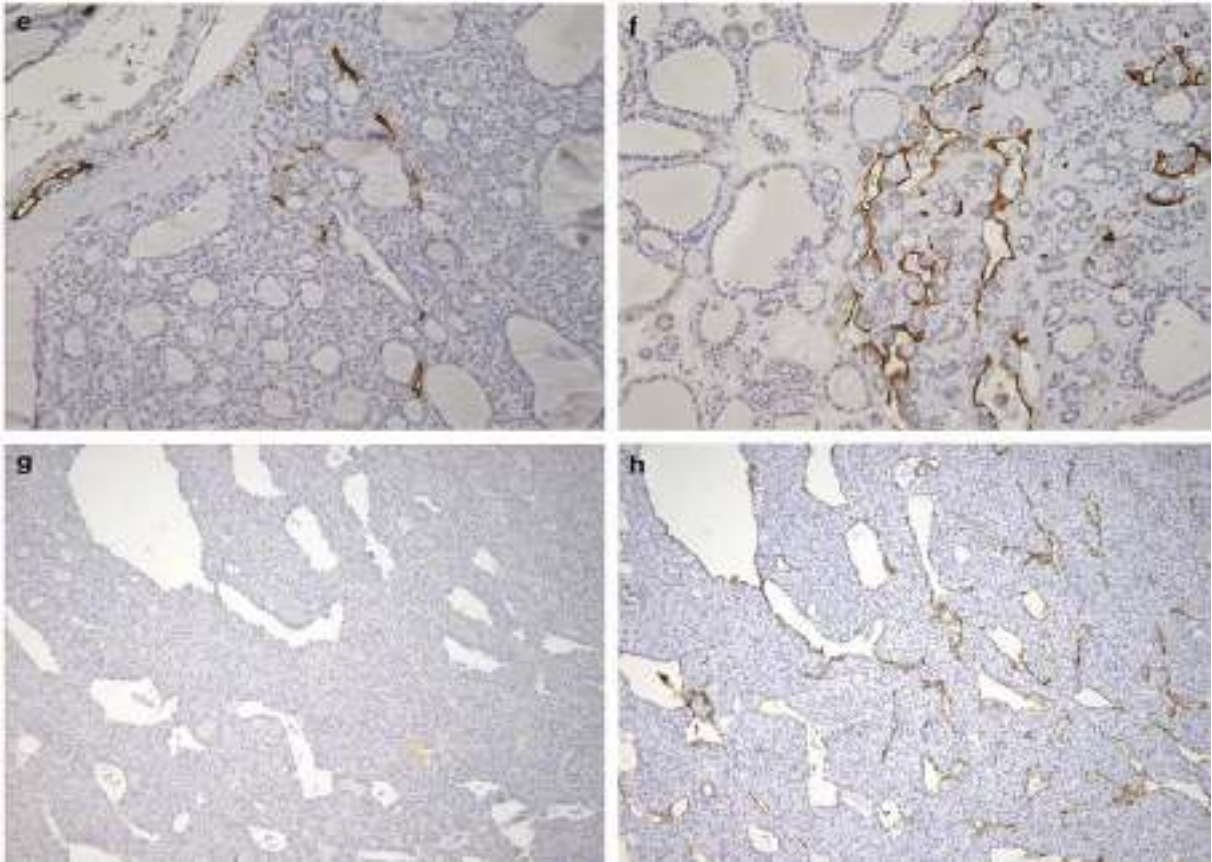
a- les vaisseaux lymphatiques intra-tumoraux D2-40-positifs avec lumina ( lumière du vaisseau) ouverte et replié; noter l'absence de coloration dans les vaisseaux sanguins adjacents.

b- immunomarquage via D2-40 d'un tissu thyroïdien sains montrant les vaisseaux lymphatiques péri-tumoraux contenant des lymphocytes (flèche).

(c-e) immunomarquage via D2-40 dans la variante folliculaire du carcinome papillaire mettant en évidence :

c- les vaisseaux lymphatiques de forme irrégulière et petits entre les cellules tumorales.

d- dans les septas intratumoraux .



e- à proximité de la capsule de la tumeur et dans la capsule tumorale

f- De nombreux vaisseaux lymphatiques morphologiquement anormaux mis en évidence par D2-40 dans le domaine de la propagation intra glandulaire de la variante folliculaire du carcinome papillaire de la thyroïde; notes l'absence de vaisseaux lymphatiques dans le parenchyme thyroïdien adjacent.

g-coupe du carcinome folliculaire démontrant l'absence de marquage via D2-40.

h- la même zone d'un carcinome folliculaire comme en (g), De nombreux vaisseaux sanguins mis en évidence par marquage au CD31.



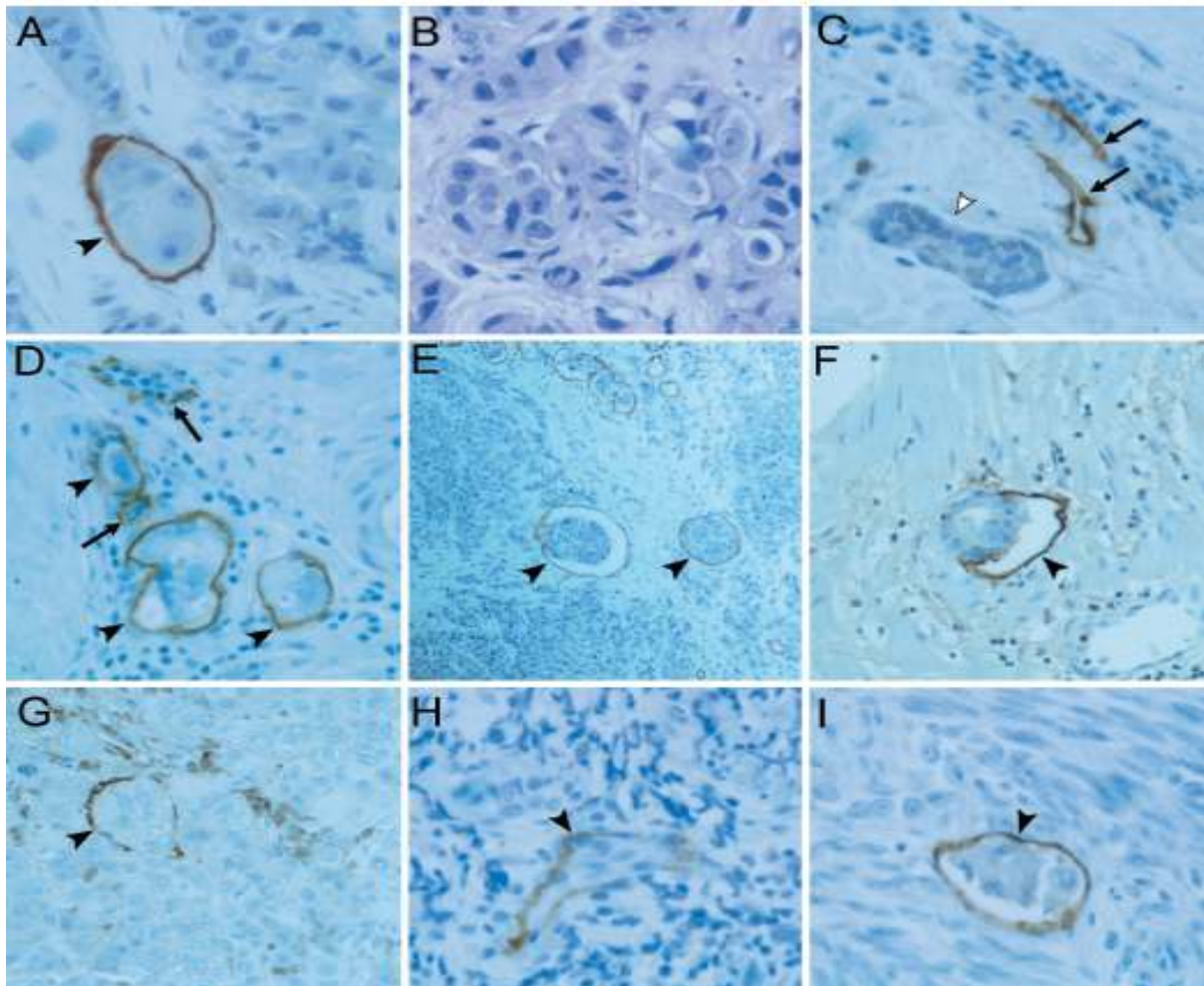


Figure 16 : Expression du D2-40 dans les tumeurs primaires (A, C à I) et coloration a l'hématoxyline et éosine (B). G : A, B, D, F, G à I X300; C X200; EX100.  
(Harriette J. et al ; 2002)

Cancers du sein (A à C) ; cancer du colon (D) cancers du cuir chevelu (E); prostate (F), la peau , mélanome(G); col de l'utérus (H); endomètre (I). Immunomarquage positif de l'endothélium lymphatique avec D2-40 décrivant les embolies dans la lumière des vaisseaux lymphatiques(A, D, E, G à I) ou entraînant l'envahissement de la paroi du vaisseau (F) est indiqué par des flèches. Absence de marquage immunologique avec D2-40 dans le vaisseau sanguin indiqué par la flèche(C) .

## **II.1. Matériels**

### **II.1.1 Population d'étude :**

Cette étude de six mois a été réalisée dans le service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques de l'EHS de Douera. Elle a porté sur une série de 61 patients atteints de cancers thyroïdiens, parmi eux 57 carcinomes papillaires, un cas de carcinome anaplasique, deux cas de carcinome peu différencié et un cas de carcinome médullaire (micro-carcinome). Ces patients ont été diagnostiqués au cours de l'année 2011 et 2012 au sein dudit service.

Les données concernant l'âge des patients et le stade clinique ont été recueillies à partir des fiches de demande d'examen anatomo-pathologique. Ces fiches ont été également revues pour qu'il n'y ait pas de répétition lors du décompte des patients.

Tout le matériel, biologique et non biologique nécessaire pour la réalisation des techniques d'immunohistochimie et de la coloration avec l' Hématéine Eosine (HE) nous a été aimablement fournit par le personnel du service d'Anatomie Pathologique. L'évaluation des lames et les prises de photos ont été faites au niveau du même service.

Sur l'ensemble des patients, 23cas de carcinomes papillaires ont été choisis incluant ses différentes variantes et seront utilisés pour la technique d'immunohistochimie afin d'évaluer l'expression du D2-40. 03 cas ont été pris comme témoin.

### II.1.2. Matériel non biologique

#### ❖ Appareillage et verrerie : ( Voir Annexe B)

- Cassettes.
- Pincés.
- Autotechnicon (Leica).
- Distributeur de paraffine (Leica).
- Moules d'inclusions.
- Congélateur.
- Microtome (Leica).
- Bain marie.
- Lames porte objet rodées.
- Lames silanisées.
- Agitateur magnétique.
- Filtres
- 
- 
- Lamelles.
- Graveur.
- Incubateur (étuve).
- Portes lames.
- Bacs de coloration et de rinçage.
- Paniers de lames thermorésistants.
- Chambre humide.
- Micropipettes réglables.
- Epindorff.
- Stylo délimitant (DAKOpen).
- Minuterie.
- Microscope photonique doté d'un appareil photo numérique (Leica)

#### ❖ Solutions et réactifs :

- Anticorps primaires monoclonaux Pré dilué (Monoclonal mouse anti-Human D2-40 ISO72 , LOT :10065424 – Dako – ).
- Eau distillée et eau de robinet.
- Eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) à 3% – Dako – réf : K4007.
- Formol à 10%.
- Hématoxyline de Harris, éosine.
- Hématoxyline de Mayer, eau ammoniaquée.
- Kit EnVision – Dako – réf : K5007 contenant : des anticorps secondaires de chèvre anti-anticorps de lapin et anti-anticorps de souris biotinylés), Streptavidine-HRP et un système de révélation : Substrat chromogène DAB (3,3Diaminobenzidine).
- Milieu de montage aqueux : Faramout Aqueux Mounting Medium – Dako – réf : S3025.
- Solution de démasquage TRS (Target Retriél Solution) à pH 9 (10×concentré) – Dako – réf : S 2367.
- Tampon PBS – Dako – réf: S3024.

- Xylène et alcool (Ethanol) à 80%, 85%, 90% et 100%.

### **II.1.3. Matériel histologique**

L'étude a été faite sur des blocs de paraffine issus de thyroïdectomie totale ou partielle (lobaire) réalisés en 2011 et 2012.

Immédiatement après l'exérèse chirurgicale, le prélèvement est orienté par un fil puis fixé dans du formol à 10% et acheminé vers le laboratoire d'Anatomie Pathologique. A ce niveau, une étude macroscopique est effectuée : elle consiste à prélever la zone tumorale et les limites d'exérèse chirurgicale. Tous les fragments sont mis séparément dans des cassettes d'inclusion en vue de la préparation de lames.

## **II.2 Méthodes**

### **II.2.1. Technique de coloration HE (Hématoxyline, Eosine)**

#### **➤ Principe :**

La coloration HE est une coloration topographique de routine permettant l'identification des caractères histologiques de tissus en associant une coloration nucléaire par l'hématoxyline de Harris à une coloration cytoplasmique par l'éosine. L'Hématoxyline de Harris est un colorant basique qui colore le noyau en bleu tandis que l'éosine, de nature acide colore le cytoplasme en rose.

#### **➤ Mode opératoire :**

##### **a) Préparation des tissus :**

- Fixation : les prélèvements sont trempés dans du formol à 10%, pH4, durant 24 heures, puis soigneusement rincés pour éliminer toute trace de fixateur. Cette étape a pour but : la conservation des structures, le durcissement des pièces ainsi que l'immobilisation des antigènes *in situ*.

**Déshydratation :** les prélèvements sont déshydratés dans des bains d'alcool à concentrations croissantes (de 80% à 100%) pendant 2 heures chacun, puis trempés dans 3 bains de Xylène pendant 2 heures chacun (autotechnicon). « Leica »



Les prélèvements sont ensuite inclus dans des moules de paraffine hydrophobe fondu à 62°C (distributeur de paraffine LEICA) puis refroidis à 4°C, afin de permettre la réalisation de coupes fines et régulières.



Réalisation des coupes de 3µm d'épaisseur au microtome, qui seront ensuite étalées sur des lames rodées à l'aide d'un bain marie.



Séchage des lames pendant une nuit à 40°C dans un incubateur.

**b) Coloration HE :**

- Faire passer les coupes dans six bains de Xylène, pendant 1 minute chaque fois pour les déparaffiner.
- Réhydrater les coupes dans des bains d'alcool à des concentrations décroissantes ; 2 bains d'alcool à 100% et 2 bains d'alcool à 95%, pendant 1 minute dans chaque bain.
- Rincer à l'eau distillée.
- Plonger les lames dans trois bains de l'hématoxyline de Harris pendant 1 minute à chaque fois, pour la coloration des noyaux en bleu.
- Laver les lames dans deux bacs d'eau du robinet pendant 2 à 3 minutes à chaque fois.
- Plonger les lames dans un bain d'éosine pendant 1 minute pour la coloration du cytoplasme en rose puis rincer à l'eau du robinet.
- Déshydrater dans 4 bains d'alcools à des concentrations croissantes pendant 1 minute chacun : 2 bains d'alcool à 95% et 2 bains d'alcool à 100%.
- Plonger les lames dans 4 bains de xylène pour l'éclaircissement pendant 1 minute à chaque fois.
- Monter les lames à la résine et observation au microscope.

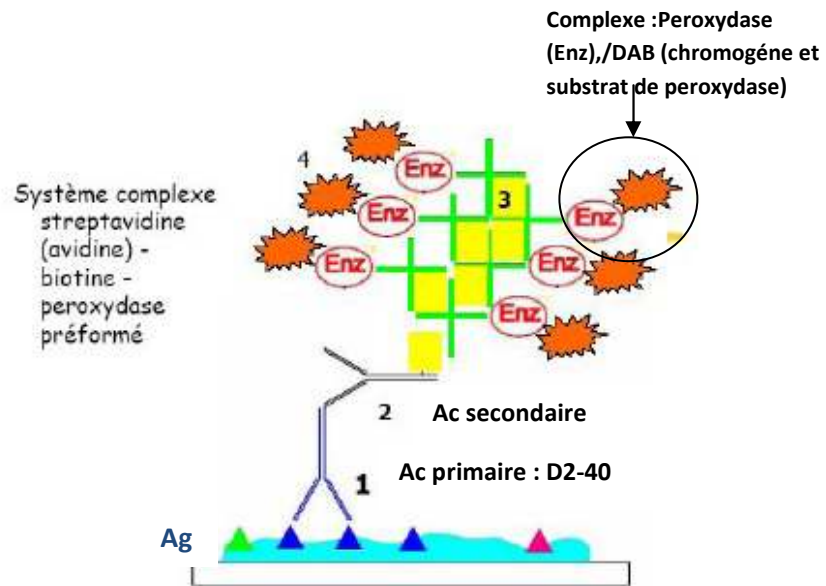
**II.2.2 Technique d'immunohistochimie (IHC)**

L'immunohistochimie (Immunologie / Histochimie) permet de localiser et d'identifier *in situ* un constituant tissulaire (Antigène) grâce à une réaction immunologique de type Ag-Ac ; dont le marqueur à visée diagnostique (D2-40). Le principe de cette technique consiste en une réaction immunologique suivie d'une révélation enzymatique qui se déroule comme suit :

❖ **Préparation des tissus :** La préparation des tissus se fait de la même façon que la technique **HE** allant de la fixation des prélèvements à la confection des coupes.

➤ **L'immunohistochimie par la méthode Streptavidine biotine (SAB)**

Le complexe Ag-Ac formé est rendu visible par une réaction colorimétrique enzymatique.



***L'immunohistochimie par la méthode Streptavidine biotine (SAB)***

**1<sup>ère</sup> étape :** Déparaffinagedes coupes tissulaires dans 3 bains de Xylène successifs de 5 minutes chacun,Réhydratationdes coupes dans 3 bains d'alcool absolu (100%) successifs durant 5minutes chacun, Blanchimentdans de l'eau distillée pendant 5 minutes.

**2<sup>ème</sup> étape :** peut se faire soit par prédigestion enzymatique (protéinase K) soit par la chaleur à l'aide de la solution de démasquage TRS au bain marie à 97°C pendant 40 minutes,Refroidissement pendant 20 minutes à température ambiante. Rinçage à l'eau distillée et cerclage des coupes retenues sur les lames avec le Dakopen.



**3<sup>ème</sup> étape :** Blocage des peroxydases endogènes tissulaires : Il est réalisé en utilisant 100 µl de l'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) à 3% pendant 10 minutes. Rinçage des lames ,puis les plonger dans un bain de tampon PBS 2 fois 5 minutes.





**4<sup>ème</sup> étape :** Application de l'anticorps primaire : Tout le tissu est couvert par les Ac primaires prédilués suivants (100µl) : Anti-D2-40. Incubation des lames pendant 30 minutes dans une chambre humide (bac et compresse humide) fermée à température ambiante puis rincer dans deux bains successifs de PBS durant 5 minutes chacun.



**5<sup>ème</sup> étape :** Application du système de visualisation EnVision : LSAB ( labeledstreptavidine biotine) pendant 15 minutes, pour l'amplification du signal..

**6<sup>ème</sup> étape :** Révélation par le DAB (3,3Diaminobenzidine) contenu dans le kit. Incubation pendant 30 minutes.

**7<sup>ème</sup> étape :** rinçage à l'eau distillée puis verification des lames au microscope optique.

**8<sup>ème</sup> étape :** Contre coloration et montage : Les lames sont imprégnées dans des bacs de coloration à l'hématoxyline de Mayer durant 2 minutes, rincées à l'eau courante. Bleuissement des lames dans l'eau ammoniacuée, puis rinçage à l'eau distillée. Montage des lames avec une colle aqueuse (Farmount). Recouvrir avec des lamelles. Observation au microscope photonique.



Nos résultats ont été réalisés sur 61 patients atteints de cancer de la thyroïde (fiches des malades + blocs de paraffine archivés).

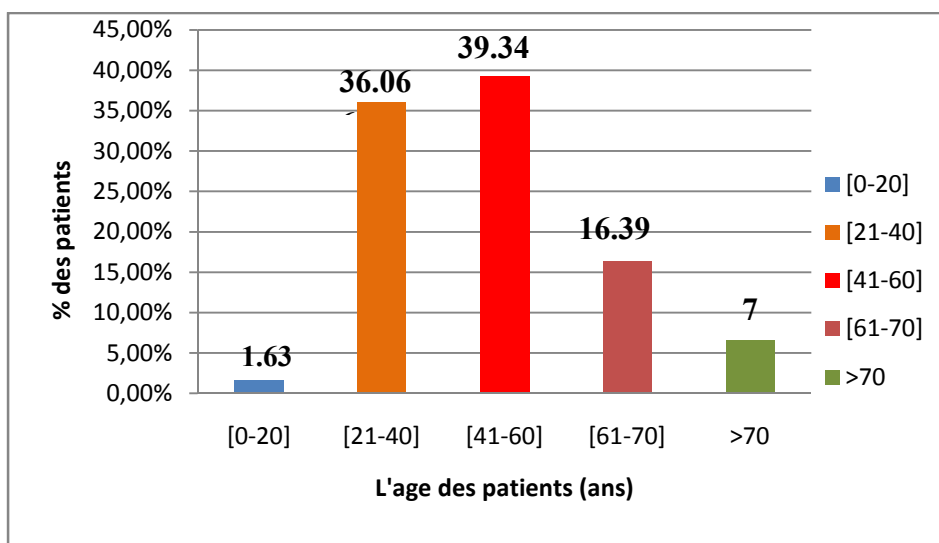
Ils seront présentés selon trois études :

### III.1.1. Paramètres cliniques

Dans cette étude, les patients ont été répartis selon l'âge et le sexe.

#### III.1.1.1 Répartition en pourcentage selon l'âge

Les résultats de cette répartition sont présentés en pourcentage dans la Figure (Tableau 1, Annexe C).



**Figure 17 : Répartition des cas selon l'âge**

Selon l'âge des patients trouvés dans notre échantillon, et cela l'âge moyen du diagnostic du cancer thyroïdien (autour de 45 ans) on a préféré de faire une différence d'âge de 20 années. Avec un minimum d'âge de 19 ans et un maximum d'âge de 77 ans. Le cancer de la thyroïde est plus fréquent chez les patients âgés entre 41 et 60 ans avec un taux de 39.34%, chez les patients âgés entre 21 et 40 ans avec un taux de 36.06%. L'incidence diminue chez les patients dont l'âge test compris entre 61 à 70 avec un taux de 16.39% tandis qu'elle est faible chez les patients dont l'âge est en dessous de 20 ans et au delà de 70 ans avec les taux les plus faibles 1.63% et 7% respectivement.

### III.1.1.2 Répartition selon le sexe

Les résultats de cette répartition sont présentés en pourcentage dans la figure (Tableau 2, Annexe C).

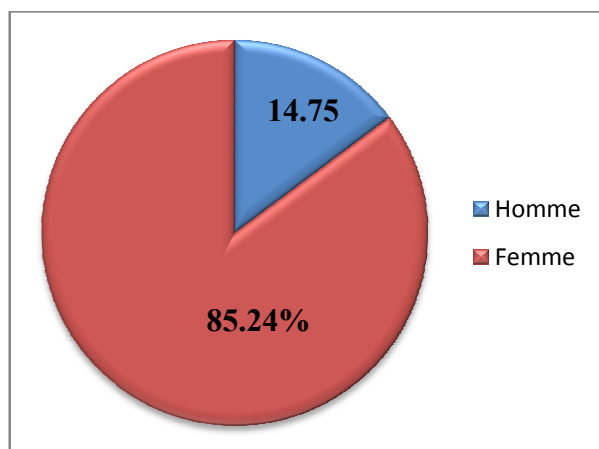


Figure 18 : Répartition des cas selon le sexe .

On constate selon nos résultats que le cancer de la thyroïde est plus fréquents chez les femmes avec un taux de 85.24% par rapport a un aux largement faible chez les hommes 14.75%.

### III.1.2 Etude Histopathologique

Dans cette étude nous allons présenté les différents types du cancer de la thyroïde diagnostiqués dans notre échantillonnage en pourcentage .

#### III.1.2.1 Répartition en pourcentage selon le type histologique du cancer de la thyroïde

Les résultats de cette répartition sont présentés en pourcentage dans la figure (Tableau 3, Annexe C).

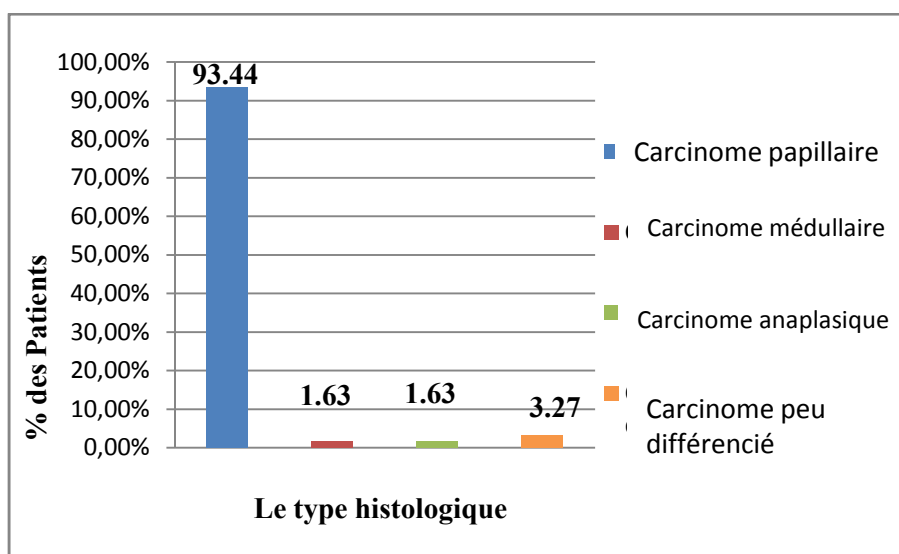
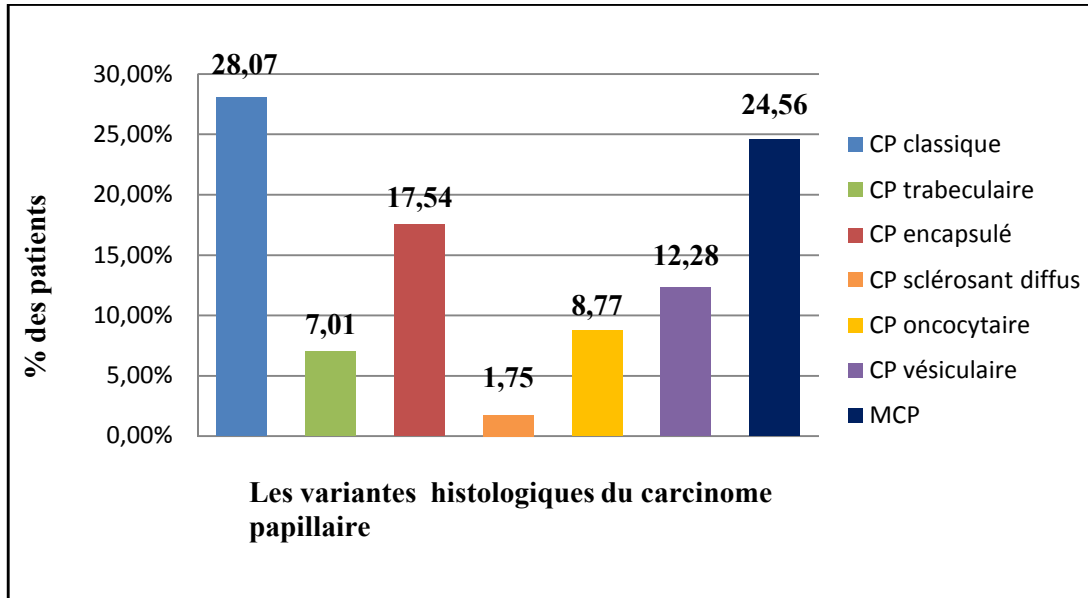


Figure 19 : Répartition des cas selon le type histologique du cancer de la thyroïde.

Sur 61 patients, on a retrouvé quatre types ; le carcinome papillaire (Figure 22a et b) est le plus fréquent avec un taux de 93.44% par rapport aux autres types, le carcinome peu différencié avec un taux de 3.27% et le carcinome médullaire et anaplasique tous les deux avec un taux de 1.63%.

### III.1.2.2 Répartition en pourcentage selon les variantes du carcinome papillaire

Les résultats de cette répartition sont présentés en pourcentage dans la figure (Tableau 4, Annexe C).

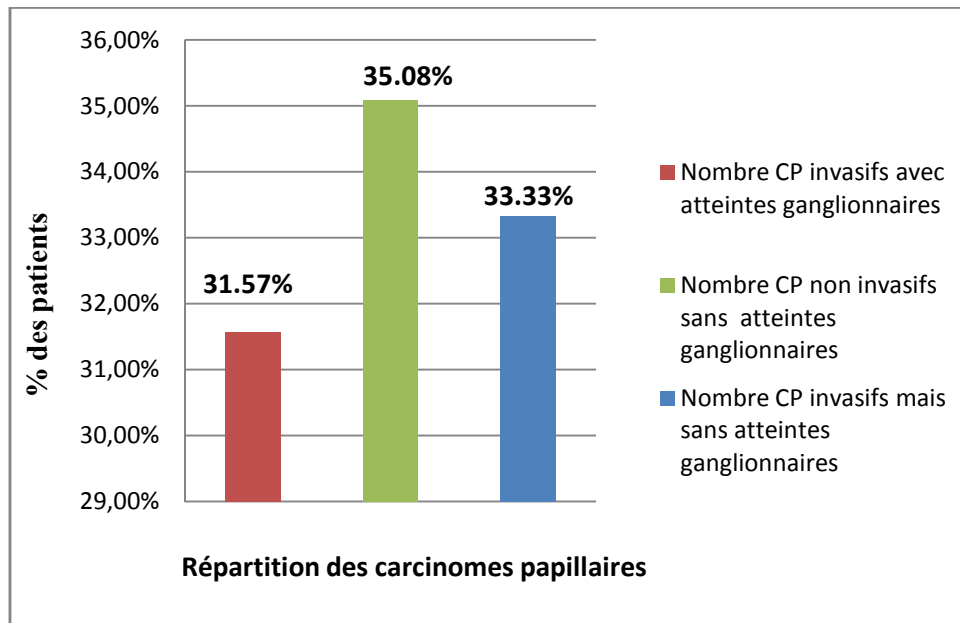


**Figure 20: Répartition des patients selon les variantes histologiques du carcinome papillaire**

L'étude histologique basée sur une coloration standard (HE) nous a permis de détecter chez nos patients 07 variantes de carcinome papillaire sur un total de 57.

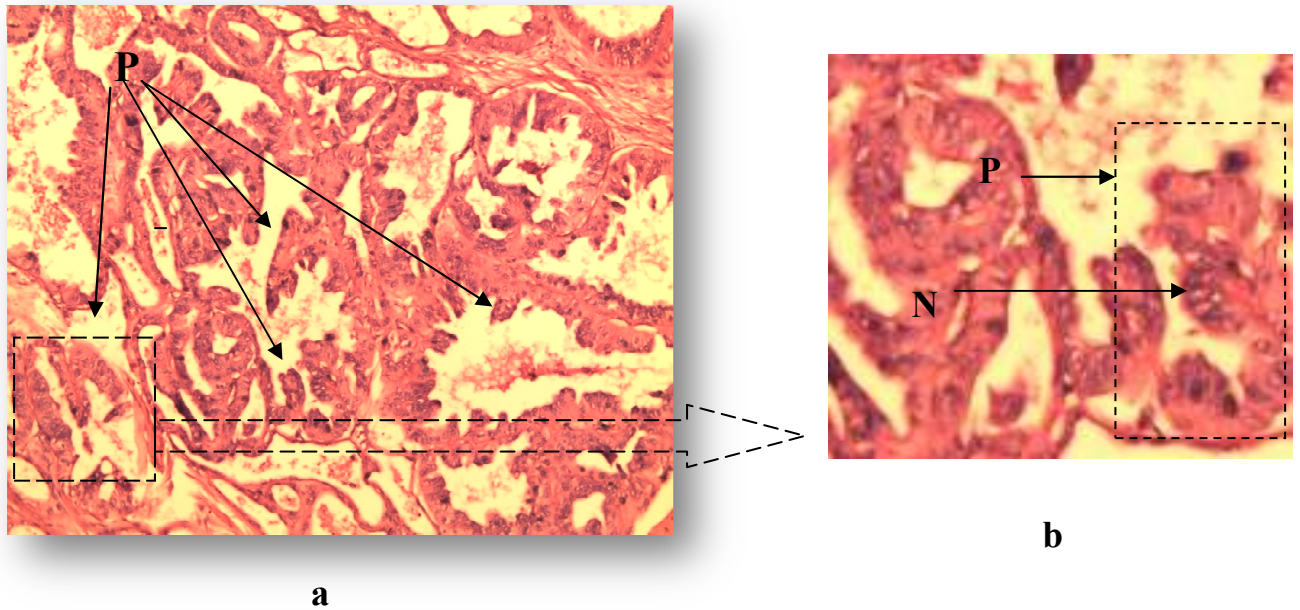
D'après les résultats présentés, nous avons remarqué que le CP classique est la variante la plus fréquente (28.07%), suivi par le microcarcinome papillaire 24.56%, le CP encapsulé 17.54%, le CP vésiculaire avec un taux de 12.28%, le CP variété oncocytaire 8.77%, le CP trabéculaire 7.01% et enfin le type sclérosant diffus du carcinome papillaire avec un taux de 1.75%.

### III.1.2.3. Répartition en pourcentage selon les critères d'invasions et d'atteintes ganglionnaires des carcinomes papillaires thyroïdiens.



**Figure 21 : Répartition en pourcentage selon les critères d'invasions et d'atteintes ganglionnaires des carcinomes papillaires thyroïdiens.**

Parmi les 57 cas de carcinomes thyroïdiens, 20 cas (35.08%) n'ont pas démontré l'existence d'embolies métastatiques avec la coloration standard H&E (Tableau 5, Annexe C), 18 cas (31.57%) ont été diagnostiqués comme étant très invasifs avec de multiples embolies vasculaires intra tumorales et atteintes ganglionnaires, et 19 cas (33.33%) étaient invasifs mais sans atteintes ganglionnaires (infraction capsulaire, lobaire...).

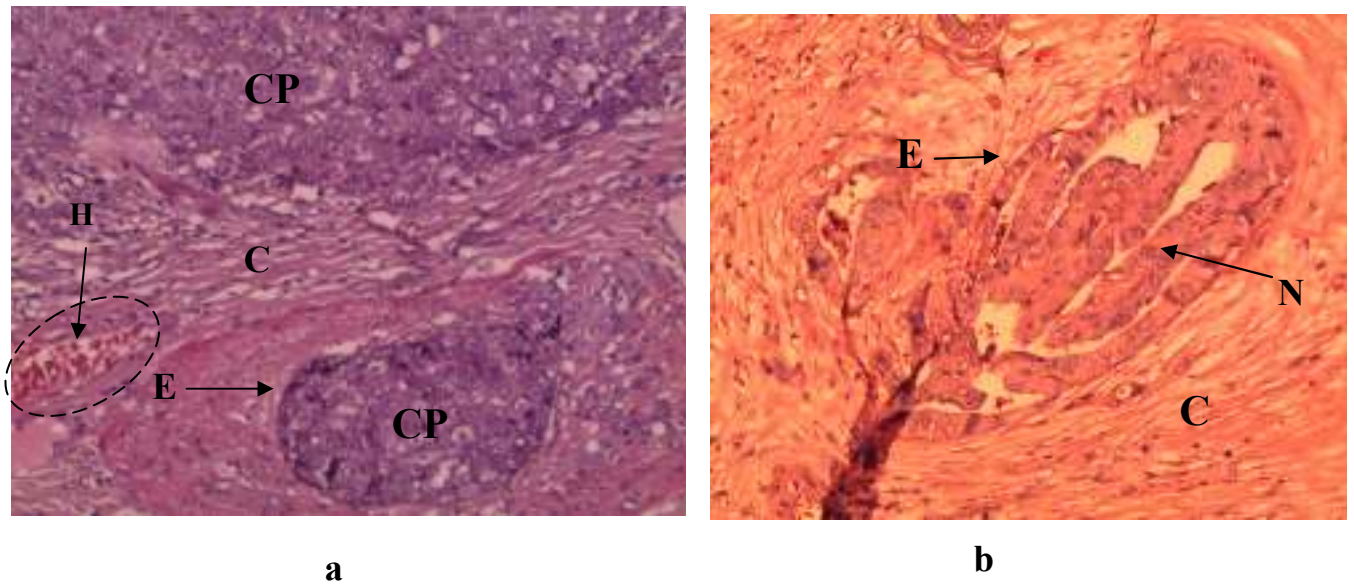


**Figure 22 : aspect histologique de la variante classique du carcinome papillaire ; coloration à L'H&E ; G : X 10 (a)**

a: vue générale des papilles ( P )

b :vue d'une papille (P), avec détail nucléaire ( N) du carcinome papillaire

Les papilles sont des formations allongées, irrégulières et ramifiées ( Figure22, a et b ). Les caractéristiques nucléaires du carcinome papillaire ont actuellement une importance diagnostique égale voire même supérieure a la structure papillaire elle-même, les noyaux (N) (Figure 22 , b) s'accompagnent d'une invagination de la membrane nucléaire plus ou moins accentuée, allant de la plicature en grain de café c'est l'aspect « incisuré » et d'autres apparaissent optiquement vide par marginalisation et condensation de la chromatine autour de leur membrane nucléaire qui devient épaisse et le centre vide, c'est l'aspect en verre dépoli (N) caractéristique du CP.



**Figure 23 :Effraction de la capsule thyroïdienne (C) et formation des embolus vasculaires (E) envahis par les cellules tumorales du carcinome papillaire thyroïdien, coloration a L'H&E, a : G X20 .**

a : embole vasculaire (E),(C) capsule thyroïdienne.(H) les hématies dans un vaisseaux -----

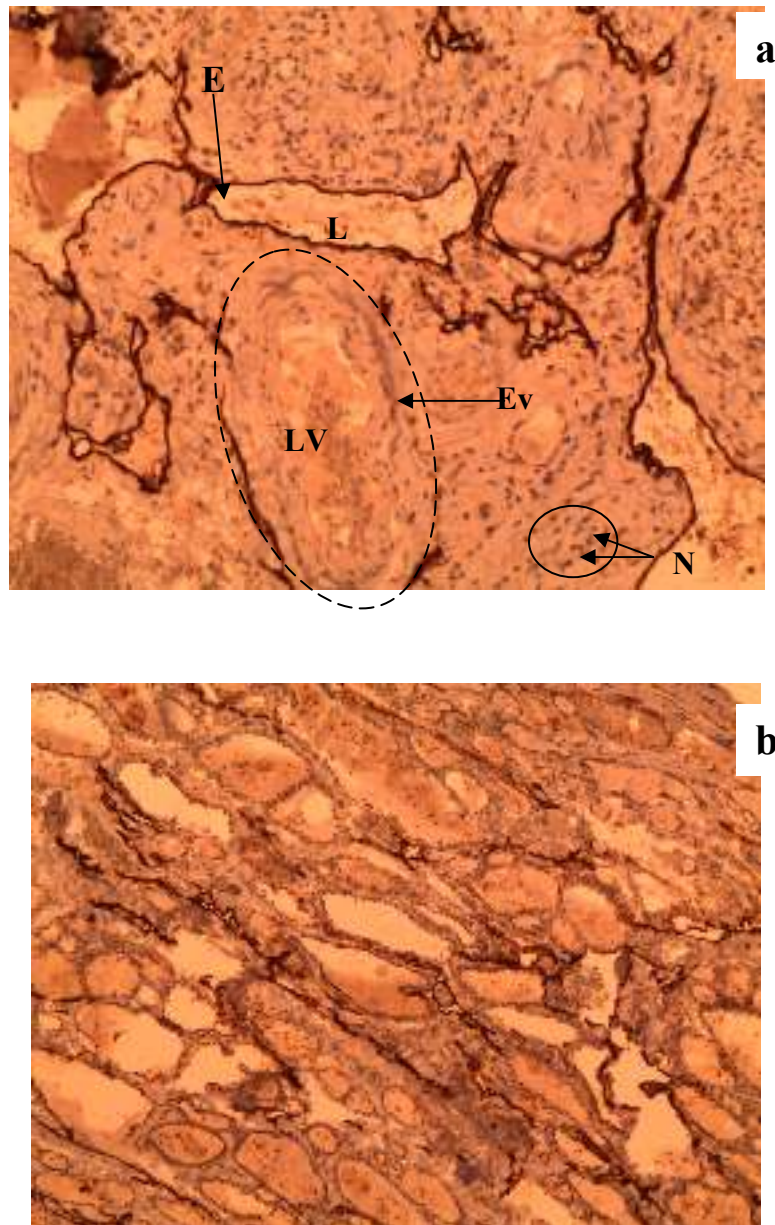
b : embole vasculaire au sein de la capsule thyroïdienne (C) envahi par les cellules tumorale de la variante classique du carcinome papillaire thyroïdien .(N) : noyaux.



### **III.1.3. Etude Immunohistochimique**

Pour la technique d'immunohistochimie utilisant le D2-40, seuls 23 cas ont été choisis, dont trois ont été isolés comme cas témoins (cas où l'H&E montrait clairement une angioinvasion et les embolies) ainsi que les 20 cas non-invasifs, ces 23 cas étaient tous des carcinomes papillaires thyroïdiens et se présentaient sous différentes variantes ; classiques, vésiculaires, oncocytaire, trabéculaires, microcarcinomes papillaires, les carcinomes papillaires classiques ont été les plus fréquents.

L'étude immunohistochimique utilisant le D2-40 réalisée sur l'ensemble des cas (23 cas) n'a pas mis en évidence de nouvelles angioinvasions dans les cas qui n'ont pas été présentés d'angioinvasions à l'H&E (les 20 cas). Elle a toutefois permis de bien individualiser la paroi des micro-vaisseaux lymphatiques intratumoraux. Tous les vaisseaux lymphatiques ont montré un marquage complet (marron allant au brun foncé).



**Figure 24: Expression du D2-40 dans les carcinomes papillaires thyroïdiens,**

a : GX20 ; b : GX10

**a** : immunomarquage d'un CP très invasif avec atteinte ganglionnaire. Les vaisseaux lymphatiques sont nombreux et bien délimités par le D2-40.

**b** : immunomarquage d'un CP invasif de variante vésiculaire .

**E** : Endothélium des vaisseaux lymphatiques, les micro-vaisseaux lymphatiques intratumoraux./**L** : lumière du vaisseau lymphatique.**N** : noyaux.

**Ev** : Endothélium sanguin qui n'a pas exprimé le D2-40, **LV** : lumière du vaisseau sanguin.

L'expression positive du D2-40 a été localisée dans la membrane et le cytoplasme des cellules endothéliales lymphatiques. Avant l'immuno-marquage, avec la coloration H&E, l'identification des micro-vaisseaux lymphatiques est difficile voire impossible. Ces vaisseaux lymphatiques sont de taille variable, avec une lumière vide ou de taille réduite (Figure 24, b) (les deux faces lumineuses du micro-vaisseau lymphatique sont entre-colées). Absence d'expression du D2-40 par les vaisseaux sanguins adjacents (Figure 24, a)

Ce mémoire de fin d'étude s'inscrit dans un projet global du laboratoire de L'EHS de DOUERA visant à démontrer la fiabilité du diagnostic émis par la technique de laboratoire standard H&E concernant l'existence ou l'absence d'embolies lymphatiques au seins des carcinomes thyroïdiens, en utilisant la techniques d'immunohistochimie avec l'aide de l'anticorps D2-40/ Anti-Podoplanine pour délimiter les endothéliums lymphatiques intra tumoraux. Cette étude nous a permis de démontrer aussi le rôle du D2-40 dans la détection des lymphatiques intra tumoraux et de ce fait le marquage des néo-vaisseaux lymphatiques dans les cancers thyroïdiens et la prédiction d'éventuelles métastases ganglionnaires.

Le cancer de la thyroïde se présente le plus souvent sous la forme d'un nodule. Il représente 4% de l'ensemble des cancers. Se situe au 15<sup>ème</sup> rang des cancers chez l'homme, au 4<sup>ème</sup> rang des cancers chez la femme. Il ne constitue pas un problème de santé publique au regard de sa faible incidence, de son pronostic favorable et de sa faible mortalité. (Colona et al ; 2008) ;(Caron ; 2010)

Les tumeurs thyroïdiennes sont particulièrement intéressantes à étudier pour comprendre les mécanismes généraux de la carcinogénèse et du pouvoir invasif étant donné que les cellules thyroïdiennes (les thyrocytes) peuvent évoluer vers différents types de tumeurs bénignes et malignes. Les carcinomes sont subdivisés en carcinomes différenciés, folliculaires ou vésiculaires (CV et CP), carcinomes anaplasiques CA et carcinomes médullaires CM.

Des altérations géniques causent et caractérisent ces différents types de tumeurs thyroïdiennes dont la classification histologique est parfois fort subjective, voir impossible. (Giordano TJ; 2008); (Franc B et al ; 2003). Plusieurs études ont démontré que la stimulation des cascades de signalisation par les hormones et les différents facteurs de croissances notamment l'EGF entraîne la transformation oncogénique et les métastases par l'activation de ces cascades et l'activation d'un programme pro-inflammatoire. De plus, l'inflammation peut avoir un rôle pro-tumoral en induisant la prolifération et la survie des cellules malignes, en promouvant l'angiogénèse et les métastases. (Balkwill F et al ; 2001)

Brindel et al ; ( 2006); Carayon (2009) ; ont expliqué la survenue des cancers thyroïdiens avait un lien avec l'hormonosynthèse thyroïdienne qui fait appel à des réactions chimiques aboutissant à la formation de radicaux libres, notamment d'espèces réactives de l'oxygène. Celles-ci entraînent au niveau des gènes des cassures des chaînes d'acides aminés et des modifications des protéines structurales et fonctionnelles. Il se forme notamment des agrégats de thyroglobuline iodée, potentiellement toxiques pour la cellule. Un excès d'iodure entraîne un risque accru de cancer; inversement, une carence en iode conduit à une sécrétion excessive de TSH conduisant à une stimulation de l'hormonosynthèse et à une prolifération anormale de la glande.

D'après les 61 fiches consultées dans notre série, il ressort que l'âge le plus touché est entre 40 et 60 ans avec un taux près de 40%, Ces données se rapprochent de celles rapportées dans la littérature. Leenhardt et al ;(2005) a déjà montré que l'incidence du cancer de la thyroïde avec l'âge est moins importante après 56 ans.

Nous avons enregistré aussi dans cette étude une prédominance féminine à 85.25% femmes par rapport à 14.75% hommes. Ces résultats se rapprochent de ceux retrouvés par Davies et al ;(2002); Xing; (2005), qui montrent en générale un sexe ratio de 4 femmes atteintes d'un cancer thyroïdien par rapport à 1 homme. Banu et al ; (2002) ont montré l'existence des récepteurs aux androgènes et aux œstrogènes au niveau de la glande immature, pubert et adulte chez le rat. Ils ont montré que la différence de l'incidence des maladies thyroïdiennes entre les deux sexes est due a la différence de la concentration des stéroïdes sexuelle et leurs récepteurs au niveau des cellules.

Sur le plan histologique, le cancer papillaire est le type le plus répondeu 93.44% parmi les cancers thyroïdiens suivi par le cancer peu différencier 3.27% et les carcinomes médullaires et indifférenciés ou anaplasiques avec tout les deux un taux de 1.63%. Ces résultats concordent avec les résultats publiés par ABDELILLAH RACHID M ; 2011 qui a indiqué un taux de 85-90 % des cas de carcinomes papillaires , et soit 3-5% de cas de carcinomes peu différencié. Les carcinomes anaplasiques sont rares (< 5 % des cas) et sont d'une gravité extrême. Dans notre étude la forme classique est la plus fréquente (soit 28.04%),selon l'étude menée par M. ABDELILLAH RACHID ; 2011, Il s'agit d'une tumeur non encapsulée, souvent multifocale et qui est bilatérale dans 20 à 80 % des cas. L'effraction de la capsule thyroïdienne est notée dans 32 % des cas. Les métastases ganglionnaires sont présentes dans 50 % des cas et leur fréquence augmente avec la taille de la tumeur thyroïdienne. Les métastases à distance sont peu fréquentes et siègent principalement au niveau des poumons.

L'étude histologique à l'H&E au microscope optique apprécie l'architecture de l'ensemble de la lésion, avec présence de papilles, de vésicules, d'amas de cellules aux caractères néoplasiques et la présence d'un envahissement des tissus voisins ou une migration par la voie des vaisseaux. (Fery-blanc et al ; 2006).

L'angiogenèse et la lymphangiogenèse jouent un rôle crucial dans la croissance de la tumeur, la progression, l'invasion et les métastases. La mise en évidence de marqueurs spécifiques des vaisseaux lymphatiques (PROX-1, LYVE1, anti-podoplanine) a permis leur identification, leur quantification au sein de tumeurs humaines et l'isolement de cellules endothéliales lymphatiques. Les modèles animaux ont permis de préciser le rôle de ces facteurs dans la croissance des vaisseaux lymphatiques et la dissémination métastatique.(DUPUY E et al ; 2003)

Le D2-40 est considéré comme un marqueur spécifique des vaisseaux lymphatique. Le D2-40 a montré une immunoréactivité sélective pour l'endothélium lymphatique, il est utile pour les utilisations cliniques concernant les envahissements ganglionnaires par des tumeurs (Schacht V et al ; 2005). Comme le montre notre étude, le D2-40 se situe spécifiquement dans les cellules endothéliales lymphatiques du tissu thyroïdien, ce qui est en fait un indicateur plus précis et sensible applicable pour une gamme plus large par rapport à d'autres

marqueurs lymphatiques. Cela était conforme aux conclusions de Fukunaga M ;(2005).La lymphoangiogénèse induite par les tumeurs est une étape importante dans la métastase lymphatique. Les néo-vaisseaux lymphatiques sont composés de cellules en monocouche. L'absence de la couche basale, les jonctions serrées entre les cellules, un grand nombre d'autres facteurs sont propices à l'entrée des cellules tumorales dans les vaisseaux lymphatiques. La lymphoangiogénèse et l'augmentation de la densité des vaisseaux lymphatiques contribuent à l'invasion par les cellules tumorales des ganglions lymphatiques régionaux, et donc l'apparition de métastases lymphatiques. Les vaisseaux lymphatiques intra tumoraux se trouvent dans un grand nombre de tumeurs et sont généralement de petite taille, aplatis et irréguliers et de temps en temps, contiennent des cellules tumorales. L'expression de Podoplanine/D2-40 était positive dans différents types de cancers notamment les cancers ovariens (Birner P et al ; 2000), cervical (Birner P et al ; 2001), du pancréas endocrine (Sipos B et al ; 2004) le mélanome (Dadras SS et al ; 2003), carcinome colorectal (Omachi T et al ; 2007) le mésothéliome(Kimura N et al ; 2005) et les tumeurs des cellules germinales (Marius Raica et al ;2008)

Les métastases ganglionnaires jouent un rôle essentiel dans la détermination du stade, le traitement et le pronostic du carcinome papillaire de la thyroïde. Bien que l'immunohistochimie a été largement reconnue comme un outil auxiliaire efficace pour la détection, il ya eu controverse concernant l'anticorps le plus efficace ou la nécessité d'une utilisation combinée d'anticorps. Certaines études ont proposé une combinaison d'anticorps pour améliorer la sensibilité et la spécificité du diagnostic différentiel du cancer de la thyroïde. Lei Gong et al ;(2012), ont testé les expressions des cinq anticorps (D2-40, CK19, la galectine-3, le VEGF et EGFR). L'expression de ces anticorps était plus élevée dans le carcinome papillaire avec métastases ganglionnaires que dans ceux sans métastases.

D2- 40 est un indicateur plus sensible et spécifique des vaisseaux lymphatiques de la tumeur et a une fiabilité plus élevée pour la prédiction de métastases ganglionnaires. Il est appelé à devenir un indicateur pour le diagnostic différentiel du carcinome papillaire de la thyroïde et une hyperplasie papillaire et prédictateur de métastases ganglionnaires. Néanmoinsle D2-40 n'a pas démontré de nouvelles angioinvasions sur l'ensembles des cas (20 /57) où l'H&E a noté l'absence d'angioinvasions, ce qui souligne que le diagnostic peut être décelable avec la méthode classique, l'étude histologique et que l'immunohistochimie ne fera que le confirmer.

Notre travail nous a permis de montrer clairement l'intérêt des deux techniques histologiques de routine et l'immunohistochimie.

L'examen histologique avec coloration H&E a le grand mérite de diagnostiquer le cancer, de déterminer son type selon la classification de L'OMS. Cette classification a un intérêt diagnostique et pronostique.

Les études immunohistochimiques concernant la densité de lymphoangiogénèse et des vaisseaux lymphatiques intra tumoraux sont devenues possibles seulement après la découverte récente des marqueurs des endothéliums lymphatiques tels que LYVE-1, anti-Podoplanine (D2-40).

L'anticorps monoclonal D2-40 est une découverte récente. Cet anticorps a été nouvellement utilisé aussi dans le service d'anatomie pathologique de l'EHS Douera.

Dans la présente étude, nous avons utilisé D2-40 pour l'évaluation de la présence et la densité des vaisseaux lymphatiques mais, aussi pour démontrer l'invasion de lymphatiques dans les carcinomes papillaires thyroïdiens afin d'émettre une corrélation entre la présence de ces vaisseaux et le pouvoir invasif et métastatique.

Il en ressort que la technique usuelle est d'un grand apport et que le D2-40 n'a pas montré de nouveaux cas d'angio-invasion.

Nous pouvons conclure qu'en pathologie thyroïdienne, le D2-40 n'est pas indispensable pour la détection des embolies lymphatiques néoplasiques.

**Abdellilah Rachid M (2011).** Carcinome papillaire de la thyroïde (A propos de 40 cas), UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE, FES, Thèse N°016/11

**Aleksander Konturek and Marcin Barczynski (2012),** Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Epidermal Growth Factor (EGF) in Papillary Thyroid Cancer. "Thyroid and Parathyroid Diseases - New Insights into Some Old and Some New Issues", By Laura Sterian Ward, ISBN 978-953-51-0221-2

**Balkwill F, Mantovani A (2001):** Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357:539-545

**Banu SK ; Govindarajulu P ; Michel M ; Aruldha ; (2002).** Testosterone and estradiol up-regulate and estrogen receptors in immature and adult rat thyroid glands in vivo. *Stroids* 67 ;1007-1014.

**Berger N; Borda N, Borda A ;Decaussa -Petrussi M ; Loghin A (2010)** Pathologie Thyroïdienne Parathyroïdienne et Surrénalienne. *Sauramps Medical*; 13:281.

**Bernstein, L., M. C. Pike, et al. (1991).** "Age at menarche and estrogen concentrations of adult women." *Cancer Causes Control* 2(4): 221-225.

**Birner P, Schindl M, Obermair A, Plank C, Breitenecker G, Kowalski H and Oberhuber G (2000):** Lymphatic microvessel density in epithelial ovarian cancer: its impact on prognosis. *Anticancer Res* 20: 2981-2985.

**Birner P, Obermair A, Schindl M, Kowalski H, Breitenecker G and Oberhuber G (2001):** Selective immunohistochemical staining of blood and lymphatic vessels reveals independent prognostic influence of blood and lymphatic vessel invasion in early-stage cervical cancer. *Clin Cancer Res* 7: 93-97.

**Borda N, Berger N; Borda A ;Decaussa -Petrussi M ; Loghin A (2010)** Pathologie Thyroïdienne Parathyroïdienne et Surrénalienne. *Sauramps Medical*; 13:281.

**Braun M, Flucke U, Debald M, Walgenbach-Bruenagel G, Walgenbach KJ, Höller T, Pölcher M, Wolfgarten M, Sauerwald A, Keyver-Paik M, Kuhr M, Buttner R and Kuhn W (2007):** Detection of lymphovascular invasion in early breast cancer by D2-40 (podoplanin): a clinically useful predictor for axillary lymph node metastases. *Breast Cancer Res Treat.*

**Breiteneder-Geleff S, Soleiman A, Kowalski H, Horvat R, Amann G, Kriehuber E, Diem K, Weninger W, Tschachler E, Alitalo K and Kerjanschki D (1999) :** Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries. *Am J Pathol* 154: 385-394.

**Breiteneder-Geleff S, Matsui K, Soleiman A, Meraner P, Poczewski H, Kalt R, Schaffner G and Kerjanschki D (1997):** Podoplanin, novel 43 kDa membrane protein of glomerular epithelial cells, is down-regulated in puromycin nephrosis. *Am J Pathol* 151: 1141-1152.

**Brindel P ; Doyon F ; Teuri J ; De vathaire F ;(2006).**Facteurs menstruels et de la reproduction dans le risque de cancer de la thyroïde en polynésie française : étude cas\_temoins en population. *Rev Epidemiol Santé Public* ;54 :2s15-2s17.

**Caillou B (1998),** Les carcinomes vésiculaires , *Arch. Annat Cytol Path*; 46(1-2):239-44



**Carayon P (2009).** D'après une communication de lors du congrès biologie pour elle, Eurobiologie, Nancy ; n°414 :12

**Caron P ;(2010).** Prevention des déordres thyroïdiens au cours de la grossesse , Revue sage-femme ; 9 :133-138

**Chavez-MacGregor, M., S. G. Elias, et al. (2005).** "Postmenopausal breast cancer risk and cumulative number of menstrual cycles." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **14**(4): 799-804.

**Colonna M ; Danzon A ; Delafosse P ; Poncet F ; Arveux P ; Molinie F (2008).** Cancer prevalence in France : Time trend, situation in 2002 and extrapolation to 2012. *Eur J Cancer* ; 44(1) :115-22

**Dadras SS, Paul T, Bertoncini J, Brown LF, Muzikansky A, Jackson DG, Ellwanger U, Garbe C, Mihm MC and Detmar M (2003):** Tumor lymphangiogenesis: a novel prognostic indicator for cutaneous melanoma metastasis and survival. *Am J Pathol* **162**: 1951-1960.

**Davanzo A; Treseler P; Ituarte Ph et al (2004)** ,follicular thyroid carcinoma: histology and prongnosis. *Cancer* ,100:1123-1129.

**Davies H ; Bignell GR ; stephens P ; Edkins ; Cleg S ;(2002).** Mutations of the Braf gene in Human cancer. *Nature* ; 417 :949-54.

**Delellis RA, Loyd RV, Heitz PU, et al (2004),** Pathology and Genetics of Tumors of Endocrine Organs.IARC Press, Lyon.

**DUPUY E'velyne, Gérard TOBELEM (2003) :** Mécanismes de la lymphangiogenèse tumorale, longtemps oubliée, dans la dissémination métastatique, *Bull Cancer* 2003 ; 90 (7) : 595-9.

**D Zenaty, M Schlumberger, Y Aigrain1, M Peuchmaur, P Philippe-Chomette,C Baumann et al ,(2009).** Medullary thyroid carcinoma identified within the first year of life in children with hereditary multiple endocrine neoplasia type 2A (codon 634) and 2B, *Eur J Endocrinol* , 160 ; 807-813

**Erdem H, Gündogdu C, Siplal S (2011).** Correlation of E-cadherin, VEGF, COX-2 expression to prognostic parameters in papillary thyroid carcinoma. *Exp Mol Pathol* ;3:12

**Francis lang H ; Price M ;Polycarpou-schwarz M; Di Lauro R ; (1992),** Cell-type-specific expression of the rat thyroperoxidase promoter indicates common mechanisms for thyroid-specific gene expression. *Mol Cell Biol* ;12:576-588.

**Franc B, de la SP, Lange F, Hoang C, Louvel A, de Roquancourt A, Vilde F, Hejblum G, Chevret S, Chastang C (2003)** Interobserver and intraobserver reproducibility in the histopathology of follicular thyroid carcinoma. *Hum Pathol* **34**:1092-1100

**Fery-Blanco C ; Pelleter F ; Humbert P ; Aubin F ; (2006).** Mucinoze dermique faciale associée à un cancer médullaire de la thyroïde sporadique métastatique ; la revue de médecine interne ; 27 :954-957.

**Fukunaga M (2005).** Expression of D2-40 in lymphatic endothelium of normal tissues and in vascular tumours. *Histopathology* ;46:396-402.

**Geoffrey M. Cooper (1997)**, La cellule: Une approche moléculaire , De Boeck université , 551

**Gheriani H - Libyan J Med (2006)**. Update on epidemiology classification, and management of thyroid cancer, HNS Department, St Vincent University Hospital, Elm Park, Dublin 4, Ireland.

**Gimm O (2001)**, Thyroid cancer.,Cancer Lett 163:143-156.

**Giordano TJ (2008)** : Genome-wide studies in thyroid neoplasia. Endocrinol Metab Clin North Am 37:311

**Greben B; Salvatore D; Harney JW; Tu HM; Larsen PR; (2001)**. The human, but not rat, Dio2 gene is stimulated by Thyroid Transcription Factor-1 (TTF-1). Mol Endocrinol; 15:112-124.

**Guliana JM ; Calmettes C;(1993)**,Calcitonine et Thyroglobuline : interet de leur dosage comme marqueurs de l'activité cellulaire normale et pathologique de la glande thyroïde. Immunoanal Biol Spéc; 8:243-247.

**Harriette J. Kahn and Alexander Marks (2002)**. A New Monoclonal Antibody, D2-40, for Detection of Lymphatic Invasion in Primary Tumors Department of Pathology, Sunnybrook and Women's College Health Sciences Centre (HJK, AM); and Banting and Best Department of Medical Research (AM), University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada, Vol. 82, No. 9, p. 1255.

**Harvey N, Williams M, Dvorak AM, Oliver G and Detmar M (2003)** : T1 $\alpha$ /podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema. EMBO J 22:3546-3556.

**Hawk W, Hazard J (1976)** . The many appearances of papillary carcinoma of the thyroid. Cleveland Clin Q;43:207-216.

**Hiroaki Yokomori, Masaya Oda, Fumihiko Kaneko, Shigeyuki Kawachi, Minoru Tanabe, Kazunori Yoshimura, Yuko Kitagawa<sup>3</sup>, Toshifumi Hibi(2010)**. Lymphatic marker podoplanin/D2-40 in human advanced cirrhotic liver- Re-evaluations of microlymphatic abnormalities.,BMC licensee BioMed Central Ltd. Gastroenterology , 10:131

**Hofman Paul (2011)** , Apport de la biologie moléculaire en pathologie thyroïdienne , REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES - - N°428

**Kaserer K, Scheuba C, Neuhold N, Weinhäusel A, Haas OA, Vierhapper H, Niederle B (2001)**. Sporadic versus familial medullary thyroid microcarcinoma: a histopathologic study of 50 consecutive patients. Am J Surg Pathol. Oct;25(10):1245-51. PMID: #11688458#

**Katharina Binza, Andreas Haldemannb, Ingrid Schweizerc, Thomas Gürtlerd, Christoph A. Meier (2008)**. Carcinome différencié de la thyroïde, Forum Med Suisse 2008;8(43):818-822.

**Kato Y, Kaneko MK, Nakazawa Y, Kunita A, Fujita N, Tsuruo T, Nishikawa R, Hirose T and Matsutani M (2006)**: Podoplanin expression in primary central nervous system germ cell tumors: a useful histological marker for the diagnosis of germinoma. Acta Neuropathol *III*: 563-568.

**Katsue Suzuki-Inoue; Yukinari Kato; Osamu Inoue; Mika Kato Kaneko; Kazuhiko Mishima; Yutaka Yatomi; Yasuo Yamazaki; Hisashi Narimatsu; Yukio Ozaki (2007)**, Involvement of the snake toxin receptor CLEC-2, in podoplanin-mediated platelet activation, by cancer cells. The Journal of biological chemistry , 282.

**Khurana KK,; Truong Ld ; Livolsi Va; Baloch Zw, (2003)**, cytokeratin 19 immunolocalization in cell block preparation of thyroid aspirates. An Adjunct to fine-needle aspiration Diagnosis of papillary Thyroid carcinoma. Arch Pathol Lab Med, 127:579-83.

**Kimura N and Kimura I (2005):** Podoplanin as a marker for mesothelioma. *Pathol Int* 55: 83-86.

**Laurent E, Mockel J, Van Sande J, Graff I, Dumont JE (1987)** Dual activation by thyrotropin of the phospholipase C and cyclic AMP cascades in human thyroid. *Mol Cell Endocrinol* 52:273-278

**Lazzaro D ; Price M ; De Felice M ; Di Lauro R; (1991)** , The transcription factor TTF-1 is expressed at ons of thyroid and lung morphogenesis and in restricted regions of the Foetal brain. *Development*; 113:11093-1104.

**Leux C (2012)**, Rôle des facteurs de risque familiaux, individuels et environnementaux dans les cancers de la thyroïde. Analyse d'études cas-témoins., UNIVERSITE PARIS SUD XI – FACULTE DE MEDECINE PARIS-SUD.ED 420

**Lin X; Zhu B ; Liu Y et al (2010)** ,Follicular thyroid carcinoma invades veneous rather than lymphatic vessels, *Diagn Pathol* , 5:8.

**Leenhardt L; Ménegaux F; Franc B, Hoang C, Salem S; Bernier M; Le marois E; Rouxel A, ( 2005)**, Cancers de la thyroïde, Thyroid cancer, EMC- Endocrinologie;2:1-38.

**LiVolsi Virginia (2011)**. Papillary thyroid carcinoma: an update, Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA, *Modern Pathology* 24, S1–S9

**Larisa V Debelenko1, Antonio R Perez-Atayde1, John B Mulliken, Marilyn G Liang, Tonora H Archibald1 and Harry PW Kozakewich (2005)** ,D2-40 immunohistochemical analysis of pediatric vascular tumors reveals positivity in kaposiform hemangioendothelioma, Department of Pathology, Children's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, USA;, USA, *Modern Pathology* 18, 1454–1460

**Lei Gong, Ping Chen, Xianjun Liu, Ying Han, Yanping Zhou, Weidong Zhang, Hong Li, Chuanjia Li, Jiang Xie (2012)** , Expressions of D2-40, CK19, galectin-3, VEGF and EGFR in papillary thyroid carcinoma, Department of Pathology, the Central Hospital of Jilin City, Jilin 132011, China , Vol 1, No 1 .

**Mansouri A ; Chowdhury K ;Gruss P.(1998)**. Follicular cells of the thyroid gland require Pax8 gene function. *Nat Genet* ;19 :8790

**MARIUS RAICA, ANCA MARIA CIMPEAN1 and DOMENICO RIBATTI (2008)**, The Role of Podoplanin in Tumor Progression and Metastasis, 1Department of Histology and Cytology, “Victor Babes” University of Medicine and Pharmacy, Timisoara, Romania; 2Department of Human Anatomy and Histology, Faculty of Medicine, University of Bari, Bari, Italy, *ANTICANCER RESEARCH* 28: 2997-3006

**Marsee DK, Pinkus GS, Hornick JL (2009)** ,Podoplanin (D2-40) is a highly effective marker of follicular dendritic cells. Department of Pathology, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. Mar;17(2):102-7.

**Marugo M ; Torr G ;Bernasco D ; ;Fazzouli L ; et al (1991)**. Androgen receptors in normal and pathological thyroid. *J. Endocrinol Invest* ; 14 :31-35.

**Nikiforov Ye; Otori Np (2009)**. Follicular carcinoma in diagnostic pathology and molecular genetics of the thyroid, Lippincott, Williams and Wilkins , 132-15.

**Omachi T, Kawai Y, Mizuno R, Nomiya T, Miyagawa S, Ohhashi T and Nakayama J (2007):** Immunohistochemical demonstration of proliferating lymphatic vessels in colorectal carcinoma and its clinicopathological significance. *Cancer Lett* 246: 167-172.

**Piccioli A, Prandoni P, Ewnstein BM, Goldhaber SZ (1996).** Cancer and venous thromboembolism. *Am. Heart J.* ;132(4):850–855. [PubMed]

**Prasad MI ; Pallegata NS ; Huang Y et al (2005),** Galectin-3;Fibronectin-1; HBME-1 and cytokeratine-19 immunohistochemistry is useful for differential diagnosis of thyroid tumors, *Mod Pathol*, , 18-48:57.

**Riesco-Eizaguirre G, Santisteban P ,(2007)** New insights in thyroid follicular cell biology and its impact in thyroid cancer therapy. *Endocr Relat Cancer* 14:957-977

**Ramzi S; Cotran ; Tucker C , (2000) ,** Anatomie pathologique : Robbins , Edition Piccin , Italie, 1672.

**Ryndak-swiercz ; Wemeau JL (2010).** Les maladies de la thyroïde.; Elsevier Masson;3-81

**Raman M, Chen W, Cobb MH (2007)** Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 26:3100-3112

**Roger P, Taton M, Van Sande J, Dumont JE (1988)** Mitogenic effects of thyrotropin and adenosine 3',5'-monophosphate in differentiated normal human thyroid cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 66:1158-1165

**Schacht V, Dadras SS, Johnson LA (2005),** Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors. *Am J Pathol.* Mar;166(3):913-21

**Sipos B, Klapper W, Kruse ML, Kalthoff H, Kerjanschki D and Kloppel G (2004):** Expression of lymphangiogenic factors and evidence of intratumoral lymphangiogenesis in pancreatic endocrine tumors. *Am J Pathol* 165: 1187-1197.

**Shchors K, Evan G (2007) :**Tumor angiogenesis: cause or consequence of cancer, *Cancer Res* 67:7059-7061

**Sobrinho M ; Maximo V; Castro IV et al (2005) ;** Hurthle (oncocytic) Cell tumors of thyroid : ethiopathogenesis, diagnosis and clinical significance, *Int J Surg Pathol*, , 13:29-35.

**Sang-Hyuk Lee, Sung-Jin Lee, Dong-Hoon Kim, Seung-Wan Chae, ·Jin-Hee Sohn, M·Won-Serk Kim, (2012).** Relationships between Lymph Node Metastasis and Expression of CD31, D2-40, and Vascular Endothelial Growth Factors A and C in Papillary Thyroid Cancer, *Clinical and Experimental Otorhinolaryngology* Vol. 5, No. 3: 150-155.

**Shahnaz Begum, Eli Rosenbaum, Rui Henrique, Yoram Cohen, David Sidransky and William H Westra( 2013).** *BRAF* mutations in anaplastic thyroid carcinoma: implications for tumor origin, diagnosis and treatment. *J Korean Med Sci* ;28(4):534-541

**Sheikh HA, Tometsko M, Niehouse L et al (2004).** Molecular genotyping of medullary thyroid carcinoma can predict tumor recurrence.*Am J Surg Pathol*,28 :101-106.

**Schlumberger MJ, Filetti S, Hay ID (2003).** Non toxic goiter and thyroid neoplasia. In: Larsen RP, Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, editors. *Williams' Textbook of Endocrinology*. 10th edition. Philadelphia: WB Saunders Company; . p. 457–90

**Schlumberger M, (2007),** Cancer papillaire et folliculaire de la thyroïde, *Annales d'Endocrinologie* , 68 : 1

**Tamar A Giorgadze, Zubair W Baloch, Teresa Pasha, Paul J Zhang and Virginia A LiVolsi (2005).** Lymphatic and blood vessel density in the follicular patterned lesions of thyroid, *Modern Pathology* : 18, 1424–1431

**Thomas Parsons J, Jill Slack-Davis, Robert Tilghman, et al. (2008)** Focal Adhesion Kinase: Targeting Adhesion Signaling Pathways for Therapeutic Intervention, *Clin Cancer Res* 2008;14:627-632.

**Tuomas Tammela and Kari Alitalo (2010).** Lymphangiogenesis: Molecular Mechanisms and Future Promise, *1Molecular/Cancer Biology Laboratory and Haartman Institute, Biomedicum Helsinki, P.O.B. 63 (Haartmaninkatu 8), 00014 University of Helsinki, Finland, Cell 140, Elsevier Inc.*

**Vandeput F, Perpete S, Coulonval K, Lamy F, Dumont JE (2003)** Role of the different mitogen-activated protein kinase subfamilies in the stimulation of dog and human thyroid epithelial cell proliferation by cyclic adenosine 5'-monophosphate and growth factors. *Endocrinology* 144:1341-1349

**Vielh P; Mansuet L ; Polivka M; saada M , (2006),** Le point sur l'immunocytochimie et sur son interet dans la prise en charge des nodules thyroïdiens, *ann Pathol*; 26:340-5.

**Wemeau JL ; Ryndak-swiercz ( 2010).** Les maladies de la thyroïde.; Elsevier Masson;3-81

**Wissmann C (2006),** Detmar M. Pathways targeting tumor lymphangiogenesis. *Clin Cancer Res* ; 12, 6865-8.

**Wemeau JL ; Do Cao ;(2008).** Cancers anaplasiques de la thyroïde, *annales d'endocrinologie* ; 69 : 174-180

**Xing M ; (2005).**BRAF mutation in in thyroid cancer (review).*ENdoc Relat Cancer*, 12 :245-62.

## Annexe A

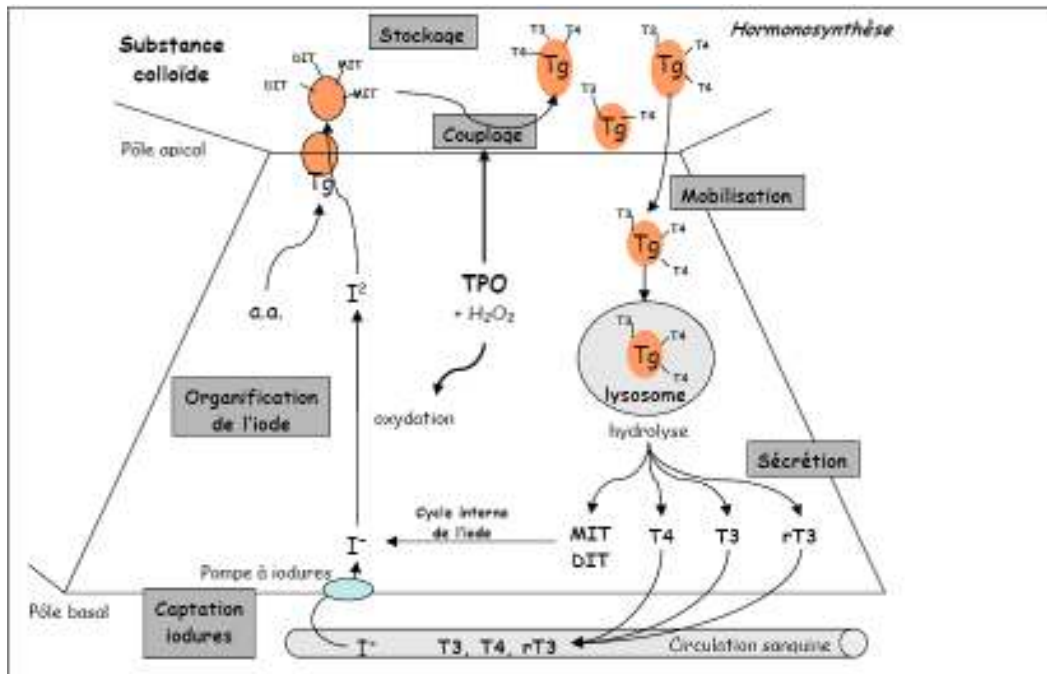


Figure 1 : Etapes de l'hormonogènes thyroïdienne.



Figure 2 : La régulation de la biosynthèse des hormones thyroïdiennes suivant L'axe hypothalamo-hypophysaire



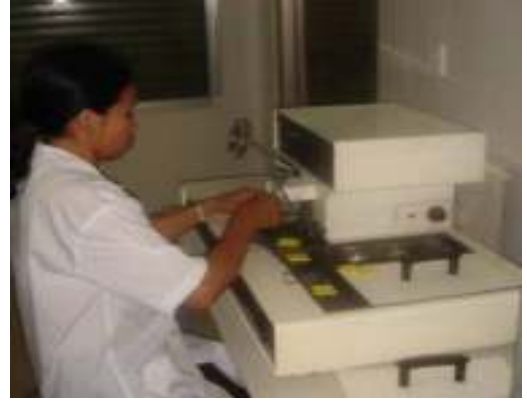
## Annexe B

### APPAREILLAGE , MATERIELS ET REACTIFS

#### 1- Appareillage



**Appareil de circulation automatique**



**Appareil d'enrobage type Leica**



**Appareil de coloration**



**Etuve thermostat**



**Bain marie**



### Anticorps primaires D2-40 :

Réactifs fournis	Anticorps monoclonal de souris prêt à l'emploi fourni sous forme liquide dans un tampon contenant une protéine stabilisante et 0,015 mol/L d'azide de sodium. /6ml dilué Clone: ISO72 D2-40. Isotype: IgG1, kappa.
Immunogène	O-glycoprotéine.
Spécificité	L'anti-D2-40 monoclonal a été testé par analyse Western blot de lysats cellulaires provenant de diverses lignées cellulaires tumorales. La D2-40 a identifié une bande de 40 kD dans les immunoblots de cellules HEY de carcinome épithélial ovarien et une forme , carcinome épithélial ovarien, de cellules PA-1PA-1 de tératocarcinome ovarien, de cellules Tera-1 et Tera-2 de tératocarcinome testiculaire, de cellules 833 de carcinome embryonnaire, de cellules RT-4 de carcinome transitionnel de la vessie et de cellules U-2 OS d'ostéosarcome. Des réactivités ont été observées dans les tests Western blot d'autres lignées cellulaires tumorales provenant de divers cancers.1 . Le traitement des protéines ou des cellules par O-sialoglycoprotéase détruit l'immunoréactivité de la D2-40 lors d'un Western blot et d'une cytométrie de flux, prouvant que l'antigène reconnu par la D2-40 est une O-glycoprotéine.1
Précautions	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Pour utilisateurs professionnels.</li><li>2. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN<sub>3</sub>), produit chimique hautement toxique dans sa forme pure. Aux concentrations du produit, bien que non classé comme dangereux, l'azide de sodium peut réagir avec le cuivre et le plomb des canalisations et former des accumulations d'aides métalliques hautement explosifs. Lors de l'élimination, rincer abondamment à l'eau pour éviter toute accumulation d'azide métallique dans les canalisations.</li><li>3. Comme avec tout produit d'origine biologique, des procédures de manipulation appropriées doivent être respectées.</li><li>4. Porter un vêtement de protection approprié pour éviter le contact avec les yeux et la peau.</li><li>5. Les solutions non utilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales et nationales.</li></ol>
Conservation	Conserver entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption indiquée sur le flacon. Si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles indiquées, celles-ci doivent être validées par l'utilisateur. Il n'y a aucun signe

	<p>évident indiquant l'instabilité de ce produit. Par conséquent, des contrôles positifs et négatifs doivent être testés en même temps que les échantillons de patient. Si une coloration inattendue est observée, qui ne peut être expliquée par un changement des procédures du laboratoire, et en cas de suspicion d'un problème lié à l'anticorps, contacter l'assistance technique de Dako.</p>
--	--

Prospectus de l'anticorps monoclonal D2-40 Dako.

**Préparation des solutions :**

**Solution Tampon :**

**PBS :**

Nacl.....880g

HNo<sub>2</sub> Po<sub>4</sub>,12H<sub>2</sub>O.....27g

H<sub>2</sub>KaPo<sub>4</sub>,2H<sub>2</sub>O.....4g

H<sub>2</sub>O.....1L

A diluer 10 fois avant l'utilisation

**Eau Ammoniacale :**

Eau distillé :1000 ml

Ammoniaque : 2 ml

**Tampon Citrate : 10ml, pH :9**

Solution A : Acide citrique 0.1M(21g/l H<sub>2</sub>O distillée)

Solution B : Citrate de sodium 0.1(29.41g/l H<sub>2</sub>O distillé)

Mélange 18ml de Solution A à 82 ml de solution B, compléter H<sub>2</sub>O pour 1000 ml.

## Annexe C

**Tableau 01** : Répartition des patients selon l'âge :

Age [ans]	Nombre	Pourcentage
[0-20]	1	1,63%
[21-40]	22	36,06%
[41-60]	24	39,34%
[61-70]	10	16,39%
>70	4	7%
Total	61	100%

**Tableau 02** : Répartition des patients selon le sexe :

Sexe	Nombre	Pourcentage
Homme	9	14,75%
Femme	52	85,24%
Total	61	100%

**Tableau 03** : Répartition des patients selon le type histologique :

Type histologique	Nombre	Pourcentage
Carcinomes papillaires	57	93,44%
Carcinomes médullaires	1	1,63%
Carcinomes anaplasiques	1	1,63%
Carcinomes peu différenciés	2	3,27%
Carcinomes vésiculaires	0	0,00%
Total	61	100%

**Tableau 04** : Répartition des patients selon les variétés histologiques des différentes variantes du carcinome papillaire (CP) :

variantes histologiques des carcinomes papillaires	Nombre	Pourcentage
CP classique	16	28,07%
CP trabéculaire	4	7,01%
CP encapsulé	10	17,54%
CP sclérosant diffus	1	1,75%
CP oncocytaire	5	8,77%
CP vésiculaire	7	12,28%
MCP	14	24,56%
Total	57	100%

**Tableau 05** : Répartition en pourcentage selon les critères d'invasions et d'atteintes ganglionnaires des carcinomes thyroïdiens.

Critères d'invasions et d'atteintes ganglionnaires	Nombre de cas	Pourcentage
Nombre CP invasifs avec atteintes ganglionnaires	18	31,57%
Nombre CP non invasifs sans atteintes ganglionnaire	20	35,08%
Nombre CP invasif mais sans atteintes ganglionnaires	19	33,33%
Ensemble des CP thyroïdiens	57	100%