



HAL
open science

Ciblage pharmacologique des récepteurs couplés aux protéines G dans les tumeurs endocrines pour un repositionnement moléculaire: exemple du cancer thyroïdien réfractaire à l'iode radioactif

Valentine Suteau

► **To cite this version:**

Valentine Suteau. Ciblage pharmacologique des récepteurs couplés aux protéines G dans les tumeurs endocrines pour un repositionnement moléculaire: exemple du cancer thyroïdien réfractaire à l'iode radioactif. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers, 2022. Français. NNT : 2022ANGE0023 . tel-04224306

HAL Id: tel-04224306

<https://theses.hal.science/tel-04224306>

Submitted on 2 Oct 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE D'ANGERS

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : Biologie Cellulaire

Par

Valentine SUTEAU

**Ciblage pharmacologique des récepteurs couplés aux protéines G
dans les tumeurs endocrines pour un repositionnement moléculaire**
Exemple du cancer thyroïdien réfractaire à l'iode radioactif

Thèse présentée et soutenue à Angers le 4 octobre 2022

Unité de recherche : MITOVASC UMR Inserm U1083 - CNRS 6015

Rapporteurs avant soutenance :

Isabelle BEAU
Samia MOURAH

Chargé de Recherche Hors Classe INSERM, Université Paris Saclay
Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Université Paris Cité

Composition du Jury :

Président : Marie-Christine COPIN
Examineur : Estelle LOUISET
Dir. de thèse : Patrice RODIEN
Co-dir. de thèse : Claire BRIET
Université d'Angers

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Université d'Angers
Chargé de Recherche Hors Classe INSERM, Université de Rouen
Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Université d'Angers
Maître de conférences des Universités-Praticien Hospitalier,

Invité

Mathilde Munier

Docteur ès sciences, Université d'Angers

L'auteur du présent document vous autorise à le partager, reproduire, distribuer et communiquer selon les conditions suivantes :



- Vous devez le citer en l'attribuant de la manière indiquée par l'auteur (mais pas d'une manière qui suggérerait qu'il approuve votre utilisation de l'œuvre).
- Vous n'avez pas le droit d'utiliser ce document à des fins commerciales.
- Vous n'avez pas le droit de le modifier, de le transformer ou de l'adapter.

Consulter la licence creative commons complète en français :
<http://creativecommons.org/licences/by-nc-nd/2.0/fr/>



Aux différents membres du Jury,

Je remercie **Madame le Docteur Isabelle BEAU** et **Madame le Professeur Samia MOURAH** d'avoir accepté d'être rapporteurs de mon travail de thèse. Je tiens également à remercier **Madame le Docteur Estelle LOUISET** de prendre part à mon jury de thèse en tant qu'examinateur. Enfin, je remercie **Madame le Professeur Marie-Christine COPIN** d'avoir accepté de présider mon jury de thèse.

A Monsieur le Professeur Patrice RODIEN,

Merci de m'avoir fait partager votre goût pour la recherche et pour l'endocrinologie. Je vous remercie pour votre disponibilité et vos conseils. Merci également pour la relecture de ce travail en plein COVID !

A Madame le Docteur Claire BRIET,

Merci pour ta simplicité et ton soutien. Je te remercie pour ton suivi depuis mon internat jusqu'à aujourd'hui. Que tous nos projets de recherche puissent voir le jour !

A Madame le Docteur Mathilde MUNIER,

Merci de m'avoir fait découvrir le monde de la recherche au cours de mon master 2. Merci de m'avoir dit un jour « tu ne t'es jamais posée la question d'une thèse de sciences ? ». Je te remercie pour ta disponibilité et tes nombreux conseils. Merci également pour la relecture de ce travail.

A Monsieur Louis GOURDIN,

Je te remercie de m'avoir initiée aux différentes techniques du laboratoire au cours de mon master 2. Je te remercie pour ton aide et ta collaboration à ce projet. Nous avons pu découvrir ensemble de nouvelles techniques pour « The » technicien.

A Monsieur le Docteur Daniel HENRION,

Je vous remercie de m'avoir permis la réalisation de cette thèse au sein de votre laboratoire.

A Mesdames les Professeurs Anne BARLIER et Delphine PRUNIER,

Je vous remercie d'avoir fait partie de mon comité de suivi de thèse. Vos remarques ont été très constructives et bienveillantes sur mon travail.

J'adresse mes remerciements aux personnes qui m'ont aidée dans la réalisation de ce travail.

A Mesdames les Docteurs Valérie THEPOT et Méline WERY,

Je vous remercie pour votre aide pour la gestion des bigdata et les analyses bioinformatiques.

Au service d'anatomopathologie du CHU d'Angers,

Je remercie en particulier **Madame le Professeur Marie-Christine ROUSSELET** et **Madame Lydie DENECHAUD** pour la relecture et la préparation des lames. Je remercie également **Monsieur le Docteur Alexandre COLLIN** ; merci Alexandre pour ton aide sur les analyses immunohistochimiques sur quelques cellules d'ascite !

A la plateforme Génomique de l'Institut Curie,

Je remercie en particulier **Monsieur David GENTIEN** et **Mesdames Cécile REYES** et **Audrey RAPINAT** pour leur accompagnement dans l'analyse NanoString nCounter.

Au service de Génomique Onco-Hématologique du CHU d'Angers,

Je remercie en particulier **Monsieur le Professeur Philippe GUARDIOLA** et **Mesdames les Docteurs Diane LAMBERT** et **Estelle PEDRONO** pour leur aide dans la caractérisation génétique des lignées cellulaires. Je remercie également **Monsieur le Docteur Jonathan DAUVE** pour les analyses de RNA-Seq.

A l'ensemble du service de Pharmacologie-Toxicologie du CHU d'Angers,

Je remercie en particulier **Madame le Professeur Marie BRIET** et les **Docteurs Sarah GHAMRAWI** et **Flavien BESSAGUET**. Merci pour votre aide dans la conception et la réalisation du criblage pharmacologique. J'espère que notre collaboration va se poursuivre pour tester encore davantage de combinaisons !

REMERCIEMENTS

Aux membres de la GPCR Team,

Ma très chère Rym, merci d'avoir partagé ce bureau pendant quasiment 4 ans. Je te remercie de m'avoir fait découvrir la bioinformatique, les heat map, les volcano plot, R Studio. Merci aussi pour ton collier de cachalot ! Merci à tous les membres du bureau de la GPCR Team qui ont partagé ce bureau un peu moins longtemps mais qui ont permis de le rendre toujours aussi vivant : Asma, Maria, Fabienne, Marvin, Louise.

Aux membres de l'équipe « Carme » du laboratoire MitoVasc,

Merci pour votre accueil, vos conseils et votre présence. Je remercie en particulier « les filles » pour tous nos points potins !

Aux médecins et internes du service,

Merci pour le suivi des patients inclus dans ce travail de thèse. Je vous remercie pour votre soutien dans ce projet.

A mes chers co-chefs de clinique,

Paul, Justine, Rodolphe, merci pour le temps passé ensemble... et le temps libéré pour que je puisse aller au labo !

A mes parents, à mes sœurs,

Je vous remercie pour votre soutien et votre présence tout au long de ces années.

A Pierre-Yves, à Constance,

Merci...!

Sommaire

LISTE DES ABREVIATIONS

GLOSSAIRE MEDICAL

AVANT-PROPOS

INTRODUCTION GENERALE

1. Cancer de la thyroïde

- 1.1. Physiologie de la thyroïde
- 1.2. Epidémiologie
- 1.3. Classification histologique
- 1.4. Anomalies génétiques du cancer différencié de la thyroïde
 - 1.4.1. Mutations constitutionnelles
 - 1.4.2. Anomalies génétiques somatiques
 - a) Généralités
 - b) Mutations de RAS
 - c) Mutation de BRAF
 - d) Mutation de EIF1AX
 - e) Réarrangements de RET/PTC
 - f) Réarrangements de PPARγ-PAX8
 - g) Autres anomalies génétiques
- 1.5. Facteurs pronostiques
 - 1.5.1. Facteurs associés à la mortalité lié au cancer de la thyroïde
 - 1.5.2. Facteurs associés à la persistance ou la récurrence du cancer thyroïdien
- 1.6. Traitement standard du cancer différencié de la thyroïde
 - 1.6.1. Traitement initial
 - a) Chirurgie
 - b) Radiothérapie métabolique
 - c) Hormonothérapie
 - 1.6.2. Traitement des récives loco-régionales
 - 1.6.3. Traitement des métastases à distance
- 1.7. Cancer thyroïdien métastatique réfractaire à l'iode radioactif
 - 1.7.1. Définition
 - 1.7.2. Traitement
 - a) Indication à l'initiation d'un traitement systémique
 - b) Traitement systémique par thérapies ciblées
 - c) Immunothérapie
 - d) Redifférenciation thyroïdienne
- 1.8. Combinaison de traitements dans le cancer thyroïdien réfractaire
 - 1.8.1. Combinaison de traitements en cancérologie
 - 1.8.2. Combinaisons testées dans le traitement du cancer thyroïdien réfractaire
 - a) Combinaisons avec une chimiothérapie classique
 - b) Combinaison d'inhibiteurs de kinases
 - c) Immunothérapie
 - d) Autres combinaisons de traitement

2. Les récepteurs couplés aux protéines G et cancer

- 2.1. Généralités sur les RCPG
 - 2.1.1. Structure
 - 2.1.2. Classification
 - a) Classe A (« Rhodopsin-like »)
 - b) Classe B (« Secretin-like »)
 - c) Récepteurs d'Adhésion
 - d) Classe C (Glutamate)
 - e) Classe F (Frizzled)
- 2.2. Anomalies génétiques des RCPG associés au cancer
- 2.3. Modifications d'expression des RCPG associées au cancer
- 2.4. Implication des RCPG dans le processus tumoral
 - 2.4.1. Rôle des RCPG dans le développement du cancer

- 2.4.2. Rôle des RCPG dans l'angiogenèse tumorale
- 2.4.3. Rôle des RCPG dans le développement des métastases
- 2.5. Voies de signalisation des RCPG impliquées dans le cancer
 - 2.5.1. Voies de signalisation couplées aux protéines G
 - 2.5.2. Voies de signalisation de la bêta-arrestine
 - 2.5.3. Voie WNT- β -caténine
 - 2.5.4. Voie Sonic HedgeHog
 - 2.5.5. Voie Hippo
 - 2.5.6. Transactivation des récepteurs à activité tyrosine kinase
- 2.6. Pharmacologie des RCPG
 - 2.6.1. Différents modes d'action des médicaments
 - a) Agoniste
 - b) Agoniste inverse
 - c) Antagoniste
 - d) Modulateur allostérique
 - e) Ligand biaisé
 - 2.6.2. Médicaments sur le marché ciblant les RCPG
 - 2.6.3. Médicaments ciblant les RCPG en cancérologie
 - 2.6.4. Peptides radiomarqués

HYPOTHESES ET OBJECTIFS DE TRAVAIL

PARTIE I : ETUDE DE L'EXPRESSION DES RECEPTEURS COUPLES AUX PROTEINES G DANS LE CANCER THYROÏDIEN REFRACTAIRE A L'IODE RADIOACTIF

1. Introduction

- 1.1. Récepteurs couplés aux protéines G et cancer de la thyroïde
 - 1.1.1. Récepteur de la TSH
 - 1.1.2. Le récepteur CD97/ADGRE5
 - 1.1.3. Récepteurs aux chimiokines
 - 1.1.4. Récepteurs aux phospholipides
 - 1.1.5. GPCRome dans le cancer de la thyroïde
- 1.2. Techniques de détection et de quantification à haut débit des ARN messager codant pour des récepteurs couplés aux protéines G
 - 1.2.1. TaqMan low-density array
 - 1.2.2. Puce à ADN ou *microarray*
 - 1.2.3. La technologie RNA-sequencing (RNA-seq)
 - 1.2.4. Le système d'analyse nCounter (technologie NanoString)
- 1.3. Repositionnement moléculaire et cancer
 - 1.3.1. Méthodologies du repositionnement moléculaire
 - a) Approches expérimentales
 - b) Approches *in silico*
 - 1.3.2. Repositionnement moléculaire et cancer de la thyroïde
 - 1.3.3. Repositionnement moléculaire et RCPG en cancérologie
- 1.4. Objectifs

2. Article 1

3. Discussion

- 3.1. Identification des RCPG avec une expression différentielle
- 3.2. Facteurs pronostiques
- 3.3. Ciblage thérapeutique spécifique

PARTIE II : CRIBLAGE PHARMACOLOGIQUE DES MOLECULES CIBLANT LES RECEPTEURS COUPLES AUX PROTEINES G DANS LE CANCER THYROÏDIEN REFRACTAIRE A L'IODE RADIOACTIF

1. Introduction

- 1.1. Médecine personnalisée
- 1.2. Modèles cellulaires utilisés
 - 1.2.1. Lignées cellulaires
 - 1.2.2. Prélèvement *ex vivo*
- 1.3. Etudes de combinaisons de traitements
 - 1.3.1. Méthodologie
 - a) Généralités

- b) Highest single agent (HSA)
- c) Modèle de Bliss
- d) Modèle de Loewe
- 1.3.2. Validation d'une méthode de criblage pharmacologique
- 1.4. Objectifs
- 2. Article 2**
- 3. Discussion**
- 3.1. Résultats principaux
- 3.2. Détection de l'expression de l'ARNm des RCPG dans les lignées cellulaires
- 3.2.1. Panel des RCPG utilisés pour le criblage pharmacologique
- 3.2.2. Profil d'expression des ARNm codant pour les RCPG dans les lignées thyroïdiennes
- 3.3. Criblage pharmacologique
- 3.3.1. Vilazodone
- 3.3.2. Vortioxetine
- 3.3.3. Fingolimod
- 3.4. Du prélèvement ex-vivo à la création d'une lignée cellulaire

PARTIE III : ATLAS DES RECEPTEURS COUPLES AUX PROTEINES G DANS LES TUMEURS NEUROENDOCRINES

- 1. Introduction**
- 1.1. Cancer médullaire de la thyroïde
- 1.2. Tumeurs neuroendocrines hypophysaires
- 1.3. Phéochromocytome et paragangliome
- 1.4. Corticosurréalome
- 1.5. Objectifs
- 2. Article 3**
- 3. Discussion**
- 3.1. Résultats principaux
- 3.2. Approche bio-informatique pour le profil transcriptomique des récepteurs couplés aux protéines G
- 3.3. Expression différentielle des récepteurs couplés aux protéines G entre tissu sain et tissu tumoral dans les tumeurs endocrines
- 3.3.1. Cancer médullaire de la thyroïde
- 3.3.2. Tumeurs neuroendocrines hypophysaires (PitNET)
- 3.3.3. Phéochromocytome et paragangliome
- 3.3.4. Corticosurréalome
- 3.3.5. Récepteurs communs entre les tumeurs
- 3.4. Repositionnement moléculaire des RCPG dans les tumeurs endocrines
- 3.5. Facteurs associés aux profils d'expression différentielles des RCPG
- 3.6. Conclusion

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

BIBLIOGRAPHIE

TABLE DES MATIERES

TABLE DES FIGURES

TABLE DES TABLEAUX

VALORISATION DU TRAVAIL DE THESE

- 1. Publications**
- 2. Communications orales**
- 3. Autres publications en lien avec la thématique**
- 4. Prix**

Liste des abréviations

ACE	Antigène CarcinoEmbryonnaire
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ALK	Anaplastic Lymphoma Kinase
AMM	Autorisation de mise sur le marché
AMPc	Adenosine 3',5' Monophosphate cyclique
ARN	Acide Ribonucléique
ATA	American Thyroid Assciation
CCLC	Cancer Cell Line Encyclopedia
CMT	Cancer médullaire de la thyroïde
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EIF1AX	Eukaryotic Translation Initiation Factor 1A X-Linked
EMA	European Medicines Association
EPP	Erythrodysesthésie palmo-plantaire
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
DAG	Diacylglycérol
FDA	Food and Drug Administration
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
FSH	Follicle Stimulating Hormone
GDP	Guanosine Diphosphate
GEO	Gene Expression Omnibus
GIRK	G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channels
GPL	GEP Platform
GRK	G protein-coupled receptor kinase
GSE	GEO Series
GSM	GEO Sample
GTE	Genotype-Tissue Expression
GTP	Guanosine Triphosphate
HSA	Highest Single Agent
HER	Human Epidermal Growth Factor Receptor
HH	Hedgehog
IP3	Inositol Trisphosphate
ITK	Inhibiteur de tyrosine kinase
IUPHAR	International Union of Basic and Clinical Pharmacology
LH	Luteinizing Hormone
LPA	Lysophosphatidic acid
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MEK	MAP/ERK kinase-1

MiRNA	micro-ARN
MTOR	Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase
NEM	Néoplasie Endocrinienne Multiple
NGS	Nex-Generation Sequencing
NIS	NaI Symporter
NTRK	Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PAX8	Paired Box 8
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PD-L1	Programmed Cell Death Ligand-1
PD1	Programmed Cell Death-1
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PKA	Protéine Kinase A
PKC	Protéine Kinase C
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog
RANK-L	Receptor activator of nuclear factor κ B-Ligand
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
RET	REarranged during Tansfection
RGS	Regulator of G protein-signaling
RTK	Récepteur à activité tyrosine kinase
S1P	Sphingosine 1 Phosphate
SMO	Smoothened
SiRNA	Small interfering RNA
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TDLA	Taqman Low density Array
TEP	Tomographie à Emission de Positions
TERT	Telomerase reverse transcriptase
TG	Thyroglobuline
TNE	Tumeurs Neuro-Endocrines
TNM	Tumor-Node-Metastasis
TPO	Thyroperoxydase
TSH	Thyroid Stimulating Hormone
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VIP	Vasoactive Intestinal Peptide
ZIP	Zero Interaction Potency

Glossaire médical

Alopécie : chute des cheveux.

Dysgueusie : altération du goût.

Dyspnée : sensation de gêne respiratoire ressentie par le patient.

Erythrodysesthésie palmo-plantaire : appelée également syndrome main-pied. Il s'agit d'une réaction inflammatoire qui fragilise les micro-vaisseaux des mains et des pieds. Les premiers signes sont des rougeurs dans la paume des mains et sur la plante des pieds avec une sensibilité augmentée de la peau, des fourmillements ou une sensation de brûlures. L'évolution peut se faire vers une peau très sèche avec épaissement de la peau et desquamation.

Glossite : Inflammation de la langue.

Glossodynie : Douleur de la langue.

Mucite : Inflammation des muqueuses de la bouche ou du système digestif. Elle se manifeste par une rougeur, une douleur et des aphtes.

Myalgies : douleurs musculaires.

Papillome cutané : tumeur bénigne de la peau liée à une infection de la peau à un virus appelé papillomavirus.

Paresthésies : Trouble sensitif se traduisant par une sensation anormale, non douloureuse, ressentie sur la peau, tels que des fourmillements ou un engourdissement.

Stomatite : inflammation aiguë des muqueuses buccales.

Avant-propos

Ma première fascination pour les hormones remonte à la première S et la découverte du rétrocontrôle négatif. J'ai ensuite découvert l'endocrinologie dans le service d'Endocrinologie-Diabétologie-Nutrition du CHU d'Angers dès mes premières années de médecine ce qui a permis de confirmer mon choix vers cette spécialité. J'ai ainsi débuté mon internat en Endocrinologie-Diabétologie-Maladies métaboliques en 2013 au sein du CHU d'Angers.

Mes premiers pas dans le monde de la recherche se sont faits au sein du laboratoire UMR CNRS 6015 - INSERM U1083 en 2016-2017 dans l'équipe de recherche « *G-protein-coupled-receptors in Endocrinology and Metabolism: from molecular mechanisms to pathophysiology* » dirigée par le Professeur Patrice RODIEN, avec la réalisation d'un Master 2 « Endocrinologie et Métabolisme ». L'objectif de l'équipe est de mieux comprendre la régulation de la signalisation de plusieurs Récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) impliqués dans des conditions physiopathologiques. Le premier axe développé par cette équipe porte sur l'étude de l'impact des composés environnementaux sur la signalisation des RCPG. Ainsi, mon stage au sein du laboratoire a porté sur l'étude des effets *in vitro* des perturbateurs endocriniens sur l'activité d'un RCPG, appelé RXFP2, impliqué, en outre, dans la descente testiculaire. Ceci a été valorisé par une publication en 2020 dans *Environment International*. Ce travail pendant 1 an au sein du laboratoire a confirmé mon attrait pour la recherche et m'a permis d'acquérir des compétences techniques.

Voulant relier la pratique clinique et de recherche, le choix du projet de thèse s'est plutôt orienté vers un projet translationnel portant sur le cancer de la thyroïde. En effet, sur le plan clinique, le service est très impliqué dans le traitement des cancers endocriniens et en particulier du cancer de la thyroïde. Ainsi, il est apparu que la gestion des effets secondaires des nouvelles thérapies ciblées de type inhibiteur de tyrosine kinase (ITK) était une problématique importante limitant la prescription de la dose recommandée sur une longue durée. Au vu de l'expertise sur le plan fondamental de l'équipe de recherche dans le domaine des RCPG et en lien avec les données émergentes des RCPG dans le domaine du cancer, l'idée a alors germé sur la possibilité d'un double ciblage pharmacologique associant les ITK au ciblage des RCPG pour augmenter en sensibilité et spécificité.

La rédaction de cette thèse se présente sous un format article. Elle débute avec une introduction générale sur le cancer de la thyroïde et sur l'implication des RCPG dans le domaine du cancer. Les résultats sont présentés en 3 parties. La première porte sur l'évaluation de l'expression des RCPG au sein des cancers thyroïdiens et présente un article publié en 2021 dans *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. La seconde partie concerne l'évaluation *in vitro* d'un ciblage pharmacologique des RCPG par du repositionnement de médicaments avec un article en préparation. Enfin, la dernière partie présente une analyse bio-informatique des données d'expression existantes des RCPG au sein des principales tumeurs endocrines après le cancer thyroïdien et présente un article publié en 2022 dans *Cells*. L'ensemble des résultats obtenus seront discutés ainsi que les perspectives ouvertes par ces études.

Introduction générale

1. Cancer de la thyroïde

1.1. Physiologie de la thyroïde

La glande thyroïde, dans l'espèce humaine, est une glande située à la base du cou, composée de deux lobes séparés par un isthme central. La thyroïde est constituée de deux grands types de cellules, à savoir les cellules folliculaires, produisant les hormones thyroïdiennes (thyroxine, T4, et triiodothyronine, T3), et les cellules parafolliculaires, ou cellules C, sécrétant la calcitonine (Figure 1). La sécrétion de T4 et de T3 est régulée par la TSH (*thyroid stimulating hormone*), hypophysaire. La sécrétion de TSH est stimulée par la TRH hypothalamique et inhibée par la Somatostatine. Les T4 et T3 exercent un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de TSH et de TRH (Figure 1). La sécrétion de calcitonine est indépendante du contrôle de la TSH.

Le follicule thyroïdien est l'unité fonctionnelle de la thyroïde. Il est composé d'un épithélium de cellules folliculaires. Ces cellules sont disposées autour d'une lumière centrale contenant la colloïde. Celle-ci contient principalement de la thyroglobuline (TG), sécrétée par les cellules folliculaires. La TG assure le stockage de l'iode et constitue le précurseur des hormones thyroïdiennes. La TSH active toutes les étapes de la synthèse des hormones thyroïdiennes depuis la captation de l'iode par le symporteur NIS (*NaI Symporter*) jusqu'à la sécrétion hormonale ainsi que la synthèse des enzymes clef de la synthèse hormonale comme la thyroperoxydase (TPO) (Figure 1).

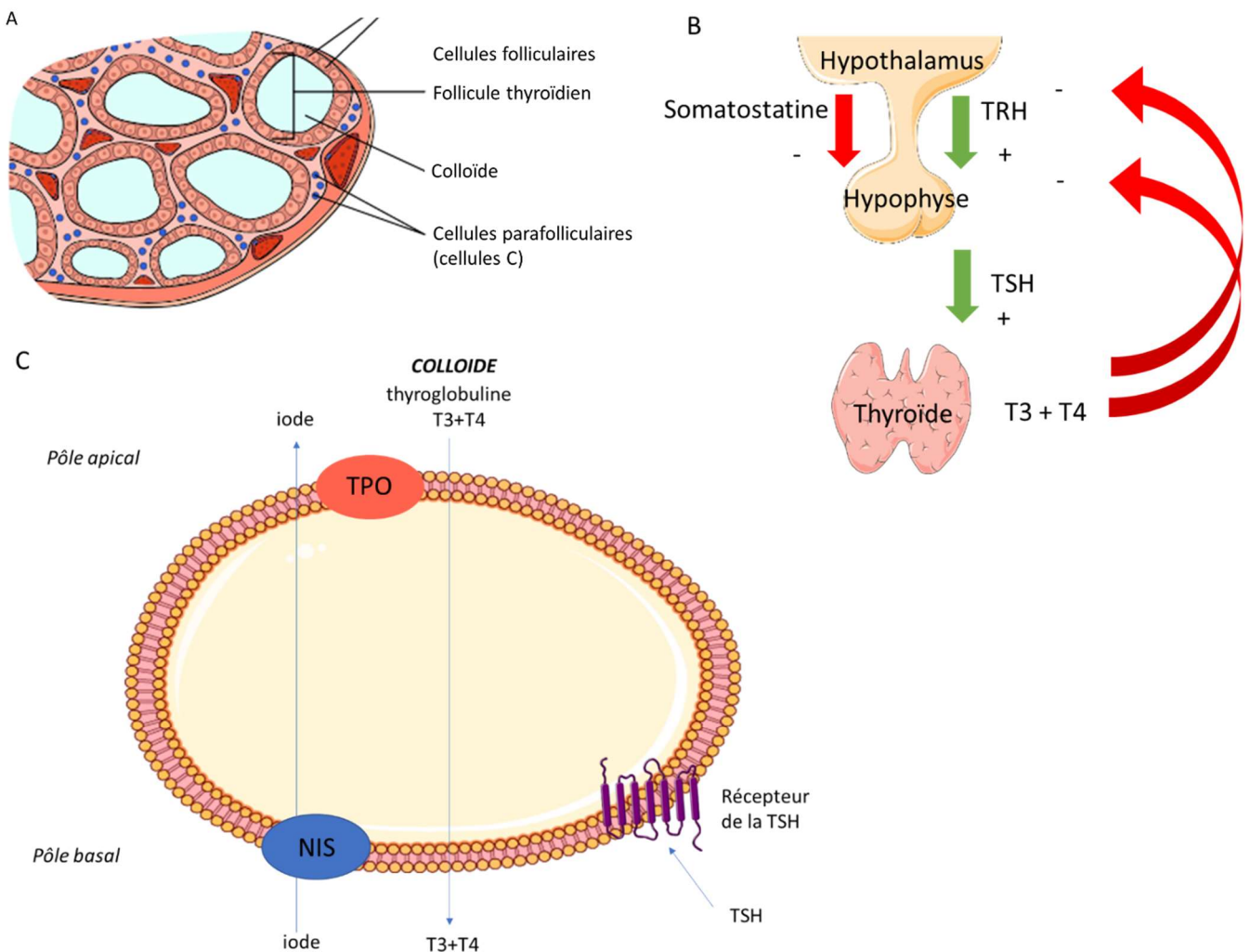


Figure 1 : Structure et fonction de la thyroïde.

(A) Schéma illustrant les cellules folliculaires et para folliculaires thyroïdiennes qui composent la glande thyroïde. (B) Contrôle physiologique de la sécrétion de TSH. (C) Synthèse des hormones thyroïdiennes. Les cellules folliculaires sont le siège de la synthèse des hormones thyroïdiennes. Celle-ci nécessite la captation et le transport de l'iode par NIS, puis l'oxydation et l'organification de l'iode et le couplage des précurseurs des hormones thyroïdiennes par la thyroperoxydase (TPO). La thyroglobuline porteuse des hormones thyroïdiennes est stockée dans la cavité colloïde. Les hormones thyroïdiennes sont libérées dans la circulation sanguine par protéolyse de la thyroglobuline (TG).

1.2. Epidémiologie

Le cancer de la thyroïde est le cancer le plus fréquent parmi l'ensemble des tumeurs endocrines. Il a été responsable de 586 000 nouveaux cas dans le monde en 2020, ce qui le place au neuvième rang en termes d'incidence (Figure 2) ¹. L'incidence est trois fois plus importante chez la femme que chez l'homme avec 449 000 nouveaux cas chez la femme en 2020 contre 137 000 cas chez l'homme ¹. En France, selon le dernier rapport épidémiologique de l'Institut national du cancer, on estime à 10 665 le nombre de nouveaux cas de cancer de la thyroïde soit 1,3 % des cancers chez l'homme et 4,5 % chez la femme. L'âge moyen au diagnostic est d'environ 50 ans. Il affecte très rarement l'enfant et sa fréquence augmente avec l'âge. L'incidence du cancer de la thyroïde

a connu une forte augmentation dans de nombreux pays ces dernières années, en particulier chez l'adulte ^{2,3}. Ceci est expliqué en grande partie par la réalisation plus fréquente d'exams d'imagerie, en particulier l'échographie thyroïdienne ³. Ainsi, l'augmentation de l'incidence des cancers thyroïdiens coïncide avec l'augmentation du diagnostic de micro carcinome (tumeur dont la taille est infra centimétrique) ⁴. En parallèle, la mortalité liée au cancer thyroïdien est restée stable voire à même tendance à diminuer ⁵. L'ensemble de ces données fait plutôt évoquer un sur-diagnostic plutôt qu'une réelle augmentation de l'incidence du cancer thyroïdien ³. On estime que ce sur-diagnostic représente par exemple 70 à 80 % des cas nouvellement diagnostiqués chez les femmes en France ^{3,6}.

Le pronostic des cancers de la thyroïde est généralement bon avec plus de 98% de taux de survie globale à 5 ans. Cependant, cette survie diminue à 70-85% en cas de récurrence locale et à 56% en cas de métastases à distance ⁷. Le taux de mortalité est relativement faible et est globalement similaire dans les deux sexes avec 41 000 décès secondaires à un cancer thyroïdien en 2020 au niveau mondial (16 000 cas chez l'homme, 28 000 cas chez la femme) ¹. Les décès liés à ces cancers surviennent principalement chez les patients atteints d'une maladie avancée.

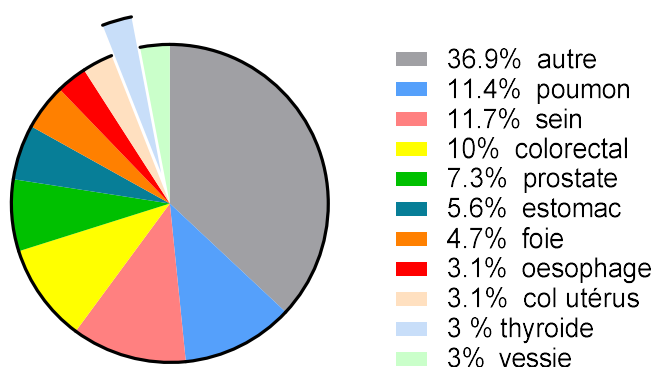


Figure 2 : Incidence mondiale des principaux cancers dont celui de la thyroïde.

La portion des camemberts représente la répartition du nombre de nouveaux cas en 2020 pour les 10 cancers les plus fréquents dans les deux sexes, *modifié d'après Sung et al. 2021*.

1.3. Classification histologique

Le mode de découverte du cancer de la thyroïde est le plus souvent celui d'un nodule thyroïdien. La prévalence des nodules thyroïdiens est d'environ 5 à 10 % chez les adultes à la palpation thyroïdienne mais est nettement plus élevée *via* l'échographie thyroïdienne, pouvant atteindre jusqu'à 70 % chez les femmes de plus de 60 ans ^{8,9}. Parmi l'ensemble de ces nodules thyroïdiens diagnostiqués, le risque global de malignité est d'environ 5% ¹⁰. L'échographie thyroïdienne permet d'identifier les nodules à risque de cancer et de poser l'indication d'une cytoponction. L'examen cytopathologique permet ensuite de discriminer les tumeurs bénignes ou malignes avec de relatives bonnes performances diagnostiques, même si cet examen reste non discriminant dans 20 à 30% des cas ¹¹. L'examen histologique de la pièce opératoire permet de déterminer le diagnostic définitif.

Le terme cancer de la thyroïde regroupe différentes entités dont l'origine histologique et le devenir sont différents.

Parmi l'ensemble des cancers de la thyroïde, 96 % proviennent de cellules folliculaires. Parmi eux, 99 % sont des cancers différenciés de la thyroïde et 1 % sont des cancers anaplasiques, ou indifférenciés, de la thyroïde. Le carcinome médullaire de la thyroïde (CMT), développé à partir de cellules parafolliculaires ou cellules C est rare et représente moins de 3% de tous les cancers de la thyroïde. Il existe également de rares lymphomes primaires de la thyroïde (<1%) et des métastases thyroïdiennes secondaires à d'autres types de cancers solides (<1%). Les cancers de souche folliculaire différenciés sont classés en cancers papillaires, folliculaires, oncocytaires et en cancers thyroïdiens peu différenciés (Figure 3). Ils ont bénéficié d'une très récente actualisation avec la publication d'une 5^{ème} édition de la classification de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) des cancers thyroïdiens en 2022 ¹².

Cancer de la thyroïde

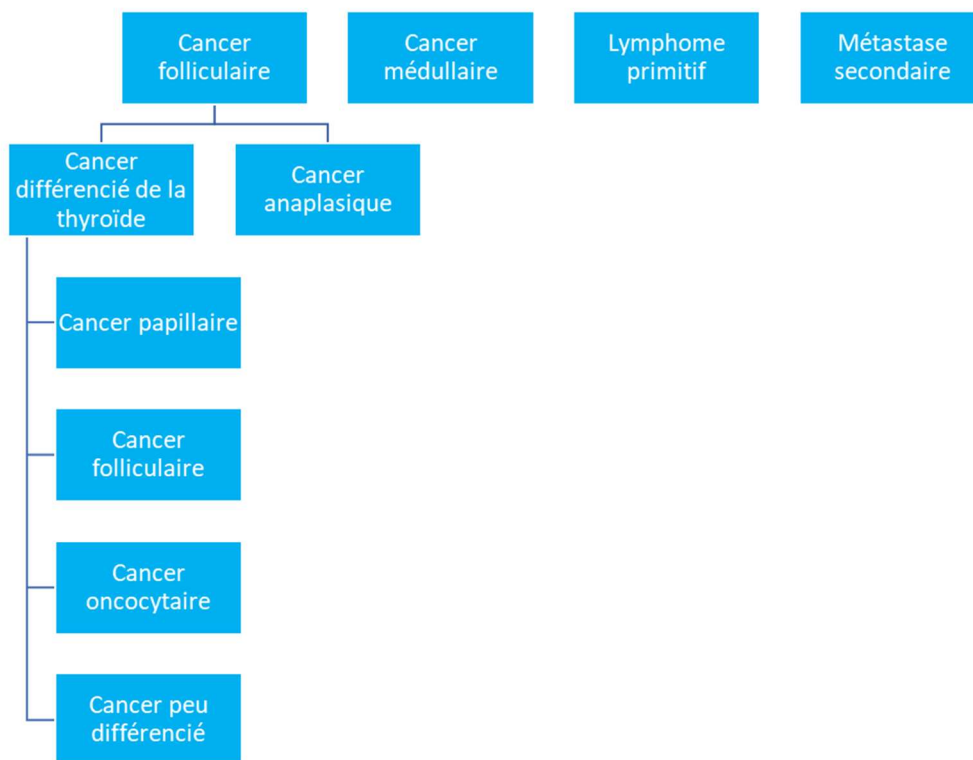


Figure 3 : Figure récapitulant l'ensemble des types histologiques de cancer de la thyroïde.

Le cancer papillaire de la thyroïde est le type de carcinome différencié de la thyroïde le plus fréquent et représente environ 85% de tous les cancers de la thyroïde. Il s'agit d'un carcinome à cellules vésiculaires constitué de papilles et de vésicules contenant une colloïde condensée. Il est défini par un ensemble de caractéristiques nucléaires. Les noyaux sont augmentés de volume avec un chevauchement des noyaux. Le contour nucléaire est irrégulier donnant un aspect en verre dépoli (Figure 4). Il existe une quinzaine de variants de carcinome papillaire de la thyroïde dont les plus fréquents sont le variant dit classique, le microcarcinome et le variant folliculaire. Le cancer folliculaire représente environ 15% des cancers différenciés de la thyroïde. Il est défini par un carcinome à cellules vésiculaires ne présentant aucune caractéristique propre au carcinome papillaire. Le diagnostic de malignité se fait sur des critères architecturaux d'invasion de la capsule et/ou d'invasion vasculaire, nécessitant

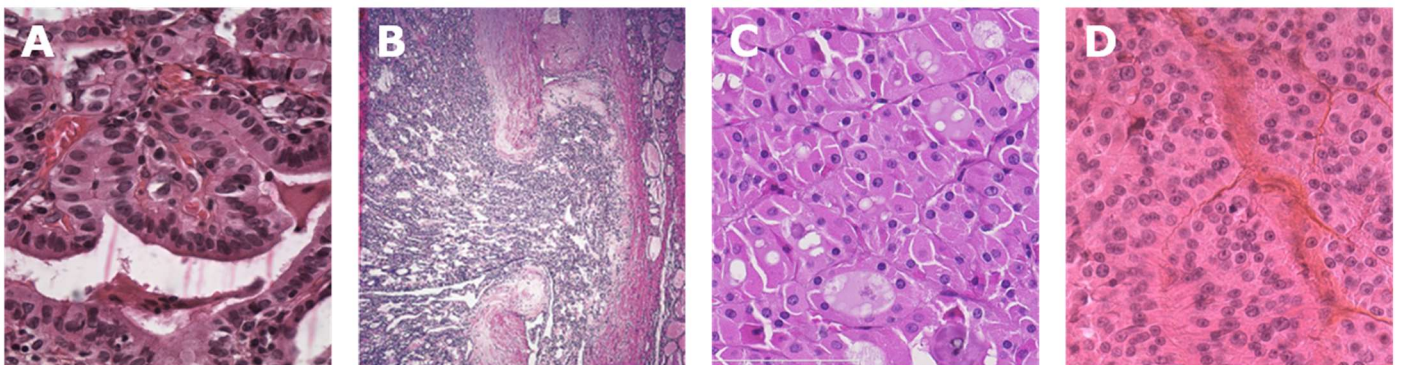
l'analyse de l'ensemble de la capsule. Il peut ainsi être à invasion minimale, à invasion vasculaire limitée ou largement invasif (Figure 4).

Le cancer oncocytaire ou à cellules de Hürtle (<10%) était initialement considéré comme le variant oncocytaire du cancer folliculaire mais les données génomiques plus récentes ont montré qu'il se distinguait de ces derniers avec un comportement également plus agressif que le carcinome folliculaire conventionnel ¹³. Il s'agit d'un carcinome folliculaire contenant plus de 75% de cellules oncocytaires. La malignité est déterminée par une invasion capsulaire et/ou vasculaire (Figure 4).

Le cancer peu différencié représente moins de 1% des cancers. Le diagnostic est basé sur les trois points de la classification de Turin : (1) architecture trabéculaire, solide, insulaire, (2) absence d'anomalies nucléaires de carcinome papillaire, (3) présence de noyaux convolutés ou d'un nombre augmenté de mitoses ($\geq 3/10$, grand champ) ou de nécrose ¹⁴ (Figure 4). Il peut apparaître *de novo* ou de la dédifférenciation d'un carcinome folliculaire ou papillaire. Il fait partie de la catégorie des cancers différenciés malgré le fait que ce soit des cancers beaucoup plus agressifs avec un risque de récurrence, de maladie métastatique (localement avancée et à distance) et de mortalité beaucoup plus élevée ¹⁵.

Figure 4 : Classification histologique des cancers différenciés de la thyroïde.

(A) Cancer papillaire avec caractéristiques nucléaires, (B) Cancer folliculaire avec franchissement capsulaire



complet, (C) Cancer oncocytaire avec oncocytes caractéristiques, (D) Cancer peu différencié avec nombreuses mitoses. Illustrations provenant du laboratoire d'anatomopathologie du CHU d'Angers, Dr Anne Croué.

1.4. Anomalies génétiques du cancer différencié de la thyroïde

1.4.1. Mutations constitutionnelles

Alors que près de 30% des CMT sont dus à une mutation germinale du proto-oncogène *RET* (*REarranged during Transfection*), moins de 10% des cancers thyroïdiens non médullaires sont liés à des mutations génétiques germinales. On considère une forme familiale quand au moins deux apparentés au premier degré présentent un cancer de la thyroïde. Ces cancers familiaux peuvent entrer dans une forme syndromique ou être isolés. En effet, la plupart des cas familiaux sont non syndromiques. Ces cancers sont plutôt de type papillaire avec un certain nombre de gènes suspectés sans réelle anomalie génétique déterminée¹⁶. Les formes syndromiques comprennent le syndrome de Cowden (*Phosphatase and TENsin homolog*, *PTEN*, 10q23), la polypose adénomateuse familiale (*adenomatous polyposis coli*, *APC*, 5q21), le syndrome de Werner (*WRN*, 8p11) et le complexe de Carney (*CNC*, 2p16)¹⁶.

1.4.2. Anomalies génétiques somatiques

a) Généralités

De nombreux progrès ont été réalisés dans la compréhension des mécanismes moléculaires du cancer de la thyroïde au cours des 10 dernières années avec le développement des nouvelles générations de séquençage (NGS, *Nex-Generation Sequencing*). Ces technologies permettent de réaliser des analyses à haut débit, en analysant rapidement un nombre important de cibles avec une profondeur d'analyse et un coût très intéressant. Concernant le cancer papillaire, les analyses du TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) faites par NGS portant sur 496 cancers papillaires de la thyroïde ont permis de confirmer les données d'études antérieures en montrant que les modifications de la voie de signalisation MAP kinases (*MAPK*, *Mitogen-activated protein kinases*) représentaient la majorité des événements moléculaires au sein du cancer papillaire. Ces analyses ont permis de diminuer à moins de 4% le pourcentage de cancers papillaires de la thyroïde sans mutation « *driver* » identifiée¹⁷. Des mutations de *BRAF*, *RAS* et des réarrangements chromosomiques de *RET* contribuent à environ 80% des altérations dans le cancer papillaire. De plus, ces anomalies sont mutuellement exclusives¹⁷. Les autres altérations retrouvées sont principalement de mutations de *EIF1AX* (*Eukaryotic Translation Initiation Factor 1A X-Linked*) et des réarrangements au sein de *NTRK1* et *NTRK3* (*Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase*).

Des études par NGS ont également été réalisées au sein des cancers peu différenciés de la thyroïde. L'étude MSK-IMPACT a caractérisé 84 cancers peu différenciés¹⁸. Ainsi, comme pour les cancers papillaires, les cancers peu différenciés présentent des altérations de la voie MAPK avec principalement des mutations de *BRAF* et *RAS* ainsi que des fusions de *RET*. Une des différences provient de la présence de mutations du promoteur de *TERT* (*Telomerase Reverse Transcriptase*) et d'*EIF1AX* retrouvés chez environ 50% et 10% respectivement des patients avec un cancer peu différenciés contrairement aux patients avec un cancer papillaire¹⁸. Des réarrangements de *PPARγ* (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor*) -*PAX8* (*Paired Box 8*) et *ALK* (*Anaplastic Lymphoma Kinase*) sont également retrouvés¹⁸.

Il existe assez peu de données concernant le cancer folliculaire. Pozdeyev *et al.* a caractérisé 65 cancers folliculaires avancés. Des mutations de *RAS* étaient retrouvées dans 66% des cas¹⁹. Une mutation du promoteur de *TERT* était présente dans 70% des cas. Les cancers folliculaires sans anomalie de la voie MAPK avaient des anomalies de *PTEN*, *RB1* et *p53*¹⁹.

Enfin, les études de NGS ont montré que le carcinome oncocytaire présentait des anomalies qui le distinguent du cancer folliculaire. En effet, il ne présente pas de mutation de *BRAF* et nettement moins de mutation de *NRAS* (10%) et de *TERT* (22%)¹³. Des mutations de *EIF1AX* sont également présentes¹³.

L'ensemble de ces anomalies est résumé dans la Figure 5.

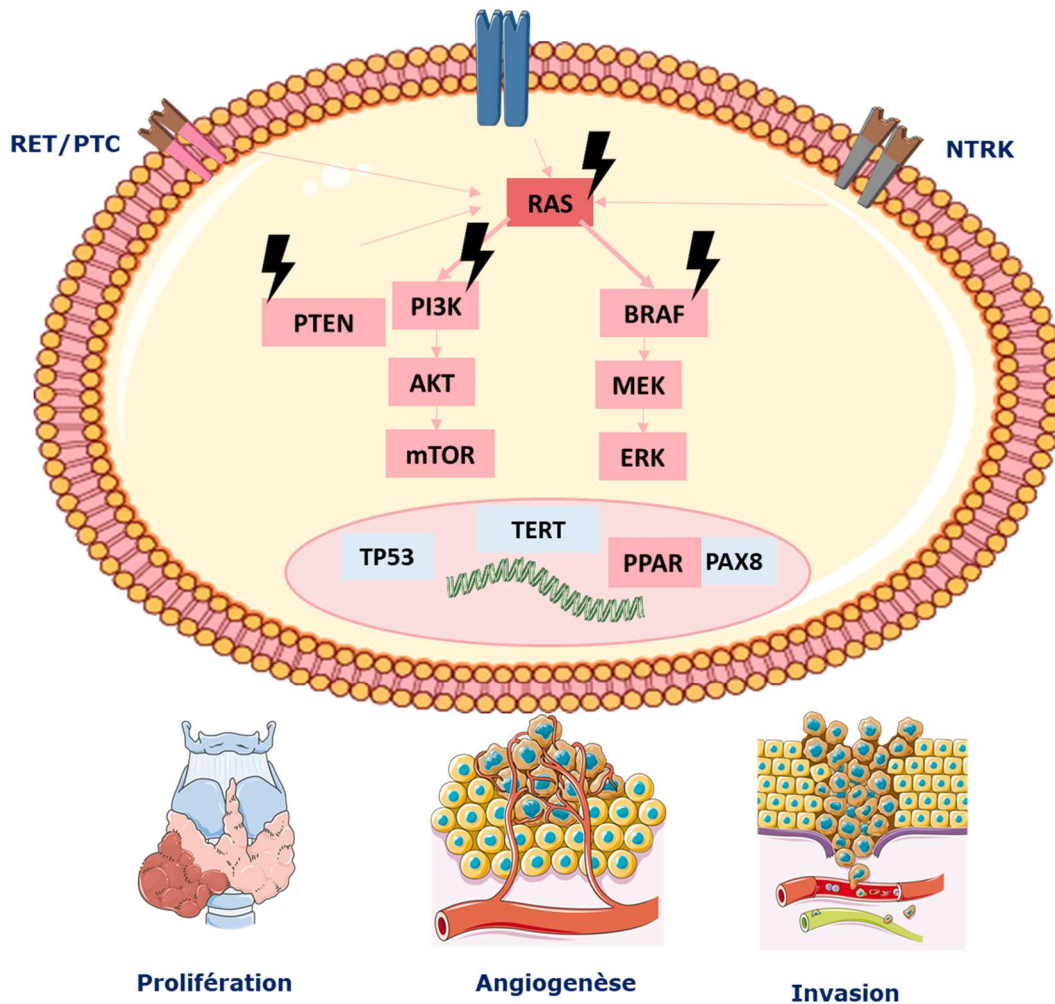


Figure 5 : Représentation schématique des grandes voies de signalisation impliquées dans la carcinogenèse thyroïdienne.

Des réarrangements chromosomiques peuvent impliquer *RET*, *NTRK* et *PPAR*. Les principales mutations concernent *RAS*, *BRAF*, *PTEN*, *TERT* et *TP53*.

La fréquence des différentes anomalies génétiques issues des données de grandes études de génomique intégrée est résumée dans le Tableau 1.

	Carcinome papillaire	Carcinome folliculaire	Carcinome oncocytaire	Carcinome peu différencié
Mutations				
BRAF	61.7%	8%	0%	33%
RAS	<i>NRAS</i> (6%), <i>KRAS</i> (2%), <i>HRAS</i> (1.26%)	<i>NRAS</i> (43%), <i>HRAS</i> (18%), <i>KRAS</i> (5%)	<i>NRAS</i> (9%), <i>HRAS</i> (2%), and <i>KRAS</i> (4%)	<i>NRAS</i> (21%), <i>HRAS</i> (5%), <i>KRAS</i> (2%)
EIF1AX	1.2%	40%	11%	10%
TP53	0.7%	12%	7%	8%
PTEN	0.5%	14%	4%	4%
TERTp	9.4%	71%	22%	50%
PI3KCA	0%	3%	0%	2%
Fusions				
RET/PTC	6.8%	0%	0%	6%
NTRK	<i>NTRK1</i> (1%), <i>NTRK3</i> (1.3%)	<i>NTRK2</i> (2%)	0%	-
PAX8-PPARY	0.8%	12%-53% ^{20,21*}	0%	4%

Tableau 1 : Fréquence des anomalies génétiques (mutations et réarrangements chromosomiques) évaluées par les nouvelles technologies de séquençage dans les différents types histologiques de cancers différenciés de la thyroïde.

* Le réarrangement *PAX8-PPAY* n'a pas été étudié dans l'étude de Pozdeyev *et al.*

b) Mutations de RAS

Les gènes *RAS* (*HRAS*, *KRAS* et *NRAS*) codent pour 4 protéines RAS (H-RAS, N-RAS, K-RAS4A ET K-RAS4B), transmettant la signalisation des récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase des facteurs de croissance (EGFR, FGFR et autres récepteurs de tyrosine kinase) aux deux voies de signalisation MAPK (*via* BRAF) et PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*)/AKT²². Ces protéines sont essentielles pour contrôler la croissance, la différenciation et la survie des cellules. Il s'agit d'une famille de GTPases présentant deux conformations, une « on », liée au GTP (guanosine 5'-triphosphate) et une « off » liée au GDP (guanosine 5'-diphosphate). Des mutations sont retrouvées au niveau des codons 12 (G12), 13 (G13) et 61 (Q61)²². Ces mutations de *RAS* entraînent une perte de fonction de son activité GTPase intrinsèque bloquant ainsi la protéine dans son état actif (liée au GTP) et activant de manière permanente les voies effectrices en aval²². Des mutations ponctuelles sont retrouvées dans ces trois gènes dans le cancer de la thyroïde avec une plus forte proportion de protéine N-RAS mutée. Ces mutations étant également identifiées dans des lésions bénignes, ceci suggère la nécessité d'anomalies moléculaires additionnelles pour induire la transformation carcinomateuse²³.

c) Mutation de BRAF

Les protéines RAF sont des serine-thréonine kinases intervenant dans la voie MAPK. Après activation par la GTPase RAS, RAF phosphoryle spécifiquement et active la tyrosine-thréonine kinase, MEK1/2, qui à son tour phosphoryle et active la Serine-Thréonine kinase, ERK1/2. ERK1/2 activée est transloquée dans le noyau et phosphoryle directement de multiples facteurs de transcription jouant notamment un rôle dans la régulation du cycle cellulaire, la croissance et la survie des cellules. ERK1/2 phosphoryle également de nombreuses protéines cytosoliques, dont des régulateurs du cycle cellulaire²⁴. BRAF est l'isoforme la plus fréquente dans les cellules folliculaires de la thyroïde et la plus efficace pour phosphoryler MEK1/2. La mutation la plus fréquente conduit à une substitution d'une valine en glutamate au niveau du résidu 600 (V600E), entraînant une activation constitutive de cette serine-thréonine kinase¹⁷. Le niveau d'activité de la kinase peut être multiplié par près de 500 par une substitution BRAF^{V600E}²⁴. Cette mutation active en effet la croissance tumorale *in vivo*²⁵. Par ailleurs et de manière intéressante, l'activation de la voie MAPK suite à une mutation BRAF entraîne une diminution de l'expression des gènes spécifiques de la thyroïde (TSHR, NIS, TG) entraînant une anomalie du métabolisme de l'iode²⁵. La mutation BRAF^{V600E} est spécifique de la malignité et du cancer papillaire de la thyroïde puisqu'elle n'est pas retrouvée dans les lésions bénignes et dans les cancers vésiculaires²³.

d) Mutation de EIF1AX

EIF1AX est une protéine participant à la formation du complexe de pré-initiation de la traduction chez les eucaryotes. Elle permet la stabilisation du complexe ternaire eIF2-GTP-Met-ARNti (ARN initiateur-méthionine) et, en l'associant à la sous-unité ribosomale 40S, permet la formation du complexe 43S²⁶. Les mutations d'EIF1AX n'étaient pas connues avant les données du TCGA dans le cancer de la thyroïde. Ces mutations sont regroupées au niveau du site d'épissage de l'exon 2 et de l'intron 5 avec les deux mutations les plus fréquentes au niveau de l'intron 5 (c.338-1A, c.338-2G)^{17,27}. Ces mutations altèrent l'assemblage du complexe de pré-initiation de la traduction. Une mutation de EIF1AX est quasi-mutuellement exclusive avec les autres anomalies génétiques dans le cancer papillaire et dans le cancer oncocytaire¹⁷. *A contrario*, elle est nettement plus fréquente et co-existe avec une mutation de RAS dans les cancers peu différenciés¹⁸.

e) Réarrangements de RET/PTC

Le proto-oncogène *RET* code pour un récepteur à activité tyrosine kinase membranaire, exprimé normalement dans les cellules parafolliculaires de la thyroïde. En condition physiologique, *RET* se lie au complexe formé par un ligand de la famille des GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic factor*) et un corécepteur GRFa (*GDNF family receptor-a*). Après liaison avec son ligand, dimérisation et transphosphorylation, le récepteur RET active les voies de signalisation telles que MAPK et PI3K/AKT²⁸. Un réarrangement de *RET* correspond à une fusion d'une séquence 3' qui code pour le domaine intracellulaire de RET avec une séquence 5' d'un autre gène de proximité codant pour des domaines de dimérisation de protéines. Dans ces conditions pathologiques, le gène *RET* fusionné est en permanence activé. Il existe au moins 13 réarrangements décrits dans le cancer thyroïdien²⁸. Les deux principaux réarrangements observés sont le réarrangement appelé *RET/PTC1* (fusion de *RET* avec le gène *CCDC6*) et le réarrangement *RET/PTC3* (fusion de *RET* avec le gène *NCOA4*)²⁸. Ils sont retrouvés chez certains patients avec un cancer papillaire de la thyroïde en particulier après exposition à des rayonnements ionisants, principalement dans l'enfance²⁸.

f) Réarrangements de PPARy-PAX8

Comme pour les réarrangements de *RET*, il s'agit d'une fusion d'une partie du domaine de liaison de l'ADN de PAX8 avec une large partie de la région codante (domaines de liaison à l'ADN, de liaison aux ligands, de dimérisation à RXR et de transactivation) de PPARy²⁹. PAX8 est un facteur de transcription qui joue un rôle dans l'ontogenèse thyroïdienne (différenciation cellulaire de type cellules folliculaires thyroïdiennes) et dans la régulation de l'expression de différents gènes spécifiques de la thyroïde (*NIS*, *TPO*...) ²⁰. Des réarrangements chromosomiques dans ces facteurs de transcription impliqués dans la différenciation cellulaire sont des phénomènes assez fréquemment retrouvés dans les cancers. PPARy est également un facteur de transcription appartenant à la famille des récepteurs nucléaires qui agit comme un gène suppresseur de tumeur. Le réarrangement PPARy-PAX8 a un effet dominant-négatif sur PPARy sauvage²⁹. Il va donc stimuler la croissance cellulaire. Il est principalement retrouvé dans les cancers folliculaires^{20,21}.

g) Autres anomalies génétiques

- *NTRK*

La famille des TRK (*tropomyosin receptor kinase*) se compose de trois membres, TRKA, TRKB et TRKC, codés respectivement par *NTRK1*, *NTRK2* et *NTRK3*. Chaque récepteur TRK est normalement activé par une neurotrophine et active les voies de signalisation Ras, PI3K et phospholipase C³⁰. Quoique rare, des réarrangements avec différentes protéines ont été décrits dans les cancers différenciés de la thyroïde³⁰. Ces réarrangements entraînent une dimérisation du récepteur, indépendante du ligand, conduisant à l'activation des voies de signalisation d'aval. Ils sont mutuellement exclusifs avec les autres mutations intervenant dans l'oncogenèse du cancer de la thyroïde¹⁷.

- *TERT*

Les mutations du promoteur du gène codant pour le domaine catalytique de la télomérase TERT entraîne un maintien de son activité au cours de la division cellulaire, permettant ainsi la réplication cellulaire et donc l'immortalisation des cellules thyroïdiennes tumorales. Les mutations de *TERT* co-existent avec les mutations de *RAS* et *RAF* dans les différents types de cancer thyroïdien. Ces mutations sont associées à une plus forte prévalence de cancers agressifs et à un mauvais pronostic³¹.

- *TP53*

TP53 est un gène suppresseur de tumeur qui joue un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire et dans la réparation de l'ADN. Ces mutations sont plutôt retrouvées dans les cancers de la thyroïde avec extension extra thyroïdienne¹⁸. Elles peuvent également participer à la dédifférenciation des tumeurs thyroïdiennes³².

- *PTEN*

PTEN code pour une phosphatase qui va déphosphoryler diverses protéines les maintenant dans leur forme inactive³³. C'est ainsi que PTEN va inhiber l'activité de la PI3K. En régulant les voies de signalisation, il participe à la régulation du cycle cellulaire et est considéré comme un gène suppresseur de tumeur³³. Des délétions hémizygotiques de *PTEN* sont retrouvées dans les différents types de cancers thyroïdiens ainsi que des anomalies épigénétiques entraînant une inactivation de *PTEN*³³. A côté des mutations de *RAS* et de *PTEN* la voie PI3K/AKT

peut être également activée par *PIK3CA* (*Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha*)

34.

Il a été ainsi mis en évidence que les voies MAPK et PI3K/AKT/mTOR étaient des événements génétiques essentiels dans la physiopathologie du cancer thyroïdien (migration, invasion, angiogenèse) (Figure 5). Ces anomalies confèrent des caractéristiques histologiques et cliniques différentes, du fait, notamment, d'une modification variable des voies de signalisation. Dans une perspective clinique, cette meilleure compréhension des mécanismes moléculaires a permis d'identifier des marqueurs diagnostiques et/ou pronostiques, pouvant guider la prise en charge des nodules avec cytoponction indéterminée, la stratégie thérapeutique après la thyroïdectomie initiale ou le choix des thérapies ciblées chez patients présentant une maladie avancée ou métastatique.

1.5. Facteurs pronostiques

L'un des principaux objectifs des dernières recommandations internationales de l'ATA (*American Thyroid Association*) publiées en 2015 était de limiter le « sur traitement » chez la majorité des patients considérés à faible risque de mortalité et de morbidité liées à la maladie ³⁵. L'enjeu est donc de définir les facteurs pronostiques pour identifier les patients à haut risque de récurrence et/ou de décès.

1.5.1. Facteurs associés à la mortalité lié au cancer de la thyroïde

Différents facteurs interviennent dans le pronostic du cancer thyroïdien, à savoir le sexe, l'âge, l'étendue de la maladie (localement et à distance) et le caractère complet de la résection chirurgicale. Le sexe masculin est associé avec un taux de mortalité plus élevé ³⁶. L'âge est un facteur pronostique important puisque le taux de mortalité augmente avec l'âge ³⁶. L'étendue de la maladie est stratifiée par la classification TNM (*Tumor-Node-Metastasis*) (Tableau 2). Ainsi, le risque augmente avec la taille de la tumeur, l'invasion locale et en cas de métastases ganglionnaires ou à distance. L'ensemble de ces paramètres sont pris en compte dans les stades de la 8^{ème} édition de la classification TNM/AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) ³⁷. Ces différents stades permettent de mieux prédire le pronostic au sein de ces différents types de cancers différenciés de la thyroïde. Ainsi le pronostic est excellent pour les stades I et II mais nettement plus mauvais pour les stades III et IV (Tableau 3).

Tumeur	<p>Tx : Tumeur non évaluée</p> <p>T0 : absence de tumeur primaire</p> <p>T1 : ≤ 2cm dans sa plus grande dimension, intra thyroïdienne T1a ≤ 1 cm, T1b : 1 à 2 cm</p> <p>T2 : 2 à 4 cm dans sa plus grande dimension, intra thyroïdienne</p> <p>T3 : ≥ 4 cm ou invasion extra-thyroïdienne minime T3a : ≥ 4 cm dans sa plus grande dimension mais limitée à la thyroïde T3b : extension extra-thyroïdienne touchant seulement les muscles avoisinant la thyroïde (muscles sterno-cleïdo-hyoïdien, sterno-thyroïdien, thyro-hyoïdien, omo-hyoïdien) quelque soit la taille de la tumeur</p> <p>T4 : extension extra-thyroïdienne large intéressant les principales structures du cou T4a : extension extra-thyroïdienne touchant les tissus sous-cutanés, le larynx, la trachée, l'œsophage, le nerf récurrent T4b : extension extra thyroïdienne envahissant le fascia prévertébral ou enveloppant l'artère carotide ou les vaisseaux médiastinaux</p>
Ganglion	<p>Nx : Envahissement ganglionnaire non évalué</p> <p>N0 : absence d'envahissement dans les ganglions régionaux N0a : au moins une cytologie ou biopsie confirmant la nature bénigne des ganglions N0b : absence d'argument radiologique ou clinique pour une atteinte ganglionnaire régionale</p> <p>N1 : Envahissement métastatique dans les ganglions régionaux N1a : envahissement ganglionnaire dans les secteurs VI ou VII (prétrachéal, paratrachéal, préaryngé ou médiastinal supérieur) uni ou bilatéral N1b : envahissement ganglionnaire dans les secteurs I, II, III, IV ou V ou aux ganglions lymphatiques rétropharyngiens, homo ou contro-latéral, uni ou bilatéral</p>
Métastase	<p>MX : Présence de métastases à distance non évaluée</p> <p>M0 : absence de métastase à distance</p> <p>M1 : présence de métastase à distance</p>

Tableau 2 : Classification TNM pour les cancers épithéliaux de la thyroïde (8^{ème} édition, AJCC 2017).

Stade	< 55 ans	≥ 55 ans	Survie globale à 10 ans
I	Tout T, tout N, M0	T1/T2, N0/Nx, M0	94,3%
II	Tout T, tout N, M1	T1/T2, N1, M0 T3a/T3b, tout N, M0	66,8%
III		T4a, tout N, M0	40,6%
IVa		T4b, tout N, M0	34,6%
IVb		Tout T, Tout N, M1	

Tableau 3 : Stades pronostiques de l’AJCC des cancers différenciés de la thyroïde (8^{ème} édition, AJCC 2017) et la survie globale associée d’après *Tam et al. 2018*.

1.5.2. Facteurs associés à la persistance ou la récurrence du cancer thyroïdien

Le risque de mortalité par un cancer de la thyroïde n’est pas forcément corrélé au risque de récurrence de la maladie. Le système AJCC/TNM ne semble pas stratifier de manière adéquate le risque de persistance ou de récurrence du cancer thyroïdien. Ainsi, le système de stratification des risques de l’ATA a été conçu pour estimer le risque de récurrence du cancer différencié de la thyroïde. Ce risque est séparé en faible risque, risque intermédiaire et haut risque de récurrence/récidive de la maladie ³⁵. Cette classification est basée sur l’histologie de la tumeur, l’existence de métastases locales ou à distance, l’invasion locorégionale ou vasculaire, le caractère complet de la résection tumorale initiale et, en cas de traitement par iode radioactif, l’existence de fixation à distance du lit thyroïdien. La dernière version de 2015 a ajouté des facteurs pronostiques supplémentaires comme le nombre et la taille des ganglions métastatiques, le statut mutationnel ou encore le degré d’invasion vasculaire dans les cancers folliculaires de la thyroïde ³⁵. Ceci est présenté dans le Tableau 4. Cette nouvelle stratification a donné de bonnes performances en termes de prédiction de risque de récurrence et de réponse au traitement initial ^{38,39}.

Faible risque de récurrence (<5%)	<ul style="list-style-type: none"> - Cancer papillaire de la thyroïde avec tous les éléments suivants : absence de métastases locales ou à distance (M0), résection chirurgicale macroscopiquement complète (R0), absence d'invasion locorégionale, absence de type histologique agressif, absence d'invasion vasculaire, absence de fixation extra thyroïdienne si scintigraphie post-thérapeutique I¹³¹, absence de métastases ganglionnaires cliniques (N0) ou ≤ 5 micrométastases à l'histologie (<0,2cm) - Cancer papillaire, variant folliculaire, encapsulé, intra- thyroïdien - Cancer folliculaire bien différencié intra- thyroïdien avec invasion capsulaire ± invasion vasculaire minime - Cancer papillaire de la thyroïde intra thyroïdien, BRAF non muté - Microcarcinome papillaire intra thyroïdien, uni ou multifocal y compris si présence d'une mutation BRAF^{V600E}
Risque intermédiaire de récurrence (5-20%)	<ul style="list-style-type: none"> - Invasion microscopique de la tumeur aux tissus mous péri thyroïdiens - Fixation de l'I¹³¹ au niveau de métastases localisées au niveau du cou sur la 1ère scintigraphie post-thérapeutique - Histologie agressive : cellules hautes, sclérosant... - Cancer papillaire avec invasion vasculaire - Atteinte ganglionnaire clinique ou plus de cinq atteintes ganglionnaires histologiques, tous ne dépassant pas 3 cm de grand axe. - Microcarcinome multifocal avec extension extra thyroïdienne avec mutation BRAF^{V600E} - Cancer papillaire de la thyroïde, intra thyroïdien, mesurant 1-4 cm avec mutation BRAF^{V600E}
Risque élevé de récurrence (>20%)	<ul style="list-style-type: none"> - Invasion macroscopique de la tumeur aux tissus mous péri thyroïdiens (extension extra-thyroïdienne importante) - Résection tumorale incomplète - Présence de métastases à distance - Dosage sérique de Thyroglobuline post-opératoire suggérant la présence de métastases à distance - Présence de métastases histologiques (N1) ≥ 3 cm de grand axe - Cancer folliculaire avec invasion vasculaire extensive (> 4 foyers d'invasion vasculaire) - Cancer papillaire de la thyroïde > 1 cm, mutation de pTERT + ± mutation de BRAF

Tableau 4 : Système de stratification initiale du risque selon l'ATA2015.

En dehors de cette évaluation initiale du risque, une re-stratification du risque doit être effectuée au cours de la surveillance, selon la réponse au traitement (réponse excellente, réponse biochimique incomplète, réponse

structurale incomplète, réponse indéterminée) afin de guider la prise en charge ³⁵. Ceci est présenté dans le Tableau 5.

Type de réponse	Définition
Réponse excellente (1-4% récurrence)	Imagerie normale Concentration sérique de la thyroglobuline <0.2 ng/ml en base ou <1 ng/ml après stimulation en l'absence d'anticorps anti-thyroglobuline.
Réponse intermédiaire (15-20% récurrence)	Lésions non-spécifiques à l'imagerie Concentration sérique de la thyroglobuline 0.2-1 ng/ml en base ou 1-10ng/ml après stimulation ou anticorps anti-thyroglobuline stable ou en diminution
Réponse biologique incomplète (20% récurrence)	Imagerie négative Concentration sérique de la thyroglobuline >1 ng/ml en base ou >10ng/ml après stimulation ou augmentation des anticorps anti-thyroglobuline
Réponse structurelle incomplète (50-85% récurrence)	Lésions tumorales à l'imagerie conventionnelle (échographie cervicale, TDM ou IRM) ou fonctionnelle (scintigraphie I ¹³¹ ou TEP- ¹⁸ FDG)

Tableau 5 : Système de re-stratification du risque après traitement selon les recommandations de l'ATA2015.

1.6. Traitement standard du cancer différencié de la thyroïde

La thérapie standard du cancer différencié de la thyroïde comprend une thyroïdectomie totale suivie d'un traitement par iode radioactif selon le risque de récurrence et une hormonothérapie substitutive et frénatrice par hormones thyroïdiennes. Avec ce traitement, la majorité des cancers différenciés de la thyroïde est guérie ³⁵.

1.6.1. Traitement initial

Les recommandations récentes ayant permis de mieux discriminer les patients selon le risque de récurrence, la tendance est à une désescalade thérapeutique ³⁵.

a) Chirurgie

La chirurgie représente le traitement principal de tous les cancers différenciés de la thyroïde. Elle va permettre d'enlever l'ensemble de la tumeur au niveau cervical. L'enjeu actuel est de déterminer l'extension de la chirurgie qui comprend une chirurgie de la thyroïde avec ou sans curage des ganglions lymphatiques. Une lobectomie, ablation d'un des deux lobes thyroïdiens, pour les tumeurs à faible risque de récurrence selon l'ATA 2015, voire une surveillance active pour les microcarcinomes papillaires est actuellement proposée. A l'inverse, une thyroïdectomie totale avec résection de l'ensemble de la tumeur primaire est indiquée pour les tumeurs volumineuses (>4 cm), avec une extension extra thyroïdienne importante (T4), la présence de métastases locales ou à distance ³⁵. Le curage ganglionnaire est indiqué en cas d'atteintes ganglionnaires cliniques au niveau du compartiment central voire latéral. Un curage central prophylactique est indiqué chez les patients avec un cancer

avancé (stade T3, T4)³⁵. Les patients avec un cancer de petite taille, non invasif, sans atteinte ganglionnaire clinique peuvent ne pas bénéficier d'un curage ganglionnaire initial³⁵.

b) Radiothérapie métabolique

La radiothérapie métabolique à l'iode 131 (I^{131}) repose sur le fait que la tumeur, provenant des cellules folliculaires, est capable de capter l'iode radioactif via le symporteur de l'iode NIS. Son utilisation a trois principaux objectifs⁴⁰. Premièrement, en détruisant les foyers cancéreux thyroïdiens résiduels y compris microscopiques, le traitement par I^{131} peut améliorer la survie globale et sans récurrence. Deuxièmement, la destruction, par I^{131} , du tissu thyroïdien résiduel normal facilite le suivi en détectant de façon plus précoce une ré-élévation de la TG sérique. Enfin, la scintigraphie corps-entier post-thérapeutique permet d'évaluer la persistance de lésions thyroïdiennes non connues. L'absorption de l'iode radioactif est faible sous traitement par hormones thyroïdiennes. Une stimulation par un taux élevé de TSH est donc nécessaire. Ceci se fait le plus souvent par injection de TSH recombinante humaine mais peut aussi se faire par un arrêt temporaire du traitement substitutif en particulier dans les maladies métastatiques. L'activité d'iode radioactif varie entre 30 et 100 mCi. Il a été montré que pour les patients à faible risque de récurrence, le taux de réponse était similaire entre les deux activités d' I^{131} et entre les deux modalités d'élévation de la TSH⁴¹. Plus récemment, il a même été montré que la non administration d'iode n'était pas associée à une augmentation du taux de récurrence à 3 ans chez les patients présentant un cancer de bas risque de récurrence⁴². Au contraire, chez les patients avec des métastases à distance, une forte activité d' I^{131} (100 mCi) en hypothyroïdie est plutôt indiquée^{35,40}.

c) Hormonothérapie

Après thyroïdectomie, l'ensemble des patients sont traités par hormones thyroïdiennes (Levothyroxine). L'objectif de ce traitement est double. D'une part, il est dit « substitutif », c'est-à-dire qu'il vient corriger l'hypothyroïdie induite par la thyroïdectomie. D'autre part, il est dit « frénateur », c'est-à-dire qu'il vient freiner la sécrétion de TSH. En effet, la TSH stimule la prolifération des cellules folliculaires⁴³. Ainsi, en inhibant sa sécrétion, le risque de persistance ou de récurrence de la maladie est réduit⁴⁴. L'enjeu est donc de déterminer le niveau optimal de TSH. En cas de maladie guérie, la TSH pourra être maintenue dans la norme³⁵. Au contraire, une maladie persistante doit faire viser une TSH inférieure à 0.1 mUI/L³⁵.

1.6.2. Traitement des récurrences loco-régionales

Environ 20% des patients avec un cancer différencié de la thyroïde présente une récurrence locale ou régionale⁴⁵. La plupart surviennent dans les cinq premières années de suivi⁴⁵. Différentes options thérapeutiques sont possibles. L'utilisation de la radiothérapie métabolique par I^{131} et de la chirurgie représentent les principaux traitements selon la taille et la localisation des lésions³⁵.

1.6.3. Traitement des métastases à distance

La présence de métastases à distance survient chez 10% des patients avec un cancer différencié de la thyroïde et représente la principale cause de mortalité par ce cancer⁴⁶. Dans la moitié des cas, ces métastases sont présentes au diagnostic⁴⁷. Les deux principaux sites sont les poumons et l'os. La prise en charge consiste en une hormonothérapie par hormones thyroïdiennes à fortes doses, à différentes modalités de traitements locaux

(chirurgie, thermo-ablation, radiothérapie externe, radiofréquence, cryoablation, embolisation) et l'administration d'iode radioactif ³⁵. L'administration d'I¹³¹ permet effectivement le traitement des métastases à distance. En cas de réponse complète, la survie globale est quasiment semblable à celle de la population générale ⁴⁷. Les patients présentant des métastases osseuses peuvent bénéficier d'un traitement par inhibiteur de la résorption osseuse : biphosphonates ou anti-RANK-L (*Receptor activator of nuclear factor κB-Ligand*) ³⁵.

1.7. Cancer thyroïdien métastatique réfractaire à l'iode radioactif

1.7.1. Définition

Parmi l'ensemble des patients présentant un cancer différencié de la thyroïde, environ 15 % récidivent ou développent une maladie métastatique ⁴⁸. Parmi eux, 25 à 60% évoluent vers un cancer réfractaire à l'iode radioactif ⁴⁷. Au total, le cancer de la thyroïde réfractaire à l'iode radioactif représente environ 5 % des patients avec une incidence estimée à quatre cas par million d'habitants, ce qui en fait un cancer rare ⁴⁹. Quoique rare, ce cancer est beaucoup plus agressif qu'un cancer de la thyroïde répondant à l'iode radioactif puisque la survie médiane après la découverte de métastases à distance est de 3 à 6 ans et constitue la principale source de décès avec moins de 10 % de survie à 10 ans ⁴⁷. Ces cancers réfractaires surviennent plus fréquemment chez les patients âgés, en cas de cancer de la thyroïde peu différencié et lorsque les métastases sont volumineuses ⁴⁷.

Il est défini de trois manières différentes :

- soit par l'absence de fixation de l'I¹³¹ d'au moins une lésion cible (d'emblée ou après une réponse initiale à l'iode),
- soit par la progression de la maladie au cours de l'année suivant un traitement par iode radioactif
- soit par la persistance de la maladie après l'administration d'une activité cumulée de 22 GBq (600 mCi) d'iode radioactif ⁵⁰.

1.7.2. Traitement

a) Indication à l'initiation d'un traitement systémique

La prise en charge globale reste celle d'un cancer thyroïdien avec des métastases à distance à savoir une hormonothérapie par lévothyroxine à dose frénatrice, des traitements locaux en cas de foyers métastatiques localisés et/ou symptomatiques, un traitement à visée osseuse ³⁵. Une surveillance régulière par imagerie (TEP 18FDG, TDM cervico-thoraco-abdomino-pelvien) et le dosage de la TG sérique est nécessaire afin d'établir la vitesse de progression de la maladie. La décision d'initier un traitement systémique est basée sur différents paramètres incluant la charge tumorale, la vitesse de progression de la maladie, la localisation des lésions, les symptômes ou le risque de complications locales et l'état général du patient. Ceci peut être synthétisé dans le Tableau 6 et la Figure 6. Ainsi, les patients présentant une charge tumorale importante et progressive nécessitent un traitement systémique.

		Taille des lésions tumorales	
		< 1 cm	>1-2 cm et multiples
Absence de progression	Absence de traitement	A discuter	

Progression (RECIST > 20%)	Progression < 12 mois	A discuter	Traitement systémique
--------------------------------------	-----------------------	------------	------------------------------

Tableau 6 : Indication à un traitement systémique chez les patients avec un cancer thyroïdien réfractaire.

Abréviations : RECIST=*Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*.

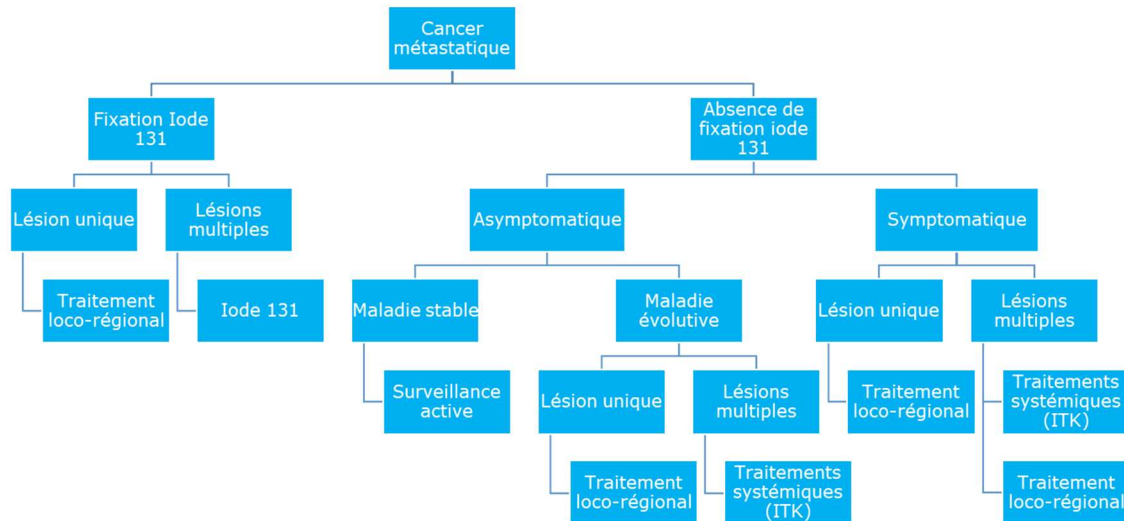


Figure 6 : Stratégie thérapeutique dans le cancer différencié de la thyroïde métastatique. ITK : Inhibiteur de tyrosine kinase.

b) Traitement systémique par thérapies ciblées

Les chimiothérapies classiques cytotoxiques ont montré une faible réponse avec une toxicité élevée ⁵¹. Comme précédemment détaillé, chez la plupart des patients atteints d'un cancer différencié de la thyroïde, un événement oncogène déclencheur peut être identifié activant de manière constitutive la voie des MAPK et/ou PI3K ⁵². Ainsi un traitement ciblant ces voies peut être justifié ^{17,52}. Les premières générations de thérapies ciblées sont des inhibiteurs de multiples récepteurs à activité tyrosine kinase comme le lenvatinib. Leur effet anti tumoral passe principalement par un effet anti-angiogénique. Les nouvelles générations d'ITK ciblent des protéines spécifiques en aval, comme le selumetinib (anti MEK) ou des altérations moléculaires précises. Les principales thérapies ciblées sont représentées dans la Figure 7.

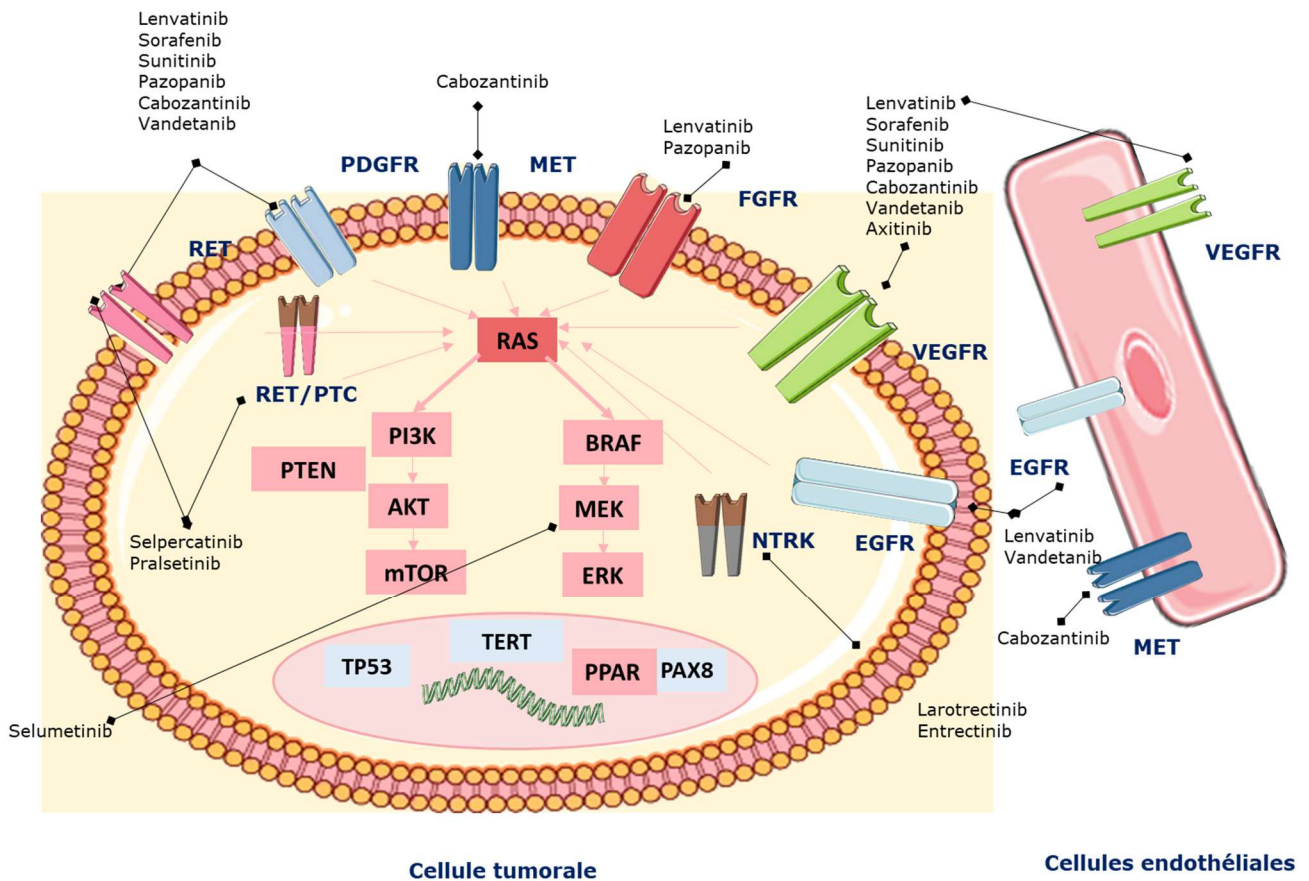


Figure 7 : Schéma représentant la plupart des thérapies ciblées utilisées dans le cancer de la thyroïde. Les différentes thérapies sont représentées ainsi que leurs principales modes d'action, figure modifiée d'après Haugen and Sherman. *Endocr Rev.* 2013

- Inhibiteurs de Tyrosine kinase avec effet anti-angiogénique

En dehors des anomalies génétiques clefs du cancer thyroïdien, il a été décrit que l'angiogenèse était activée par une augmentation de la production de VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) et une surexpression des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) au VEGF, VEGFR, retrouvés au niveau des cellules thyroïdiennes tumorales ainsi que sur les cellules endothéliales⁵². De plus, d'autres RTK (PDGFR, *Platelet-Derived Growth Factor receptor*, EGFR, *Epidermal Growth Factor Receptor*, FGFR, *fibroblast growth factor receptor*) ou des mutations sur les effecteurs d'aval stimulent également les deux grandes voies de signalisation entraînant la prolifération, la différenciation, l'invasion et l'angiogenèse des tumeurs⁵³. Les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) agissent en bloquant le site de l'ATP du RTK, empêchant l'activation des tyrosines kinases et les voies de signalisation impliquées dans la migration, la prolifération, la survie ou l'angiogenèse. La FDA (*Food and Drug Administration*) et l'EMA (*European Medicines Association*) ont approuvé deux ITK ayant un effet à la fois antitumoral et anti-angiogénique dans le traitement des cancers métastatiques réfractaires à l'iode radioactif à savoir le sorafenib et le lenvatinib⁵⁴.

Le sorafenib est un ITK qui inhibe plusieurs RTK dont RET et des récepteurs des facteurs de croissance endothéliaux vasculaires (VEGFR1, 2 et 3, PDGFRb, c-KIT et Flt3, *fms like tyrosine kinase*) qui sont impliqués dans la néovascularisation et la progression des tumeurs. Le sorafenib cible également les sérine/thréonine kinases RAF1 et BRAF. Ce médicament peut donc inhiber la croissance du cancer de la thyroïde par des

mécanismes antiprolifératifs et anti angiogéniques. Il a été approuvé à la suite de l'essai de phase III, DECISION ayant montré que la survie sans progression était significativement augmentée à 10,8 contre 5,8 mois sous placebo. La survie globale médiane n'était pas atteinte en fin d'étude ⁵⁵.

Le lenvatinib est un ITK qui agit contre les VEGFR 1 à 3 (VEGFR1-VEGFR3), les récepteurs de facteur de croissance des fibroblastes 1 à 4 (FGFR1-FGFR4) et PDGFR α , qui sont impliqués dans la néovascularisation et la progression des tumeurs. Il est également actif contre c-KIT et le proto-oncogène RET, qui sont impliqués dans l'angiogenèse tumorale. Il s'agit de la 2^{ème} molécule approuvée dans le cancer de la thyroïde réfractaire à l'iode à la suite de l'étude SELECT. Une augmentation de la survie sans progression a été également observée chez les patients traités par lenvatinib (18,3 versus 3,6 mois sous placebo) ⁵⁶. Les principaux résultats de ces essais de phase III sont illustrés dans la Figure 8.

Plus récemment, le cabozantinib a été approuvé pour les patients ayant progressé après un traitement antérieur ciblant le VEGFR. Ceci fait suite à l'étude COSMIC-311, un essai clinique multicentrique randomisé, en double aveugle et contrôlé par placebo chez des patients localement avancé ou métastatique ayant progressé après un traitement antérieur ciblant le VEGFR. Le cabozantinib avait réduit de manière significative le risque de progression de la maladie ou de décès par rapport au placebo ($p < 0,0001$). La survie sans progression médiane était de 11,0 mois dans le groupe cabozantinib par rapport à 1,9 mois pour ceux recevant le placebo ⁵⁷.

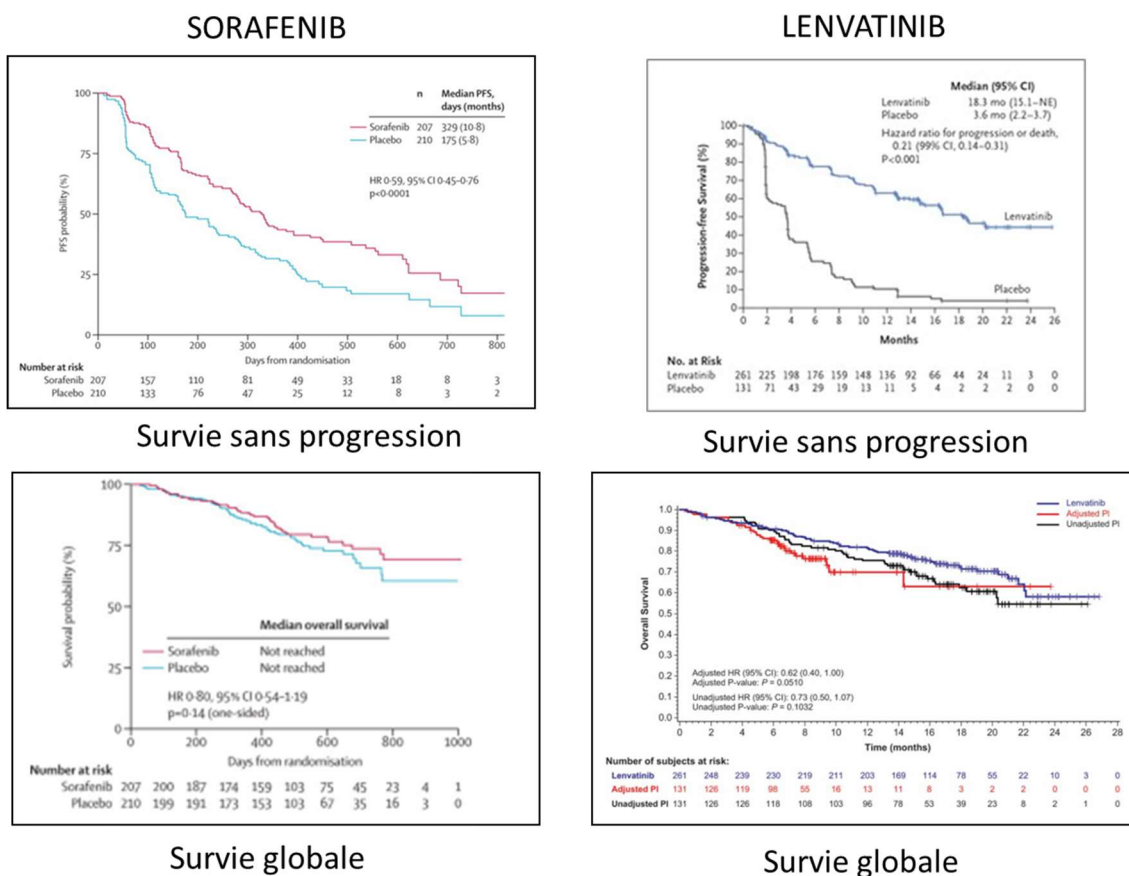


Figure 8 : Principaux résultats d'efficacité du Sorafenib et du Lenvatinib.

Résultats des essais de phase III (DECISION, SELECT) comparant le sorafenib et le lenvatinib au placebo dans le cancer thyroïdien réfractaire à l'iode radioactif ^{55,56}.

D'autres ITK avec un effet anti-angiogénique ont été étudiés dans le cadre d'essais mais n'ont pas l'autorisation de mise sur le marché (AMM) dans le cancer thyroïdien réfractaire à l'iode radioactif ⁵⁴. Les données d'efficacité et de tolérance des principales études de phases II et III sont résumées dans le Tableau 7.

En termes d'efficacité, très peu de réponses complètes ont été décrites et le taux de réponse partielle est assez modeste. Le taux de réponse partielle était en moyenne de 28% et un temps médian de survie sans récurrence de 12 mois. Il a été montré cependant une amélioration de la survie sans progression pour plusieurs molécules (Sorafenib, Lenvatinib, Vandetanib et Apatinib). La survie globale médiane n'a jamais été atteinte dans les différents essais en fin d'étude.

Du fait de leur mécanisme d'action pleiotropique, ces molécules peuvent engendrer différents effets secondaires qui sont classés selon les critères du CTCAE (*Common Terminology Criteria for Adverse Events*). Les grades font référence à la sévérité de l'effet indésirable et sont divisés en 5 grades de gravité croissante :

- Grade 1 : Léger ; asymptomatique ou symptômes légers ; ne nécessitant pas de traitement
- Grade 2 : Modéré ; nécessitant un traitement minimal, local ou non-invasif ; interférant légèrement avec les activités de la vie quotidienne
- Grade 3 : Sévère ou médicalement significatif mais sans mise en jeu immédiate du pronostic vital ;

Indication d'hospitalisation ou de prolongation d'hospitalisation ; invalidant ; interférant avec les activités de la vie quotidienne

- Grade 4 : Mise en jeu du pronostic vital ; nécessitant une prise en charge en urgence
- Grade 5 : Décès lié à l'effets indésirables.

Les effets secondaires varient selon le type de molécules. Le sorafenib présente plutôt des effets cutanés alors que le lenvatinib plutôt une toxicité cardiaque. Le point commun de l'ensemble de ces molécules est cependant la fréquence importante des effets secondaires touchant plus de 95% des patients. Les diminutions de doses voire des arrêts de traitement en lien avec les effets secondaires étaient également importants (>60% pour les diminutions de doses, >10% d'arrêt définitif de traitement). Cependant, comme illustré très récemment avec le lenvatinib, une dose plus faible ne conduit pas à la même efficacité ⁵⁸.

Molécule	Design	Efficacité	Effets secondaires			
			Effets secondaires tout grade confondu survenant dans ≥25% des cas	Effets secondaires graves (≥grade 3) et survenant dans ≥5%	Réduction de doses (% de patients)	Interruption de traitement (% de patients)
Lenvatinib*	Phase II, simple bras, ouverte (58 patients) ⁵⁹	RP : 29/58 (50%) SSR : 12.6 mois	HTA (76%), perte de poids (69%), diarrhée (67%), protéinurie (64%), fatigue (60%), diminution appétit (52%)	Perte de poids (12%), HTA, diarrhée et protéinurie (10%), fatigue (9%)	66%	74%
	Phase III, randomisée, en double aveugle, contre placebo (392 patients) ⁵⁶	RC : 4/261 (1.5%), RP : 63.2% SSR : 18.3 vs 3.6 mois (p<0.001) SG : p=0.10	HTA (68%), diarrhée et fatigue (59%), diminution de l'appétit (5%), perte de poids (46%), nausées (41%), EPP (32%)	Fatigue (28%), nausées (14%), diminution de l'appétit (12%), perte de poids (9%), diarrhée (8%), vomissements et céphalées (6%)	67.8%	82.4%
Sorafenib*	Phase II, simple bras, ouverte (30 patients) ⁶⁰	RP : 7/30 (23%) SSR : 2.6 mois	EPP (83%), éruption cutanée (70%), fatigue (60%), perte de poids (50%), diarrhées (73%), alopecie (43%)	HTA (13%), EPP et éruption cutanée (10%), perte de poids (10%), diarrhée (7%)	47%	20%
	Phase II, ouverte, plusieurs bras (A :CPT en 1 ^{ère} ligne, B : CPT en 2 ^{ème} ligne C : autre histologie), 58 patients ⁶¹	RP : 15% (A), 13% (B), 0% (C) SSR : 16 (A), 10 (B), 4.5 (C) mois SG : 23 (A), 38 (B), 24 (C) mois	Alopecie (79%), éruption cutanée (75%), Perte de poids et diarrhée (74%), douleurs abdominales (69%), Fatigue (68%), EPP (57%)	Fatigue (16%), EPP (12%), arthralgies (11%), douleurs abdominales (6%), perte de poids (5%)	52%	Nd

Molécule	Design	Efficacité	Effets secondaires			
			Effets secondaires tout grade confondu survenant dans $\geq 25\%$ des cas	Effets secondaires graves (\geq grade 3) et survenant dans $\geq 5\%$	Réduction de doses (% de patients)	Interruption de traitement (% de patients)
Sorafenib*	Phase II, ouverte, simple bras (31 patients) ⁶²	RC : 0% ; RP : 31 % SSR : 18 mois SG : 34.5 mois	EPP (71%), perte de poids (58%), diarrhée et alopecie (52%), éruption cutanée (55%), mucite et hypocalcémie (48%), HTA (42%)	EPP (23%), éruption cutanée et HTA (16%), perte de poids et mucite (10%), diarrhée (6%), infarctus du myocarde (10%)	58%	13%
	Phase II, (15 CMT ⁶³ , 19 CDT)	RC : 0% RP : 18 % (CDT) SSR/SG non atteintes	Diarrhée (77 %), infection (44 %), fatigue (59 %), douleurs abdominales, glossite ou glossodynies (35 %), anorexie (29 %), perte de poids, hémorragie (29 %)	Nd	79%	82%
	Phase III, randomisée, en double aveugle, contre placebo (417 patients) ⁵⁵	RP : 12.2% (p<0.0001) SSR : 10.8 vs 5.8 (p<0.0001) SG : p=0.14	EPP (76%), diarrhée (69%), alopecie (67%), éruption cutanée et fatigue (50%), diminution de l'appétit (47%), HTA (41%)	EPP (20%), HTA (10%), hypocalcémie (9%), diarrhée, fatigue, perte de poids (6%), dyspnée et éruption cutanée (5%)	64%	66%
Vandetanib	Phase II, randomisée, en double aveugle, contre placebo (145 patients) ⁶⁴	RP : 8%, p=0.50 SSR : 11.1 vs 5.9 mois (p=0.008) SG : p=0.42	Diarrhée (73%), HTA (34%), acné (27%), asthénie (26%), éruption cutané (25%), nausée (25%)	Allongement de l'espace QT à l'ECG (14%), diarrhées (10%), asthénie (7%)	22%	38%

Molécule	Design	Efficacité	Effets secondaires			
			Effets secondaires tout grade confondu survenant dans ≥25% des cas	Effets secondaires graves (≥grade 3) et survenant dans ≥5%	Réduction de doses (% de patients)	Interruption de traitement (% de patients)
Cabozantinib*	Phase I, simple bras, ouverte (15 patients), ≥ 2 ^{ème} ligne d'ITK ⁶⁵	RP : 8/15 (53%)	Diarrhées (87%), fatigue et diminution de l'appétit (80%), augmentation des transaminases (100%), perte de poids (73%), HTA (53%), EPP (40%)	Diarrhées (27%), élévation de la lipase (20%), HTA (13%), diminution du poids et de l'appétit (13%), EPP (13%), fatigue (7%)	93%	93%
	Phase II, simple bras, ouverte, en 2 ^{ème} ou 3 ^{ème} ligne d'ITK (25 patients) ⁶⁶	RP : 10/25 (40%) SSR : 12.7 mois SG : 34.7 mois	Fatigue (76%), EPP (76%), diarrhée (72%), anorexie (64%), perte de poids (60%), HTA (48%)	Dysfonction ventriculaire gauche (24%), Fatigue (12%), EPP (8%), élévation de la lipase (12%), perte de poids (12%), diarrhée (8%)	56%	Nd
	Phase III, contre placebo, ≥ 2 ^{ème} ligne d'ITK (187 patients) ⁵⁷	RP : 10/67 (15%) SSR : p<0.0001 SG : p= 0.27	Diarrhée (51%), EPP (45%), HTA (28%), fatigue (27%)	EPP (10%), HTA (9%), fatigue (8%), Diarrhée (7%), Hypocalcémie (7%)	56%	5%
Axitinib	Phase II, simple bras, ouverte, (34 patients), en 1 ^{ère} , 2 ^{ème} ou 3 ^{ème} ligne de traitement ⁶⁷	RC : 2/34 (6%) RP : 8/34 (24%) SSR : 7.4 mois SG : 20.7 mois	Asthénie (44%), diarrhée (35%), HTA (32%), mucite (35%)	Diarrhées (6%), anorexie (9%)	26%	nd

Molécule	Design	Efficacité	Effets secondaires			
			Effets secondaires tout grade confondu survenant dans ≥25% des cas	Effets secondaires graves (≥grade 3) et survenant dans ≥5%	Réduction de doses (% de patients)	Interruption de traitement (% de patients)
Dovitinib	Phase II, ouverte (28 patients) ⁶⁸	RP : 6/28 (21%) SSR : 5.9 mois	Diarrhée (54%), anorexie (36%), vomissements (26%)	Neutropénie (13%), diarrhée (5%)	33%	31%
Pazopanib	Phase II, ouverte (37 patients) ⁶⁹	RP : 5/37 (14%) SSR : 9.4 mois SG : 19.9 mois	Diarrhée (73%), Fatigue et hypopigmentation (59%), HTA (51%), Nausées (49%), Anorexie (43%), élévation des transaminases (39%)	Fatigue (14%), Diarrhée (8%), Perforation colique, EPP et dyspnée (5%),	40%	nd
Sunitinib	Phase II, ouverte (29 patients), 37.5 mg ⁷⁰	RC : 1/29 (3%) RP : 7/29 (24%) SSR : 12.8 mois SG : non atteinte	Leucopénie (34%), Fatigue, EPP et diarrhée (26%),	Leucopénie (34%), Fatigue (11%), diarrhée et EPP (17%), saignement digestif, anémie et tachycardie ventriculaire (6%)	60%	nd
	Phase II, ouverte (41 patients), 50 mg ⁷¹	RC : 1/41 (2%) RP : 8/41 (20%) SSR : 13.1 mois SG : 26.4 mois	Asthénie (83%), Mucite (65%), EPP (54%), autres toxicités cutanée (48%), toxicité cardiaque (14%)	Asthénie (25%), Mucite (10%), EPP (18%), diarrhée (10%), toxicité cardiaque (7%)	46%	Nd

Molécule	Design	Efficacité	Effets secondaires			
			Effets secondaires tout grade confondu survenant dans $\geq 25\%$ des cas	Effets secondaires graves (\geq grade 3) et survenant dans $\geq 5\%$	Réduction de doses (% de patients)	Interruption de traitement (% de patients)
Sunitinib	Phase II, ouverte (23 patients), 37.5 mg ⁷²	RP : 6/23 (26%) SSR : 8 mois SG : 56.5 mois	Leucopénie (83%), thrombopénie (57%), Fatigue et diarrhée (52%), Anémie (48%), EPP et nausée (39%), perte de poids et vomissements (35%)	Leucopénie et HTA (13%), EPP et anorexie (9%)	26%	13%
Motesanib	Phase II, ouverte (91 patients) ⁷³	RP : 14% SSR : 10 mois SG : non atteinte	Diarrhée (59%), HTA (56%), fatigue (46%), perte de poids (40%), douleurs abdominales (30%), nausées (28%)	Diarrhée (13%), HTA (26%), perte de poids et douleurs abdominales (5%),	Nd	Nd
Apatinib	Phase III randomisée, en double aveugle, contre placebo (92 patients) ⁷⁴	RP : 54,3 vs 2,2% SSR : 22,2 vs 4,5 mois (p<0.001) SG : non atteinte	EPP, HTA (87%), protéinurie (80%), diarrhée (54%), hypocalcémie (33%), Thrombopénie, céphalées (30%), neutropénie (28%)	EPP, protéinurie, (17%), HTA (35%), diarrhée (15%), hypocalcémie (6,5%)	37%	6,5%

Tableau 7 : Etudes cliniques évaluant l'efficacité et la tolérance d'inhibiteurs de tyrosine kinase dans le cancer thyroïdien réfractaire éligible à une thérapie ciblée.

*approuvé dans le cancer différencié de la thyroïde avancé ou métastatique, réfractaire à l'iode et évolutif. Les résultats significatifs sont indiqués en gras.

CDT = Cancer différencié de la thyroïde ; CMT = Cancer médullaire de la thyroïde ; RC= réponse complète ; RP=réponse partielle ; SSR=survie sans rechute ; SG=survie globale ; ns=non significatif ; nd=non disponible ; ITK=inhibiteurs de tyrosine kinases ; EPP = érythrodysesthésie palmo-plantaire ; HTA = Hypertension artérielle

– Autres inhibiteurs de kinases ciblant des altérations moléculaires précises

Les traitements anti angiogéniques constituaient jusqu'à très peu de temps la base du traitement en cas de maladie progressive. Depuis peu, des thérapies ciblées sur des altérations moléculaires précises sont venues compléter le panel de traitements disponibles. En effet, en dehors de traitements ciblant de multiples tyrosines kinases, principalement membranaires, d'autres kinases présentant des anomalies génétiques peuvent être la cible de traitements dans le cancer thyroïdien réfractaire. Les premiers traitements à avoir été testés sont des inhibiteurs de BRAF, comme le vémurafénib et le dabrafénib ^{75,76}. Plus récemment, le larotrectinib et l'entrectinib, des inhibiteurs de *NTRK*, ont l'AMM européenne dans les rares tumeurs présentant des fusions de gènes *NTRK* ^{77,78}. Le selpercatinib, anti-RET, a été autorisé par la FDA pour les patients atteints d'un cancer de la thyroïde réfractaire à l'iode radioactif avec fusion de RET ⁷⁹. La tolérance de ces traitements est en général meilleure avec une majorité d'effets indésirables de grade 1-2.

Les données d'efficacité et de tolérance des autres inhibiteurs de kinases en cours d'essai cliniques sont résumées dans le Tableau 8.

Molécule	Design et références des études	Efficacité	Effets secondaires			
			Effets secondaires les plus fréquents	Effets secondaires grave (grades 3/4) et ≥5%	Réduction de doses	Interruption de traitement
Larotrectinib (*si fusion de <i>NTRK</i>)	Phase I et II, ouverte, incluant toute tumeur solide avec fusion de <i>NTRK</i> (dont 17 cancers de la thyroïde) ^{78,80}	RC : 3/17 (17%) RP : 10/17 (59%)	Elévation des transaminases (38%), vertiges (26%), fatigue, nausée et constipation (16%)	Elévation des transaminases (5%)	15%	0%
Entrectinib (*si fusion de <i>NTRK</i>)	Phase II, incluant toute tumeur solide avec fusion de <i>NTRK</i> ou <i>ROS1</i> ou <i>ALK</i> (dont 4 cancers de la thyroïde) ⁸¹	RP : 2/4 (50%)	Fatigue (46%), dysgueusie (42%), paresthésies (29%), nausée (28%), myalgies (23%)	Aucun	nd	Nd
Selpercatinib (*si fusion ou mutation de <i>RET</i>)	Phase I/II incluant 143 CMT (naïf ou non de traitement) et 27 CDT (naïf ou non de traitement) ⁷⁹	Groupe CDT : Réponse globale 79%	Sècheresse buccale (39%), HTA (30%), fatigue (25%), augmentation transaminases (28%)	HTA (12%), augmentation transaminases (10%)	30%	2%
Pralsetinib (*si fusion ou mutation de <i>RET</i>)	Phase I/II incluant 122 CMT et 22 CDT ⁸²	Groupe CDT : RP : 89%	Augmentation transaminases, neutropénie (34%), constipation (28%), fatigue (26%), HTA (33%)	Neutropénie (14%), anémie (10%), HTA (17%), lymphopénie (12%)	46%	4%

Molécule	Design et références des études	Efficacité	Effets secondaires			
			Effets secondaires les plus fréquents	Effets secondaires grave (grades 3/4) et ≥5%	Réduction de doses	Interruption de traitement
Vemurafenib	Phase II, ouverte (51 patients mutés BRAF ^{V600E}) en 1 ^{ère} (A) ou 2 ^{ème} (B) ligne de traitement ⁷⁵	RP : 39% (A), 27% (B) SSR : 18.2 (A) et 8.9 mois (B) SG : non atteinte (A), 14.3 mois (B)	Eruption cutanée et asthénie (71%), perte de poids (53%), diminution appétit (47%), alopecie (41%), dysgueusie (39%), altération fonction rénale (37%)	Elévation des enzymes hépatiques, lymphopénie et dyspnée (8%), cancer secondaire (6%)	53%	75%
Dabrafenib	Phase I, ouverte (14 patients mutés BRAF ^{V600E}) ⁷⁶	RP : 4/14 (29%) SSR : 11.3 mois	Papillomes cutanés (57%), hyperkératose (36%) et alopecie (29%)	Douleurs abdominales, Constipation, neutropénie, pancréatite, Pneumonie, Carcinome épidermoïde (7%)	14%	50%
Everolimus	Phase II, simple bras, ouverte (25 patients) ⁸³	RP : 2/25 (8%) SSR : 10.8 mois SG : non atteinte	Mucite (84%), anorexie (44%), Elévation des transaminases (26%),	Mucite (15%), diarrhée (10%), Neutropénie et hypertriglycéridémie (5%)	nd	Nd
	Phase II, simple bras, ouverte (28 patients) ⁸⁴	RC/RP : 0% SSR : 9 mois SG : 18 mois	Anémie et toux (64%), stomatite et hyperglycémie (61%), HTA (54%), fatigue (50%), perte d'appétit et thrombopénie (39%)	Stomatite, dyslipidémie (cholestérol et/ou triglycérides) et HTA (11%), hypocalcémie (7%)	46%	4%

Molécule	Design et références des études	Efficacité	Effets secondaires			
			Effets secondaires les plus fréquents	Effets secondaires grave (grades 3/4) et ≥5%	Réduction de doses	Interruption de traitement
Everolimus	Phase II, simple bras, ouverte (33 patients) ⁸⁵	RP : 1/33 (3%) SSR : 12.9 mois SG : non atteinte	Mucite, acné, fatigue, toux, anémie, thrombocytopénie, élévation des transaminases (<50%)	Fatigue (12%), perte de poids et infection (9%), hypercholestérolémie, leucopénie et thrombopénie (6%)	Nd	Nd
Selumetinib	Phase II, ouverte, simple bras (39 patients) ⁸⁶	RP : 1/39 (3%) SSR : 8 mois	Eruption cutanée (77%), diarrhée et fatigue (49%), œdèmes (36%)	Eruption cutanée (18%), fatigue (8%), diarrhée (5%), œdèmes (5%)	31%	34%
Donafenib	Phase II, randomisée, ouverte (35 patients) ⁸⁷	RP : 11/35 (11%) SSR : 9 mois (200 mg) ; 15 (300 mg)	EPP (83%), alopecie (71%), HTA (46%), fatigue (26%), diarrhée (28%)	EPP (11%), HTA (23%), fatigue (26%), diarrhée (28%)	60%	nd

Tableau 8 : Etudes cliniques évaluant l'efficacité et la tolérance des autres inhibiteurs de kinases dans le cancer thyroïdien réfractaire éligible à une thérapie ciblée.

*approuvé dans le cancer différencié de la thyroïde avancé ou métastatique, réfractaire à l'iode et évolutif. Les résultats significatifs sont indiqués en gras.

RC= réponse complète ; RP=réponse partielle ; SSR=survie sans rechute ; SG=survie globale ; ns=non significatif ; nd=non disponible ; ITK=inhibiteurs de tyrosine kinase ; EPP = érythrodysesthésie palmo-plantaire

c) Immunothérapie

Le développement de l'immunothérapie, ciblant les molécules de costimulation, a modifié le paysage des traitements de nombreux cancers comme le cancer du poumon ou le mélanome ^{88,89}. Parmi les différentes immunothérapies existantes, il y a notamment les immunothérapies anti-PD1 (*Programmed cell Death protein 1*), et anti-PD-L1 (*Programmed death-ligand 1*), qui agissent au niveau des interactions entre les cellules immunitaires (lymphocyte T) et les protéines à la surface des cellules cancéreuses. PD-1 est une protéine présente à la surface des lymphocytes T. Celui-ci peut interagir avec une cellule tumorale via PD-L1, présent à sa surface. Cette interaction inactive le lymphocyte T et par conséquent, inactive un des mécanismes de défense du système immunitaire contre les cellules tumorales. Dans le cancer papillaire de la thyroïde, il a été montré que la fréquence des lymphocytes T régulateurs était augmentée et que l'expression de PD-L1 était corrélée à un risque accru de récurrence et à une réduction de la survie sans maladie ⁹⁰. Ainsi, le pembrolizumab, un anticorps monoclonal anti-PD-1, a été évalué chez les patients présentant une expression de PD-L1 $\geq 1\%$ ⁹¹. Cependant, le taux de réponse a été faible avec seulement 2/22 patients avec une réponse partielle. Une des explications de l'absence de réponse vient peut-être du fait que le cancer de la thyroïde présente une charge mutationnelle faible alors que la réponse à l'immunothérapie a été corrélée à l'importance de cette dernière ⁹². Ainsi, pour le moment, aucune immunothérapie n'est approuvée dans le cancer de la thyroïde.

d) Redifférenciation thyroïdienne

La stratégie de redifférenciation consiste à trouver des médicaments capables de restaurer la sensibilité à l'iode des cellules issues des cancers thyroïdiens réfractaires. De nombreux composés ont été testés pendant plusieurs années avec des résultats incohérents. Les agents ayant donné le plus de résultats sont des anti-MEK et anti-BRAF (Selumetinib, Vemurafenib, association Dabrafenib et Tramétinib) avec une augmentation suffisante de la captation de l'iode 131 pour envisager une radiothérapie métabolique dans 40% des cas et une réponse partielle pour environ la moitié des patients ^{48,93,94}.

Au total, les ITK ont permis d'améliorer la survie sans progression des patients avec un cancer thyroïdien réfractaire à l'iode radioactif. Cependant, ces traitements semblent montrer une réponse thérapeutique partielle. Ce traitement permet plutôt une stabilité temporaire de la maladie mais au prix d'effets secondaires impactant de manière significative la qualité de vie. Ainsi, la durée du traitement est déterminée par la progression de la tumeur et par la gestion des effets toxiques. L'immunothérapie et les stratégies de (re)sensibilisation tumorale à l'iode radioactif sont en cours. De nouvelles stratégies thérapeutiques semblent être nécessaires orientées vers des combinaisons de traitements.

1.8. Combinaison de traitements dans le cancer thyroïdien réfractaire

1.8.1. Combinaison de traitements en oncologie

Les combinaisons de traitements ont révolutionné le devenir des patients dans différentes maladies telles que le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), l'asthme, l'HTA mais aussi différents types de cancer comme le cancer

du sein ou le mélanome ⁹⁵. La synergie est définie par le fait que l'effet thérapeutique global de la combinaison des médicaments est plus important que la somme des effets causés indépendamment par chaque molécule. A côté de l'augmentation de l'efficacité du traitement, les combinaisons de traitements synergiques peuvent souvent réduire la toxicité et les effets secondaires indésirables, étant donné que les doses de chaque médicament de la combinaison sont généralement inférieures à celles des médicaments pris de manière individuelle pour atteindre l'efficacité souhaitée. Ces combinaisons peuvent également réduire le développement de résistance au traitement ou encore moduler l'immunité antitumorale ⁹⁵.

1.8.2. Combinaisons testées dans le traitement du cancer thyroïdien réfractaire

Dans le cancer de la thyroïde, une des stratégies actuelles est d'identifier des combinaisons de médicaments qui ciblent à la fois les voies principalement impliquées dans les processus tumoraux (PI3K et /ou MAPK) et des voies contournant ou interagissant avec les voies principales afin d'augmenter en efficacité et/ou lever les chimiorésistances ^{95,96}. De nombreuses études précliniques ont été menées afin d'évaluer l'effet de combinaisons d'inhibiteurs sur un panel de lignées cancéreuses de la thyroïde. La plupart des études cliniques ayant évalué ces combinaisons de traitements l'ont faite avec des chimiothérapies classiques. Les études avec des thérapies ciblées sont en cours.

a) Combinaisons avec une chimiothérapie classique

Les études se sont principalement focalisées sur le cancer anaplasique de la thyroïde. Plusieurs associations avec le paclitaxel, un agent anti microtubules, ont été testées sans effet synergique retrouvé, en particulier en combinaison avec l'acide valproïque, un inhibiteur des histones désacétylases, ou avec l'efatutazone, un agoniste de PPAR γ ⁹⁶. Une étude de phase I a exploré l'association de la capecitabine, un antimétabolite, avec l'irofulven, un dérivé semi-synthétique de l'illudin capable d'inhiber la synthèse de l'ADN ⁹⁷. Cette combinaison a été testée dans plusieurs tumeurs solides dont 4 cancers thyroïdiens. Pour deux d'entre eux, une réponse partielle a été observée.

b) Combinaison d'inhibiteurs de kinases

Le sorafenib a montré des effets intéressants en combinaison avec un inhibiteur de m-TOR (*mammalian target of rapamycin*) (temsirolimus, everolimus). La combinaison du sorafenib avec le temsirolimus semble être plus efficace que le sorafenib seul chez les patients avec un cancer thyroïdien réfractaire à l'iode radioactif. Les résultats obtenus étaient une réponse partielle chez 8/36 (22%) patients et une stabilité de la maladie chez 21/36 (58%) ⁹⁸. L'association Sorafenib et everolimus semble montrer une meilleure réponse et une moindre toxicité par rapport au Sorafenib en monothérapie dans le cancer différencié de la thyroïde (Abstract, ASCO 215). Plusieurs essais cliniques sont en cours (NCT01141309, NCT01263951, NCT02143726). Des inhibiteurs de MEK1/2 comme le Trametinib ont été évalués en combinaison avec le dabrafenib (inhibiteur BRAF). Cependant, les résultats préliminaires d'une étude réalisée chez des patients présentant un cancer différencié de la thyroïde et muté BRAF^{V600E} n'a pas montré d'amélioration clinique (NCT02034110) ⁹⁹.

c) Immunothérapie

En l'absence de réponse de l'immunothérapie seule, des études sont en cours évaluant une combinaison de traitements associant l'immunothérapie avec des thérapies ciblées ¹⁰⁰. Par exemple, une étude de phase II évaluant le pembrolizumab, un anticorps monoclonal anti-PD-1, au lenvatinib chez 60 cancers différenciés de la thyroïde est en cours (NCT02973997).

d) Autres combinaisons de traitement

Il a été montré qu'un mécanisme d'échappement aux thérapies ciblées passait par une surexpression des récepteurs HER2/3 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor*) et l'activation de mTOR et MEK ¹⁰¹. Ainsi, le ciblage de ces différentes voies a été évalué en combinaison avec au moins deux traitements et a montré des résultats prometteurs *in vitro* et *in vivo* ⁹⁶. En recherche clinique, le ciblage des récepteurs HER dans le cancer de la thyroïde a également été évalué. Un essai de phase I évaluant le lapatinib (inhibiteur HER2/3) en combinaison avec le dabrafenib (inhibiteur BRAF) chez des patients présentant un cancer différencié de la thyroïde est en cours (NCT01947023). Les premiers résultats semblent indiquer un taux de réponse partielle de l'ordre de 60% et une faible incidence d'effets secondaires graves ¹⁰².

Actuellement, la recherche de combinaison de traitements dans le cancer thyroïdien réfractaire s'est limitée à la recherche de traitements plus efficaces, contournant les mécanismes de résistance aux ITKs. La question de la réduction de la toxicité a été nettement moins abordée. Par ailleurs, le nombre de combinaisons et le type de cibles thérapeutiques ont été limités. A titre d'exemple, dans le cancer différencié de la thyroïde, le sorafenib n'a été testé en association qu'avec 8 molécules (withaferine A, dactolisib, curcumin, chloroquine, quinacrine, metformine, everolimus et temsirolimus), principalement dans des modèles *in vitro* avec toutefois des effets synergiques retrouvés pour la plupart d'entre eux ⁹⁶. Le développement de criblage pharmacologique à plus haut débit semble donc nécessaire afin de sélectionner de nouvelles combinaisons thérapeutiques.

Les combinaisons les plus prometteuses dépendent des cibles choisies. Une cible émergente en cancérologie est la famille des récepteurs couplés aux protéines G.

2. Les récepteurs couplés aux protéines G et cancer

2.1. Généralités sur les RCPG

La famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) comprend plus de 800 membres et constitue environ 4% du génome humain, ce qui en fait la plus grande famille de récepteurs membranaires impliqués dans la transduction de signaux extracellulaires ¹⁰³. Environ la moitié ont des fonctions sensorielles, médiatrices de l'olfaction (~400), du goût (33), de la perception de la lumière (10) et de la signalisation des phéromones (5). L'autre moitié (~350-400) sont appelés endo-récepteurs, c'est-à-dire des récepteurs capables de se lier à des ligands endogènes. On désigne sous le terme RCPG orphelins, les récepteurs pour lesquels aucun ligand n'est connu. L'ensemble de ces récepteurs est impliqué dans la détection de très nombreux stimuli extracellulaires : des plus petits comme les photons ou les ions aux grosses protéines (hormones, chimiokines...) en passant par de nombreuses petites molécules (peptides, acides aminés, nucléotides...) ¹⁰⁴. Ainsi, ils sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques incluant la vision, l'odorat, la neurotransmission, la libération d'hormones et d'enzymes, la réponse immunitaire, l'hémostase, la régulation de la pression artérielle, le renouvellement cellulaire....

2.1.1. Structure

Malgré la grande hétérogénéité de leurs ligands, tous les RCPG, appelés aussi récepteurs à sept domaines transmembranaires sont caractérisés par une structure commune. La partie centrale est composée de 7 domaines transmembranaires (TM1-7) reliés entre eux par une alternance de 3 boucles intracellulaires (ICL 1-3) et 3 boucles extracellulaires (ECL 1-3). L'extrémité N-terminale est toujours située en extracellulaire et l'extrémité C-terminale en intracellulaire ¹⁰⁴ (Figure 9). Ainsi la structure commune des RCPG peut être divisée en 3 parties. La première est la région extracellulaire qui comprend l'extrémité N-terminale et les 3 boucles extracellulaires. Au niveau des boucles extracellulaires, des ponts disulfures peuvent être présents au niveau de résidus cystéines conservés ainsi que des sites de glycosylation permettant la stabilité du récepteur. Cette région est très variable d'un récepteur à l'autre car elle module l'accès au ligand ¹⁰⁴. La longueur et la composition en acides aminés va donc varier modifiant l'hydrophobicité et la charge de l'extrémité N-terminale. La seconde partie est représentée par les domaines transmembranaires composés de 7 hélices α hydrophobes insérées dans la bicouche lipidique. Cette partie est particulièrement bien conservée, chaque domaine transmembranaire est composé d'environ 25 à 35 acides aminés. L'angle d'inclinaison de ces hélices dépend du type de récepteur et de son état d'activation. Enfin, la troisième partie est composée des 3 boucles intracellulaires, de l'extrémité C-terminale et parfois d'une petite hélice 8 intracellulaire. Comme pour l'extrémité N-terminale, la longueur de l'extrémité C-terminale peut varier entre les récepteurs et elle peut subir plusieurs modifications (phosphorylation, palmitoylation) modulant le couplage avec ses différents partenaires (protéines G, autres protéines membranaires ou solubles) et modulant ainsi les différentes voies de signalisation d'aval ¹⁰⁴.

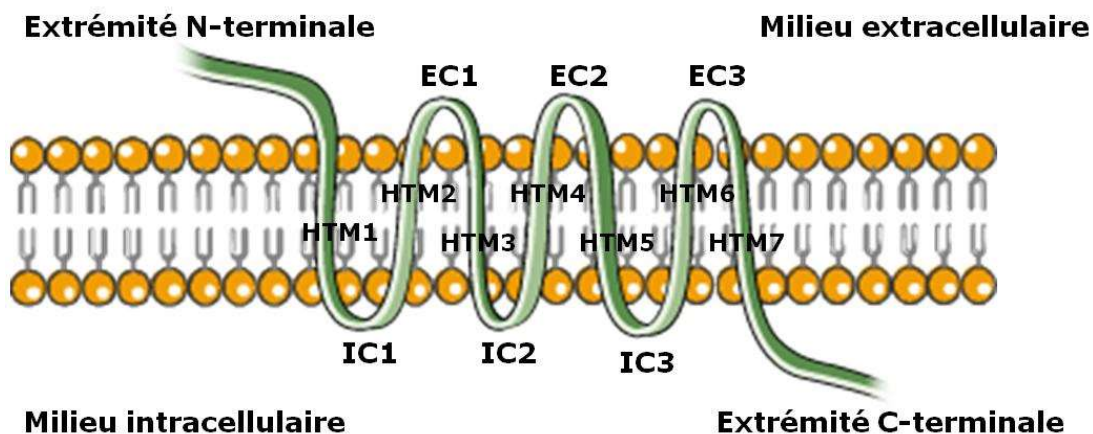


Figure 9 : Représentation schématique de la structure commune des récepteurs couplés aux protéines G. Figure modifiée d'après *Bockaert et al, 1994*. Le récepteur est inséré dans la bicouche lipidique de la membrane cellulaire. Abréviations : EC : extra-cellulaire ; IC : intra-cellulaire ; HTM : hélice transmembranaire.

2.1.2. Classification

Plusieurs classifications existent pour séparer les différents RCPG. La classification A-F, reprise par l'IUPHAR (*International Union of Pharmacology*), basée sur l'homologie de séquences, divise les RCPG en 6 classes (classes A à F). Ces classes et leurs chefs de file sont les suivants : Classe A (« Rhodopsin-like »), classe B (« Secretin-like »), classe C (glutamate métabotropique), classe D (récepteurs des phéromones), classe E (récepteurs de l'AMP cyclique) et classe F (Frizzled/smoothened). Les classes D et E ne sont utilisées que pour les invertébrés ¹⁰⁵. La classification GRAFS (Glutamate, Rhodopsine, Adhésion, Frizzled/Taste2 et Sécrétine), basée en fonction de l'origine phylogénétique, divise les RCPG des vertébrés en 5 classes en isolant les récepteurs d'adhésion ¹⁰⁶ (Figure 10).

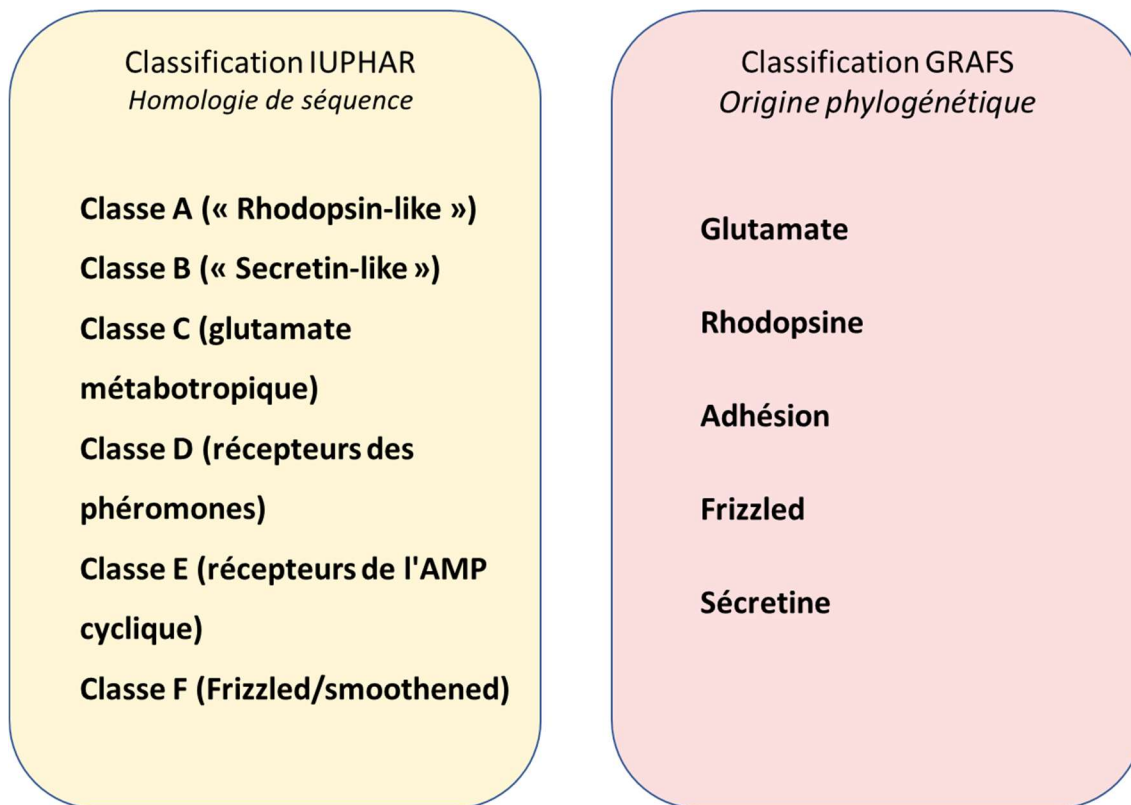


Figure 10 : Classification des récepteurs couplés aux protéines G.

La classification de l'Union internationale de pharmacologie (IUPHAR) (colonne de gauche) s'applique à la fois aux vertébrés et aux invertébrés (les classes D et E sont propres aux invertébrés). Le système GRAFS (colonne de droite) s'applique spécifiquement aux vertébrés.

a) **Classe A (« Rhodopsin-like »)**

La famille de RCPG de classe A, dite « Rhodopsin-like », représente plus de 85% des RCPG chez l'homme et compte à ce jour 719 membres ¹⁰⁷. Cette famille de récepteur peut lier une grande diversité de ligands (chimiokines, neuropeptides, glycoprotéines...) et comprend également des récepteurs olfactifs, visuels et gustatifs ¹⁰⁶. Ils partagent des homologies de séquence, notamment le motif NSxxNPxxY au niveau de l'hélice 7 et le motif e/DRY entre le 3^{ème} domaine transmembranaire et la 2^{ème} boucle intracellulaire ¹⁰⁸. Sur le plan structurel, cette famille est caractérisée par une structure relativement simple avec une extrémité N-terminale courte. Le site de liaison des ligands implique principalement les domaines transmembranaires ainsi que les boucles extracellulaires à l'exception des récepteurs aux glycoprotéines (récepteurs de la LH, *luteinizing hormone*, FSH, *Follicle Stimulating Hormone*, TSH et les LGR, *leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptors*) où la liaison au ligand se situe au niveau de l'extrémité N-terminale ¹⁰⁶. Les récepteurs de la classe A non-olfactifs ont été divisés en 12 sous-familles selon la classification GRAFS, qui les regroupe le plus souvent selon le type de ligand : opsines, mélatonines, mélanocortines-endoglucocannabinoïdes-adénosines (MECA), peptides, somatostatine/opioïde/galanine (SOG), mélanine, chimiokines, MAS, glycoprotéines, purines, prostaglandines, amines ¹⁰⁶.

b) **Classe B (« Secretin-like »)**

Une des différences importantes entre les RCPG de classe B, dite « Secretin-like » avec la classe A est la taille de l'extrémité N-terminale, beaucoup plus longue chez la classe B, à l'exception des récepteurs de type LGR de la classe A, souvent entre 60 et 80 acides aminés mais pouvant aller jusqu'à 300 acides aminés ¹⁰⁹. Cette extrémité N-terminale contient des ponts de cystéines conservées ¹⁰⁹. Ce domaine extracellulaire est important pour la liaison du ligand à ces récepteurs permettant la liaison à des ligands volumineux comme des hormones peptidiques (glucagon, GLP, *glucagon like peptide 1* et *2*, VIP, *Vasoactive Intestinal Peptide*, GIP, *Gastric Inhibitory Polypeptide...*)¹⁰⁹. La classe B est souvent divisée en deux sous-sections, la première (B1) regroupant les récepteurs proches de la sécrétine et du VIP (15 membres), la seconde (B2) étant la famille des récepteurs d'adhésion (33 membres).

c) Récepteurs d'Adhésion

Une des principales caractéristiques de la classification GRAFS est la séparation des récepteurs d'adhésion des récepteurs de type « sécrétine » ¹⁰⁶. En effet, il est apparu qu'ils sont différents des récepteurs de la sécrétine sur différents points. Ces récepteurs se distinguent principalement par une longue extrémité N-terminale composée de divers domaines, notamment des domaines d'adhésion, et un domaine d'autoprotéolyse qui permet au récepteur un auto-clivage pendant sa maturation ¹¹⁰. Enfin, alors que les récepteurs de type « sécrétine » servent souvent de médiateurs pour les réponses hormonales, les récepteurs d'adhésion ont un rôle dans l'adhésion cellule-cellule et cellule-matrice ¹¹¹.

d) Classe C (Glutamate)

La famille des RCPG de classe C comprend principalement les récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluRs), du GABA_B (acide gamma-aminobutyrique), du calcium extracellulaire (*calcium-sensing receptor*) et quelques récepteurs orphelins ^{106,112}. Elle comprend également trois récepteurs de type 1 du goût. Ces récepteurs sont caractérisés par un très grand domaine extracellulaire (~ 600 acides aminés). Une des caractéristiques des récepteurs de la famille C est la nécessité d'une dimérisation entre deux récepteurs identiques (homodimérisation) ou entre deux récepteurs différents (hétérodimérisation) pour permettre son activation. Après dimérisation, le repliement des extrémités N-terminales de chaque récepteur va former deux lobes séparés par une cavité, appelée "attrape-mouche de Vénus" (« *Venus FlyTrap* »), qui constitue le site de liaison au ligand ¹¹².

e) Classe F (Frizzled)

La famille des RCPG de classe F se compose de 10 récepteurs *Frizzled* (FZD) et d'un récepteur *smoothened* (SMO) chez l'homme ¹¹³. Les récepteurs Frizzled ont été classés dans la famille des RCPG de façon assez récente lorsqu'il a été démontré que la liaison de lipoglycoprotéines sécrétées de la famille WNT (*Wingless/Int-1*) au récepteur pouvait induire un couplage aux protéines G. Ils présentent une structure similaire à l'extrémité N-terminale, avec une séquence signal permettant l'insertion de la protéine à la membrane, suivie du domaine Frizzled, un domaine riche en cystéine hautement conservé qui peut constituer le site de liaison de WNT ¹¹³. SMO est indirectement activé par la famille de protéines Hedgehog (HH) agissant sur la protéine transmembranaire Patched (PTCH).

2.2. Anomalies génétiques des RCPG associés au cancer

En activant de nombreuses voies de signalisation, les RCPG régulent un grand nombre de fonctions cellulaires comme la viabilité des cellules, la prolifération, la migration, l'invasion et l'angiogenèse. Or ces fonctions sont retrouvées dans les processus tumoraux soulevant ainsi le rôle des RCPG en cancérologie.

Grâce aux données récentes d'oncoGPCRome, il a pu être mis en évidence que près de 20% de l'ensemble des tumeurs humaines présentaient des mutations dans les gènes codant pour des RCPG ¹¹⁴. Parmi l'ensemble de ces RCPG, les récepteurs les plus fréquemment mutés appartiennent à la famille des récepteurs d'adhésion et aux récepteurs du glutamate ^{115,116}. La plupart de ces mutations n'ont pas été caractérisées et il est difficile de préjuger de leur pathogénicité et de savoir si elles entraînent une perte ou un gain de fonction du récepteur. De manière intéressante, la plupart de ces mutations semblent survenir dans les mêmes motifs structuraux, à savoir les domaines d'activation du récepteur, de liaison au ligand ou aux protéines ¹¹⁶. Ainsi, même si ces mutations ne sont pas retrouvées au sein des mêmes codons, les RCPG semblent se comporter comme les autres oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs avec ce qu'on pourrait appeler des « hotspots » structuraux ¹¹⁷. Les principaux RCPG mutés au sein de tumeurs sont représentés dans la Figure 11.

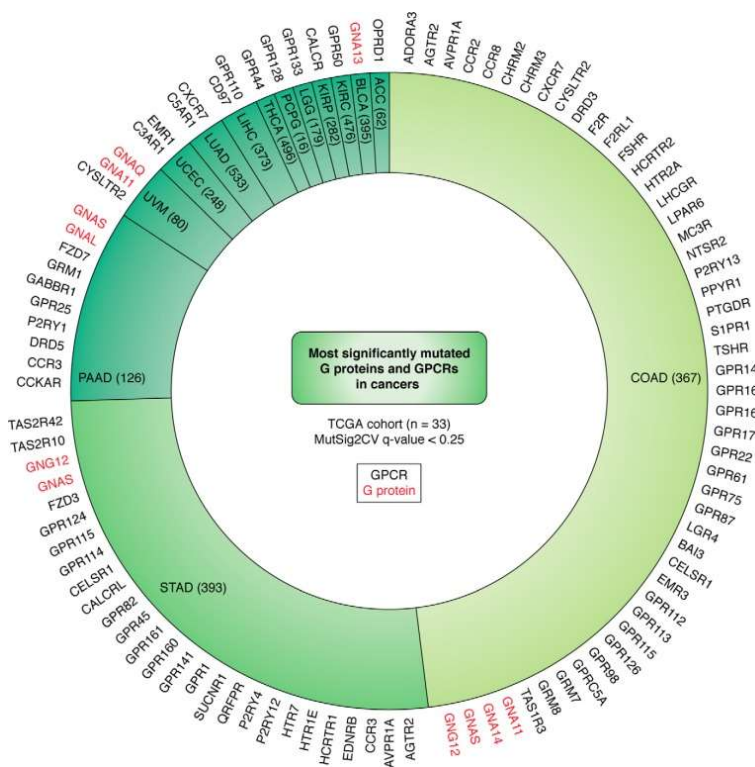


Figure 11 : Principales mutations des récepteurs couplés aux protéines et des protéines G dans le cancer. Les données proviennent la cohorte TCGA. Les mutations intéressant les RCPG sont indiquées en noir et celles concernant les protéines G en rouge, d'après Wu et al. 2019, *J Biol Chem.* 2019 Jul 19;294(29):11062-11086

2.3. Modifications d'expression des RCPG associées au cancer

Même non mutés, les RCPG peuvent jouer un rôle important dans la progression tumorale. En effet, il semble que ce soit des modifications d'expression des RCPG qui contribuent davantage à leur implication dans les processus

tumoraux ¹¹⁸. De plus, les récepteurs surexprimés sont très rarement mutés ¹¹⁷. Les modifications d'expression peuvent correspondre à une surexpression, une sous-expression ou une expression aberrante de RCPG au sein des tissus tumoraux. Il faut toutefois souligner que ces modifications d'expression sont le plus souvent observées au niveau transcriptionnel. En effet, du fait de la difficulté de disposer d'anticorps validés pour les RCPG, le niveau d'expression protéique et surtout membranaire est difficile à étudier ¹¹⁹. Ainsi, il a été montré que la plupart des tumeurs exprimait un ensemble commun de RCPG. Certaines tumeurs exprimaient plus de 150 RCPG différents, dont certains à des niveaux relativement élevés ^{116,120}. Ils appartiennent aux différentes classes des RCPG (A/Rhodopsine, B/Secretine, C/Glutamate, Adhésion, Frizzled). Un grand nombre des récepteurs exprimés sont des RCPG peu ou pas étudiés, dont des récepteurs orphelins. Les analyses de mesure d'expression différentielle des ARNm entre le tissu tumoral et le tissu sain ont également montré que plus de 50 RCPG présentaient une différence d'expression significative, environ un tiers sont surexprimés (comme *FPR3*, *F2RL1* et *GPR160*) et un tiers étaient sous-exprimés au sein des tumeurs (*GABBR1*, *GPR146*, *ACKR1*) ¹¹⁷. Ces différences d'expression entre le tissu sain et le tissu tumoral appuie l'idée que ces RCPG sont impliqués dans les différents composants de la réponse tumorale (prolifération, invasion, angiogenèse...) même si, pour certains, ce rôle n'est pas décrit.

2.4. Implication des RCPG dans le processus tumoral

2.4.1. Rôle des RCPG dans le développement du cancer

De nombreux RCPG sont surexprimés dans différents types de cancers et contribuent à la croissance des cellules tumorales après activation par un ligand circulant ou produit localement par la tumeur ou son microenvironnement ¹¹⁸. En effet, de plus en plus de neuropeptides (bombésine, neurotensine, somatostatine...) sont décrits comme ayant un rôle dans la prolifération cellulaire de différents types de cancer. L'activation de ces récepteurs entraîne une diminution de l'apoptose, une augmentation de la prolifération cellulaire, de la migration et de l'invasion *in vitro* et *in vivo* ^{118,121,122}. Même si la plupart des RCPG caractérisés semblent avoir un rôle pro-tumoral, certains agiraient plutôt comme suppresseur de tumeur. En effet, le premier gène suppresseur de tumeur, *KISS1*, est le ligand spécifique d'un RCPG, *GPR54/KISS1-R* ¹²³. D'autres récepteurs retrouvés sous-exprimés au sein de tumeurs pourraient aussi jouer un rôle anti tumoral ¹²⁴.

2.4.2. Rôle des RCPG dans l'angiogenèse tumorale

Du fait d'une augmentation des besoins en nutriments et en oxygène ; la tumeur a besoin de développer une angiogenèse tumorale. Ainsi, à côté des RCPG impliqués dans la croissance et la dissémination des cellules tumorales, certains sont plutôt impliqués dans cette angiogenèse. C'est le cas par exemple des récepteurs de la thrombine (famille des PAR) qui favorisent l'angiogenèse en augmentant l'activité des métalloprotéases et l'expression et l'activité du récepteur au VEGF ^{125,126}. Les récepteurs aux chimiokines *CCL2*, *CCL5* et *CXCL8* permettent quant à eux le recrutement de leucocytes et macrophages au niveau du site tumoral permettant la production de VEGF favorisant la croissance des vaisseaux sanguins associés à la tumeur ^{125,127}. Ainsi, certains RCPG vont participer à la réponse angiogénique en agissant directement sur les cellules endothéliales en favorisant la prolifération, la migration et la formation de nouveaux vaisseaux. D'autres RCPG vont agir indirectement en stimulant la libération de facteurs proangiogéniques favorisant là aussi la progression de nombreuses tumeurs solides ^{118,125}.

2.4.3. Rôle des RCPG dans le développement des métastases

Le développement des métastases consiste en la diffusion des cellules cancéreuses depuis le site primaire vers les sites tumoraux secondaires par voie hématogène et/ou lymphatique. Ceci nécessite des mécanismes directionnels afin d'orienter la migration et l'invasion du tissu cible par les cellules tumorales ¹²⁸. Même si l'ensemble des mécanismes sous-jacents ne sont pas élucidés, les récepteurs aux chimiokines, appartenant tous à des RCPG jouent un rôle primordial dans ce processus ¹²⁹. En effet, les chimiokines induisent naturellement la migration des cellules immunitaires *via* leur interaction avec les RCPGs. Les cellules tumorales vont de la même manière détourner le réseau des récepteurs aux chimiokines pour pouvoir migrer vers les sites secondaires métastatiques. Les chimiokines sont sécrétées par la tumeur mais aussi par les cellules stromales ^{127,129}. Ainsi CXCL12 va activer CXCR4 au niveau principalement du poumon, du foie et de la moelle osseuse ^{129,130}. CCL21 et CCL19, via le récepteur CCR7, interviendrait plutôt au niveau des métastases ganglionnaires ¹³¹. Même si ces deux RCPG sont les plus présents au niveau des métastases, d'autres récepteurs aux chimiokines pourraient être spécifiques à certains organes métastatiques. D'autres RCPG semblent également participer au développement des métastases comme la famille des récepteurs de la thrombine (PAR) et de l'acide lysophosphatidique (LPAR) ¹²².

2.5. Voies de signalisation des RCPG impliquées dans le cancer

Le nom de la super famille des RCPG indique que ces récepteurs interagissent avec les protéines G. De plus, ils sont connus pour avoir de nombreuses voies de signalisation alternatives, interagissant directement avec un certain nombre d'autres protéines telles que les β -arrestines ou les canaux ioniques de façon indépendante des protéines G. Les voies canoniques et non canoniques des RCPG sont activées en contexte tumoral. Bien que parfois très en aval des RCPG, différentes voies décrites dans le cancer peuvent également être activées de manière dépendante ou non des protéines G. L'ensemble de ces voies va pouvoir réguler l'expression des gènes, le cycle cellulaire, la migration, la survie cellulaire et ainsi contribuer au développement et à la progression tumorale.

La Figure 12 résume de façon très schématique les voies de signalisation médiées par les RCPG et associées au cancer.

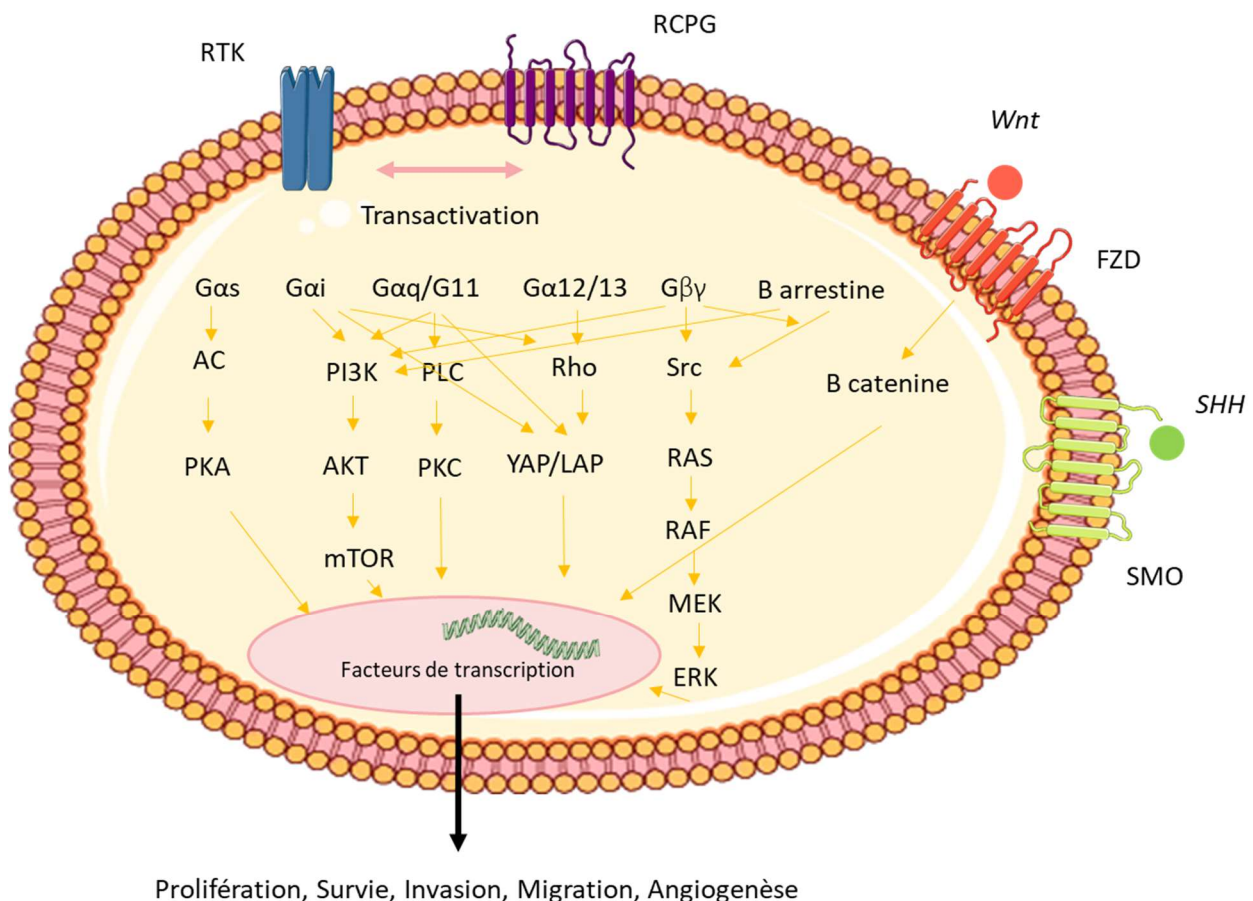


Figure 12 : Voies de signalisation cellulaire médiées par les RCPG et associées au cancer.

Lors de la liaison avec le ligand, le RCPG active plusieurs voies de signalisation en aval, y compris des voies secondaires comme les MAPK et les PI3K. Ces cascades de signalisation médiées par les récepteurs sont à l'origine de divers processus physiopathologiques tels que la croissance, la survie, la différenciation et le développement des cellules. Abréviations : RTK : récepteur à tyrosine kinase, RCPG : récepteurs couplés aux protéines G, FZD : Frizzled ; SMO : Smoothed, SHH : Sonic HedgeHog ; PLC : phospholipase C ; AC : adénylate cyclase ; PKA : protéine kinase A ; PI3K : phosphoinositide 3-kinase. *Modifiée, d'après Raymond JH et al, Cancers (Basel). 2022 Jan 29;14(3):706.*

2.5.1. Voies de signalisation couplées aux protéines G

De façon classique, l'activation des RCPG passe par la liaison du récepteur à son ligand, conduisant secondairement à l'activation de protéines G hétérotrimériques composées de sous-unités α , β , et γ . Contrairement au nombre important de gènes codant pour les RCPG, seulement 16 gènes codent pour les protéines Ga. Elles sont généralement regroupées en quatre classes principales (Gs, Gi/o, Gq/11 et G12/13) en fonction de la similarité des séquences des sous-unités Ga¹³². La capacité de ce nombre limité de protéines G à se coupler à un ensemble très divers de récepteurs suggère un mécanisme conservé d'activation des protéines G, impliquant des changements dans le type de nucléotides liés à la sous-unité Ga. En effet, lorsqu'elle est liée au GDP, Ga s'associe au dimère G $\beta\gamma$ pour former un hétérotrimère inactif¹⁰⁴. La liaison du RCPG à son ligand entraîne un changement de conformation stimulant la libération de GDP de la sous-unité Ga. En raison de la forte concentration de GTP dans les cellules, le complexe récepteur-protéine G se lie rapidement au GTP. Par la suite,

la sous-unité Ga subit des changements conformationnels qui entraînent la dissociation de l'hétérotrimère en un monomère lié au GTP (Ga) et en un dimère $\beta\gamma$ ¹⁰⁴. Il a été démontré que les deux sous-unités modulent l'activité de différentes protéines effectrices en aval. La protéine Ga va ensuite interagir avec différentes protéines modulant diverses voies de signalisation. Ainsi, l'activation d'un RCPG qui se couple à la protéine Gas entraîne l'activation de l'adénylate cyclase conduisant à la production d'AMP cyclique (AMPC). En revanche, l'activation d'un RCPG qui se couple à la protéine Gai provoque la suppression des activités de l'adénylate cyclase, ce qui entraîne une réduction des niveaux cytoplasmiques d'AMPC. La sous-unité Gai peut aussi activer certaines phosphodiesterases, enzymes responsables de la dégradation de l'AMPC. La protéine Gaq permet l'activation de la phospholipase C β , hydrolysant le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP2) en diacylglycérol (DAG) et en inositol 1,4,5 triphosphate (IP3). L'IP3 entraîne ensuite une augmentation du calcium intracellulaire par libération du réticulum endoplasmique. La signalisation G12/13 implique une famille de RhoGEFs qui va stimuler la Rho GTPase¹³³. D'autres effecteurs peuvent être la cible des sous-unités Ga telles que les phospholipases D et A2 ou encore la GMP cyclase. Les seconds messagers produits vont à leur tour être l'activateur de d'autres enzymes comme des kinases : protéine kinase A (PKA), dépendante de l'AMPC, la Protéine kinase G (PKG) dépendante du GMPc, la protéine kinase C (PKC) dépendante du calcium ou encore des enzymes sensibles au calcium comme la calcineurine. Environ 10% des RCPG sont capables de se coupler avec différents types de sous-unité Gs selon le type et le contexte cellulaire¹³⁴. Certains RCPG peuvent effectuer un *Switch* moléculaire passant d'une voie Gs à une voie Gi, régulant ainsi inversement la même voie de signalisation selon les conditions physiopathologiques et/ou les modifications post-traductionnelles¹³⁵.

La sous-unité G $\beta\gamma$ est capable d'activer une multitude d'effecteurs. En contexte tumoral, le dimère G $\beta\gamma$ est décrit comme médiateur pour l'activation des ERK. Il peut également recruter des GRK (*G protein receptor kinases*, GRK1-7) au niveau de la membrane. Il est aussi capable d'agir sur les canaux ioniques comme le GIRK (*G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channels*) et les canaux calciques dépendant du potentiel, d'activer la PI3K, des phospholipases et les protéines kinases de la voie MAPK pour provoquer divers effets cellulaires. Cette signalisation semble contribuer à la survie cellulaire et l'action pro-migratoire au niveau des métastases de différents RCPG¹³⁶.

La signalisation médiée par la protéine G est interrompue lorsque la sous-unité Ga hydrolyse le GTP en GDP, en raison de son activité GTPase intrinsèque. Ceci entraîne alors la réassociation de Ga avec G $\beta\gamma$ pour former l'hétéro trimère inactif. Cette activité d'hydrolyse est régulée par différentes protéines comme les RGS (*Regulator of G protein signaling*) afin de moduler à la fois la durée et l'intensité de la signalisation dépendante des protéines G. La Figure 13 illustre les voies de signalisation couplées aux protéines G.

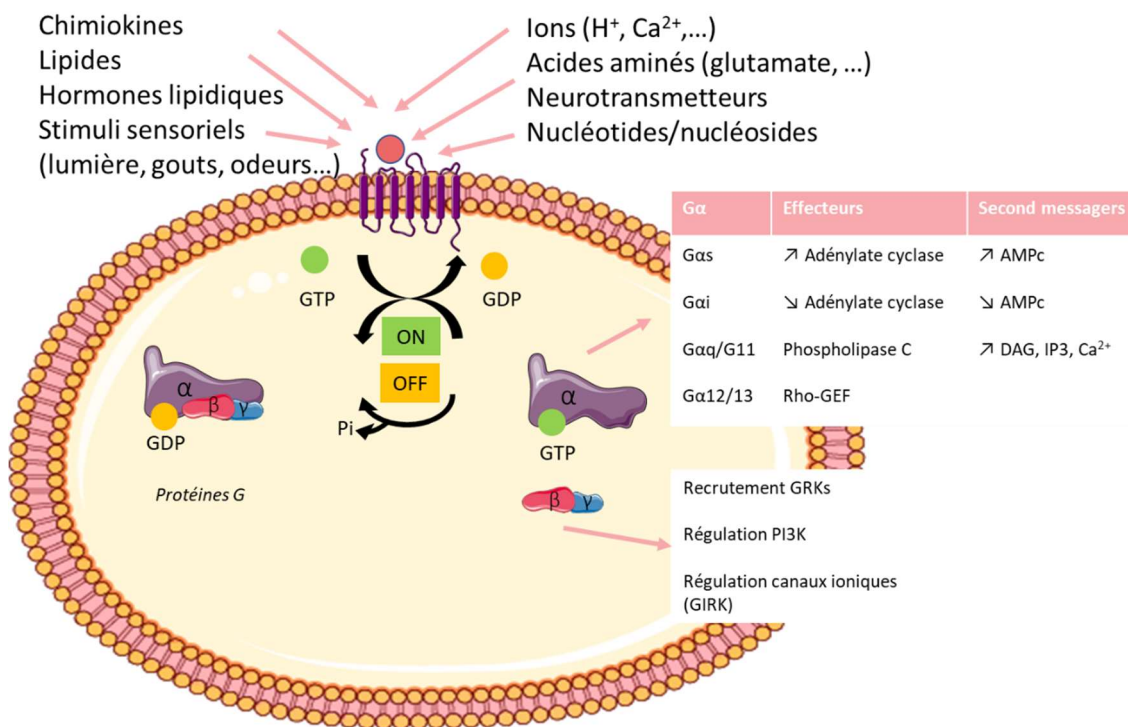


Figure 13 : Les voies de signalisation couplées aux protéines G.

Après la liaison au ligand, le récepteur couplé aux protéines G adopte une conformation active et se couple avec à une protéine G hétérotrimérique. Cette interaction entraîne l'échange de GDP en GTP et la dissociation de la sous-unité α des sous-unités $\beta\gamma$. Ces sous-unités vont ensuite réguler différents effecteurs entraînant une modification de seconds messagers intracellulaires. Abréviations : IP3 : inositol-1,4,5-trisphosphate ; DAG : diacylglycérol ; PI3K : phosphoinositide 3-kinase ; GRK : récepteur couplé à la protéine G ; GRK : G protein receptor kinases, GIRK : G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channels ; *Modifiée, d'après Sutkeviciute Iet al. J Biol Chem. 2020 Aug 14;295(33):11626-11642.*

2.5.2. Voies de signalisation de la bêta-arrestine

L'une des avancées les plus importantes dans le domaine des RCPG au cours des dernières décennies a été que la transduction du signal des RCPG est également liée à la β -arrestine. L'activation d'un RCPG par son ligand va conduire à sa phosphorylation au niveau des résidus serine ou thréonine des boucles intracellulaires et de l'extrémité C-terminale intracellulaire ¹⁰⁴. Cette phosphorylation peut être faite par les GRK mais aussi par des protéines kinases dépendantes des seconds messagers (PKA, PKC). Les résidus phosphorylés diffèrent d'un récepteur à un autre et la position des phosphorylations semble avoir des répercussions sur le devenir du récepteur. Ces phosphorylations sont reconnues par les β -arrestines qui vont être transloquées du cytoplasme vers la membrane au niveau de ces sites de liaison. Il n'existe que quatre isoformes d'arrestine. Alors que arrestine-1 et arrestine-4 ont une distribution tissulaire limitée à la rétine, arrestine-2 et arrestine-3, également connus sous les noms de β -arrestine 1 et β -arrestine 2, sont distribuées de manière ubiquitaire ¹³⁷. Initialement, le couplage à la β -arrestine était décrit comme une fonction d'arrêt de la signalisation. En effet, ce couplage, par un mécanisme d'encombrement stérique, bloque toute signalisation médiée par la protéine G ¹³⁷. Une désensibilisation dite hétérologue peut également être effectuée *via* les kinases activées par les seconds messagers (PKA, PKB, PKC) ¹³⁸. La deuxième fonction habituelle de la β -arrestine pour limiter la signalisation dépendante de la protéine G est son rôle dans l'internalisation des récepteurs ¹³⁹. En effet, les β -arrestines se

lient à différentes protéines impliquées dans l'internalisation des récepteurs en particulier la clathrine et son adaptateur l'AP2 (*Adaptor Protein Complex 2*). Il transporte le complexe vers des puits de clathrine permettant l'endocytose ¹³⁹. Ensuite, la stabilité du complexe RCPG- β -arrestine détermine si les récepteurs se recyclent à la surface de la cellule ou s'ils sont dégradés (classes A et B, différentes de la classification des récepteurs précédemment décrite) ¹⁴⁰. Ainsi, les récepteurs de la classe A forment des complexes transitoires RCPG- β -arrestine, principalement la β -arrestine 2, qui subissent un recyclage rapide vers la membrane plasmique, tandis que les récepteurs de la classe B qui forment des complexes plus stables avec les deux types de β -arrestine vont se recycler lentement ou être ciblés pour la dégradation ¹⁴⁰. Les β -arrestines sont elles-mêmes fortement régulées, notamment par ubiquitinylation ¹⁴¹.

Aujourd'hui, d'autres fonctions associées aux β -arrestines sont étudiées et le couplage à la β -arrestine est de plus en plus décrit comme des protéines « échafaudages » impliquées dans de multiples voies de signalisation intracellulaires régulant la prolifération et la motilité cellulaires ¹⁴². En effet, à côté de la clathrine, les β -arrestines sont capables de se lier avec de nombreuses protéines impliquées dans différentes voies de signalisation telles que les tyrosines kinases de la famille Src, les kinases ERK1/2 et JNK3 de la voie des MAP kinases, I κ B (*Inhibitor of nuclear factor NF κ B*) de la voie NF κ B, des protéines phosphatases, des ubiquitines ligases et enzymes de débubiquitination, des enzymes impliquées dans la dégradation de second messagers (phosphodiesterases par exemple), des régulateurs des petites GTPases de la famille Ras...¹³⁷. L'activation de ces voies de signalisation peut se faire à la membrane mais aussi en intracellulaire après internalisation. Un certain nombre de ces effecteurs ne sont pas connus pour être régulés par les protéines G, ce qui suggère que les voies de signalisation médiées par la β -arrestine fonctionnent en parallèle avec les voies médiées par les protéines G augmentant les modalités de signalisation des RCPG ¹⁴³.

Des données récentes sont en faveur d'un rôle des signaux dépendants des β -arrestines dans l'initiation et la progression tumorale ^{116,142}. Dans différentes cellules cancéreuses, la liaison des ligands aux RCPG entraîne le recrutement de β -arrestines. Le recrutement de la β -arrestine participe également à la transactivation des récepteurs des facteurs de croissance avec les RCPG, autre voie importante pour la croissance cellulaire et le cancer ¹⁴³. Les β -arrestines ont été retrouvées exprimées dans de nombreux cancers chez l'homme (ovaire, poumon, prostate, colon, sein....) et agiraient dans la croissance et la prolifération cellulaire, la résistance aux médicaments, la migration cellulaire, l'invasion et le développement des métastases ¹⁴³. La Figure 14 illustre les différentes fonctions de la β -arrestine.

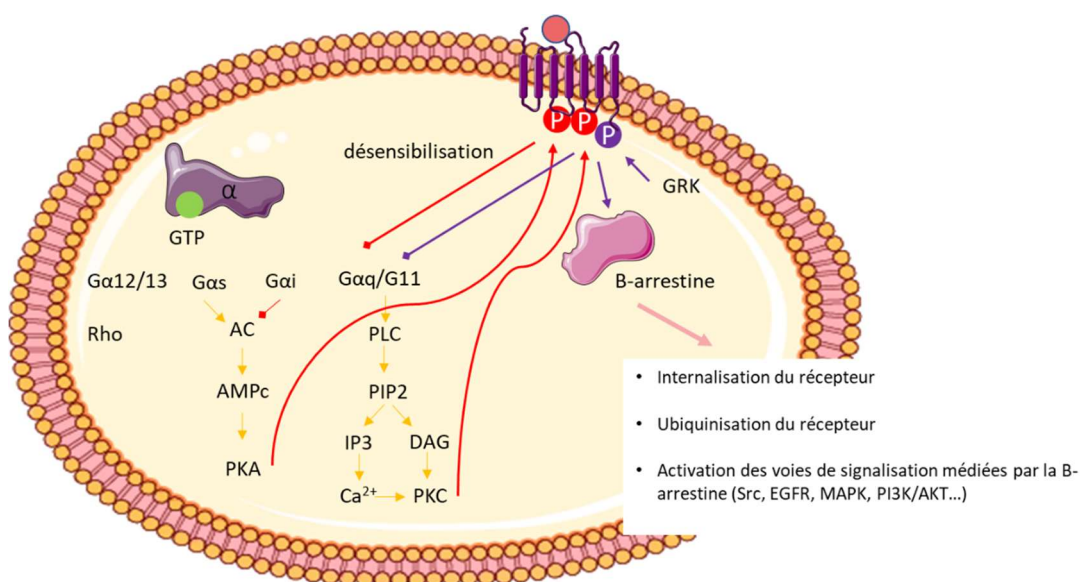


Figure 14 : Différentes fonctions de la β -arrestine.

Les voies de signalisation de la PKC et la PKA activées par la protéine G phosphorylent à leur tour le récepteur et désactivent la signalisation de la protéine G (désensibilisation hétérologue). La phosphorylation du RCPG médiée par la GRK conduit au recrutement des β -arrestines, ce qui entraîne une désensibilisation en bloquant l'interaction avec la protéine G (désensibilisation homologue), puis l'internalisation et l'ubiquitination du récepteur. L'interaction de la β -arrestine avec le récepteur initie également l'activation de voies de signalisation médiée par la β -arrestine. Abréviations : PLC : phospholipase C ; PIP2 : phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate ; IP3 : inositol-1,4,5-trisphosphate ; DAG : diacylglycérol ; AC : adénylate cyclase ; PKA : protéine kinase A ; PI3K : phosphoinositide 3-kinase ; GRK : récepteur couplé à la protéine G ; EGFR : récepteur du facteur de croissance épidermique ; MAPK : protéine kinase activée par des agents mitogènes. *Modifiée, d'après Wang et al, Circ Res. 2018 Aug 31;123(6):716-735.*

2.5.3. Voie WNT- β -caténine

Les récepteurs de la famille FZD sont capables d'activer la voie de la β -caténine, qui joue un rôle majeur dans le développement tumoral ^{116,144}. En effet, les protéines WNT se lient au récepteur FZD et à une molécule transmembranaire LRP5/6 (*lipoprotein receptor-related proteins 5 et 6*), entraînant la dimérisation des deux récepteurs ¹⁴⁵. Suite à un changement conformationnel, les récepteurs sont phosphorylés ce qui permet le recrutement de différentes protéines (GSK3 phosphorylée/Axin sur la protéine LRP et *Disheveled* avec le récepteur FZD). Ceci empêche la phosphorylation et dégradation de la β -caténine ¹⁴⁵. La β -caténine se transloque alors dans le noyau et induit la transcription de nombreux gènes. La signalisation WNT/ β -caténine est impliquée dans la plupart des mécanismes qui conduisent à la formation et au développement des cellules cancéreuses ¹⁴⁴. En effet, cette voie joue un rôle central dans le cycle cellulaire, la régulation immunitaire et le microenvironnement tumoral. Lorsque la voie WNT est fortement activée dans de nombreux cancers, l'augmentation de β -caténine dans le noyau conduit à l'activation de l'expression de nombreux gènes, en particulier la CYCLINE D1 et cMYC activant le cycle cellulaire. Ces voies semblent également favoriser la différenciation des myofibroblastes du stroma cancéreux ¹⁴⁴.

2.5.4. Voie Sonic HedgeHog

L'activation aberrante de la voie de signalisation Hh est associée à certains cancers en particulier le carcinome basocellulaire, les médulloblastomes, les rhabdomyosarcomes et les méningiomes. Plus récemment, cette voie contribuerait au développement d'un tiers de toutes les tumeurs malignes. En effet, une fois activée, elle joue un rôle important dans la prolifération tumorale. Cette voie est médiée par un RCPG, le récepteur SMO. En l'absence du ligand Hedgehog, le facteur de transcription GLI est phosphorylé ce qui réprime l'expression des gènes cibles. L'activation de cette voie par le ligand entraîne l'expression membranaire et l'activation de SMO. Le récepteur SMO est ensuite phosphorylé pouvant ainsi activer GLI qui induit la transcription des gènes cibles. Cet effet était jusque-là considéré comme indépendant de la protéine G, mais l'activation de GLI nécessite l'inhibition de la PKA, qui pourrait passer par l'activation des protéines Gi ou l'inhibition de Gs ¹⁴⁶.

2.5.5. Voie Hippo

La voie Hippo joue un rôle crucial dans le cancer en raison de son implication dans la régulation de la survie, de la prolifération et de la différenciation cellulaire ¹⁴⁷. Cette voie peut être considérée comme une cascade de kinases conduisant en particulier à la phosphorylation par LATS1/2 de YAP et TAZ. Non phosphorylées, YAP et TAZ sont considérées comme des onco-protéines ¹⁴⁸. En effet, les YAP/TAZ sont capables de favoriser la prolifération cellulaire et la transformation des cellules en un phénotype tumoral (transition épithélio-mésenchymateuse, migration cellulaire) ¹⁴⁹. Ces protéines jouent également un rôle dans la régulation des cellules souches cancéreuses. YAP/TAZ sont activées dans de nombreux cancers et sont associées à un mauvais pronostic et à une résistance au traitement ¹⁴⁸. Des études récentes suggèrent que la voie Hippo est une branche en aval de la signalisation des RCPG ¹⁴⁸. De nombreux RCPG (GPER, LPAR, S1PR, PAR, ETA-R, FZD, CXCR4, AGTR1) ont ainsi montré qu'ils pouvaient moduler positivement ou négativement l'activité des YAP/TAZ dans différents types de cancer ^{116,148}. En effet, les récepteurs couplés à la voie Gs/PKA inhibent l'activité des YAP/TAZ alors que les RCPG couplés à Gi ou Gq l'activent ¹⁴⁸. Par ailleurs, l'activité de YAP/TAZ peut être modulée par la voie des MAPK, de WNT et Shh ajoutant des interactions entre les RCPG et la voie Hippo en cancérologie ^{116,147,148}.

2.5.6. Transactivation des récepteurs à activité tyrosine kinase

Les RCPG sont également capables d'activer d'autres récepteurs membranaires, dont les RTK. Ce phénomène est appelé transactivation ¹⁵⁰. Ce mécanisme de transactivation a été décrit en détail pour le récepteur de l'EGF mais a été également confirmé avec d'autres RTK comme le PDGFR ^{151,152}, les VEGFRs ^{153,154}, ou le FGFR ¹⁵⁵. Ce phénomène semble dépendre du type cellulaire, du type de RCPG et de l'environnement cellulaire. Il existe deux hypothèses concernant les mécanismes d'activation du RTK par un RCPG dans le cancer. La première décrit l'activation de métalloprotéases membranaires (MMP) par différents seconds messagers libérés après activation du RCPG par son ligand (Ca²⁺, PKC, protéine tyrosine kinase, Src...). Ces MMP vont ensuite cliver les ligands des RTK pour qu'ils puissent se lier et activer les RTK ¹⁵⁰. La deuxième hypothèse décrit une phosphorylation directe du RTK, indépendante des MMP ou des ligands, par des kinases activées par les seconds messagers ¹⁵⁰. Ces RTK vont ensuite activer différentes cascades de signalisation, notamment la voie MAPK et la voie PI3K-AKT, conduisant à des réponses cellulaires de type prolifération, migration, invasion ou survie cellulaire. De façon réciproque, les RTK peuvent également activer les RCPG d'une manière dépendante ou indépendante de leur ligand ¹⁵⁶.

L'interaction fonctionnelle, ou *cross talk*, entre les RCPG et l'EGFR contribue à la progression des tumeurs du colon, du poumon, du sein, des ovaires, de la prostate et de la tête et du cou. Plusieurs RCPG ont été retrouvés surexprimés dans des lignées cancéreuses résistantes aux ITK comme CXCR7 ou GPR87 dans le cancer pulmonaire ou GPR110 dans le cancer du sein ^{157,158}.

2.6. Pharmacologie des RCPG

Les RCPG présentent un intérêt de longue date en pratique clinique. En effet, en activant de nombreuses voies de signalisation, les RCPG régulent un grand nombre de fonctions cellulaires et peuvent être considérés comme des cibles thérapeutiques dans un nombre important de domaines comme le contrôle de la pression artérielle, la réponse allergique, la fonction rénale, les troubles hormonaux, les maladies neurologiques. Par ailleurs, ils possèdent des sites médicamenteux accessibles à la surface des cellules via leur extrémité N-terminale. Par conséquent, les médicaments qui ciblent les RCPG représentent environ un quart de la part de marché mondial des médicaments, avec des ventes cumulées pour 2011-2015 de 890 milliards de dollars aux Etats-Unis ¹⁵⁹.

2.6.1. Différents modes d'action des médicaments

Le ciblage des RCPG par des molécules chimiques intéresse le plus souvent la poche de liaison du ligand endogène. Cependant, les récentes découvertes sur les mécanismes d'activation des RCPG ont permis de générer de nouvelles entités pharmacologiques comme des ligands biaisés et des modulateurs allostériques. La Figure 15 illustre les différents modes d'actions des molécules selon le site d'action, orthostérique ou allostérique.

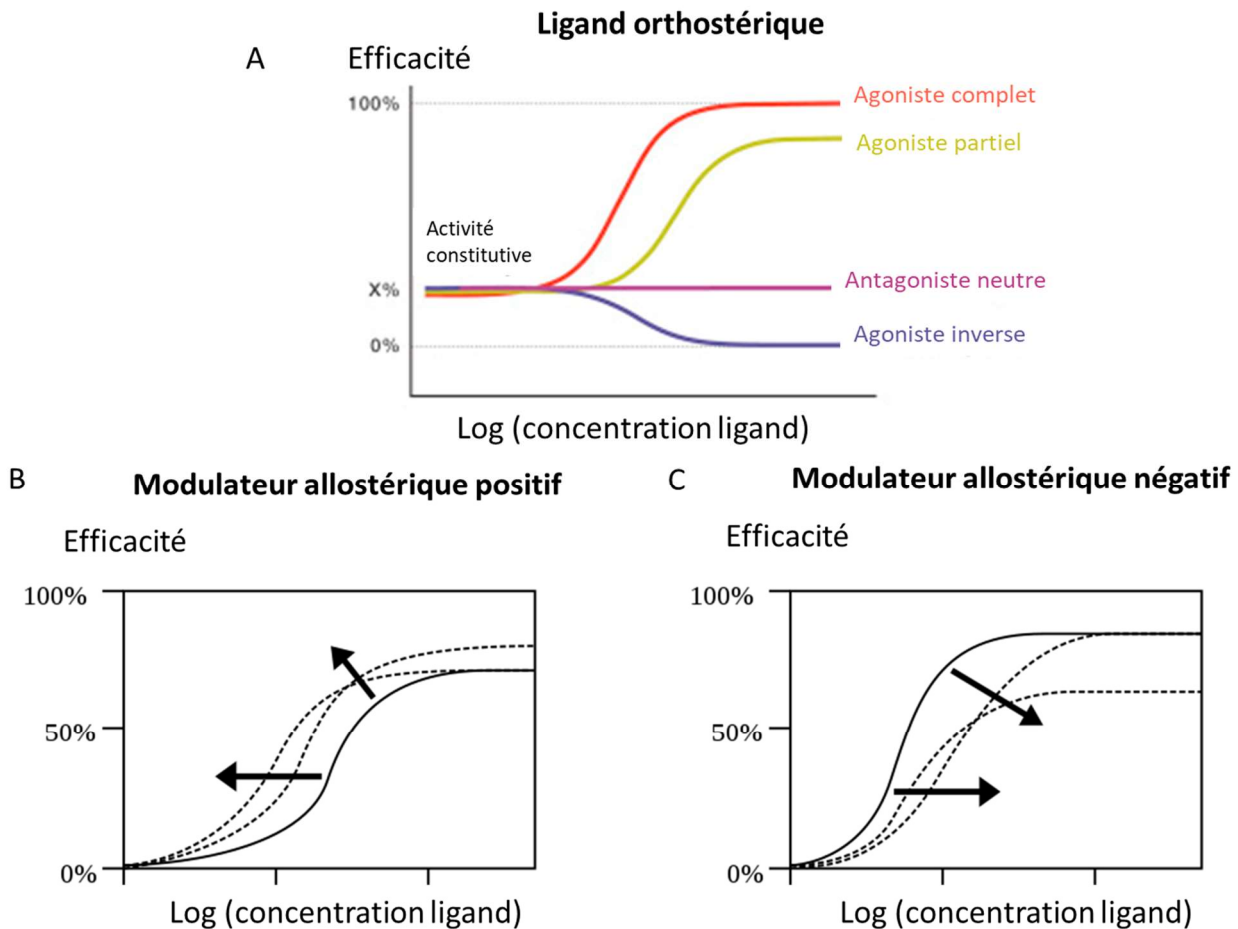


Figure 15 : Les différents modes d'action des médicaments agissant sur les récepteurs couplés aux protéines G. (A) Lors de la fixation sur un site orthostérique, la molécule peut agir comme un agoniste, un antagoniste ou un agoniste inverse en cas d'activité constitutive. (B-C) Lors de la fixation sur un site allostérique, la molécule peut augmenter l'efficacité et/ou la puissance du ligand endogène (modulateur allostérique positif) ou diminuer l'efficacité et/ou la puissance du ligand endogène (modulateur allostérique négatif). *Modifié d'après Wacker D, et al. Cell. 2017*

a) Agoniste

Selon l'IUPHAR, un agoniste est un ligand qui se lie sur un récepteur, provoquant un réarrangement conformationnel qui aboutit à l'initiation d'une réponse biologique¹⁶⁰. On parle d'agoniste complet ou plein lorsque le médicament est capable d'obtenir la réponse maximale possible du système après la stimulation du récepteur. On parle d'agoniste partiel lorsque l'effet est de moindre amplitude. La différence d'effet entre les deux types d'agoniste est probablement expliquée par le fait que l'agoniste partiel va stabiliser une conformation active

différente de celle stabilisée par un agoniste plein ¹⁶⁰. La plupart des médicaments agonistes sont en réalité des agonistes partiels ¹⁵⁹.

b) Agoniste inverse

Un certain nombre de RCPG présente une activité constitutive, c'est-à-dire une signalisation en absence de ligand. Certaines molécules peuvent venir diminuer cette activité intrinsèque du récepteur entraînant un effet agoniste inverse ¹⁶⁰. En effet, un agoniste inverse va être capable de réduire la fraction de récepteur qui était dans un état actif en l'absence de ligand ¹⁶¹. C'est le cas par exemple pour la prazosine (récepteur $\alpha 1$ adrénergique), le losartan (récepteur de l'angiotensine AT1R) et la cimetidine (récepteur de l'histamine HRH2) ¹⁶¹.

c) Antagoniste

Ce sont des molécules neutres. En effet, elles ne possèdent pas d'activité propre, ne modifiant par l'état d'activation du récepteur ¹⁶⁰. En l'absence de ligand, un antagoniste n'aura aucun effet. En présence du ligand, un antagoniste diminuera son effet par compétition au niveau du même site orthostérique. Il existe peu de médicaments ciblant les RCPG qui agissent comme des antagonistes ^{159,161}.

d) Modulateur allostérique

Ces molécules se fixent sur des sites distincts des sites de liaison, orthostériques, des ligands endogènes. Ces ligands allostériques sont capables d'interagir avec les domaines extracellulaires, transmembranaires ou intracellulaires du récepteur ¹⁶². On distingue : les agonistes allostériques qui produisent un effet activateur *via* la fixation sur le site allostérique, les ligands allostériques neutres pour lesquels la liaison sur le site allostérique n'a pas d'incidence en tant que tel mais peut agir par compétition, les modulateurs allostériques positifs qui n'ont pas d'effet propre mais qui augmentent l'affinité et/ou l'efficacité des molécules qui se fixent sur le site orthostérique et enfin les modulateurs allostériques négatifs qui à l'inverse diminuent l'affinité et/ou l'efficacité du ligand orthostérique ^{160,162}. En modifiant la structure, la dynamique et la fonction du récepteur, ces molécules présentent souvent des avantages, tels qu'une plus grande sélectivité au niveau de la cible (en se liant sur un site moins conservé), une sélectivité temporelle (action liée à la libération du ligand endogène) et parfois aussi une sélectivité fonctionnelle grâce à une signalisation biaisée ¹⁶².

e) Ligand biaisé

Un agoniste biaisé permet d'activer préférentiellement une voie de signalisation intracellulaire, c'est-à-dire par les protéines G ou par les β -arrestines ¹⁶³. Pour un RCPG se couplant à plusieurs protéines G, un agoniste biaisé sera capable d'activer un seul type de protéine G. En effet, ces molécules sont capables de stabiliser le récepteur sous une conformation donnée plus favorable à l'activation d'une voie plus qu'une autre permettant ainsi d'induire l'effet souhaité ¹⁶³. Un des mécanisme sous-jacent serait que l'activation d'une voie de signalisation serait liée à la phosphorylation de certains sites au niveau du récepteur, médiée par des kinases spécifiques (théorie du « *phospho-barcode* »)¹⁶⁴. Ceci permet notamment d'avoir un effet thérapeutique *via* l'activation d'une cible tout en minimisant les effets secondaires indésirables dus à l'activation de l'autre voie, comme c'est le cas pour les morphiniques. En effet, les effets secondaires seraient liés à l'activation de la voie de la β -arrestine ^{163,165}.

Plus récemment, il a été mis en évidence des ligands se fixant à des sites de liaison allostériques et exerçant leurs effets spécifiquement sur une voie de signalisation intracellulaire. Il s'agit de modulateurs allostériques biaisés (Slosky et al. 2021). La Figure 16 illustre les différents modes d'actions selon les voies de signalisation.

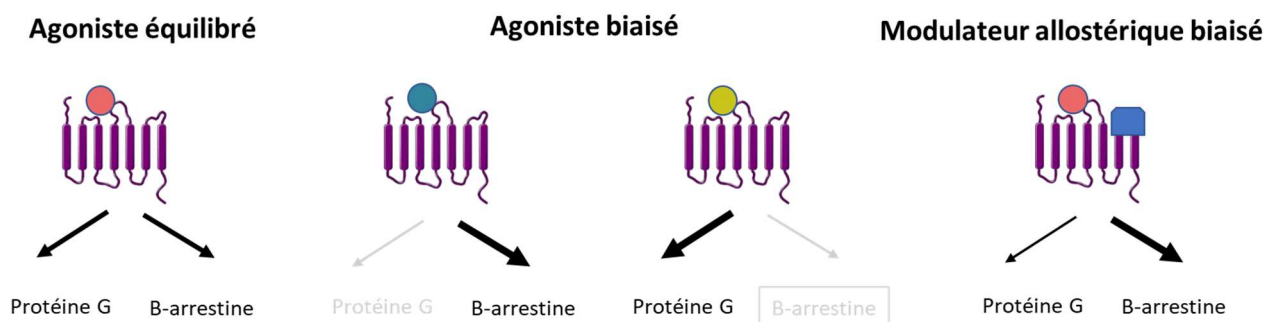


Figure 16 : Agonistes biaisés des récepteurs couplés aux protéines G.

Les agonistes biaisés activent sélectivement les voies de signalisation médiées par les protéines G ou les β -arrestines. Les modulateurs allostériques se lient à des sites distincts sur le récepteur et modulent l'activité des ligands orthostériques de manières positives ou négatives. *Modifiée, d'après Wang et al, Circ Res. 2018 Aug 31;123(6):716-735.*

2.6.2. Médicaments sur le marché ciblant les RCPG

En compilant différentes sources (DrugBank, GtoPdb, et ChEMBL), il a été possible d'identifier jusqu'à 704 médicaments ciblant au moins un RCPG. Cela représente environ 34 % de tous les médicaments approuvés par la FDA et l'EMA ¹⁶⁶. L'ensemble des médicaments approuvés agit par l'intermédiaire de 134 RCPG ¹⁶⁶. Cela représente environ un tiers de l'ensemble des endo-RCPG mais seulement 15% de l'ensemble des RCPG chez l'homme ¹⁶⁶. Par ailleurs, plus de 300 médicaments ciblant des RCPG sont en cours d'essais cliniques ¹⁵⁹. De façon intéressante, environ 20% des molécules en cours d'essais ciblent de nouveaux RCPG pour lesquels aucun médicament n'est encore approuvé, y compris des récepteurs orphelins ¹⁵⁹. Pour 98 récepteurs, ils représentent la cible principale du médicament et sont responsables de l'effet du traitement. Pour les autres, soit 36, l'interaction avec le récepteur n'est probablement pas un aspect principal de l'utilisation thérapeutique prévue de ces médicaments ¹⁶⁶. De telles interactions peuvent même contribuer aux effets secondaires du traitement ¹⁶⁶. En termes de nombre de médicaments disponibles, les récepteurs à l'histamine, la sérotonine, la dopamine, les opioïdes et les récepteurs adrénergiques sont les RCPG les plus fréquemment ciblés ¹⁶⁶. Le récepteur à l'histamine HRH1 est le récepteur le plus ciblé avec jusqu'à 60 médicaments ayant une interaction avec ce récepteur selon DrugBank ¹⁶⁷. La plupart des molécules ciblant les RCPG sont de petites molécules, mais une proportion croissante des nouveaux médicaments sont des peptides, des anticorps monoclonaux ou encore des protéines recombinantes ¹⁵⁹.

Concernant leur mode d'action, l'ensemble de ces médicaments sont principalement des agonistes et des agonistes inverses, mais une part croissante sont des modulateurs allostériques positifs et négatifs ¹⁵⁹.

2.6.3. Médicaments ciblant les RCPG en cancérologie

Bien que les RCPG soient la cible d'environ 30% de l'ensemble des médicaments commercialisés, seulement une quinzaine de médicaments anticancéreux approuvés par la FDA et l'EMA ciblent directement des RCPG. Ces

médicaments peuvent se présenter sous forme d'agonise/antagoniste mais aussi sous forme d'anticorps monoclonal spécifique dirigé contre un RCPG. Les principales molécules, leurs modes d'actions et leurs indications sont résumées dans le Tableau 9.

Molécules	Indications
Analogue de la GnRH (triptoreline, goséréline, buséréline, leuproréline, l'histréline)	Cancer de la prostate, cancer du sein avancé
Antagoniste de la GnRH (abarelix, degarelix)	Cancer de la prostate
Analogue de la somatostatine (octréotide, lanréotide, pasiréotide)	Tumeurs neuroendocrines, adénomes hypophysaires
Agoniste dopaminergique (cabergoline)	Adénome hypophysaire
Anticorps monoclonal anti-CCR4 (mogamulizumab)	Lymphome cutané à cellules T, leucémie/lymphome T récidivant ou réfractaire, lymphome périphérique à cellules T
Antagoniste anti-CXCR4 (Plerixafor)	Mobilisation des cellules souches hématopoïétiques (autogreffe des hémopathies malignes)
Antagoniste de SMO (sonidegib, vismodegib)	Carcinome baso-cellulaire localement avancé récidivant ou métastatique après une chirurgie ou une radiothérapie, ou non éligible à la chirurgie ou à la radiothérapie

Tableau 9 : Médicaments ciblant les récepteurs couplés aux protéines G utilisés en pratique clinique.

- Les analogues de la GnRH de longue durée d'action, tels que la triptoreline, la goséréline, la buséréline, la leuproréline et l'histréline, sont utilisés dans le traitement du cancer de la prostate en raison de leur capacité à stimuler les récepteurs hypophysaires de la GnRH, conduisant à leur désensibilisation et la réduction consécutive de la LH, FSH et du taux de testostérone ¹⁶⁸. La goséréline est également approuvée par la FDA dans le traitement palliatif des cancers du sein avancés chez les femmes non ménopausées ou en péri-ménopause ¹⁶⁹.
- Les antagonistes de la GnRH, tels que l'abarelix et le degarelix, ont été développés comme traitement alternatif aux agonistes de la GnRH afin d'obtenir une castration médicale efficace à long terme sans la survenue d'un pic de testostérone et ses risques associés, contrairement aux analogues de la GnRH. Ils sont également indiqués dans le traitement des patients atteints d'un cancer avancé de la prostate ^{116,168,169}.
- Les analogues de la somatostatine, l'octréotide et lanréotide, qui se lient principalement aux récepteurs de la somatostatine SSTR2 et SSTR5, sont utilisés comme agents anti-tumoraux dans des tumeurs neuroendocrines (TNE) bien ou modérément différenciées mais aussi comme traitement anti sécrétoire pour contrôler le syndrome carcinoïde induit par ces TNE (ensemble de symptômes apparaissant suite à la sécrétion tumorale anormale et excessives d'hormones) ^{170,171}. Ces analogues sont également indiqués dans le traitement des adénomes somatotropes (acromégalie) après échec de la chirurgie et les adénomes thyrotropes ¹⁷². Un autre analogue de

la somatostatine, le pasiréotide ciblant plus spécifiquement le récepteur SSTR5 semble plus efficace dans l'acromégalie ¹⁷². Il est également indiqué dans les adénomes corticotropes (maladie de Cushing) ¹⁷³.

- La cabergoline, un agoniste dopaminergique ciblant principalement le récepteur D2 de la dopamine, a été initialement approuvé dans le traitement des adénomes hypophysaires à prolactine ¹⁷⁴. Il est aujourd'hui utilisé dans les autres types d'adénomes hypophysaires (acromégalie, maladie de Cushing, adénomes non fonctionnels) à visée antisécrétoire et/ou antitumorale ¹⁷⁴.

- Le mogamulizumab, un anticorps monoclonal humanisé ciblant le récepteur de chimiokines CCR4, a été approuvé dans le traitement du lymphome cutané à cellules T (mycoses fongoïdes et syndrome de Sézary) ainsi que dans la leucémie/lymphome T récidivant ou réfractaire et dans le lymphome périphérique à cellules T ¹⁷⁵.

- Le Plerixafor (AMD3100) est une petite molécule qui antagonise de manière réversible un autre récepteur de la famille des chimiokines, le récepteur CXCR4. Il est utilisé en combinaison avec le G-CSF (*Granulocyte-Colony Stimulating Factor*) pour mobiliser les cellules souches hématopoïétiques vers le sang périphérique en vue d'une transplantation autologue chez les patients atteints de lymphome non hodgkinien et de myélome multiple ¹⁷⁶.

- Le sonidegib et le vismodegib sont de petites molécules antagonistes du récepteur Smoothened (SMO) et bloquent la signalisation du SHH. Ils sont approuvés pour le traitement du carcinome basocellulaire localement avancé récidivant après une chirurgie ou une radiothérapie, ou pour les patients atteints de carcinome basocellulaire non éligible à la chirurgie ou à la radiothérapie ¹⁷⁷. Le vismodégib est également approuvé pour le traitement du carcinome basocellulaire métastatique ^{177,178}.

D'autres molécules sont en cours d'études cliniques dans différents cancers et sont résumées dans le Tableau 10.

Cancer	Molécules	Mode d'action	Etudes cliniques
Cancer de prostate	Zibotentan	Antagoniste du récepteur de l'endothéline de type A (EDNRA)	Phase III : Absence d'effet seul en comparaison au placebo ^{179,180} Absence d'amélioration de la survie globale en combinaison avec le docetaxel ¹⁸¹
	Atrasentan	Antagoniste du récepteur de l'endothéline de type A (EDNRA)	Phase III : Absence d'effet seul en comparaison au placebo ^{182,183} Absence d'amélioration de la survie globale en combinaison avec le docetaxel ¹⁸⁴
Cancer de l'ovaire	Atrasentan	Antagoniste du récepteur de l'endothéline de type A (EDNRA)	Phase I/II : association faisable avec Doxorubicine dans cancer résistant aux sels de platine ¹⁸⁵ Phase II terminée, en attente de publication (NCT00653328)
Cancer du pancréas	CCX872	Antagoniste de CCR2	Phase Ib terminée (association avec FOLFIRINOX) en attente de publication (NCT02345408)
	Vantictumab	Anticorps anti-FZD	Phase Ib (association avec nab-paclitaxel and gemcitabine) ¹⁸⁶
	Gastrazole	Antagoniste récepteur de la cholécystokinine 2	Phase II : amélioration de la survie en comparaison au placebo ¹⁸⁷
Myélome multiple	Ulocuplumab	Antagoniste CXCR4	Phase Ib/II : meilleur taux de réponse pour la combinaison avec lenalidomide et dexaméthasone ¹⁸⁸
Mélanome	Plozalizumab	Anticorps anti-CCR2	Phase I terminée, attente de publication (NCT02723006)
Cancer du sein	Vantictumab	Anticorps anti-FZD	Phase Ib (en association avec paclitaxel) ¹⁸⁹ : incidence augmentée de fractures
Cancer du poumon non à petites cellules	Vantictumab	Anticorps anti-FZD	Phase I terminée, attente de publication (NCT01957007)

Tableau 10 : Médicaments et anticorps anti-récepteurs couplés aux protéines G en cours d'essais cliniques.

2.6.4. Peptides radiomarqués

Depuis plusieurs années, des ligands naturels ou synthétiques radiomarqués des RCPG ont également acquis un grand intérêt clinique pour le diagnostic et le traitement de certains cancers. En effet, les RCPG surexprimés dans les cellules tumorales constituent des cibles moléculaires de choix, puisque les ligands induisent classiquement une internalisation du complexe ligand-récepteur permettant une rétention de la radioactivité dans les cellules

tumorales permettant ainsi de détecter les tumeurs (imagerie métabolique) mais potentiellement aussi d'induire leur mort (radiothérapie métabolique)¹⁹⁰. Les récepteurs d'intérêt pour un « radiociblage » sont ceux pour lesquels la surexpression est importante et limitée aux cellules tumorales avec une expression faible dans la plupart des autres organes ¹¹⁸. À ce jour, les récepteurs les plus ciblés en médecine nucléaire sont les récepteurs à la somatostatine. Suite à la découverte que la plupart des tumeurs neuroendocrines humaines exprimaient une forte densité de récepteurs de la somatostatine, il a été possible de développer une méthode de localisation de ces tumeurs et de leurs métastases par scintigraphie suite à l'injection d'un analogue radiomarqué de la somatostatine ^{190,191}. Ce ciblage des récepteurs de la somatostatine est aujourd'hui l'examen de choix pour la détection des TNE ¹⁹². D'un point de vue thérapeutique, le traitement par analogue de la somatostatine radiomarqué a montré une amélioration de la survie sans progression ¹⁹³.

Au-delà des récepteurs de la somatostatine, une stratégie similaire a été développée pour d'autres RCPG dans d'autres tumeurs. Les principales données sur ces RCPG sont synthétisées dans le Tableau 11. D'autres récepteurs sont en cours d'études comme le ciblage du récepteur de l'adénosine ADORA2B en TEP ¹⁹⁴.

Récepteur	Ligand	Principaux ligands radiomarqués utilisés en imagerie (scintigraphie ou TEP)	Principaux ligands radiomarqués utilisés en radiothérapie métabolique	Tumeurs
Récepteurs de la somatostatine SSTR	Somatostatine	⁶⁸ Ga DOTATOC, -NOC, -TATE, ¹¹¹ In-pentetreotide (octreoscan)	¹⁷⁷ Lu DOTATATE	Insulinome, Tumeurs neuro-endocrines
Récepteur du GLP1	GLP1	⁶⁸ Ga-DOTA-exendin-4	-	Insulinome ¹⁹⁵
Récepteur de la bombésine (gastrin-releasing-peptide)	Bombésine	^{99m} Tc-RP527	-	Cancer du sein et de la prostate ^{196,197}
Récepteur de la cholécystokinine 2	Cholécystokinine 2	⁶⁸ Ga-DOTA-MGS5	¹⁷⁷ Lu-PP-F11N	Cancer médullaire de la thyroïde ^{198,199}

Tableau 11 : Principaux récepteurs couplés aux protéines G pouvant être ciblés en imagerie fonctionnelle et/ou en radiothérapie métabolique en cancérologie.

Hypothèses et objectifs de travail

Les mécanismes moléculaires sous-jacent au développement du cancer de la thyroïde ont été évalués et de nouveaux traitements ont été proposés pour les cancers de la thyroïde réfractaires à l'iode radioactif et évolutifs. Ainsi depuis plusieurs années, les ITKs sont devenus de nouvelles options thérapeutiques dans le cancer de la thyroïde. Cependant ces traitements ne sont pas curatifs. Une prise d'un traitement en continu est donc nécessaire pour maintenir une réponse antitumorale. De plus, le bénéfice clinique de ces traitements n'est pas persistant avec un phénomène d'échappement. Ainsi, malgré une amélioration de la survie sans progression, ces traitements n'ont pas montré d'amélioration de la survie globale. En dehors d'une efficacité antitumorale limitée, ces traitements sont associés à de nombreux effets secondaires médicamenteux altérant la qualité de vie des patients et pouvant également induire de graves effets au niveau de certains tissus cibles^{55,56}. Ces effets s'expliquent en partie par un manque de spécificité de ces molécules vis-à-vis du tissu thyroïdien tumoral. Ces éléments montrent donc l'importance d'identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques avec un double objectif, celui d'améliorer la réponse clinique aux ITKs et de limiter l'incidence des effets indésirables grâce à une diminution des doses de ces derniers.

Nous avons vu que différentes stratégies sont en cours de développement dans le cancer de la thyroïde réfractaire avec pour chacune leurs points forts mais aussi leurs limites. La recherche de combinaisons de médicaments synergiques émerge dans le traitement du cancer et, pour les raisons suivantes, il pourrait être intéressant de cibler les RCPGs en combinaison avec les ITKs :

- (I) Les RCPGs jouent un rôle important dans le contrôle de l'initiation et de la progression de différents types de tumeurs (prolifération des cellules cancéreuses, angiogenèse et métastases)¹¹⁸ ;
- (II) Il a été décrit que certains RCPG ont une distribution tissulaire plus spécifique que les RTK et que certains RCPG sont surexprimés ou sous-exprimés dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus sains adjacents¹¹⁸ ;
- (III) Il a également été démontré qu'il existe des interactions fonctionnelles entre les RCPG et les RTK, l'activation des RTK pouvant se faire *via* l'activation des RCPGs (phénomène de transactivation). Cela pourrait contribuer au rôle des RCPG dans la croissance des tumeurs mais aussi dans la résistance au traitement par ITKs¹²¹ ;
- (IV) Ce double ciblage (RCPG et RTK) a déjà donné des résultats intéressants dans certains cancers^{200,201} ;
- (V) Les RCPG représentent la famille la plus importante de cibles pharmacologiques validées par les instances du médicament (FDA, EMA)¹⁶⁶, ouvrant des perspectives de repositionnement moléculaire, c'est-à-dire l'utilisation de médicaments déjà approuvés dans une autre indication²⁰².

Compte tenu de l'ensemble de ces données, nous faisons l'hypothèse que le ciblage pharmacologique des RCPG en association aux ITK pourrait être une approche thérapeutique intéressante dans le cancer de la thyroïde réfractaire à l'iode radioactif et évolutif.

Mes objectifs de ce travail de thèse sont donc :

(I) de répertorier les RCPGs présentant une expression différentielle dans le cancer thyroïdien réfractaire à l'iode radioactif en comparaison au tissu sain et pour lesquels du repositionnement moléculaire serait envisageable.

(II) de développer un système de criblage pharmacologique à haut débit des médicaments ciblant les RCPG de manière *in vitro* puis *ex vivo*.

(III) d'identifier des combinaisons de traitements associant un ITK et une molécule ciblant un RCPG et conduisant à une augmentation de la chimiosensibilité des cellules tumorales thyroïdiennes aux ITKs.

(IV) au-delà du cancer thyroïdien réfractaire à l'iode radioactif, d'identifier les RCPG exprimés de manière différentielle dans les autres tumeurs endocrines et de sélectionner ceux pour lesquels du repositionnement moléculaire serait envisageable.

Partie I : Etude de l'expression des récepteurs couplés aux protéines G dans le cancer thyroïdien réfractaire à l'iode radioactif

1. Introduction

1.1. Récepteurs couplés aux protéines G et cancer de la thyroïde

Contrairement aux cancers fréquents et/ou de mauvais pronostic (cancer du sein, prostate, pancréas...), le rôle des RCPG dans le cancer thyroïdien était jusqu'à présent limité à la place du récepteur de la TSH (TSHR) et à des études sur certaines familles de récepteurs connues pour leur rôle dans la progression tumorale dans divers cancers.

1.1.1. Récepteur de la TSH

TSHR est principalement identifié dans les tissus thyroïdiens, qu'ils soient bénins ou malins. En réalité, TSHR (ARNm et/ou protéine) est retrouvé dans près de 90% des cancers différenciés de la thyroïde mais son expression relative vis-à-vis du tissu normal n'est pas univoque²⁰³. De même, peu d'information est disponible quant au niveau d'expression dans les tissus métastatiques, en particulier pour les métastases à distance²⁰³. Il a été démontré que les cascades de signalisation induites par le TSHR, servent de voies oncogéniques dans le cancer de la thyroïde. Cependant d'autres mutations co-existantes semblent être nécessaires pour établir un phénotype entièrement malin et notamment invasif²⁰⁴. Les voies Gas (induisant une augmentation de l'AMPC) et Gαq (induisant une augmentation du calcium) sont considérées comme étant les plus pertinentes d'un point de vue physiologique. La voie AMPC-PKA participerait à la prolifération cellulaire et à l'expression de divers gènes spécifiques de la thyroïde impliqués dans le métabolisme de l'iode (TG, TPO, NIS). En cas de cancers de la thyroïde dédifférenciés, il semblerait que la signalisation Gα12/13 serait augmentée, tandis que Gas serait diminuée²⁰⁵. TSHR est considéré comme l'élément clef de la régulation de la croissance et de la différenciation thyroïdienne. Les données expérimentales ont montré que TSHR était nécessaire à la progression tumorale du cancer thyroïdien en stimulant la prolifération cellulaire et l'angiogenèse^{43,206}.

En pratique clinique, l'utilisation de la lévothyroxine à dose frénatrice a montré depuis longtemps une réduction de la croissance des cancers thyroïdiens et une amélioration de la survie²⁰⁷. De plus, en augmentant l'expression de NIS, TSHR est aussi utilisé comme cible pour préparer à la radiothérapie métabolique par I¹³¹³⁵. Plusieurs petites molécules inhibitrices de kinases, identifiées comme des répresseurs de la prolifération des cellules cancéreuses de la thyroïde, ont été évaluées pour traiter le cancer différencié de la thyroïde résistant à l'iode radioactif. Cependant, les toxicités de cette classe empêchent son utilisation généralisée. Cette cible semble toutefois intéressante notamment pour une délivrance spécifique des médicaments au niveau du site tumoral.

1.1.2. Le récepteur CD97/ADGRE5

A côté du récepteur de la TSH, un des premiers RCPG étudié dans le cancer de la thyroïde a été CD97/ADGRE5 (*Adhesion G Protein-Coupled Receptor E5*), un récepteur d'adhésion exprimé initialement au niveau des cellules hématopoïétiques. CD97/ADGRE5 est l'un des récepteurs d'adhésion les plus exprimés dans tous les cancers et en particulier dans le cancer de la thyroïde^{116,117}. Etant donné son niveau très élevé au niveau des leucocytes, ces données d'expression reflètent probablement en partie la réponse immunitaire dirigée contre la tumeur. Dans les cellules thyroïdiennes, il est exprimé uniquement par les cellules tumorales et le niveau d'expression est positivement corrélé au stade de la maladie²⁰⁸. Il pourrait avoir un rôle dans la dédifférenciation des tumeurs thyroïdiennes²⁰⁹. Il est capable de s'hétérodimériser avec le récepteur de l'acide lysophosphatidique (LPAR1),

activant la voie Gα12/13 et stimulant l'activation de Rho induite par le LPA et ainsi la prolifération, la survie et l'invasion tissulaire *in vitro* et *in vivo* ²¹⁰.

1.1.3. Récepteurs aux chimiokines

Les chimiokines et leurs récepteurs jouent un rôle majeur dans la détermination du phénotype immunitaire des cellules infiltrant le microenvironnement tumoral y compris au sein des tumeurs thyroïdiennes. Les récepteurs aux chimiokines sont les RCPG les plus étudiés dans le cancer thyroïdien en particulier CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR7, DARC, CCR3, CCR6 et CCR7. Il a en effet été montré que les cellules thyroïdiennes normales et cancéreuses expriment des récepteurs de chimiokines spécifiques. Le récepteur CXCR4 a été retrouvé surexprimé dans 30-60% des cancers thyroïdiens, principalement papillaires de même que le récepteur CCR3 ^{211,212}. Le récepteur CXCR7 était également surexprimé mais le récepteur était exprimé quasi exclusivement par les cellules endothéliales des tumeurs malignes et beaucoup plus rarement dans les tumeurs bénignes, suggérant un effet dans la régulation de l'angiogenèse ²¹². Une forte expression de CXCR1, CXCR4 ou de CXCR7 a été associée avec la présence de métastases ganglionnaires chez l'homme ²¹³⁻²¹⁵. Les études *in vitro* et *in vivo* ont confirmé leur rôle dans la prolifération, l'invasion, les métastases et l'angiogenèse ²¹⁵. Des traitements ciblant ces récepteurs ont également été testés. La réparixine, un inhibiteur allostérique, non compétitif de CXCR1 et CXCR2 et le plerixafor (AMD3100), un antagoniste de CXCR4 ont en effet montré des effets antitumoraux intéressants *in vitro* sur des lignées cellulaires et *in vivo* dans des modèles de xénogreffes ^{216,217}.

La Figure 17 illustre les principaux récepteurs de chimiokines et leurs ligands étudiés dans le cancer de la thyroïde.

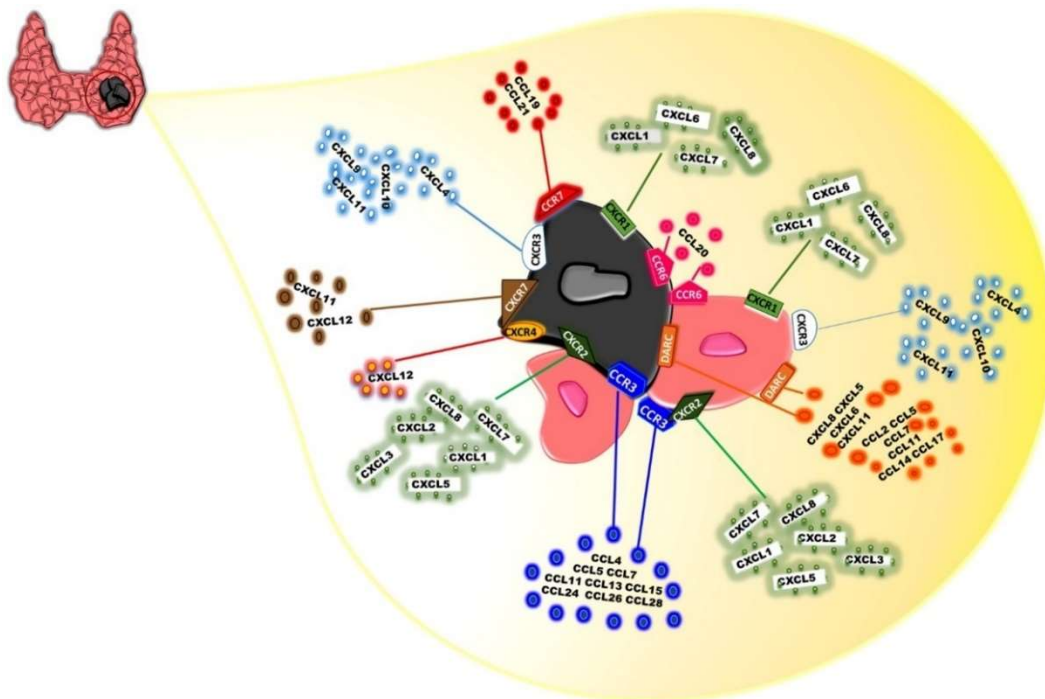


Figure 17 : Expression des récepteurs de chimiokines et leurs ligands dans les cellules thyroïdiennes normales et cancéreuses. D'après Coperchini F et al. *Endocr Relat Cancer*. 2019 Aug;26(8):R465-R478.

1.1.4. Récepteurs aux phospholipides

Les lysophospholipides sont une famille de molécules endogènes qui comprend l'acide lysophosphatidique (LPA) et la sphingosine-1-phosphate (S1P). Ils jouent un rôle important dans le développement du cancer. Ces

lysophospholipides exercent leurs activités principalement par l'intermédiaire de deux grandes familles de RCPG, les récepteurs LPA (LPAR₁₋₆) et les récepteurs S1P (S1P₁₋₅). Ces récepteurs ont été retrouvés surexprimés dans divers cancers. Ils interviennent dans la survie cellulaire, l'apoptose, la prolifération cellulaire, l'invasion et le développement des métastases.

A l'exception de LPAR6, tous les autres membres (LPAR1-5) ont été retrouvés surexprimés dans les tissus tumoraux thyroïdiens par rapport au tissu sain et semblent être impliqués dans la progression du cancer thyroïdien ^{7,218-220}. Le plus étudié semble être LPAR5. De nombreuses études bio-informatiques ont montré qu'il était surexprimé au sein des cancers thyroïdiens ^{7,221,222}. Il a été en particulier retrouvé surexprimé dans les cancers papillaires de type BRAF-like d'après les données du TCGA. Un fort niveau d'expression était également associé à la présence de métastases ganglionnaires et à une moins bonne survie globale ⁷. L'utilisation d'un antagoniste sélectif du LPAR5 ou une inactivation par siRNA (*small interfering RNA*) conduit à une inhibition de la prolifération et de la migration cellulaire. Ceci passerait par une activation de la voie PI3K/AKT ⁷.

La S1P est un régulateur de nombreux processus cellulaires, dont l'invasion et la migration des cellules cancéreuses. La S1P peut se lier à cinq RCPG (S1P1-5), qui activent les voies de signalisation en aval. Les différents membres des S1PR sont présents au sein du tissu tumoral thyroïdien. De manière intéressante, selon le type cellulaire et la densité de récepteurs, la réponse au S1P peut être pro ou anti-migratoire ²²³. Ainsi, S1P2 diminuait la migration cellulaire dans une lignée de cancer anaplasique en activant la voie Rho-ROCK et en diminuant l'expression, la sécrétion et l'activité de métalloprotéases ²²⁴. A l'inverse, S1P induisait la migration des cellules cancéreuses folliculaires de la thyroïde (lignée ML-1) *via* S1P1 et S1P3 ²²⁵. De manière intéressante, l'antagoniste de S1P, le Fingolimod (FTY720) a montré un effet antitumoral *in vitro* et *in vivo* ^{223,226}.

1.1.5. GPCRome dans le cancer de la thyroïde

De manière très récente, les analyses de pan-cancer ont mis en évidence le rôle potentiel de nombreux RCPG dans un large nombre de cancers y compris dans le cancer de la thyroïde. Les données d'onco-GPCRome du TCGA (≈500 cancers papillaires de la thyroïde) ont ainsi montré le profil de mutations des RCPG ainsi que les modifications d'expression au sein du tissu tumoral thyroïdien.

En ce qui concerne les mutations, plus d'une centaine de mutations ont été retrouvées au sein des RCPG, les plus fréquentes concernant, comme quasiment tous les cancers, des récepteurs d'adhésion ¹¹⁶. En réalité, seulement une minorité sont des mutations non silencieuses, intéressant principalement ADGRV1/GPR98 (*Adhesion G Protein-Coupled Receptor V1*), GRM6 (*Glutamate Metabotropic Receptor 6*) et PTGDR2/GPR44 (*Prostaglandin D2 Receptor 2*) dans 0.8% des cas pour chacune des mutations (Sriram et al., 2019a). De plus, en utilisant MutSig2CV, un outil de bio-informatique permettant d'interpréter les mutations découvertes par le séquençage de l'ADN par rapport au taux de mutation globale des tumeurs, il a été montré que seul PTGDR2/GPR44 était muté de manière significative dans le cancer de la thyroïde (Sriram et al., 2019a; Wu et al., 2019). Une étude de génome entier dans une population chinoise avait identifié des mutations de LPAR4. Ceci n'avait pas été confirmé dans d'autres ethnies et dans le TCGA (Pan et al., 2016).

Le profil d'expression de l'ensemble des RCPG au sein de la cohorte du TCGA a été étudié par RNA-Seq révélant des variations d'expression entre les différentes familles de RCPG (Wu et al., 2019). Ces données ont confirmé des données antérieures comme la forte expression du récepteur ADGRE5/CD97 dans le cancer thyroïdien (Aust et al., 1997; Ward et al., 2013). De manière encore plus récente, l'équipe d'Insel et Sriram a couplé les données

des tissus tumoraux du TCGA avec les données de tissus normaux du GTE (*Genotype-Tissue Expression*) afin de comparer les niveaux d'expression entre tissus thyroïdiens tumoraux et tissus thyroïdiens sains. Ils mettent en évidence 268 RCPG sur ou sous-exprimés de manière significative au sein des cancers thyroïdiens (FDR<0.05) (Sriram et al., 2019a). Ainsi, ces analyses d'oncoGPCRome ont souligné le rôle émergent des RCPG dans le cancer de la thyroïde. Un certain nombre de ces récepteurs et leurs voies de signalisation pourraient ainsi être ciblés de manière pharmacologique pour agir sur la progression tumorale. Toutes les voies de signalisation activées par les RCPG en contexte tumoral n'ont pas été décrites au sein du cancer de la thyroïde. A ce jour, l'activation de la voie de l'AMPc et de la PI3K ont été étudiées. La voie de l'AMPc pourrait être associée à l'activation de ERK, en particulier au niveau des cellules souches cancéreuses. Parmi les récepteurs couplés à cette voie, le récepteur aux chimiokines CCR7, le récepteur α -adrénergique 2C (ADRA2C) et le récepteur au complément C5A (C5AR1), ont été retrouvés surexprimés dans les cellules thyroïdiennes tumorales (Choi et al., 2018).

1.2. Techniques de détection et de quantification à haut débit des ARN messenger codant pour des récepteurs couplés aux protéines G

En raison de leur faible expression et du manque d'anticorps validés pour de nombreux RCPG, leur détection repose principalement sur les tests d'expression de l'ARN messenger (ARNm) plus qu'une détection et une quantification au niveau protéique. En dehors de la PCR classique, plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour mesurer l'expression de l'ARNm, en particulier pour mesurer un grand nombre de gènes de manière simultanée. Certaines techniques de quantification des RCPG à haut débit ont déjà été évaluées : le *TaqMan low-density array* (TLDA), le séquençage de l'ARN (RNA-seq) et les puces à ADN complémentaire (ADNc) ou *microarray* comme par exemple, les puces Affymetrix (Sriram et al., 2019b). Dans ce travail de thèse, nous avons utilisé la technologie NanoString nCounter pour détecter et quantifier à grande échelle l'expression des RCPG, étant donné sa plus grande fiabilité pour les tissus inclus en paraffine.

1.2.1. TaqMan low-density array

Le TLDA est une technologie basée sur des tests de RT-qPCR (PCR quantitative en temps réel). Une carte peut détecter simultanément l'expression de 384 gènes pour un seul échantillon, ce qui permet de valider rapidement plusieurs gènes candidats dans une étude du transcriptome. Il a été largement utilisé dans la recherche sur le cancer pour l'analyse de l'expression multiples de gènes et de micro-ARN (miARN) (Lü et al., 2008). Depuis 2012, une puce TaqMan utilisant la technologie TLDA a été validée pour mesurer l'expression de l'ARN de 356 RCPG principalement non olfactifs chez la souris puis chez l'homme (Hohenhaus et al., 2013; Rønnekleiv et al., 2014). Cette puce spécifiquement dédiée à l'évaluation des RCPG a été ensuite testée dans le domaine du cancer, d'abord dans des lignées de glioblastomes puis dans divers lignées dérivées de différents cancers et des cultures primaires (Fève et al., 2014; Insel et al., 2018). Cette technique présente une très bonne corrélation avec la RT-qPCR classique y compris pour la quantification des RCPG (Sriram et al., 2019b). Cette technologie n'a pas été évaluée dans le cancer de la thyroïde.

1.2.2. Puce à ADN ou *microarray*

La puce à ADN est une technologie reposant sur la propriété de l'ADN à s'hybrider par paires de bases. Après extraction de l'ARN et transcription inverse, les brins d'ADNc de l'individu dont on souhaite mesurer l'expression sont marqués par une molécule fluorescente. Ces brins d'ADNc marqués, appelés cibles, s'hybrident aux ADN présents sur la puce, appelé sondes. Le niveau d'hybridation est alors détecté par fluorescence pour les différentes conditions expérimentales. L'expression mesurée correspond donc à un niveau de fluorescence. Elle nécessite de connaître par avance la séquence d'ADN que l'on souhaite hybrider. Des étapes de traitement de données sont ensuite nécessaires pour convertir les données brutes (fluorescence) en données d'expression. La base de données la plus utilisée pour héberger les données de *microarray* est la base *Gene Expression Omnibus* (GEO) hébergeant des résultats publiés ou non (Barrett et al., 2013). La nomenclature standardisée va désigner chaque série selon un numéro commençant par GSE (*GEO Series*). Cette série se compose de plusieurs échantillons, désignés chacun par un code GSM (*GEO Samples*). Enfin, le nom de la plateforme utilisée est codifié par un numéro de GPL (*GEO Platform*). La puce la plus utilisée est la puce *Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array* pouvant quantifier jusqu'à 30000 gènes. Les puces à ADN ont été et sont encore largement utilisées en cancérologie. Grâce aux bases de données publiques comme GEO, de plus en plus d'études bio-informatiques ont vu le jour, réutilisant ces informations afin d'identifier des gènes candidats y compris dans le cancer de la thyroïde (Tang et al., 2014). L'utilisation des données GEO spécifiquement pour quantifier les RCPG a déjà été évaluée en cancérologie, notamment dans les cancers de la prostate, du sein ou encore de l'ovaire (Albrecht and Kübler, 2019; Kübler and Albrecht, 2018). Avant la publication de notre travail, cette approche n'avait jamais été utilisée dans le cancer de la thyroïde.

1.2.3. La technologie RNA-sequencing (RNA-seq)

Le RNA-Seq est une méthode utilisée pour déterminer les niveaux d'expression des gènes et les séquencer. Les données RNA-Seq proviennent de l'ARN total extrait. Après purification, les ARNm vont être fragmentés, retro-transcrits en ADNc puis associés à un adaptateur permettant de constituer ce qu'on appelle une librairie. La librairie est ensuite transférée sur une plaque (*flow cell*) contenant de multiples amorces. A chaque cycle d'amplification, la synthèse d'ADN est détectée par l'émission de fluorescence. Des analyses bio-informatiques sont ensuite nécessaires afin de traiter les données de fluorescence en données d'expression de gènes. Contrairement aux puces à ADN, l'analyse des gènes se fait *a priori* sans connaître la liste des gènes étudiés. Cette technologie a largement été utilisée en cancérologie, notamment avec le projet du TCGA, visant à caractériser du point de vue moléculaire près de 33 types de cancers en utilisant le séquençage génomique et la bio-informatique (Cheng et al., 2015). La caractérisation moléculaire du cancer papillaire de la thyroïde a été réalisé en 2014 par Agrawal *et al* dans le cadre du projet TCGA (Agrawal et al., 2014). Comme pour les données GEO, les données du TCGA ont été ré-utilisées pour quantifier l'expression des RCPG dans les tumeurs et en comparaison au tissu normal y compris dans le cancer papillaire de la thyroïde (Sriram et al., 2019a; Wu et al., 2019). Cependant, les données sont disponibles uniquement pour ce type histologique et la comparaison était faite avec du tissu thyroïdien sain, apparié mais ne correspondant pas au même patient.

1.2.4. Le système d'analyse nCounter (technologie NanoString)

Nous avons choisi d'utiliser la technologie nCounter Nanostring pour effectuer notre analyse devant la quantité et la qualité potentiellement limitées des échantillons (blocs de paraffine inclus entre 1999 et 2015). Du fait de ces particularités techniques, ce système d'analyse a montré de très bonnes performances pour les échantillons fixés et inclus en paraffine et ne nécessite pas d'étapes de validation par q-PCR comme c'est le cas pour les puces à ADN et le RNA-Seq. Le système d'analyse nCounter de NanoString, est une autre manière simple d'établir le profil d'un nombre important d'ARNm, de miARN, ou d'ADN simultanément. Contrairement aux autres méthodes, le protocole n'inclut pas de conversion de l'ARNm en ADNc, ni d'amplification qui peuvent entraîner des biais dans les résultats. Les ARNm sont directement hybridés avec deux sondes spécifiques du gène d'intérêt : une sonde de capture couplée à une biotine qui permettra la fixation au support nécessaire au comptage et une sonde rapporteuse qui porte à son extrémité 5' une séquence unique de 6 molécules fluorescentes, correspondant au code-barre. Après hybridation, les sondes en excès sont éliminées. Les complexes ainsi formés sont immobilisés et alignés sur la surface servant à l'acquisition des images. Les échantillons sont ensuite scannés par un microscope à épifluorescence. Chaque code-barre est compté et associé à sa cible spécifique. Les données sont ensuite importées dans un logiciel spécifique (*nSolver*) pour effectuer un contrôle de qualité, une normalisation des données et la réalisation des analyses souhaitées. Les différentes étapes sont résumées dans la Figure 18.

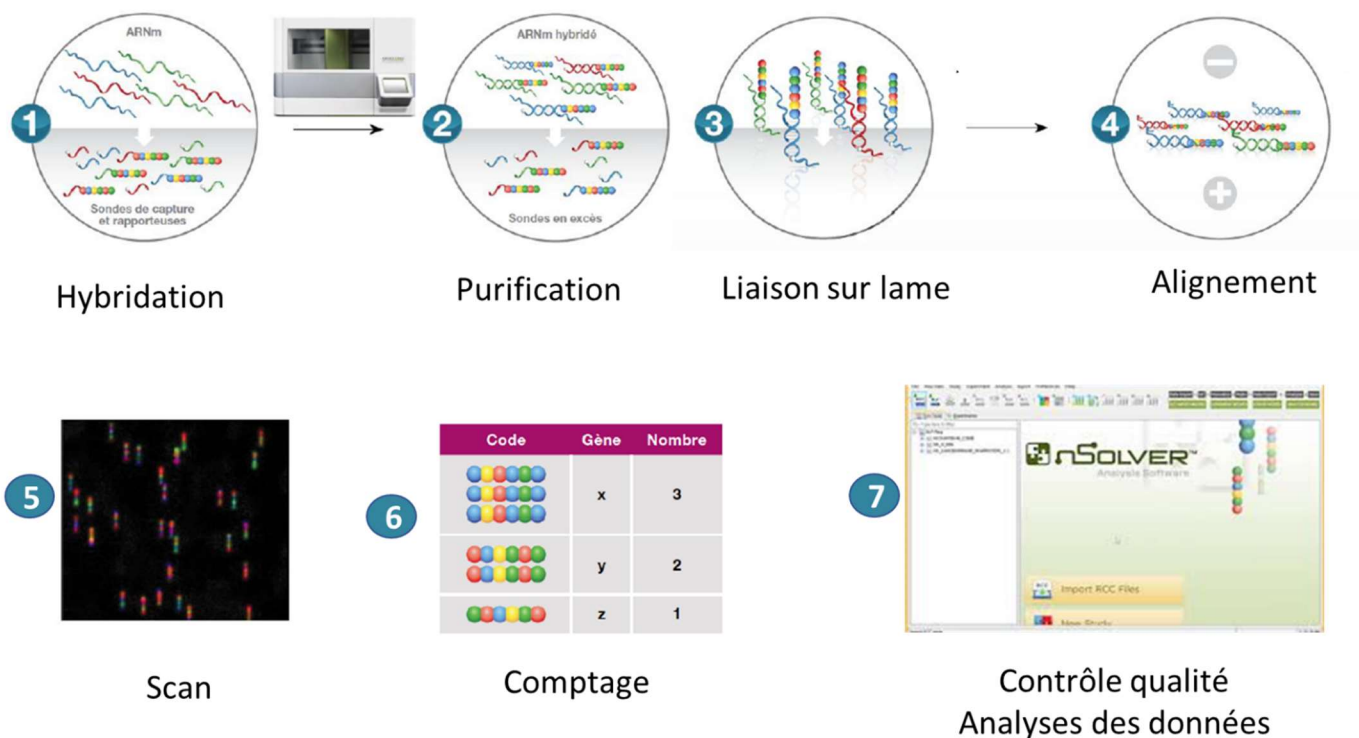


Figure 18 : Etapes détaillées de l'analyse nCounter de NanoString.

Cette technologie a été largement utilisée en cancérologie à partir de panels commerciaux ou sur mesure avec la possibilité d'étudier jusqu'à 800 gènes de manière simultanée (Tsang et al., 2017). Ce système d'analyse a également été validé dans le cancer de la thyroïde et réutilisé dans une quinzaine d'études pour évaluer le profil d'expression d'ARNm, de miARN ou de gènes de fusion (Chitikova et al., 2015; Macerola et al., 2020). Le nombre de gènes étudiés variait de 22 à 770 transcrits. Ces études ont pu proposer des gènes candidats pour le diagnostic

ou le pronostic des cancers thyroïdiens. Cependant aucune de ces études se sont intéressées aux cancers thyroïdiens réfractaires à l'iode radioactif. Comme pour la puce TaqMan GPCR, à notre connaissance, avant ce travail de thèse, il n'existait pas de panel commercialisé ou sur mesure s'étant focalisé sur les RCPG. L'analyse plus en détails des gènes analysés dans les études antérieures ont cependant pu isoler certains RCPG (Macerola et al., 2020). Les résultats sont synthétisés dans le Tableau 12. En comparaison à des nodules bénins, par cette technique, il a été montré une sous-expression du récepteur de type I de l'angiotensine II *AGTR1* dans les cancers folliculaires (Poma et al., 2017). Une seule étude de 2019 a comparé le profil transcriptomique de 7 tissus thyroïdiens normaux à 25 cancers papillaires, 14 peu différenciés et 13 cancers anaplasiques. De manière intéressante, le récepteur aux chimiokines *CXCR4* était surexprimé dans les 3 types de cancers en comparaison au tissu sain (Giannini et al., 2019).

Etude	comparaison	GPCR inclus	GPCR DE
Chitikova Z 2015	nodules bénins vs PTC	CXCR4, TSHR	0
Makhlouf 2016	FA vs FTC/PDTC	FZD1 +/- CXCR4, TSHR	FZD1 sous-expression dans PDTC et FTC
Makhlouf 2017	non disponible	non disponible	non disponible
Poma AM 2018	FI-FTC vs WI-FTC	AGTR1, GABBR2	AGTR1 sous-expression dans MI-FTC et WI-FTC vs FA
Smallridge 2014	PTC BRAF muté vs non	XCR1, CD97, LTB4R, CCR2, 5, 6, 7, 8, 10, CXCR1, 2, 3, 4, 6	CXCR4, CXCR6 et CCR7 sous expression avec nanostring et RNASeq
Giannini R 2019	ATC/PTC/PDC vs NT	non disponible	CXCR4 surexpression dans ATC/PTC/PDC
Perera D 2019	microPTC N0 vs N1b	TSHR, GPR182	0
Condello 2019	V FVPTC M0 vs M1	non disponible	0

Tableau 12 : Etudes ayant utilisées dans le cancer de la thyroïde la technologie ncounter NanoString pour évaluation de l'expression d'ARNm.

Abréviations : CFT : cancer folliculaire de la thyroïde ; CPT : cancer papillaire de la thyroïde ; CPDT : cancer peu différencié de la thyroïde ; CAT : cancer anaplasique de la thyroïde.

Nous avons ainsi créé et validé un panel sur mesure reprenant les 356 RCPG de la puce TaqMan auquel nous avons ajouté les autres endo-RCPG connus, c'est-à-dire ceux qui interagissent avec les ligands endogènes (Sriram and Insel, 2018). Au total, 354 RCPG non sensoriels et 17 RCPG sensoriels connus pour leur rôle dans le cancer ont été inclus dans l'analyse.

1.3. Repositionnement moléculaire et cancer

Les stratégies classiques de développement du médicament exigent un investissement considérable en temps et en argent. En effet, la mise sur le marché d'une nouvelle molécule représente un coût moyen de 2 à 3 milliards de dollars. De plus, selon une récente estimation, 90 % des nouvelles pistes thérapeutiques identifiées lors des études *in vitro* et des essais précliniques n'obtiennent pas l'approbation du médicament (Langedijk et al., 2015). Il devient donc difficile, dans ces conditions, de trouver de nouveaux médicaments en utilisant ces méthodes traditionnelles. Une autre approche pour surmonter ces difficultés est le repositionnement ou reconversion des médicaments, qui permet d'élargir les indications des médicaments déjà commercialisés. Comme la pharmacocinétique, la pharmacodynamique et les informations sur le profil de toxicité sont déjà connues pour ces médicaments, une nouvelle indication peut être rapidement évaluée dans des essais cliniques de phase II/III pour tester l'efficacité du composé. Cette approche offre donc plusieurs avantages, tels qu'un risque d'échec plus faible, un temps de mise sur le marché réduit et un coût moindre (en moyenne seulement 300 000 dollars) (Pushpakom et al., 2019). De plus, le repositionnement des médicaments offre des opportunités pour les maladies rares et pour la médecine personnalisée où la petite taille des cohortes rend le processus de découverte de traitement difficile et très coûteux (Adasme et al., 2020).

L'effet de ce médicament peut être du soit à son effet sur sa cible principale et connue, appelé « *on-target effect* », soit à un effet sur une autre cible, connue ou non, dénommé « *off-target effect* ». Il y a de nombreuses raisons pour lesquelles un médicament pourrait être un traitement pour deux maladies. Parisi et al a synthétisé les différents cadres du repositionnement moléculaire comme étant centré sur la maladie, la cible ou le médicament (Parisi et al., 2019). Ainsi un médicament peut être la cible de deux maladies car les deux maladies sont étroitement liées, parce que la cible du médicament peut jouer un rôle dans les deux maladies différentes, ou bien parce que le médicament a deux cibles, chacune étant liée à une maladie différente (Adasme et al., 2020).

1.3.1. Méthodologies du repositionnement moléculaire

Différentes approches méthodologiques sont développées afin d'envisager ce repositionnement moléculaire. Ces approches peuvent être globalement divisées en deux catégories : celles basées sur des approches expérimentales de dépistage et les approches *in silico* qui utilisent les données existantes pour identifier les nouvelles associations potentielles entre médicaments et maladies.

a) Approches expérimentales

Les approches expérimentales utilisent des plateformes de criblage à haut débit à partir de chimiothèques comportant un nombre important de médicaments (500-2000 composés) approuvés et/ou en cours d'études (Cha et al., 2018). Deux types de criblage sont couramment utilisés. Le premier, sans cellule, est basé sur l'étude de l'activité d'un médicament vis-à-vis d'un mécanisme spécifique. Le second, dit phénotypique, est basé sur le comportement des cellules (par exemple, la croissance et la mort) en présence ou en absence du médicament à tester. Ce criblage phénotypique est considéré comme plus efficace que le criblage ciblé (Eder et al., 2014). Bien qu'il y ait évidemment des limites à ces modèles *in vitro*, en particulier dans la représentabilité de la maladie chez l'homme, ils ont clairement le potentiel de contribuer à la sélection des molécules actives dans une démarche de repositionnement moléculaire.

b) Approches *in silico*

Les approches *in silico* sont basées sur des données existantes provenant le plus souvent des grandes études « omics » visant une meilleure compréhension de la physiopathologie des maladies. Parmi les différents types de données « omiques » disponibles, la transcriptomique, consistant à mesurer les niveaux d'expression de gènes (ARN) à l'aide de RNA-Seq ou de puces à ADN (*microarrays*) est l'une des données les plus largement utilisées dans le repositionnement moléculaire, en raison de la disponibilité, de la robustesse et de la reproductibilité des données (Iorio et al., 2013). A côté des approches transcriptomiques, la génomique (mutations et variants génétiques associés à une maladie) est également utilisée pour identifier des médicaments candidats au repositionnement moléculaire. En effet, il a été démontré que les médicaments bénéficiant d'un support génétique sous-jacent ont une probabilité importante de succès dans les essais cliniques (Nelson et al., 2015). La combinaison de données transcriptomiques et génomiques peut être également utilisée pour identifier des médicaments cibles. Ces dernières années, un nombre important de ressources sont devenues disponibles en ligne que ce soit des bases de données axées sur les médicaments (par exemple, ChEMBL, DrugBank, Cmap (Lamb et al., 2006)) ou axées sur les maladies (par exemple, TCGA, GEO), ou encore reliant médicaments et maladies (par exemple, PREDICT ou PROMISCUOUS).

Finalement, les médicaments qui seront les meilleurs candidats à un repositionnement moléculaire proviendront probablement d'une combinaison de plusieurs approches, provenant de différents types de données.

1.3.2. Repositionnement moléculaire et cancer de la thyroïde

Le repositionnement moléculaire a été utilisé dans d'autres cancers mais est sous-exploité dans le cancer de la thyroïde. Un criblage à haut débit de 2816 médicaments cliniquement approuvés a toutefois démontré que certains médicaments dont la classe pharmacologique initiale n'appartenait pas aux chimiothérapies, pouvaient inhiber la croissance des cellules thyroïdiennes, suggérant un éventuel repositionnement pour le traitement du cancer thyroïdien (Zhang et al., 2012). En effet, dans ce criblage pharmacologique, seize agents ont montré une efficacité antitumorale supérieure à 60% et une concentration inhibitrice à 50% (IC50) de l'ordre du nanomolaire (statines, cardiotoniques, antiviraux). Cependant, seules la deslanoside et la ouabain, des digitaliques utilisés dans l'insuffisance cardiaque et l'arythmie cardiaque, avaient des effets *in vitro* à des concentrations sériques cliniquement atteignables (Zhang et al., 2012). Plus récemment, une approche *in silico* de prédiction de médicaments basée sur les anomalies moléculaires présentes dans le cancer de la thyroïde a proposé des pistes intéressantes impliquant des médicaments validés. En effet, parmi les meilleurs médicaments retenus, on retrouvait : le baclofène, un myorelaxant, le cidofovir, un antiviral, et les glucocorticoïdes (Xu et al., 2019b). D'autres médicaments ont été proposés comme candidats. Les données expérimentales (*in vitro*, *in vivo*) et les données cliniques, ainsi que les mécanismes d'action proposés sont synthétisés dans Tableau 13. Parmi ces différents médicaments, certains sont la cible de RCPG comme le baclofène (récepteur GABBA) ou les cannabinoïdes (récepteurs CB1 et CB2).

Médicaments	Mode d'action	Etudes précliniques	Etudes cliniques
Lithium	GSK-3 β (Thakur et al., 2019)	Redifférenciation (Gilbert-Sirieix et al., 2011), inhibition de la croissance, induction de l'apoptose (Camacho et al., 2009)	Amélioration du taux d'ablation des reliquats thyroïdiens en association avec l'iode radioactive sauf chez les patients réfractaires (Barbaro et al., 2010)
Acide valproïque	Histone desacetylase (Puppin et al., 2005)	Redifférenciation (Puppin et al., 2005), Induction de l'apoptose et de l'autophagie (Xu et al., 2015)	Pas d'augmentation du captage de l'iode chez les patients réfractaires (Nilubol et al., 2017), Absence d'effet synergique en association avec chimiothérapie paclitaxel (Catalano et al., 2016)
Cannabinoïdes	CB1 et CB2 (cannabinoid receptor) (Cozzolino et al., 2010; Shi et al., 2008)	Inhibition de la croissance, induction de l'apoptose (Cozzolino et al., 2010; Shi et al., 2008)	Pas de données
Statines (lovastatine, atorvastatine, simvastatine)	HMG-CoA réductase	Inhibition de la croissance tumorale de manière dose-dépendante <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> (Zhao et al., 2018)	Résultats contradictoires sur le risque de cancer de la thyroïde (Trivedi et al., 2021; Zhao et al., 2018)
Metformine	AMPK, LRP2, mTOR (Hanly et al., 2015; He et al., 2020)	Inhibition de la prolifération et induction de l'apoptose seul et en association avec ITK (sorafenib et vemurafenib) (Chen et al., 2015; Hanly et al., 2015; He et al., 2020)	En cours (NCT03109847)
Nelfinavir	PI3K/AKT (Jensen et al., 2017)	Inhibition de la prolifération et induction de l'apoptose (Jensen et al., 2017)	Pas de données
Chloroquine	Inhibition de l'autophagie (Yi et al., 2018)	Effet synergique avec le sorafenib sur l'apoptose (Yi et al., 2018)	Pas de données

Médicaments	Mode d'action	Etudes précliniques	Etudes cliniques
Cidofovir	Non décrit	Réduction de la viabilité cellulaire et induction de l'apoptose (Catalani et al., 2017)	Pas de données
Sildenafil, Tadalafil	Phosphodiesterases de type 5	Diminution de la prolifération et de la migration cellulaire (Sponziello et al., 2015)	Pas de données

Tableau 13 : Liste des agents pharmacothérapeutiques testés dans le cancer de la thyroïde avec leur mécanisme d'action décrit, les effets en pré-cliniques et en cliniques si disponibilité.

1.3.3. Repositionnement moléculaire et RCPG en cancérologie

Malgré le fait que les RCPG soient impliqués dans la progression tumorale et représentent des cibles pharmaceutiques majeures, un nombre limité de traitements ciblant les RCPG et leur signalisation est actuellement utilisé comme traitement anti tumoral (Lappano and Maggiolini, 2011). Plusieurs médicaments sont en cours de développement clinique sur la base de leur efficacité et de leur sécurité établies dans les études précliniques. Les principaux sont résumés dans le Tableau 14.

Médicaments	RCPG	Indication initiale	Etudes pré-cliniques	Etudes cliniques
Maraviroc, Vicriviroc	Récepteur de chimiokines, CCR5	VIH	Données <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> dans le cancer du sein, de l'estomac et du foie (Aldinucci and Colombatti, 2014)	Cancer colorectal métastatique seul ((Halama et al., 2016), NCT01736813) ou en association avec l'anti-PD1 Pembrolizumab (phase I (Haag et al., 2022), NCT03631407)
Carvedilol, propranolol	Récepteurs β - adrénergiques	Insuffisance cardiaque, HTA, tachycardie, prévention cardiovasculaire, migraines...	Données <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> dans le mélanome, le cancer du sein, de l'ovaire, de la prostate (Cole and Sood, 2012)	Cancer colorectal métastatique (NCT03919461), Cancer de la prostate (NCT02944201), glioblastome (NCT03980249, NCT03861598), Cancer de l'estomac (NCT04005365), Cancer du sein (Hiller et al., 2019), de l'ovaire (NCT01504126)...
Macitentan, Bosentan	Récepteurs de l'endothéline, ET _A R, ET _B R	Hypertension artérielle pulmonaire	Données <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> notamment en combinaison avec le traitement anti tumoral standard dans le cancer du sein, du poumon, de l'ovaire et le glioblastome (Lappano and Maggiolini, 2017; Rosanò and Bagnato, 2016)	Mélanome métastatique ((Kefford et al., 2010), NCT01009177), Cancer pancréatique en association avec la gemcitabine et le paclitaxel (NCT04158635), glioblastome en association avec le temozolomide (Weathers et al., 2021)
telmisartan, irbesartan, valsartan, candesartan, losartan	Récepteur à l'angiotensine II, AT ₁ R	HTA	Données <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> dans le carcinome hépatocellulaire, le cancer colorectal (Tabatabai et al., 2021; Xu et al., 2021), données <i>in vitro</i> en combinaison avec Docetaxel dans le cancer de prostate et du sein (Khorsand et al., 2022)	Cancer pancréatique en association avec immunothérapie par Nivolumab et chimiothérapie par FOLFIRINOX (Phase II, NCT03563248), Cancer du sein en association avec le camrelizumab et la doxorubicine (Phase II, NCT05097248), Ostéosarcome en association avec sunitib (Phase I, NCT03900793)

Tableau 14 : Médicaments ciblant des Récepteurs couplés aux protéines G et utilisés dans une stratégie de repositionnement moléculaire dans le cancer.

1.4. Objectifs

La possibilité d'un ciblage pharmacologique d'un élément biologique n'est justifiée qu'après avoir mis en évidence un lien potentiel ou prouvé entre la maladie et l'élément en question. De plus en plus de données lient les RCPG au cancer et certains RCPG semblent être de bons candidats dans le cancer de la thyroïde. Cependant, avant de débiter ce travail de thèse, aucune donnée de profil transcriptomique élargi n'était disponible dans les cancers thyroïdiens afin d'envisager un ciblage large des RCPG dans ces cancers. La première étape de ma thèse a donc consisté à étudier l'expression des RCPG au sein des cancers de la thyroïde. Pour cela, nous avons créé une puce étudiant spécifiquement environ 400 RCPG par la technologie NanoString, permettant l'analyse d'échantillons inclus en paraffine en quantité et qualité parfois limitées. Nous avons choisi de ne retenir que les récepteurs exprimés de manière différentielle en comparaison au tissu sain adjacent. En effet, la sur- ou la sous-expression de ces récepteurs en conditions pathologiques appuie l'hypothèse que ces RCPG peuvent être impliqués dans le développement ou la progression tumorale. Dans un second temps, dans l'objectif de réaliser du repositionnement de médicament, nous n'avons retenu que les RCPG ciblés par des médicaments sur le marché.

L'article issu de ce travail a été publié en 2021 dans *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* et présente les données transcriptomiques analysées par la technique NanoString nCounter, issues de prélèvements de patients présentant un cancer du thyroïde réfractaire à l'iode radioactif et éligible à une thérapie ciblée. Ces données ont été comparées aux profils transcriptomiques issues des bases publiques de microarray (GEO) et de RNA-Seq (TCGA). L'impact pronostique a été évalué pour la survie spécifique et globale dans la cohorte du TCGA. Enfin, la liste des RCPG ciblés par des médicaments approuvés par les autorités européennes et/ou américaines a été établie.

2. Article 1

G Protein-coupled Receptors in Radioiodine-refractory Thyroid Cancer in the Era of Precision Medicine

Valentine Suteau, Valérie Seegers, Mathilde Munier, Rym Ben Boubaker, Cécile Reyes, David Gentien, Méline

Wery, Anne Croué, Frédéric Illouz, Antoine Hamy, Patrice Rodien, Claire Briet

J Clin Endocrinol Metab. 2021 Jul 13;106(8):2221-2232. doi: 10.1210/clinem/dgab343.

Clinical Research Article

G Protein–coupled Receptors in Radioiodine-refractory Thyroid Cancer in the Era of Precision Medicine

Valentine Suteau,^{1,2} Valérie Seegers,³ Mathilde Munier,^{1,2,4}
Rym Ben Boubaker,² Cécile Reyes,⁵ David Gentien,⁵ Méline Wery,⁶
Anne Croué,⁷ Frédéric Illouz,^{1,4,8} Antoine Hamy,⁹ Patrice Rodien,^{1,2,4,8} and
Claire Briet^{1,2,4,8}

¹Département d'Endocrinologie-diabétologie nutrition, CHU Angers, Angers, France; ²Faculty of Health, University of Angers (CHU Angers), Inserm 1083, CNRS 6015, MITOVASC, SFR ICAT, Angers, France; ³Institut de Cancérologie de l'Ouest, Service de Biométrie, Angers, France; ⁴Centre de référence des maladies rares de la Thyroïde et des Récepteurs Hormonaux, Endo-ERN centre for rare endocrine diseases, Angers, France; ⁵Institut Curie, Plateforme Génomique, Paris, France; ⁶Faculty of Health, University of Angers (CHU Angers), SFR ICAT, Angers, France; ⁷Département de Pathologie Cellulaire et Tissulaire, CHU Angers, Angers, France; ⁸Centre de compétence TUTHYREF, TUTHYREF Network, Angers, France; and ⁹Service de chirurgie viscérale, CHU d'Angers, Angers, France

ORCID number: 0000-0002-1316-8190 (V. Suteau).

Abbreviations: DEG, differentially expressed gene; FFPE, formalin fixed paraffin embedded; FTC, follicular thyroid cancer; GPCR, G protein–coupled receptor; PTC, papillary thyroid cancer; TCGA, The Cancer Genome Atlas; TKI, tyrosine kinase inhibitor; TSHR, thyrotropin receptor.

Received: 10 February 2021; Editorial Decision: 8 May 2021; First Published Online: 17 May 2021; Corrected and Typeset: 4 June 2021.

Abstract

Context: Radioiodine-refractory thyroid cancers have poor outcomes and limited therapeutic options (tyrosine kinase inhibitors) due to transient efficacy and toxicity of treatments. Therefore, combinatorial treatments with new therapeutic approaches are needed. Many studies link G protein–coupled receptors (GPCRs) to cancer cell biology.

Objective: To perform a specific atlas of GPCR expression in progressive and refractory thyroid cancer to identify potential targets among GPCRs aiming at drug repositioning.

Methods: We analyzed samples from tumor and normal thyroid tissues from 17 patients with refractory thyroid cancer (12 papillary thyroid cancers [PTCs] and 5 follicular thyroid cancers [FTCs]). We assessed GPCR mRNA expression using NanoString technology with a custom panel of 371 GPCRs. The data were compared with public repositories and pharmacological databases to identify eligible drugs. The analysis of prognostic value of genes was also performed with TCGA datasets.

Results: With our transcriptomic analysis, 4 receptors were found to be downregulated in FTC (*VIPR1*, *ADGRL2/LPHN2*, *ADGRA3*, and *ADGRV1*). In PTC, 24 receptors were deregulated, 7 of which were also identified by bioinformatics analyses of publicly available datasets on primary thyroid cancers (*VIPR1*, *ADORA1*, *GPRC5B*, *P2RY8*, *GABBR2*, *CYSLTR2*, and *LPAR5*). Among all the differentially expressed genes, 22 GPCRs are the target of approved drugs and some GPCRs are also associated with prognostic factors.

Discussion: For the first time, we performed GPCR mRNA expression profiling in progressive and refractory thyroid cancers. These findings provide an opportunity to identify potential therapeutic targets for drug repositioning and precision medicine in radioiodine-refractory thyroid cancer.

Key Words: Thyroid cancer, papillary, thyroid cancer, follicular, G protein-coupled receptors, molecular targeted therapies, prognostic factor

Differentiated papillary thyroid cancer (PTC) and follicular thyroid cancer (FTC) account for most malignant thyroid tumors. Despite the excellent overall prognosis of differentiated thyroid cancer, the 10-year survival rate of radioiodine-refractory thyroid cancer is below 10% (1). Tyrosine kinase inhibitors (TKIs) are new options for progressive and radioiodine-refractory differentiated thyroid carcinoma. The multi-TKIs lenvatinib and sorafenib demonstrated an improvement in progression-free survival compared with placebo (2, 3). However, utilization of TKIs is limited by their side effects, leading to dose reduction in over 60% of cases (2, 3). Thus, identifying novel targets is needed for combinatorial treatment to enhance the potency and/or specificity of the available treatments.

G protein-coupled receptors (GPCRs) constitute the largest superfamily of receptors involved in transmembrane-initiated transduction pathways and are the most prominent family of validated pharmacological targets, with 34% of current medicines targeting GPCRs, putatively allowing drug repositioning (4). Much evidence supports the involvement of GPCRs in controlling initiation and progression of tumors (5). In addition, it has been reported that some GPCRs are either over- or underexpressed in tumor tissue compared with adjacent healthy tissue in different cancers, turning them into prognostic biomarkers (5-7). Based on their accessibility from the extracellular environment, their role in cancer signal transduction, and their expression by specific cell types, GPCRs appear to be eligible drug targets in oncology, alone or in combination with anticancer drugs (8).

In thyroid cancer, some potential GPCR targets have been previously identified as thyrotropin receptor (*TSHR*), *ADGRE5/CD97*, or sphingosine-1-phosphate receptors (9-11). Indeed, GPCRs appear to be an interesting therapeutic option in progressive and refractory thyroid cancer. However, an atlas of human GPCR mRNA expression in progressive and refractory thyroid cancer for comparison with adjacent normal tissue

has been missing, until now. We conducted an exploratory study to identify GPCRs differentially expressed in normal and tumoral thyroid tissues via a transcriptomic analysis in patients with progressive and refractory thyroid cancer.

Materials and Methods

Patient Cohort and Tissue Selection

Retrospective formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples from 19 original thyroidectomies for thyroid cancer diagnosed and operated on between 1999 and 2015 were collected from the archives of Pathology of Angers University Hospital, La Roche-sur-Yon, and Poitiers Hospital (France). All patients were classified as radioiodine-refractory metastatic according to American Thyroid Association (ATA) guidelines in 4 basic ways: (1) the malignant/metastatic tissue does not ever concentrate radio active iodine (RAI), (2) the tumor tissue loses the ability to concentrate RAI after previous evidence of RAI-avid disease, (3) RAI is concentrated in some lesions but not in others; and (4) metastatic disease progress despite significant concentration of RAI (12, 13). All patients were followed at the Angers University Hospital (France), a competence center in a French clinical network of physicians specialized in refractory thyroid cancers. Institutional review board approval was obtained for retrospective data collection and for research use of archival tissue samples (DC-2014-2224, AC-2017-2993, and CNIL2019-001). Written informed consents were obtained from each patient.

For each subject, after hematoxylin and eosin stain, the pathologist delineated normal and tumoral thyroid tissues, followed by micro-dissection of 10 unstained slides (10 μ m) from each FFPE primary tumor and nontumoral thyroid tissue. Malignant tumors were classified according to the World Health Organization classification, TNM (Tumor Node Metastasis) classification, and AJCC (American Joint Commission on Cancer) prognosis stage 8th edition (14).

Nucleic Acid Extraction

RNA from tumor and normal samples was extracted from FFPE tissue using RNeasy FFPE Kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions. Its quality was acceptable for NanoString nCounter-based expression analysis if the ratio between the value of the absorbance at 260 nm and the absorbance at 280 nm was ≥ 1.6 , as previously described (15, 16).

Gene Quantification Using NanoString nCounter System

NanoString nCounter panel design

We developed a custom-targeted GPCR panel for NanoString nCounter-based expression analysis of FFPE-derived RNA with 354 nonsensory GPCRs and 17 sensory GPCRs known to have a role in cancer. Additionally, we included 17 mRNAs related to thyroid function. Finally, we added 9 appropriate housekeeping genes, based on their gene expression in multiple cancer types, including thyroid carcinoma (17). Probes were designed and synthesized by NanoString technologies. The full list of genes is provided elsewhere (Table 1 (18)).

Gene expression and data analysis

NanoString nCounter digital mRNA detection was used to characterize FFPE RNA expression using the panel described above. All procedures related to mRNA quantification, including sample preparation, hybridization, detection, and scanning, were performed following the manufacturer's instructions. In detail, 300 ng of total RNA was hybridized to capture reporter probe sets and immobilized on NanoString nCounter cartridges according to the manufacturer's specifications. Data were processed with NanoString analysis software version 4.0 for quality control as previously detailed (19). For normalization, in brief, noise background was subtracted using negative controls (mean + 2 SD negative controls), as previous detailed (19). Counts were normalized to positive controls and the 9 housekeeping genes as recommended by NanoString nSolver, using geNORM algorithm (20).

Bioinformatics Analysis

Data selection

The NCBI GEO database was used to identify GEO Datasets. To identify all studies, the term "thyroid carcinoma" and "not medullary" were used after selecting studies assessing expression profiling by array in *Homo sapiens*. We excluded data from cell lines or from thyroid cancer tissues without adjacent normal tissue. Finally, 9

datasets, not specifically focused on GPCR, were selected for thyroid cancer, including 8 for PTC and 1 for FTC (21-26) (Figure 1 (18)).

Microarray data

The microarrays datasets were downloaded from GEO datasets (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/>). These RNA profiles were based on GPL570 (Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array), GPL19850 (Agilent-060228 Human LncRNA v5 4X180K), GPL13607 (Agilent-028004 SurePrint G3 Human GE 8x60K Microarray), GPL96 (Affymetrix Human Genome U133A Array), and GPL23126 (Affymetrix Human Clariom D Assay) platforms. Overall, they contained a total of 79 PTC samples and 79 adjacent normal thyroid samples. They also contained 3 patients with FTC with both tumoral and adjacent normal thyroid samples (Table 2 (18)).

Identification of differentially expressed genes

Patient samples from different studies were divided according to histological subtypes of thyroid cancer (papillary, follicular). For each study, a differentially expressed gene (DEG) analysis of tumor vs nontumor tissue in the same patient was performed for all probes in the studied platform. For all probes in the platform, a multiple linear regression model was applied to estimate coefficients of tumoral vs nontumoral expression (logFC estimation), taking into account paired samples for a patient. The empirical Bayes moderation was applied to adjust the variability over all genes in these few replicate studies. DEGs of GPCRs were identified using adjusted *P* values for multiple testing (false discovery rate [FDR] < 0.05). These analyses were computed with R version 3.5.2 software, bioconductor interface, and the LIMMA package.

Validation of the DEGs

To validate transcriptomic analysis in human samples, TCGA (The Cancer Genome Atlas) data from papillary thyroid cancer were also used to quantify differential expression of GPCRs by comparing tumors against normal tissue from the Gene Tissue Expression Project (GTEx) database as previous described (<https://insellab.github.io/data>).

Survival Analysis

The Kaplan–Meier plotter (kmplot.com/analysis) was used to compare survival curves (overall and progression-free survival) based on gene expression data and clinical data from TCGA, GEO, and the European Genome-phenome Archive (EGA) databases in 502 thyroid carcinoma (27). To analyze the prognostic value of GPCR genes, the patient

samples were split into 2 groups according to the median expression of the biomarker. The 2 patient cohorts were compared by a Kaplan–Meier survival plot, and the log-rank *P* value was calculated.

Results

Patients and Sample Characteristics

RNA was extracted from 38 FFPE tissues (19 tumors and 19 matched normal controls). For each of the patient samples included in the study, nucleic acid quality was sufficient for successful performance of RNA analysis. However, 2 of the samples were excluded after normalization control. Overall, 17 patients with progressive and refractory metastatic thyroid cancer (normal and tumoral tissues for each subject) were included in the analysis. Clinicopathological features of all the cases are reported in Table 1. The study population comprised 41% women. Mean age was 55 ± 18 years. Twelve (70%) participants had PTC and 5 (30%) FTC. Six patients (35%) were initially assigned to stage I and stage II, 1 (6%) patient to stage III, and 4 (24%) to stage IV, according to the AJCC prognostic stage 8th edition. The mean follow-up was 8.1 ± 4.7 years. All deaths were related to thyroid cancer.

GPCR Gene Expression Data In Progressive and Refractory Thyroid Cancer

First, we analyzed each patient individually (from #1 to #17) for differentially expressed GPCR genes. Hierarchical clustering of GPCR genes according to the tumoral/normal ratio did not distinguish enrichment in a specific class of GPCR (Fig. 1A). We also evaluated the impact of histological type or clinical prognostic factors on sample clustering. The patients with a global GPCR strong overexpression were older (>55 years of age, $P = .0145$) and had a more advanced tumor ($P = .0061$) (Fig. 1B).

We calculated the DEG level for each GPCR gene in the custom NanoString nCounter panel. In the whole series, 31 GPCRs were deregulated (18 downregulated, 13 upregulated) (Fig. 1C). Interestingly, the GPCRome seemed markedly different between PTC and FTC. In FTC, 4 statistically downregulated GPCR genes were identified: *VIPR1*, *ADGRL2/LPHN2*, *ADGRA3/GPR125*, and *ADGRV1/MASS1* (Fig. 1D; Table 3 (18)). In PTC, 24 GPCR genes were statistically differentially expressed in comparison to normal adjacent samples ($P < .005$) (Fig. 1E; Table 3 (18)). Five GPCR genes were downregulated (*VIPR1*, *GPR132*, *UTS2R*, *NPY1R*, *P2RY8*) and 19 GPCR genes were upregulated

(*GPR137B*, *ADGRE5*, *F2RL1*, *P2RY5*, *F2R*, *S1PR2*, *GPRC5B*, *HRH1*, *GPR161*, *HTR1D*, *ADGRB3/BAI3*, *P2RY4*, *LPAR5/GPR92*, *HRH4*, *ADORA1*, *GPR141*, *KISS1R/GPR54*, *GABBR2*, *CYSLTR2*). As an exploratory analysis we also considered tumor groups separately: Follicular variant PTC displayed, as PTC, a significant upregulation of *GPRC5B* and downregulation of *UTS2R*; oncocytic variant FTC displayed, as FTC, significant downregulation of *ADGRL2/LPHN2* (Table 3 (18)).

Finally, we compared GPCR expression with that of thyroid differentiation genes. Thyroid genes *TPO* (thyroperoxidase gene) and *SLC26A4* (pendrin gene) were downregulated in PTC ($\log_2[\text{fold Change (FC)}] = -6.10$, $P = .03$ and $\log_2(\text{FC}) = -1.96$, $P = .049$, respectively), and *TG* (thyroglobulin gene) in FTC ($\log_2(\text{FC}) = -8.06$, $P = .023$). Conversely, *NOX4* (NADPH oxidase 4 gene) was overexpressed in papillary tumor tissue ($\log_2(\text{FC}) = 2.84$, $P = .025$). Interestingly, alterations of GPCR and thyroid gene expression levels in thyroid carcinoma exhibited pairwise correlations (Table 4 (18)). Upregulated GPCRs were negatively correlated with thyroid differentiation genes *TPO*, *SLC26A4* and *TG*, whereas downregulated GPCRs correlated positively. The *NOX4* messenger had the exact opposite correlation with GPCRs.

GPCR Gene Expression in Thyroid Samples From Public Repositories

We performed an analysis of 8 microarray datasets from PTC and related normal thyroid tissue (GSE3467, GSE3678, GSE66783, GSE6004, GSE60542, GSE29265, GSE50901, and GSE5364) from the GEO database. Forty-two GPCRs were differentially expressed in at least 1 study, with 18 upregulated GPCR, 23 downregulated genes, and 1 with confusing results (*CHRM3* was found overexpressed in 1 study and underexpressed in another). In total, when we included findings from our transcriptomic analysis (refractory thyroid cancer), 59 receptors were differentially expressed in at least 1 study (Fig. 2A). Furthermore, when comparing datasets from 3 transcriptomic approaches (ie, our work with Nanostring data, GEO data and TCGA data), 7 GPCR were common for PTC samples: *VIPR1*, *ADORA1*, *GPRC5B*, *P2RY8*, *GABBR2*, *CYSLTR2*, and *LPAR5/GPR92* (Fig. 2B and 2C).

We also performed an analysis of the only microarray dataset from 3 FTC paired with normal thyroid tissue (GSE111455). After applying the same algorithm used for PTC, we identified no consistently differentially expressed GPCR gene (Figure 2 (18)).

Table 1. Clinical and histological characteristics of patients included in NanoString nCounter (NanoString Technologies) analysis

Patients	Age, Sex, y	Tumor histology	TNM grade	Tumor size (mm)	E TE	ENE	Vascular invasion	Progression to RAI-refractory cancer	Number of RAI doses	Other therapies	Fol- low-up, y	Outcomes
#1	54 Male	PTC	T3N1bM0	45	No	Yes	Yes	Pulmonary metastases and neck pro- gression	2	EBT, TKI	4.10	Death
#2	77 Female	PTC	T4N1a1	2.5	Yes	No	No	Pulmonary metastases	1	TKI	7.36	Death
#3	64 Male	FTC, oncocytic variant	T3N1aM1	18	Yes	Yes	Yes	Bones, pulmonary and liver metastases	1	EBT, TKI, immuno- therapy	3.89	Alive
#4	26 Female	PTC	T1bN1bM0	7 + 1	na	No	No	Neck progression	2	No	10.76	Alive
#5	26 Female	PTC	T1bN1bM0	12	na	Yes	No	Neck progression	2	No	8.76	Alive
#6	28 Male	PTC	T1bN1aM0	8 + 3 + 2 + 1	na	No	Yes	Neck progression	2	EBT	20.02	Alive
#7	63 Male	FTC, oncocytic variant	T3N1aM0	35	Yes	Yes	No	Bones, pulmonary and liver metastases	2	TKI, chemotherapy	6.54	Death
#8	61 Male	FTC, oncocytic variant	T3N0M0	70	Yes	na	Yes	Pulmonary metastases and neck pro- gression	3	TKI	10.82	Alive
#9	27 Female	PTC, follicular variant	T2N0M0	30	No	na	No	Neck progression	2	No	15.37	Alive
#10	56 Male	PTC	T2N1bM0	20	No	Yes	No	Pulmonary metastases	2	TKI	10.73	Death
#11	61 Male	FTC	T3N0M1	40	Yes	na	Yes	Pulmonary and lung metastases	2	TKI	4.29	Death
#12	73 Male	PTC, tall cell variant	T4N1aM0	30	Yes	Yes	Yes	Neck progression	3	EBT, TKI	6.04	Death
#13	72 Male	PTC, follicular variant	T3N0M0	80	No	na	Yes	Bones, pulmonary and brain metastases	2	EBT, TKI	14.14	Alive
#14	58 Female	PTC	T3N1bM0	30	Yes	nk	Yes	Bones, pulmonary and brain metastases	2	TKI	6.35	Death
#15	52 Male	PTC, tall cell variant	T4N1aM0	7 + 13 + 24	Yes	nk	Yes	Pulmonary and lung metastases	2	TKI, EBT	9.15	Death
#16	74 Male	FTC	T3N0M0	65	Yes	na	na	Pulmonary metastases and neck pro- gression	2	TKI	5.92	Alive
#17	68 Female	PTC	T3N1bM1	42	No	Yes	No	Pulmonary metastases	2	TKI, chemotherapy	1.72	Alive

Tumor classification according to TNM stage. Tumor size in millimeters.

Abbreviations: EBT, external beam therapy; ENE, extranodal extension; ETE, extrathyroidal extension; FTC, follicular thyroid cancer; na, not applicable; nk, not known; PTC, papillary thyroid cancer; TKI, tyrosine kinase inhibitor.

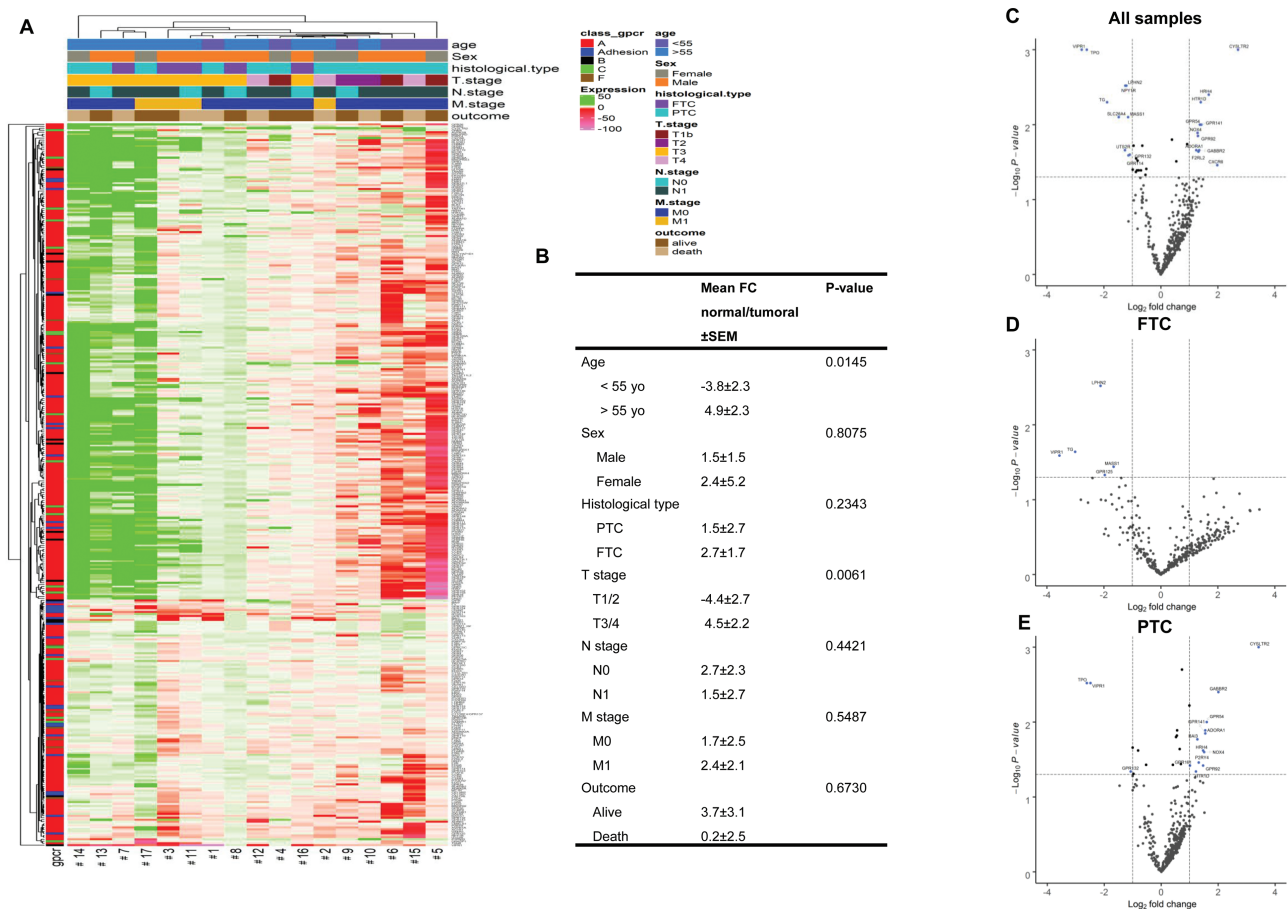


Figure 1. Identification of DEG in progressive and refractory thyroid cancer tissues. (A) Sample and GPCR clustering in thyroid tissues. Heat map representative of tumoral/normal tissue fold change for each GPCR gene in each of 17 patients with RAI-refractory thyroid cancer. The number indicates the corresponding patient number (#1 to #17). GPCR were classified in 5 categories according to GRAFS classification. Annotations from clinical and histopathological features were also added. Red and green indicate a low and a high level of expression, respectively. The columns represent the samples and the rows the GPCR genes. (B) Impact of histological and clinical prognostic factors and overall GPCRome expression. Mean tumoral/normal fold change for overall GPCR was compared between 2 groups for age, sex, histological type, TNM stage, and overall survival. Comparisons between 2 groups were tested by the Mann-Whitney U test. $P < .05$ was considered statistically significant. (C-E) Distribution of DEGs from refractory thyroid tissues in all samples (C), follicular thyroid cancer (D), and papillary thyroid cancer (E). The distribution of DEGs is represented as a volcano plot. Each GPCR transcript is represented by a dot. Log_2 fold change (2.0-fold upregulation and downregulation, vertical lines) was plotted against the $-\log_{10} P$ ($P < .05$, horizontal line). yo, years old; PTC, papillary thyroid cancer; FTC, follicular thyroid cancer.

Potential Drug Target for Drug Repositioning Among GPCR Panel in Thyroid Cancer

Identification of approved drug target

We collected information from 2 pharmacological databases, ChEMBL and DrugBank, on approved drugs targeting the differentially expressed GPCRs. For the PTC series, 22/59 (37%) GPCRs were targeted by more than 1 approved drug. By contrast, for FTC, none of the 4 receptors underexpressed was targeted by an approved drug (Fig. 3A).

GPCRs expression in healthy tissues

We assessed the receptor expression profile in large panels of healthy tissues collected from the Consensus dataset from proteinatlas.org based on transcriptomic data (Fig. 3B). Targeting a GPCR with both low and restricted expression in healthy tissues would be desirable to limit side

effects. Arbitrarily, a cut-off at “Sum<100” (ie, sum of 1 transcript in each tissue) was applied, as previously reported (28). Among all the DEGs, *TSH-R* was an ideal candidate because it is almost thyroid specific. *HTR1D* appeared to have a very low expression level in healthy tissues except for the gastrointestinal tract. *FSHR* was expressed almost exclusively in the female and male reproductive system. *AVPR1B* was also very minimally expressed in healthy tissues except in the pituitary gland, consistent with its known physiological role.

Potential Prognosis Biomarkers Among GPCR Panel in Thyroid Cancer

Due to larger cohorts, all differentially expressed GPCRs were assessed using multiple gene survival analysis of the

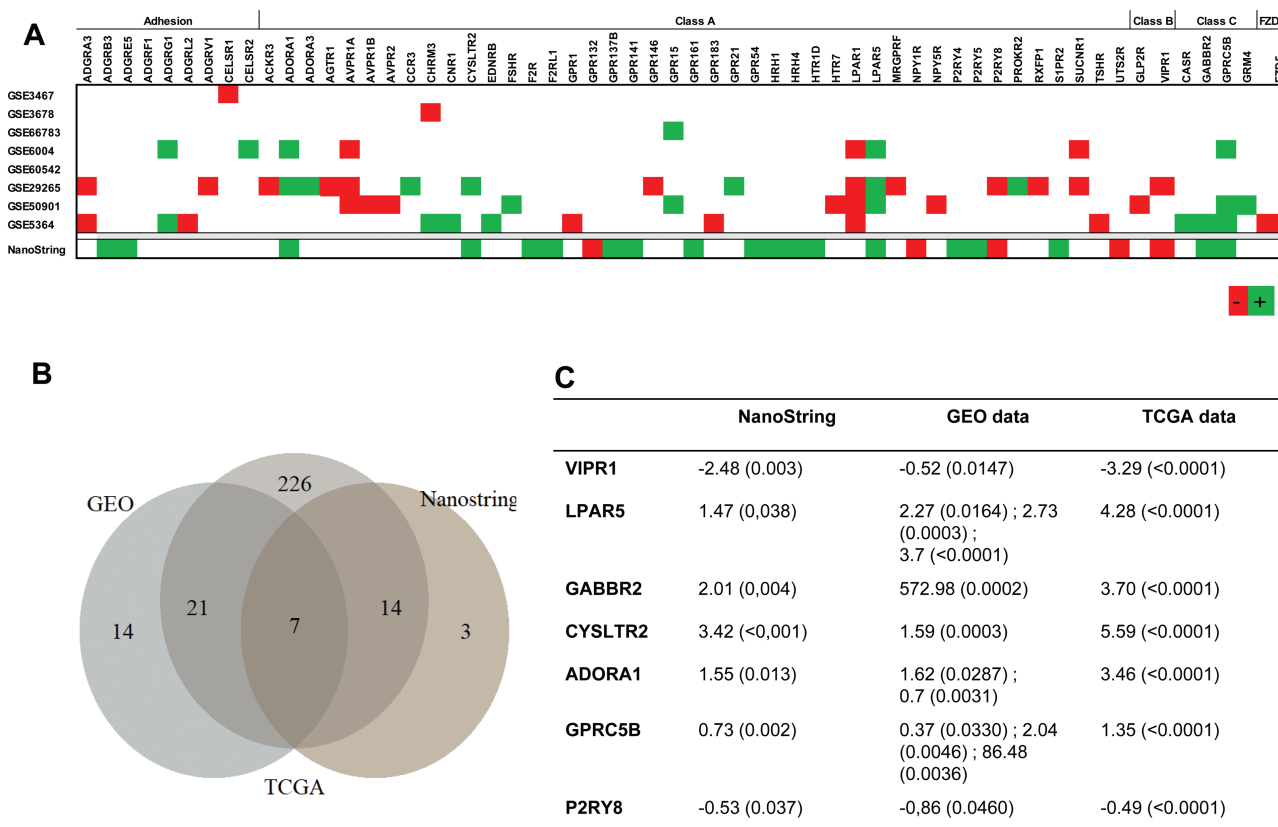


Figure 2. Identification of differential expression GPCR genes in GEO datasets. (A) Significant differentially expressed GPCR genes. Each column represents GPCR genes with significant different expression in at least 1/8 GEO datasets and/or NanoString analysis, classified according to GPCR families. Each line represents 1 dataset (defined by its GSE number). Red indicates significant underexpression in tumoral samples, green indicates significant overexpression in tumoral samples, and a clear box indicates no statistically significant DEG between normal and tumoral tissue. (B) Significant differentially expressed GPCR genes in NanoString nCounter (NanoString Technologies) and bioinformatics analyses (GEO and TCGA datasets). The Venn diagram represents the number of differentially expressed genes in GEO data, TCGA cohort, and in NanoString nCounter analyses for papillary thyroid carcinoma samples. (C) Common GPCR for the different types of transcriptomic approaches. Seven receptors (VIPR1, LPAR5, GABBR2, ADORA1, CYSLTR2, P2RY8, and GPRC5B) were found to be differentially expressed in GEO, NanoString nCounter, and TCGA analyses. Fold change (FC) and P values are given for each approach.

Kaplan–Meier plotter from the TCGA dataset. A low expression of *LPAR5/GPR92*, *GPRC5B* and a high expression of *F2RL1*, *HRH4*, *ACKR3*, and *GPR132* was associated with poorer overall survival (Fig. 4; Table 6 (18)). Moreover, low expression of *ADGRL2/LPHN2*, *AGTR1*, *AVPR1A*, *TSH-R*, and *VIPR1* and high expression of *ADORA1*, *AVPR1B*, *F2RL1*, *GPR141*, *GPR15*, *HRH1*, and *HTR1D* were associated with increased risk of thyroid cancer recurrence (lower progression-free survival) (Fig. 4; Table 5 (18)). Interestingly, among these 12 GPCRs associated with progression-free survival, *TSHR* and *ADGRL2/LPHN2* were also associated with T and AJCC stages in the TCGA cohort (Table 7 (18)). Moreover, while these GPCR genes were not associated with survival in our cohort of refractory thyroid cancer using NanoString analyses, *ADGRL2/LPHN2* seemed to be associated with the risk of recurrence. Indeed, low expression of *ADGRL2/LPHN2* was associated with worse T3-4, M1, and III/IV AJCC stages (Table 7 (18)).

Discussion

To the best of our knowledge, this is the first GPCRomic study performed analyzing the expression of a large panel of GPCRs in thyroid tissue, specifically in progressive and refractory thyroid cancer. Differentially expressed gene analyses, including GPCR genes, have been reported to unveil diagnosis, prognosis, or therapeutic target candidates (29). We used NanoString nCounter analysis, a validated method to quantify the mRNA expression from FFPE samples, including thyroid samples (30). Here, we focused on the study of GPCRs. In our cohort with refractory thyroid cancer, a total of 24 and 4 GPCR mRNAs were found differentially expressed in papillary and follicular thyroid cancer, respectively, when compared with control tissue. Among them, *VIPR1* was the only receptor with consistent underexpression in the 2 types of well-differentiated thyroid cancer, as previously described in lung cancer (31). We compared the results from our patients with public cancer gene

A

Papillary thyroid cancer				Follicular thyroid cancer	
GPCR gene	Number of drugs			GPCR gene	Number of drugs
ACKR3	1	CYSLTR2	7	GRM4	0
ADGRA3	0	EDNRB	3	HRH1	139
ADGRB3	0	F2R	6	HRH4	9
ADGRE5	0	F2RL1	3	HTR1D	48
ADGRF1	0	FSHR	8	LPAR1	0
ADGRG1	0	FZD5	0	LPAR5	0
ADGRL2	0	GABBR2	3	MRGPRF	0
ADGRV1	0	GLP2R	2	NPY1R	0
ADORA1	16	GPR1	0	NPY5R	0
ADORA3	10	GPR132	0	P2RY4	0
AGTR1	19	GPR137B	0	P2RY5	0
AVPR1A	11	GPR141	0	P2RY8	0
AVPR1B	7	GPR146	0	PROKR2	0
AVPR2	12	GPR15	0	RXFP1	0
CASR	7	GPR161	0	S1PR2	1
CCR3	0	GPR183	0	SUCNR1	0
CELSR1	0	GPR21	0	TSHR	3
CELSR2	0	GPR54	0	UTS2R	0
CHRM3	100	GPRC5B	0	VIPR1	0

B

	adipose tissue	adrenal gland	amygdala	appendix	β-cells	basal ganglia	bone marrow	breast	cerebellum	central cortex	cervix, uterine	colon	corpus callosum	dentritic cells	ductus deferens	duodenum	endometrium	epididymis	esophagus	fallopian tube	galbladder	granulocytes	heart muscle	hippocampal formt	hypothalamus	kidney	liver	lung	lymph node	midbrain	monocytes	
CYSLTR2	2	11.4	3.4	3.9	0	4.2	0.7	1	1.6	8	0.9	1	1.1	0.9	25.1	2.1	1.3	1.7	0.7	3.4	1.6	37.2	11.5	4.1	3.4	1.8	1	1.5	4.4	3.3	3.2	
GABBR2	0.9	4.4	13.6	1	0.7	14.6	0.8	0.9	19.7	52.7	0.8	0.9	2.1	0.7	0	0.8	1.1	1.1	0.9	0.8	0.9	1.7	0.9	14.6	11.1	0.9	0.9	1	0.9	7.6	1.1	
ADORA1	4.5	1	19.7	2.6	0	21.7	0.8	6.1	9.7	38.7	1.1	1.6	27.4	0.6	0	2	2	1.6	1.6	2	1.8	0	13.8	19.8	12.1	4.2	1	2.8	1.4	23	0.1	
ADORA3	5.2	13.4	8.7	3.1	0	4.5	1	6.2	3.7	5.2	10.3	2.2	0	3.5	0.5	1	1.8	2.8	4.8	88.6	1.6	0	0	1.9	2.1	2.8	3.8	1.2	0	0	0	0
CNR1	19	6.4	18	5.2	2.9	15.8	1.5	15	13.8	30.5	3.9	5.5	0.8	0	0.8	2.3	3.1	4.7	3.7	5.5	3.6	0.4	1.4	17.6	7.7	0.9	0.7	6.4	6.5	2.3	0	
EDNRB	25	23.2	22.2	10	0	29.8	0.8	23	10.3	30.7	8.1	7.2	13.6	0	2.3	1.1	7.7	3.6	4.9	6	8.5	0	23.7	16.7	16.4	22	27	28	16	24	2.1	
CASR	0	0	0	0	0	1.4	0	0	0	0.6	0	0.8	0.4	0.5	0	0.1	0	0	0	0	0	21	1.1	0	0.1	0.2	18	0.5	0	0.1	0.3	
F2R	12	11.2	1.5	7.5	0.4	2.2	1.1	8.9	0.8	3.5	12	14	3.3	0.2	20.1	5.9	18	8.6	9.3	3.5	21	0.8	19.2	1.4	1.7	20	23	24	10	15	0.3	
FSHR	0.1	0.1	0.1	0	0	1.5	0.1	0.1	0.1	2.9	0.1	0.1	0	0	0	0	0.1	0	0.2	0.3	5.3	0	1	0.1	0.4	0.3	0.1	0.1	0	0.1	0.1	
HRH1	9.1	4.4	7.3	4.6	0.1	4.4	0.2	9.6	0.5	10.6	8	14	1.3	0.3	2.4	3.8	6.2	7.2	5.7	11	9.9	1.2	7	5.1	4	3.3	1.1	8.2	1.8	2.2	0.2	
HRH4	1.7	0.6	0.4	1.5	0	0.4	2.8	0.6	0.3	0.3	0.4	0.6	0.3	0	0.3	2.1	1.4	1.9	1.3	0.3	0.8	48.5	0.5	0.4	0.4	0.4	1.7	1.9	0.7	0.4	0	
HTR1D	0	0	0.3	0	1	0	0	0	0	0.2	0	0.1	0	0.7	12	0	0	0	0.5	1.9	2.2	0	0.4	0	0	0	0	0.2	0	1.2	0	
HTR7	1	0.5	2.4	1.1	0	2.5	0.5	0.7	0.3	4.3	0.6	0.8	1.7	4.6	1.2	0.8	0.4	0.3	1	0.4	1.3	0	0.6	9.9	5.1	0.3	0.6	0.5	0.7	1.7	0.3	
S1PR2	17	2.3	1.4	1.4	10.3	1.3	0.9	7.2	0.9	1.5	13	4.1	1.7	1.6	3.9	1.8	8.3	9.2	6.4	7.9	6.5	23.7	6.1	1.3	1.5	2.4	9.5	1.1	1.3	1.3	1.9	
ACKR3	56	2.9	5.4	6.9	1	5.6	1.7	29	2.2	6.4	11	15	8.9	0.2	9.1	5.7	9.9	20	24	15	15	0.1	30.2	8.4	3	3.8	30	11	7.2	3.8	0.5	
AGTR1	19	11.6	0	0.1	0	0	11	0	0	0.8	5.5	0	0	0	0	0.6	0.5	0.5	2.2	1.6	0	3.1	0.1	0	5.7	30	2.6	0	0	0	0	
AVPR1A	26	34.9	0.3	2.8	0	0.3	0	6.3	0.2	0.4	9.7	4.2	0.5	0	1.1	0.2	1.7	2.1	2.5	3.7	0.9	2.5	0.3	0.3	4.2	7.1	0.7	1.5	0.3	0	0	
AVPR1B	0	0	0.2	0.2	0	0.2	0	0.6	0.5	0.1	1.3	0	0	0	0	1.0	0.2	0	0.1	0.1	0	0	0	0.1	0.6	0	0	0.1	0	0	0	
AVPR2	8.9	0.1	0	0.1	0	0.9	7.1	1.2	0	2.1	1.6	0.2	0	0.7	2.7	0	0.8	2.6	1.4	0	6.3	0	4.7	0	1.9	1.1	6.2	0	0	0	0	
CHRM3	0.8	0	2.1	1.4	0	1.8	0	0.8	0.8	8.7	0.8	5.9	0.8	0	0.8	0.8	1.4	0.8	6.6	0.3	0.8	0	0.8	2.5	1.8	0.8	0.8	1.5	0.8	0.8	1.2	
GLP2R	7.9	0.7	0.6	2	0	2.9	0	2.6	0.3	4.3	6.6	15	0	0	1.7	1.2	1.9	0.4	5.3	1.4	3.3	0	0.9	0.6	0.5	0.4	3.2	1.4	0.7	0.6	0	
TSHR	0.1	0.2	0.1	0.2	1.8	0.4	0.3	0.2	0.1	0.3	0.1	0.1	0	0.8	0	0	0.1	0.1	0	0.3	0.1	1.3	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.4	0.1	0.3	
	NK-cells	olfactory region	ovary	pancreas	parathyroid gland	pituitary gland	placenta	pons and medulla	prostate	rectum	retina	salivary gland	seminal vesicle	skeletal muscle	small intestine	smooth muscle	spinal cord	spleen	stomach	substantia nigra	T-cells	testis	thalamus	thymus	thyroid gland	tongue	tonsil	total PBMC	urinary bladder	vagina		
CYSLTR2	0.4	1.5	5.4	0.5	0.7	2.3	23	3.7	3.4	1.1	2.9	0.7	22.4	0.5	1.3	2.5	0.7	2.3	6.9	1.1	3.3	0.5	1	2.9	1.1	0.5	1.5	0.4	1	1.2		
GABBR2	1.7	17.6	0.8	0.8	0.9	0.3	0.9	10	0.9	0.8	0.6	0.9	0.9	3.2	0.9	0.8	1	2.2	0.9	1	7.6	1	1.3	0.2	0.2	0.3	0	1.1	0.4	1.5	0.1	
ADORA1	0	13.4	0.8	16	16	0.9	8.9	25	1.2	1.6	1.8	8.9	1.3	2	1.9	1.8	1.3	21	7.4	1.6	23	0	16.3	15.9	0.32	0	1.4	0.1	3.4	0.3		
ADORA3	0	2.2	1.2	1	0.9	1.2	2	1	4.2	2.7	1.1	1.9	0.5	0	7.9	3.8	26	1.5	2.2	18	0	1.1	13.3	0.4	0.5	0	1.9	0.3	3.4	0		
CNR1	0	14.7	4.1	1.8	1.3	18.3	5.2	4.2	1.5	5.1	0	4.3	4	1.7	2.4	4.2	5.8	3.2	2.3	2.3	2.3	0	2.7	2.8	0.26	0	9.9	0.1	2.7	3.1		
EDNRB	0	8.1	4.9	6.4	7.7	6.3	68	33	14.9	7.7	51	13	4.4	6.7	5.1	12	7.4	33	16	5.8	24	0	3.1	12.4	0	18	2	2.9	0.4	11	8.2	
CASR	0.8	0	0.6	12	15.5	0.6	0	0.2	0	0.6	0.5	0	0	0.6	0.3	0.2	0.2	0.5	0.1	1.1	0.3	0	0.1	1.6	0	0.1	0.2	0.7	0	0		
F2R	4.2	1.8	6.2	4	1.6	4.7	32	2.5	9.6	5.1	9.6	26	14	7.2	23.7	16	8.4	3.5	68	4.5	1.5	17.6	16.6	1.4	4.9	11	14	6.4	11	4.7		
FSHR	0	0.1	6.5	0.1	0	0.1	0	0.5	0.1	0.3	0.1	0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	16.3	0	0	0.1	0	0	0	0.1	0.1		
HRH1	0.1	2.1	8.7	2.1	1.7	1.2	5.5	3.2	7.2	7.2	2	3.4	6.1	3	8	11	9.2	8.6	1.4	3.3	2.2	3.5	2.4	2	0.1	2.5	7.2	3.1	0.1	11	16	
HRH4	0	0.3	0.8	0.4	0	2.5	0.3	0.8	1	0.4	1	0.1	0.3	0.8	2.3	1.9	2.8	2.6	1.4	0.9	0.4	0.3	1.4	0.3	0.3	0.5	0.3	5.1	0.1	1.9	0.6	
HTR1D	1.2	0	0	0.1	0	0.1	0	0.1	0	0.1	0	0	0.1	0	0	0.2	0	0	0.2	0.9	0.4	0	0	0	0	0	0.2	0.5	0	0		
HTR7	0	1.8	0.4	1.4	31	0.2	0.5	3.1	1	1.2	0.4	0.6	0.3	1.7	0.9	2.2	3.6	1.5	1.3	1.5	1.7	0.2	14.3	1	0	0.3	0.1	0.6	0.1	3.5	2.1	
S1PR2	2.1	0	12.9	2.6	3.9	2.2	31	1.7	9.8	2.5	3.2	9.4	5.7	3.4	4	3.9	8.7	1.7	2.2	4.2	1.3	7.4	21.8	1	2	3.3	6.3	16	1.2	8	12	
ACKR3	6.1	6.5	19.3	26	2.2	10.7	60	8.4	14.2	12.8	25	8.9	8.9	36	16	16	33	7.2	7.1	13	3.8	6.1	9.4	5.5	0.2	34	22	8.6	0.6	59	18	
AGTR1	0	0.8	0	0.6	0.6	0.8	4.5	1.3	1	1	1	1	2.9	4.4</																		

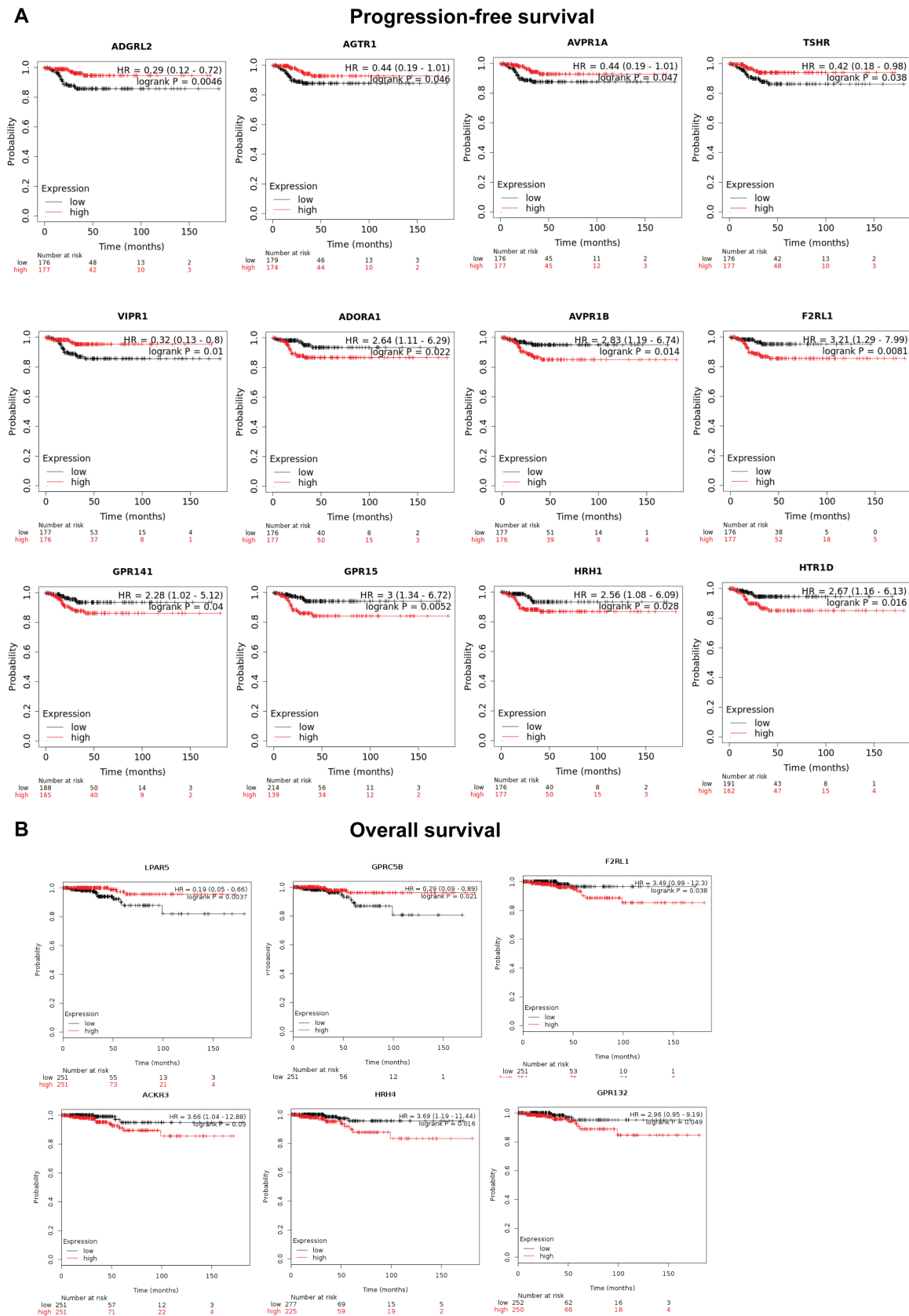


Figure 4. The candidate prognostic GPCR biomarker. GPCR genes significantly associated with progression-free survival (A) and overall survival (B) in thyroid carcinoma in pan-cancer databases. To analyze the prognostic value of GPCR gene expression, the patient samples are split into 2 groups according to the median expressions of the genes. The 2 patient cohorts were compared by a Kaplan–Meier survival plot and log-rank *P* value was calculated. Horizontal axis: overall survival (months); vertical axis: survival function.

expression databases, which were not restricted to progressive and refractory thyroid cancer. For FTC, in contrast with our results, we did not pick out any DEGs in GEO datasets. This may be due to the small sample (1 study with 3 patients). For PTC, GEO, and TCGA datasets, analyses confirmed 7 GPCRs noticed as deregulated in the NanoString nCounter analysis. *LPAR5/GPR92*, *GABBR2*, and *ADORA1* have already been found overexpressed in thyroid cancers, which validates our results (32-35). *CYLSTR2*, has already shown an important role in tumoral angiogenesis (36). In addition, the administration of a specific *CYLSTR2* antagonist has shown antitumoral efficacy in lung cancer (36). *P2RY8* is known to have a role in hematological cancers (37). Regarding *GPRC5B*, any role is currently described in cancer.

In the era of precision medicine and drug repositioning, GPCRome studies offer a unique opportunity to act on deregulated signaling pathways in tumor cells. In our study, we showed that NanoString nCounter technology offers a new approach to detect and quantify GPCR mRNA. This targeted RNA profiling panel could easily translate to clinical use because it is a highly sensitive approach compatible with small-volume FFPE tissue, less dependent on tissue preservation procedures (30). Indeed, only 2 samples had to be removed from analysis because of insufficient quality. In this context, we propose that targeting deregulated GPCRs may bring novel therapeutic approaches for the treatment of progressive and refractory thyroid cancer in combination with conventional treatment (ie, TKI), as previously described in ovarian cancer (38). By combining data from our patients and from bioinformatics analysis, we found 22 GPCRs that could be targeted by approved drugs and could be used for drug repositioning. Moreover, since we do not separate, here, the tumor cells from the stroma, the putative repositioned drug may target stromal and vascular cells rather than the tumor cells themselves and potentiate TKI by indirect ways. Interestingly, pairwise correlations between thyroid genes and GPCRs were identified suggesting a link between some GPCRs and thyrocyte dedifferentiation, as previously described with *ADGRE5/CD97* (9). Therefore, targeting some GPCRs could be part of innovative therapeutic strategies to redifferentiate refractory thyroid cancer. Moreover, modulating the level of GPCR expression rather than targeting the receptor itself may represent another approach, according to the inverse correlation between expression of some GPCRs and markers of thyroid cell differentiation.

Finally, the survival analysis of the TCGA cohort confirmed the association between *LPAR5/GPR92* and of *AGTR1* and the survival in thyroid cancer (32, 35, 39). We also found new GPCRs associated with progression-free

and/or overall survival. Interestingly, among these specific genes, *ADGRL2* was also associated with T stage, distant metastases, and AJCC stage in thyroid cancers, including in refractory thyroid cancer. Even if there is a small amount of data on prognostic association, these deregulated GPCRs may serve as prognosis biomarkers.

The main limitations of the present study are its retrospective nature and the small number of cases with primary thyroid cancer tissue. In addition, mutational status (BRAF, RAS) was not known. Further examinations are needed with more samples and with comparisons between primary and metastatic refractory tumors. A larger cohort would allow for a better evaluation of the different variants.

In summary, our data describe a human GPCRome in progressive and refractory thyroid carcinoma. A review of pharmacological databases revealed that a number of GPCRs could be targets for approved drugs, opening the field for drug repositioning and precision medicine in refractory and progressive thyroid cancer.

Acknowledgments

We would like to thank M.C. Rousselet for identification of histological sections; L. Denechaud for FFPE slide preparation; A. Rapinat for NanoString nCounter (NanoString Technologies) analysis.

Financial Support: This work was supported by CHU Angers, France (to C.B) and by the Nationwide Inserm cancer program (Inserm-Plan Cancer, France (to V.S)).

Additional Information

Correspondence: Valentine Suteau, Département d'Endocrinologie Diabétologie Nutrition, CHU Angers, 4 rue Larrey, 49100 ANGERS, France. Email: valentine.suteau@inserm.fr, valentine.courant@chu-angers.fr.

Disclosures: The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have influenced the work reported in this paper.

Data Availability: The datasets generated and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

References

1. Durante C, Haddy N, Baudin E, et al. Long-term outcome of 444 patients with distant metastases from papillary and follicular thyroid carcinoma: benefits and limits of radioiodine therapy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(8):2892-2899.
2. Brose MS, Nutting CM, Jarzab B, et al. Sorafenib in radioactive iodine-refractory, locally advanced or metastatic differentiated thyroid cancer: a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet.* 2014;384(9940):319-328.

3. Schlumberger M, Tahara M, Wirth LJ, et al. Lenvatinib versus Placebo in radioiodine-refractory thyroid cancer. *N Engl J Med*. 2015;372(7):621-630.
4. Sriram K, Insel PA. G protein-coupled receptors as targets for approved drugs: how many targets and how many drugs? *Mol Pharmacol*. 2018;93(4):251-258.
5. Dorsam RT, Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(2):79-94.
6. Wu V, Yeerna H, Nohata N, et al. Illuminating the OncoGPCRome: Novel G protein-coupled receptor-driven oncocrine networks and targets for cancer immunotherapy. *J Biol Chem*. 2019;294(29):jbc.REV119.005601.
7. Sriram K, Moyung K, Corriden R, Carter H, Insel PA. GPCRs show widespread differential mRNA expression and frequent mutation and copy number variation in solid tumors. *PLoS Biol*. 2019;17(11):e3000434.
8. Lappano R, Maggolini M. Pharmacotherapeutic targeting of G protein-coupled receptors in oncology: examples of approved therapies and emerging concepts. *Drugs*. 2017;77(9):951-965.
9. Aust G, Eichler W, Laue S, et al. CD97: a dedifferentiation marker in human thyroid carcinomas. *Cancer Res*. 1997;57(9):1798-1806.
10. Törnquist K. Sphingosine 1-phosphate and cancer: lessons from thyroid cancer cells. *Biomolecules*. 2013;3(2):303-315.
11. Rowe CW, Paul JW, Gedye C, et al. Targeting the TSH receptor in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2017;24(6):R191-R202.
12. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, et al. 2015 American thyroid association management guidelines for adult patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer: the American thyroid association guidelines task force on thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid*. 2016;26(1):1-133.
13. Schlumberger M, Brose M, Elisei R, et al. Definition and management of radioactive iodine-refractory differentiated thyroid cancer. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2014;2(5):356-358.
14. Tuttle RM, Haugen B, Perrier ND. Updated American joint committee on cancer/tumor-node-metastasis staging system for differentiated and anaplastic thyroid cancer (eighth edition): what changed and why? *Thyroid*. 2017;27(6):751-756.
15. Gentien D, Piqueret-Stephan L, Henry E, et al. Digital multiplexed gene expression analysis of mRNA and miRNA from routinely processed and stained cytological smears: a proof-of-principle study. *Acta Cytol*. 2021;65(1):88-98.
16. Rouzier R, Roulot A, Jeuranian AH, et al. Denaturing fixatives are compatible with the NanoString nCounter® platform and the Prosigna® assay. *New Biotechnol*. 2017;36:37-41.
17. Razavi SA, Afsharpad M, Modarressi MH, et al. Validation of reference genes for normalization of relative qRT-PCR studies in papillary thyroid carcinoma. *Sci Rep*. 2019;9. Published online October 23, 2019. doi:10.1038/s41598-019-49247-1
18. Suteau V, Seegers V, Munier M, et al. *Data from: G protein-coupled receptors in progressive and radioiodine-refractory thyroid cancer in the era of precision medicine*. Mendeley Data 2021. Deposited 1 May 2021, doi:10.17632/6873gsrjzf.3
19. Condello V, Torregrossa L, Sartori C, et al. mRNA and miRNA expression profiling of follicular variant of papillary thyroid carcinoma with and without distant metastases. *Mol Cell Endocrinol*. 2019;479:93-102.
20. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002;3(7):research0034.1-research0034.11.
21. He H, Jazdzewski K, Li W, et al. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(52):19075-19080.
22. Lan X, Zhang H, Wang Z, et al. Genome-wide analysis of long noncoding RNA expression profile in papillary thyroid carcinoma. *Gene*. 2015;569(1):109-117.
23. Vasko V, Espinosa AV, Scouten W, et al. Gene expression and functional evidence of epithelial-to-mesenchymal transition in papillary thyroid carcinoma invasion. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(8):2803-2808.
24. Tarabichi M, Saiselet M, Trésallet C, et al. Revisiting the transcriptional analysis of primary tumours and associated nodal metastases with enhanced biological and statistical controls: application to thyroid cancer. *Br J Cancer*. 2015;112(10):1665-1674.
25. Beltrami CM, dos Reis MB, Barros-Filho MC, et al. Integrated data analysis reveals potential drivers and pathways disrupted by DNA methylation in papillary thyroid carcinomas. *Clin Epigenetics*. 2017;9. Published online May 02, 2017. doi:10.1186/s13148-017-0346-2
26. Yu K, Ganesan K, Tan LK, et al. A precisely regulated gene expression cassette potently modulates metastasis and survival in multiple solid cancers. *PLoS Genet*. 2008;4(7). Published online July 18, 2008. doi:10.1371/journal.pgen.1000129.
27. Nagy Á, Lániczky A, Menyhárt O, Györfly B. Validation of miRNA prognostic power in hepatocellular carcinoma using expression data of independent datasets. *Sci Rep*. 2018;8. Published online June 15, 2018. doi:10.1038/s41598-018-27521-y
28. Albrecht H, Kübler E. Systematic meta-analysis identifies co-expressed kinases and GPCRs in ovarian cancer tissues revealing a potential for targeted kinase inhibitor delivery. *Pharmaceutics*. 2019;11(9). Published online September 2, 2019. doi:10.3390/pharmaceutics11090454
29. Insel PA, Sriram K, Gorr MW, et al. GPCRomics: an approach to discover GPCR drug targets. *Trends Pharmacol Sci*. 2019;40(6):378-387.
30. Macerola E, Poma AM, Basolo F. NanoString in the screening of genetic abnormalities associated with thyroid cancer. *Semin Cancer Biol*. 2020. Published online October 19, 2020. doi:10.1016/j.semcancer.2020.10.004
31. Moody TW, Walters J, Casibang M, Zia F, Gozes Y. VPAC1 receptors and lung cancer. *Ann NY Acad Sci*. 2000;921(1):26-32.
32. Tang J, Kong D, Cui Q, et al. Bioinformatic analysis and identification of potential prognostic microRNAs and mRNAs in thyroid cancer. *Peer J*. 2018;6. Published online May 4, 2018. doi:10.7717/peerj.4674
33. Wu C-Y, Zheng C, Xia E-J, et al. Lysophosphatidic acid receptor 5 (LPAR5) plays a significance role in papillary thyroid cancer via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway. *Med Sci Monit*. 2020;26:e919820-1-e919820-12.
34. Fujarewicz K, Jarzab M, Eszlinger M, et al. A multi-gene approach to differentiate papillary thyroid carcinoma from benign lesions: gene selection using support vector machines with bootstrapping. *Endocr Relat Cancer*. 2007;14(3):809-826.

35. Liu L, He C, Zhou Q, Wang G, Lv Z, Liu J. Identification of key genes and pathways of thyroid cancer by integrated bioinformatics analysis. *J Cell Physiol*. 2019. Published online June 6, 2019. doi:[10.1002/jcp.28932](https://doi.org/10.1002/jcp.28932)
36. Duah E, Teegala LR, Kondeti V, et al. Cysteinyl leukotriene 2 receptor promotes endothelial permeability, tumor angiogenesis, and metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2019;**116**(1):199-204.
37. Fujiwara S-I, Yamashita Y, Choi YL, et al. Transforming activity of purinergic receptor P2Y₂, G protein coupled, 8 revealed by retroviral expression screening. *Leuk Lymphoma*. 2007;**48**(5):978-986.
38. Rosanò L, Castro VD, Spinella F, et al. Combined targeting of endothelin a receptor and epidermal growth factor receptor in ovarian cancer shows enhanced antitumor activity. *Cancer Res*. 2007;**67**(13):6351-6359.
39. Jiang Q, Feng W, Xiong C, Lv Y. Integrated bioinformatics analysis of the association between apolipoprotein E expression and patient prognosis in papillary thyroid carcinoma. *Oncol Lett*. 2020;**19**(3):2295-2305.

1 **G Protein-Coupled Receptors in progressive and radioiodine-refractory thyroid cancer**
2 **in the Era of Precision Medicine**

3

4 Valentine Suteau (MD)^{1,2}, Valérie Seegers (MD)³, Mathilde Munier (PhD)^{1,2,4}, Rym Ben
5 Boubaker², Cécile Reyes⁵, David Gentien⁵, Méline Wery (PhD)⁶, Anne Croué (MD)⁷,
6 Frédéric Illouz (MD)^{1,4,8}, Antoine Hamy (MD, PhD)⁹, Patrice Rodien (MD, PhD)^{1,2,4,8},
7 Claire Briet (MD, PhD)^{1,2,4,8}

8

9 Supplemental Tables

Gene name	Class gene		
		<i>CALCRL</i>	GPCR
<i>ADCYAP1R1</i>	GPCR	<i>CASR</i>	GPCR
<i>ADMR</i>	GPCR	<i>CCBP2</i>	GPCR
<i>ADORA1</i>	GPCR	<i>CCKAR</i>	GPCR
<i>ADORA2A</i>	GPCR	<i>CCKBR</i>	GPCR
<i>ADORA2B</i>	GPCR	<i>CCR1</i>	GPCR
<i>ADORA3</i>	GPCR	<i>CCR10</i>	GPCR
<i>ADRA1A</i>	GPCR	<i>CCR2</i>	GPCR
<i>ADRA1B</i>	GPCR	<i>CCR3</i>	GPCR
<i>ADRA1D</i>	GPCR	<i>CCR4</i>	GPCR
<i>ADRA2A</i>	GPCR	<i>CCR5</i>	GPCR
<i>ADRA2B</i>	GPCR	<i>CCR6</i>	GPCR
<i>ADRB1</i>	GPCR	<i>CCR7</i>	GPCR
<i>ADRB2</i>	GPCR	<i>CCR8</i>	GPCR
<i>ADRB3</i>	GPCR	<i>CCR9</i>	GPCR
<i>AGTR1</i>	GPCR	<i>CCRL1</i>	GPCR
<i>AGTR2</i>	GPCR	<i>CCRL2</i>	GPCR
<i>AGTRL1</i>	GPCR	<i>CD97</i>	GPCR
<i>AVPR1A</i>	GPCR	<i>CELSR1</i>	GPCR
<i>AVPR1B</i>	GPCR	<i>CELSR2</i>	GPCR
<i>AVPR2</i>	GPCR	<i>CELSR3</i>	GPCR
<i>BAI1</i>	GPCR	<i>CHRM1</i>	GPCR
<i>BAI2</i>	GPCR	<i>CHRM2</i>	GPCR
<i>BAI3</i>	GPCR	<i>CHRM3</i>	GPCR
<i>BDKRB1</i>	GPCR	<i>CHRM4</i>	GPCR
<i>BDKRB2</i>	GPCR	<i>CHRM5</i>	GPCR
<i>BLR1</i>	GPCR	<i>CMKLR1</i>	GPCR
<i>BRS3</i>	GPCR	<i>CNR1</i>	GPCR
<i>C11ORF4/GPR137</i>	GPCR	<i>CNR2</i>	GPCR
<i>C3AR1</i>	GPCR	<i>CRHR1</i>	GPCR
<i>C5R1</i>	GPCR	<i>CRHR2</i>	GPCR
<i>CALCR</i>	GPCR	<i>CX3CR1</i>	GPCR

<i>CXCR3</i>	GPCR	<i>FPRL2</i>	GPCR
<i>CXCR4</i>	GPCR	<i>FSHR</i>	GPCR
<i>CXCR6</i>	GPCR	<i>FY</i>	GPCR
<i>CXCR7</i>	GPCR	<i>FZD1</i>	GPCR
<i>CYSLTR1</i>	GPCR	<i>FZD10</i>	GPCR
<i>CYSLTR2</i>	GPCR	<i>FZD2</i>	GPCR
<i>DRD1</i>	GPCR	<i>FZD3</i>	GPCR
<i>DRD2</i>	GPCR	<i>FZD4</i>	GPCR
<i>DRD3</i>	GPCR	<i>FZD5</i>	GPCR
<i>DRD4</i>	GPCR	<i>FZD6</i>	GPCR
<i>DRD5</i>	GPCR	<i>FZD7</i>	GPCR
<i>EBI2</i>	GPCR	<i>FZD8</i>	GPCR
<i>EDG1</i>	GPCR	<i>FZD9</i>	GPCR
<i>EDG2</i>	GPCR	<i>GABBR1</i>	GPCR
<i>EDG3</i>	GPCR	<i>GABBR2</i>	GPCR
<i>EDG4</i>	GPCR	<i>GALR1</i>	GPCR
<i>EDG5</i>	GPCR	<i>GALR2</i>	GPCR
<i>EDG6</i>	GPCR	<i>GALR3</i>	GPCR
<i>EDG7</i>	GPCR	<i>GALR4</i>	GPCR
<i>EDG8</i>	GPCR	<i>GCGR</i>	GPCR
<i>EDNRA</i>	GPCR	<i>GHRHR</i>	GPCR
<i>EDNRB</i>	GPCR	<i>GHSR</i>	GPCR
<i>ELTD1</i>	GPCR	<i>GIPR</i>	GPCR
<i>EMR1</i>	GPCR	<i>GLP1R</i>	GPCR
<i>EMR2</i>	GPCR	<i>GLP2R</i>	GPCR
<i>EMR3</i>	GPCR	<i>GNRHR</i>	GPCR
<i>F2R</i>	GPCR	<i>GNRHR2</i>	GPCR
<i>F2RL1</i>	GPCR	<i>GPBAR1</i>	GPCR
<i>F2RL2</i>	GPCR	<i>GPR1</i>	GPCR
<i>F2RL3</i>	GPCR	<i>GPR10</i>	GPCR
<i>FKSG83</i>	GPCR	<i>GPR101</i>	GPCR
<i>FPR1</i>	GPCR	<i>GPR103</i>	GPCR
<i>FPRL1</i>	GPCR	<i>GPR109A</i>	GPCR

<i>GPR110</i>	GPCR	<i>GPR161</i>	GPCR
<i>GPR111</i>	GPCR	<i>GPR17</i>	GPCR
<i>GPR112</i>	GPCR	<i>GPR171</i>	GPCR
<i>GPR113</i>	GPCR	<i>GPR173</i>	GPCR
<i>GPR114</i>	GPCR	<i>GPR174</i>	GPCR
<i>GPR115</i>	GPCR	<i>GPR176</i>	GPCR
<i>GPR116</i>	GPCR	<i>GPR18</i>	GPCR
<i>GPR119</i>	GPCR	<i>GPR19</i>	GPCR
<i>GPR12</i>	GPCR	<i>GPR20</i>	GPCR
<i>GPR120</i>	GPCR	<i>GPR21</i>	GPCR
<i>GPR123</i>	GPCR	<i>GPR22</i>	GPCR
<i>GPR124</i>	GPCR	<i>GPR23</i>	GPCR
<i>GPR125</i>	GPCR	<i>GPR24</i>	GPCR
<i>GPR126</i>	GPCR	<i>GPR25</i>	GPCR
<i>GPR128</i>	GPCR	<i>GPR26</i>	GPCR
<i>GPR132</i>	GPCR	<i>GPR27</i>	GPCR
<i>GPR133</i>	GPCR	<i>GPR3</i>	GPCR
<i>GPR135</i>	GPCR	<i>GPR30</i>	GPCR
<i>GPR141</i>	GPCR	<i>GPR31</i>	GPCR
<i>GPR142</i>	GPCR	<i>GPR32</i>	GPCR
<i>GPR143</i>	GPCR	<i>GPR34</i>	GPCR
<i>GPR145</i>	GPCR	<i>GPR35</i>	GPCR
<i>GPR146</i>	GPCR	<i>GPR37</i>	GPCR
<i>GPR147</i>	GPCR	<i>GPR37L1</i>	GPCR
<i>GPR148</i>	GPCR	<i>GPR39</i>	GPCR
<i>GPR149</i>	GPCR	<i>GPR4</i>	GPCR
<i>GPR15</i>	GPCR	<i>GPR40</i>	GPCR
<i>GPR150</i>	GPCR	<i>GPR43</i>	GPCR
<i>GPR152</i>	GPCR	<i>GPR44</i>	GPCR
<i>GPR153</i>	GPCR	<i>GPR45</i>	GPCR
<i>GPR154</i>	GPCR	<i>GPR50</i>	GPCR
<i>GPR158</i>	GPCR	<i>GPR52</i>	GPCR
<i>GPR160</i>	GPCR	<i>GPR54</i>	GPCR

<i>GPR55</i>	GPCR	<i>GRM2</i>	GPCR
<i>GPR56</i>	GPCR	<i>GRM3</i>	GPCR
<i>GPR6</i>	GPCR	<i>GRM4</i>	GPCR
<i>GPR61</i>	GPCR	<i>GRM5</i>	GPCR
<i>GPR62</i>	GPCR	<i>GRM6</i>	GPCR
<i>GPR63</i>	GPCR	<i>GRM7</i>	GPCR
<i>GPR64</i>	GPCR	<i>GRM8</i>	GPCR
<i>GPR65</i>	GPCR	<i>GRPR</i>	GPCR
<i>GPR68</i>	GPCR	<i>HCRTR1</i>	GPCR
<i>GPR7</i>	GPCR	<i>HCRTR2</i>	GPCR
<i>GPR73</i>	GPCR	<i>HRH1</i>	GPCR
<i>GPR73L1</i>	GPCR	<i>HRH2</i>	GPCR
<i>GPR74</i>	GPCR	<i>HRH3</i>	GPCR
<i>GPR75</i>	GPCR	<i>HRH4</i>	GPCR
<i>GPR77</i>	GPCR	<i>HTR1A</i>	GPCR
<i>GPR78</i>	GPCR	<i>HTR1B</i>	GPCR
<i>GPR8</i>	GPCR	<i>HTR1D</i>	GPCR
<i>GPR81</i>	GPCR	<i>HTR1E</i>	GPCR
<i>GPR82</i>	GPCR	<i>HTR1F</i>	GPCR
<i>GPR83</i>	GPCR	<i>HTR2A</i>	GPCR
<i>GPR84</i>	GPCR	<i>HTR2B</i>	GPCR
<i>GPR85</i>	GPCR	<i>HTR2C</i>	GPCR
<i>GPR87</i>	GPCR	<i>HTR4</i>	GPCR
<i>GPR88</i>	GPCR	<i>HTR5A</i>	GPCR
<i>GPR92</i>	GPCR	<i>HTR6</i>	GPCR
<i>GPR97</i>	GPCR	<i>HTR7</i>	GPCR
<i>GPRC5A</i>	GPCR	<i>IL8RA</i>	GPCR
<i>GPRC5B</i>	GPCR	<i>IL8RB</i>	GPCR
<i>GPRC5C</i>	GPCR	<i>LGR4</i>	GPCR
<i>GPRC5D</i>	GPCR	<i>LGR5</i>	GPCR
<i>GPRC6A</i>	GPCR	<i>LGR6</i>	GPCR
<i>GRASP1</i>	GPCR	<i>LGR7</i>	GPCR
<i>GRM1</i>	GPCR	<i>LGR8</i>	GPCR

<i>LHCGR</i>	GPCR	<i>NTSR2</i>	GPCR
<i>LPHN1</i>	GPCR	<i>OPN1SW</i>	GPCR
<i>LPHN2</i>	GPCR	<i>OPN3</i>	GPCR
<i>LPHN3</i>	GPCR	<i>OPN4</i>	GPCR
<i>LTB4R</i>	GPCR	<i>OPN5</i>	GPCR
<i>LTB4R2</i>	GPCR	<i>OPRD1</i>	GPCR
<i>MAS1</i>	GPCR	<i>OPRK1</i>	GPCR
<i>MAS1L</i>	GPCR	<i>OPRL1</i>	GPCR
<i>MASS1</i>	GPCR	<i>OPRM1</i>	GPCR
<i>MATK</i>	GPCR	<i>OPRM1_var</i>	GPCR
<i>MC1R</i>	GPCR	<i>OR2A4</i>	GPCR
<i>MC2R</i>	GPCR	<i>OR2C3</i>	GPCR
<i>MC3R</i>	GPCR	<i>OR7C2</i>	GPCR
<i>MC4R</i>	GPCR	<i>OR7E5P</i>	GPCR
<i>MC5R</i>	GPCR	<i>OXER1</i>	GPCR
<i>MLNR</i>	GPCR	<i>OXGR1</i>	GPCR
<i>MRGPRD</i>	GPCR	<i>OXTR</i>	GPCR
<i>MRGPRE</i>	GPCR	<i>P2RY1</i>	GPCR
<i>MRGPRF</i>	GPCR	<i>P2RY10</i>	GPCR
<i>MRGPRX1</i>	GPCR	<i>P2RY11</i>	GPCR
<i>MRGPRX2</i>	GPCR	<i>P2RY12</i>	GPCR
<i>MRGPRX3</i>	GPCR	<i>P2RY13</i>	GPCR
<i>MRGPRX4</i>	GPCR	<i>P2RY14</i>	GPCR
<i>MTNR1A</i>	GPCR	<i>P2RY2</i>	GPCR
<i>MTNR1B</i>	GPCR	<i>P2RY4</i>	GPCR
<i>NMBR</i>	GPCR	<i>P2RY5</i>	GPCR
<i>NMUR1</i>	GPCR	<i>P2RY6</i>	GPCR
<i>NMUR2</i>	GPCR	<i>P2RY8</i>	GPCR
<i>NPY1R</i>	GPCR	<i>PPYR1</i>	GPCR
<i>NPY2R</i>	GPCR	<i>PTAFR</i>	GPCR
<i>NPY5R</i>	GPCR	<i>PTGDR</i>	GPCR
<i>NPY6R</i>	GPCR	<i>PTGER1</i>	GPCR
<i>NTSR1</i>	GPCR	<i>PTGER2</i>	GPCR

<i>PTGER3</i>	GPCR	<i>TRHR</i>	GPCR
<i>PTGER4</i>	GPCR	<i>TSHR</i>	GPCR
<i>PTGFR</i>	GPCR	<i>UTS2R</i>	GPCR
<i>PTGIR</i>	GPCR	<i>VIPR1</i>	GPCR
<i>PTHR1</i>	GPCR	<i>VIPR2</i>	GPCR
<i>PTHR2</i>	GPCR	<i>VN1R1</i>	GPCR
<i>PTPN22</i>	GPCR	<i>VN1R2</i>	GPCR
<i>RGR</i>	GPCR	<i>VN1R5</i>	GPCR
<i>RHO</i>	GPCR	<i>XCR1</i>	GPCR
<i>RLN3R1</i>	GPCR	<i>ANO1</i>	Thyroid
<i>RRH</i>	GPCR	<i>ANO5</i>	Thyroid
<i>SCTR</i>	GPCR	<i>CFTR</i>	Thyroid
<i>SMO</i>	GPCR	<i>DIO2</i>	Thyroid
<i>SSTR1</i>	GPCR	<i>DUOX1</i>	thyroid
<i>SSTR2</i>	GPCR	<i>DUOX2</i>	Thyroid
<i>SSTR3</i>	GPCR	<i>DUOXA1</i>	Thyroid
<i>SSTR4</i>	GPCR	<i>DUOXA2</i>	Thyroid
<i>SSTR5</i>	GPCR	<i>NOX4</i>	Thyroid
<i>SUCNR1</i>	GPCR	<i>PAX8</i>	Thyroid
<i>TAAR1</i>	GPCR	<i>SLC16A2</i>	Thyroid
<i>TAAR2</i>	GPCR	<i>SLC26A4</i>	Thyroid
<i>TAAR5</i>	GPCR	<i>SLC5A4</i>	Thyroid
<i>TAAR6</i>	GPCR	<i>TG</i>	Thyroid
<i>TAAR8</i>	GPCR	<i>TPO</i>	Thyroid
<i>TAAR9</i>	GPCR	<i>TTF1</i>	Thyroid
<i>TACR1</i>	GPCR	<i>TTF2</i>	Thyroid
<i>TACR2</i>	GPCR	<i>ABCF1</i>	Housekeeping
<i>TACR3</i>	GPCR	<i>G6PD</i>	Housekeeping
<i>TAS1R1</i>	GPCR	<i>GAPDH</i>	Housekeeping
<i>TBXA2R</i>	GPCR	<i>GUSB</i>	Housekeeping
<i>TM7SF1</i>	GPCR	<i>HPRT1</i>	Housekeeping
<i>TM7SF11L2</i>	GPCR	<i>POLR2A</i>	Housekeeping
<i>TRBV5</i>	GPCR	<i>RPLP0</i>	Housekeeping

TBP Housekeeping

TFRC Housekeeping

10 **Supplemental Table 1.** List of genes included in Nanostring custom panel.

11

GPL platform	Data set accession	Total number of samples	Primary cancer samples
GPL570	GSE3467 (1)	18	PTC tissue; adjacent normal thyroid tissue (n=9)
GPL570	GSE3678 ^a	14	PTC; Paired normal thyroid tissues (n=7)
GPL19850	GSE66783 (2)	10	PTC tissue; adjacent normal thyroid tissues (n=5)
GPL570	GSE6004 (3)	18	Intratumoral papillary thyroid tissue; histologically normal thyroid tissue (n=4)
GPL570	GSE60542 (4)	92	PTC; patient-matched normal thyroid tissues (n=24)
GPL570	GSE29265 ^a	49	PTC tissue; adjacent non-cancerous thyroid tissue (n=10)
GPL13607	GSE50901 (5)	65	PTC; adjacent normal thyroid tissue (n=4)
GPL96	GSE5364 (6)	341	PTC; adjacent non-malignant tissues (n=16)
GPL23126	GSE111455 ^a	6	FTC ; normal tissue (n=3)

12 **Supplemental Table 2.** Gene expression data sets

13 ^a No study published. For each data set, the number of samples are indicated in brackets.

14 Abbreviation: PTC (Papillary thyroid cancer); FTC (Follicular thyroid cancer).

15

16 **References**

- 17 1. He H, Jazdzewski K, Li W, Liyanarachchi S, Nagy R, Volinia S, Calin GA, Liu C,
18 Franssila K, Suster S, Kloos RT, Croce CM, de la Chapelle A. The role of microRNA
19 genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005;102(52):19075–
20 19080.
- 21 2. Lan X, Zhang H, Wang Z, Dong W, Sun W, Shao L, Zhang T, Zhang D. Genome-wide
22 analysis of long noncoding RNA expression profile in papillary thyroid carcinoma. *Gene*
23 2015;569(1):109–117.

- 24 3. Vasko V, Espinosa AV, Scouten W, He H, Auer H, Liyanarachchi S, Larin A, Savchenko
25 V, Francis GL, de la Chapelle A, Saji M, Ringel MD. Gene expression and functional
26 evidence of epithelial-to-mesenchymal transition in papillary thyroid carcinoma invasion.
27 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007;104(8):2803–2808.
- 28 4. Tarabichi M, Saiselet M, Trésallet C, Hoang C, Larsimont D, Andry G, Maenhaut C,
29 Detours V. Revisiting the transcriptional analysis of primary tumours and associated
30 nodal metastases with enhanced biological and statistical controls: application to thyroid
31 cancer. *Br. J. Cancer* 2015;112(10):1665–1674.
- 32 5. Beltrami CM, dos Reis MB, Barros-Filho MC, Marchi FA, Kuasne H, Pinto CAL,
33 Ambatipudi S, Herceg Z, Kowalski LP, Rogatto SR. Integrated data analysis reveals
34 potential drivers and pathways disrupted by DNA methylation in papillary thyroid
35 carcinomas. *Clin. Epigenetics* 2017;9. doi:10.1186/s13148-017-0346-2.
- 36 6. Yu K, Ganesan K, Tan LK, Laban M, Wu J, Zhao XD, Li H, Leung CHW, Zhu Y, Wei
37 CL, Hooi SC, Miller L, Tan P. A Precisely Regulated Gene Expression Cassette Potently
38 Modulates Metastasis and Survival in Multiple Solid Cancers. *PLoS Genet.* 2008;4(7).
39 doi:10.1371/journal.pgen.1000129.

40

41

Papillary thyroid cancer

HUGOgene

nomenclature	GPCR gene name	log₂FC	P value
<i>VIPR1</i>	<i>Vasoactive Intestinal Peptide Receptor 1</i>	-2.48	0.003
<i>GPR132</i>	<i>G Protein-Coupled Receptor 132</i>	-1.07	0.046
<i>UTS2R</i>	<i>Urotensin 2 Receptor</i>	-1.00	0.022
<i>NPY1R</i>	<i>Neuropeptide Y Receptor Y1</i>	-0.81	0.024
<i>P2RY8</i>	<i>P2Y Receptor Family Member 8</i>	-0.53	0.037
<i>GPR137B</i>	<i>G Protein-Coupled Receptor 137B</i>	0.41	0.037
<i>ADGRE5/CD97</i>	<i>Adhesion G Protein-Coupled Receptor E5</i>	0.52	0.016
<i>F2RL1</i>	<i>F2R Like Trypsin Receptor 1</i>	0.55	0.015
<i>P2RY5</i>	<i>Pyrimidinergic Receptor P2Y5</i>	0.56	0.013
<i>F2R</i>	<i>Coagulation Factor II Thrombin Receptor</i>	0.65	0.023
<i>S1PR2</i>	<i>Sphingosine-1-Phosphate Receptor 2</i>	0.69	0.036
<i>GPRC5B</i>	<i>G Protein-Coupled Receptor Class C Group 5 Member B</i>	0.73	0.002
<i>HRH1</i>	<i>Histamine Receptor H1</i>	0.99	0.006
<i>GPR161</i>	<i>G Protein-Coupled Receptor 161</i>	1.01	0.038
<i>HTR1D</i>	<i>5-Hydroxytryptamine Receptor 1D</i>	1.22	0.046
<i>ADGRB3/BAI3</i>	<i>Adhesion G Protein-Coupled Receptor B3</i>	1.27	0.017
<i>P2RY4</i>	<i>Pyrimidinergic Receptor P2Y4</i>	1.32	0.035
<i>LPAR5/GPR92</i>	<i>Lysophosphatidic Acid Receptor 5</i>	1.47	0.038
<i>HRH4</i>	<i>Histamine Receptor H4</i>	1.47	0.024
<i>ADORA1</i>	<i>Adenosine A1 Receptor</i>	1.55	0.013
<i>GPR141</i>	<i>G Protein-Coupled Receptor 141</i>	1.55	0.014
<i>KISS1R/GPR54</i>	<i>KISS1 Receptor</i>	1.60	0.01
<i>GABBR2</i>	<i>Gamma-Aminobutyric Acid Type B Receptor Subunit 2</i>	2.01	0.004
<i>CYSLTR2</i>	<i>Cysteinyl Leukotriene Receptor 2</i>	3.42	0.01

Follicular thyroid cancer

HUGO gene			
nomenclature	GPCR gene name	log₂FC	P value
<i>VIPR1</i>	<i>Vasoactive Intestinal Peptide Receptor 1</i>	-3.56	0.026
<i>ADGRL2/LPHN2</i>	<i>Adhesion G Protein-Coupled Receptor L2</i>	-2.12	0.003
<i>ADGRA3/GPR125</i>	<i>Adhesion G Protein-Coupled Receptor A3</i>	-1.97	0.047
<i>ADGRV1/MASS1</i>	<i>Adhesion G Protein-Coupled Receptor V1</i>	-1.66	0.036

42

Follicular variant	log₂(FC)	p-value	Tall cell variant	log₂(FC)	p-value	oncocytic variant	log₂(FC)	p-value
<i>GPRC5B</i>	0,23	0,021	<i>LGR4</i>	0,28	0,013	<i>LPHN2</i>	-0,61	0,028
<i>UTS2R</i>	-0,46	0,025	<i>TSHR</i>	-0,25	0,015			
<i>GPR124</i>	-0,30	0,032	<i>LPHN2</i>	-0,57	0,033			
<i>GPR160</i>	0,59	0,037	<i>OR2A4</i>	-0,40	0,035			

43

44 **Supplemental Table 3.** List of significant differentially expressed GPCR genes in papillary
45 and follicular thyroid cancer and in variants. P-values <0.05 were considered statistically
46 significant.

47

Papillary thyroid cancer

GPCR genes	<i>TPO</i>		<i>SLC26A4</i>		<i>NOX4</i>	
	R	p-value	R	p-value	R	p-value
<i>VIPRI</i>	0.775	< 0.0001	0.7648	< 0.0001	-0.5815	0.0018
<i>GPR132</i>	0.5371	0.0047	0.3026	0.133	-0.1904	0.3514
<i>UTS2R</i>	0.4701	0.0154	0.6561	0.0003	-0.4209	0.0323
<i>NPY1R</i>	0.4591	0.0183	0.7422	< 0.0001	-0.347	0.0824
<i>P2RY8</i>	0.12	0.5593	0.06462	0.7538	-0.1658	0.4182
<i>GPR137B</i>	0.1282	0.5325	0.2793	0.167	0.09812	0.6335
<i>ADGRE5</i>	-0.7525	< 0.0001	-0.7627	< 0.0001	0.6335	0.0005
<i>F2RL1</i>	-0.3819	0.0542	-0.2246	0.27	0.3949	0.0459
<i>P2RY5</i>	-0.706	< 0.0001	-0.5125	0.0074	0.6937	< 0.0001
<i>F2R</i>	-0.5651	0.0026	-0.6356	0.0005	0.7545	< 0.0001
<i>SIPR2</i>	-0.6294	0.0006	-0.5344	0.0049	0.5952	0.0013
<i>GPRC5B</i>	-0.425	0.0305	-0.0947	0.6454	0.5337	0.005
<i>HRH1</i>	-0.3668	0.0653	-0.3074	0.1267	0.5569	0.0031
<i>GPR161</i>	-0.425	0.0305	-0.1781	0.384	0.8379	< 0.0001
<i>HTR1D</i>	-0.5138	0.0072	-0.347	0.0824	0.6554	0.0003
<i>ADGRB3</i>	-0.6055	0.001	-0.3566	0.0738	0.7135	< 0.0001
<i>P2RY4</i>	-0.3593	0.0714	-0.2321	0.2538	0.7477	< 0.0001
<i>HRH4</i>	-0.5788	0.0019	-0.4038	0.0408	0.8393	< 0.0001
<i>ADORA1</i>	-0.8209	< 0.0001	-0.6082	0.001	0.9097	< 0.0001
<i>GPR141</i>	-0.7074	< 0.0001	-0.5583	0.003	0.7012	< 0.0001
<i>KISS1R</i>	-0.6073	0.001	-0.2985	0.1385	0.6986	< 0.0001
<i>GABBR2</i>	-0.5597	0.003	-0.3607	0.0703	0.721	< 0.0001

<i>CYSLTR2</i>	-0.6807	0.0001	-0.5186	0.0066	0.6732	0.0002
<i>LPAR5</i>	-0.6301	0.0006	-0.6185	0.0008	0.8379	< 0.0001

Follicular thyroid cancer

<i>TG</i>		
GPCR genes	R	p-value
<i>VIPRI</i>	0.7697	0.0126
<i>ADGRL2</i>	0.8788	0.0016
<i>ADGRA3</i>	0.9394	0.0002
<i>ADGRV1</i>	0.7576	0.0149

48 **Supplemental Table 4.** Pair-wise correlation coefficients (R) for GPCRs and thyroid genes
49 levels (*TPO*, *SLC26A4*, *NOX4* and *TG*) in refractory thyroid cancers.

50 For greater clarity, negative correlations have been greyed out. Significant negative
51 correlation (nonparametric Spearman correlation, p-values<0.05) are shown in boldface.

52 Abbreviation: TG: Thyroglobulin, TPO: Thyroperoxydase, NOX4 : *NADPH oxidase 4*.

53

GPCR gene	p-value				
		CNR1	0.96	HRH1	0.028
ACKR3	0.07	CYSLTR2	0.94	HRH4	0.44
ADGRA2	0.74	EDNRB	0.28	HTR1D	0.016
ADGRA3	0.28	F2R	0.98	HTR7	0.67
ADGRB3	0.18	F2RL1	0.0081	KISS1R	0.26
ADGRE5	0.9	FSHR	0.38	LPAR1	0.43
ADGRF1	0.29	FZD5	0.6	LPAR5	0.44
ADGRG1	0.49	GABBR2	0.17	MRGPRF	0.38
ADGRL2	0.0046	GLP2R	0.075	NPY1R	0.74
ADGRV1	0.25	GPR1	0.1	NPY5R	0.42
ADORA1	0.022	GPR132	0.72	P2RY4	0.086
AGTR1	0.046	GPR137B	0.39	P2RY5	0.55
AVPR1A	0.047	GPR141	0.04	P2RY8	0.14
AVPR1B	0.014	GPR146	0.4	PROKR2	0.47
AVPR2	0.13	GPR15	0.0052	RXFP1	0.11
CASR	0.67	GPR161	0.45	S1PR2	0.14
CCR3	0.93	GPR183	0.29	SUCNR1	0.83
CELSR1	0.91	GPR21	0.19	TSHR	0.038
CELSR2	0.56	GPRC5B	0.73	UTS2R	0.16
CHRM3	0.057	GRM4	0.85	VIPR1	0.001

54 **Supplemental Table 5.** Progression-free survival analysis in thyroid carcinoma. All
55 Differentially expressed GPCR were assessed with Kaplan-Meier plotter. To analyze the
56 prognostic value of GPCR genes, the patient samples are split into two groups according to
57 the median expressions of the biomarker. The two patient cohorts are compared by a Kaplan-
58 Meier survival plot, and log-rank P value are calculated. GPCR genes significantly associated
59 with progression-free survival were in bold (p<0.05).

60

GPCR gene	p-value				
<i>ACKR3</i>	0.03	<i>CNR1</i>	0.08	<i>HRH1</i>	0.28
<i>ADGRA2</i>	0.83	<i>CYSLTR2</i>	0.76	<i>HRH4</i>	0.016
<i>ADGRA3</i>	0.056	<i>EDNRB</i>	0.25	<i>HTR1D</i>	0.94
<i>ADGRB3</i>	0.71	<i>F2R</i>	0.64	<i>HTR7</i>	0.61
<i>ADGRE5</i>	0.28	<i>F2RL1</i>	0.038	<i>KISS1R</i>	0.89
<i>ADGRF1</i>	0.9	<i>FSHR</i>	0.57	<i>LPAR1</i>	0.69
<i>ADGRG1</i>	0.78	<i>FZD5</i>	0.2	<i>LPAR5</i>	0.004
<i>ADGRL2</i>	0.79	<i>GABBR2</i>	0.075	<i>MRGPRF</i>	0.58
<i>ADGRV1</i>	0.32	<i>GLP2R</i>	0.33	<i>NPY1R</i>	0.63
<i>ADORA1</i>	0.2	<i>GPR1</i>	0.51	<i>NPY5R</i>	0.2
<i>AGTR1</i>	0.73	<i>GPR132</i>	0.049	<i>P2RY4</i>	0.1
<i>AVPR1A</i>	0.9	<i>GPR137B</i>	0.96	<i>P2RY5</i>	0.14
<i>AVPR1B</i>	0.81	<i>GPR141</i>	0.77	<i>P2RY8</i>	0.1
<i>AVPR2</i>	0.9	<i>GPR146</i>	0.1	<i>PROKR2</i>	0.45
<i>CASR</i>	0.8	<i>GPR15</i>	0.68	<i>RXFP1</i>	0.7
<i>CCR3</i>	0.98	<i>GPR161</i>	0.33	<i>S1PR2</i>	0.6
<i>CELSR1</i>	0.47	<i>GPR183</i>	0.28	<i>SUCNR1</i>	0.81
<i>CELSR2</i>	0.49	<i>GPR21</i>	0.64	<i>TSHR</i>	0.31
<i>CHRM3</i>	0.82	<i>GPRC5B</i>	0.021	<i>UTS2R</i>	0.64
		<i>GRM4</i>	0.16	<i>VIPR1</i>	0.61

61 **Supplemental Table 6.** Overall survival analysis in thyroid carcinoma. All Differentially-
62 expressed GPCR were assessed with Kaplan-Meier plotter. To analyze the prognostic value of
63 GPCR genes, the patient samples are split into two groups according to the median
64 expressions of the biomarker. The two patient cohorts are compared by a Kaplan-Meier
65 survival plot, and log-rank P value are calculated. GPCR genes significantly associated with
66 overall survival were in bold (p<0.05).

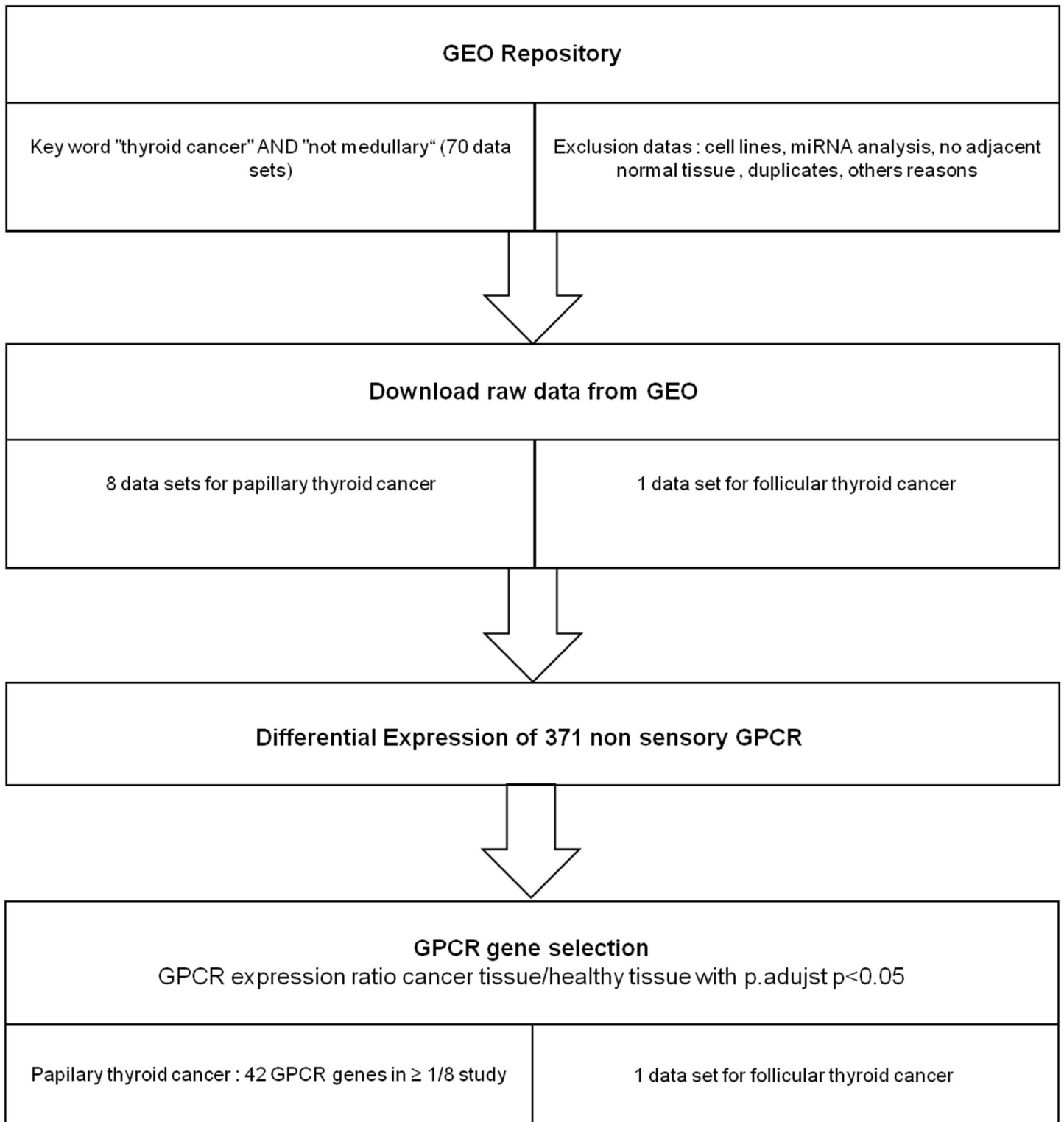
67

	NanoString		TCGA data	
	<i>ADGRL2</i>	<i>TSHR</i>	<i>ADGRL2</i>	<i>TSHR</i>
T stage :	1852±598 vs 536±505	2444±1427 vs 1523±1269	31±18 vs 25±7	250±112 vs 212±100
T 1/ T2 vs T3 /T4	(p=0.0039)	(p=0.3284)	(p<0.0001)	(p=0.0001)
N stage :	758±768 vs 1114±845	1926±1734 vs 1722±1168	29±18 vs 26±16	246±113 vs 217±91
N0 vs N1	(p=0.352)	(p=0.5249)	(p=0.0791)	(p=0.002)
M stage :	1127±616 vs 260±136	2133±1262 vs 692±1062	29±17 vs 19±11	228±103 vs 235±81
M0 vs M1	(p=0.0101)	(p=0.0597)	(p=0.0608)	(p=0.8426)
AJCC stage :	1174±384 vs 320 ±178	2156±1315 vs 926±1058	32±18 vs 24±17	250±116 vs 209±95
I/ II vs III/IV	(p=0.0194)	(p=0.0637)	(p<0.0001)	(p<0.0001)

68 **Supplemental Table 7.** Relationship between *ADGRL2* and *TSHR* mRNA expression and clinicopathological features. Data are expressed in
69 number of counts for Nanostring technologie and in CPM for TCGA data sets. Comparison between groups were tested by Mann Whitney test or
70 t test according data distribution. significant data in bold.

71

72

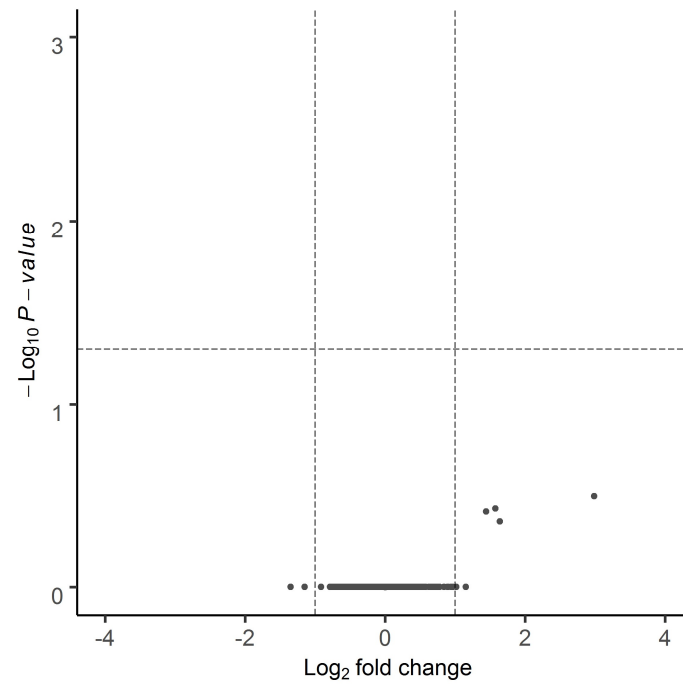


75 **Supplemental Figure 1. G protein-coupled Receptor selection algorithm in GEO**
 76 **bioinformatics analysis.**

77 Suitable datasets were selected with inclusion and exclusion criteria to select a final of nine
78 datasets screening with 371 GPCRs. Abbreviation: GEO = Gene Expression Omnibus; GPCR
79 = G protein-coupled receptor.

80

81



82

83 **Supplemental Figure 2. Volcano plot of DEGs in normal and tumoral samples in the**
84 **follicular thyroid carcinoma samples (GSE111455 dataset).** Each GPCR transcript was
85 represented by a spot. Log₂ fold change (cut-off=±1, vertical lines) was plotted against the
86 -log₁₀ p-value (cut-off= 1.3, horizontal line).

3. Discussion

Malgré les preuves de l'implication des RCPG en cancérologie, seulement 35 RCPG ont été évalués dans le cancer de la thyroïde dans des études précliniques ou translationnelles. Cependant, il existe plus de 800 RCPG dont environ 360 récepteurs avec des ligands endogènes connus. Jusqu'ici, une très faible proportion de récepteurs avait donc été évaluée. En 2019, l'expression des ARNm codant pour des RCPG dans la cohorte TCGA a été évaluée uniquement dans le cancer papillaire de la thyroïde et sans comparaison avec les tissus normaux adjacents (Wu et al., 2019). A notre connaissance, notre travail présenté dans l'article 1 constitue donc la première étude transcriptomique analysant l'expression d'un large panel de RCPGs dans la thyroïde, en particulier dans le cancer de la thyroïde réfractaire à l'iode radioactif avec une comparaison avec les tissus normaux adjacents. Nous avons ainsi montré par ce travail que la technologie NanoString nCounter offre une nouvelle approche pour détecter et quantifier les ARNm des RCPG. Son principal avantage est l'utilisation de tissus de petit volume, inclus en paraffine, un atout majeur en pratique clinique où les tissus congelés sont rares.

3.1. Identification des RCPG avec une expression différentielle

Les analyses des gènes exprimés de manière différentielle, y compris les gènes des RCPG, ont été rapportées pour révéler des cibles diagnostiques, pronostiques ou thérapeutiques. En dehors de notre travail, il existe un nombre très important d'études ayant réalisées des analyses différentielles de gènes, non limitées aux RCPG. Cependant les critères d'inclusion sont très variables en particulier pour la sélection des tissus contrôles (propre patient, tissu normal d'un autre patient avec ou sans appariement).

Nous avons constaté que vingt-quatre RCPG étaient exprimés de manière différentielle dans les cancers de la thyroïde réfractaire de type papillaire et quatre dans les cancers de type folliculaire, respectivement. Les analyses bio-informatiques (données GEO et TCGA) ont confirmé la présence de sept RCPG dans les tumeurs thyroïdiennes de type papillaire : *VIPR1*, *ADORA1*, *GPRC5B*, *P2RY8*, *GABBR2*, *CYSLTR2* et *LPAR5*.

Le récepteur au VIP, *VIPR1* était sous-exprimé dans les cancers thyroïdiens papillaires réfractaires ou non. Jusqu'à maintenant, aucune donnée était disponible dans le cancer de la thyroïde. Dans la cohorte du TCGA, une faible expression de *VIPR1* était associée à une diminution de la survie sans récurrence, comme dans le cancer du poumon (Zhou et al., 2022). Ce récepteur n'est pas la cible de médicaments actuellement sur le marché mais sa surexpression est utilisée pour du ciblage en imagerie ou pour de la nanovectorisation (Moody et al., 2016). Il est exprimé de manière physiologique dans de nombreux tissus (cerveau, poumons, prostate, leucocytes, foie, intestin, cœur...)(Reubi, 2000). Il a également été retrouvé exprimé dans la thyroïde saine, en particulier dans les cellules folliculaires et les vaisseaux (Reubi, 2000). Son ligand, le neuropeptide VIP, est impliqué dans la relaxation des muscles lisses, la sécrétion exocrine et endocrine, et le flux d'eau et d'ions au niveau de épithéliums pulmonaire et intestinal. Il a également été retrouvé sous-exprimé dans l'adénocarcinome pulmonaire et le carcinome hépatocellulaire et agirait comme un gène suppresseur de tumeur (Liu et al.; Zhao et al., 2019; Zhou et al., 2022). Au contraire, il a été retrouvé surexprimé dans d'autres cancers comme le cancer du sein ou de la prostate (Moody et al., 2016).

Le récepteur purinergique *P2RY8* était sous-exprimé dans les cancers thyroïdiens, y compris réfractaires. Ce RCPG n'était pas associé à la survie du cancer de la thyroïde et aucun médicament n'est connu pour cibler ce récepteur. Les données en termes d'expression n'étaient pas connues dans le cancer de la thyroïde mais aussi pour les

autres types de cancer. *P2RY8* est surtout connu comme gène de fusion avec le gène *CRLF2* (*cytokine receptor-like factor 2*) avec un réarrangement du premier exon non codant de *P2RY8* avec la totalité de la région codante de *CRLF2* dans les leucémies lymphoblastiques aiguës et des mutations dans ce gène ont été associées à des cas de lymphome diffus à grandes cellules B (Panzer-Grümayer et al., 2017).

Nous avons montré que le récepteur de l'adénosine *ADORA1* était surexprimé dans les cancers de la thyroïde de type papillaire. Ceci a été retrouvé également dans d'autres cohortes de cancers papillaires dont celles du TCGA (Lin et al., 2021). Nous avons également montré qu'une forte expression d'*ADORA1* était associée, dans la cohorte du TCGA, à une diminution significative de la survie sans récurrence. En condition physiologique, le récepteur A1 de l'adénosine est fortement exprimé dans le cerveau et le cœur. Dans le cerveau, il régule la libération d'autres neurotransmetteurs tels que la dopamine et le glutamate. Il intervient également dans la régulation de la consommation d'oxygène myocardique et du flux sanguin coronaire. Ainsi, l'adénosine, est un traitement utilisé pour la tachycardie supraventriculaire. D'autres agonistes et antagonistes sur le marché ciblent les récepteurs de l'adénosine dont le récepteur A1 (Sriram and Insel, 2018). Il a été retrouvé surexprimé dans différents cancers et son rôle pro-tumoral (prolifération, invasion, migration) a été prouvé *in vitro* et *in vivo*. Ces effets passeraient par la voie PI3K/AKT (Huang et al., 2016; Ni et al., 2020; Pan et al., 2021).

Nous confirmons chez les patients présentant un cancer papillaire de la thyroïde, y compris réfractaire, la surexpression du récepteur de type B au GABBA, *GABBR2*, comme cela a été montré dans les cancers papillaires de la thyroïde post-Chernobyl et dans les variants folliculaires des cancers papillaires (Schulten et al., 2015; Stein et al., 2009). Aucune valeur pronostique n'a été retrouvée dans les cancers thyroïdiens pour *GABBR2*. Peu de composés sont connus pour cibler le récepteur, et seul l'agoniste baclofène est approuvé pour un usage clinique. A l'état physiologique, ce récepteur au neurotransmetteur GABA inhibe l'activité neuronale en régulant la libération des neurotransmetteurs. Comme d'autres récepteurs aux neuropeptides, il a également été retrouvé surexprimé dans d'autres cancers comme le mélanome, le cancer du poumon et du sein (Hozhabri et al., 2022; Xia et al., 2021; Zhang et al., 2013). Une forte expression de *GABBR2* était associée à un moins bon pronostic dans ces cancers.

GPRC5B a été également retrouvé surexprimé dans le cancer de la thyroïde. Ceci n'avait pas été montré jusqu'à maintenant dans la littérature. Ce RCPG n'était pas associé à la survie du cancer de la thyroïde et aucun médicament n'est connu pour cibler ce récepteur. Contrairement au cancer de la thyroïde, il a été montré sous-exprimé dans le cancer colorectal (Huang et al., 2022). Il s'agit d'un récepteur orphelin dont la fonction spécifique physiologique n'est pas connue. Très récemment, il a été suggéré un rôle dans le développement des ganglions lymphatiques (Xu et al., 2022).

Le récepteur au leucotriène *CYSLTR2* (*Cysteinyl leukotriene receptor 2*) était surexprimé dans les cancers papillaires de la thyroïde. Ceci n'avait pas encore décrit dans la littérature. Pour les patients présentant un cancer de la thyroïde, dans notre travail, le niveau d'expression de *CYSLTR2* n'était pas associé à la survie. Il intervient de manière physiologique dans les réactions allergiques et d'hypersensibilité chez l'homme. Ainsi de manière intéressante, des traitements antiallergiques ciblent ce récepteur en pratique clinique. Il a déjà montré un rôle important dans l'angiogenèse tumorale. De plus, l'administration d'un antagoniste spécifique de *CYSLTR2* a montré une efficacité antitumorale dans le cancer du poumon (Duah et al., 2019). Il est également fréquemment muté dans le mélanome uvéal.

Enfin, nous confirmons le rôle de *LPAR5* dans le cancer de la thyroïde. Comme évoqué dans l'introduction de cette partie de mon travail de thèse, il s'agit du récepteur de la famille LPAR le plus étudié dans le cancer de la thyroïde. De nombreuses études bio-informatiques ont montré qu'il était surexprimé au sein des cancers thyroïdiens et qu'une forte expression était associée à une moins bonne survie globale (Liu et al., 2019a; Tang et al., 2018; Wu et al., 2020). Son rôle dans le cancer de la thyroïde a été prouvé *in vitro* et passerait par une activation de la voie PI3K/AKT (Wu et al., 2020). Malgré son rôle intéressant, aucun médicament approuvé ne cible ce récepteur. Il est également impliqué dans d'autres cancers (ovaire, sein, poumon, colon, pancréas, mélanome...)(Balijepalli et al., 2021).

Devant un nombre limité de récepteurs communs à l'ensemble des populations étudiées, nous avons choisi d'élargir le panel en conservant l'ensemble des RCPG exprimés de manière différentielle dans la cohorte de patients réfractaires ou dans les données GEO, sans distinction du type histologique. Ainsi, nous avons confirmé l'implication d'autres RCPG dans le cancer de la thyroïde, confirmant la robustesse des résultats. Les données concernant *TSHR*, *ADGRE5/CD97*, *S1PR2* et les récepteurs aux chimiokines *CCR3* et *ACKR3/CXCR7* ont déjà été présentées dans l'introduction de ce travail. Les quelques données disponibles concernant les autres récepteurs sont présentées dans le Tableau 15. En revanche, pour deux récepteurs, les résultats étaient contradictoires avec les données de la littérature (*LPAR1/EDG2*, *RXFP1/LGR7*). Ainsi, nous avons identifié près de 35 nouveaux récepteurs, jusqu'alors non décrits dans le cancer de la thyroïde.

Récepteur couplé aux protéines G	Résultats dans l'article	Données existantes
Récepteur d'adhésion <i>ADGRF1/GPR110</i>	Surexpression dans les cancers papillaires dans 2 séries GEO	Surexpression dans les cancers folliculaires et les cancer anaplasiques, biomarqueurs diagnostiques (Espinal-Enríquez et al., 2015).
Récepteur d'adhésion <i>ADGRG1/GPR56</i>	Surexpression dans les cancers papillaires dans 2 séries GEO	Forte expression dans les thyrocytes normaux ; Expression conservée dans les cancers folliculaires et papillaires (Kaiser et al., 2021).
Récepteur de l'adénosine <i>ADORA3</i>	Surexpression dans les cancers papillaires dans 1 série GEO	Surexpression sur d'autres échantillons y compris au niveau protéique par immunohistochimie, inhibition de la croissance cellulaire mais de manière indépendante de l'activation du récepteur (Morello et al., 2008).
Récepteur de type 1 à l'angiotensine 2, <i>AGTR1</i>	Sous expression dans une série GEO de cancer papillaire et dans la cohorte du TCGA	Données du TCGA déjà publiées dans de précédents travaux (Jiang et al., 2020; Lin et al., 2019), Surexpression dans cancer folliculaire en comparaison aux adénomes bénins (Poma et al., 2017)
Récepteur de la vasopressine, <i>AVPR1A</i>	Sous-expression dans 3 séries GEO de cancers papillaires ainsi que dans la cohorte du TCGA	Surexpression dans cancers thyroïdiens sans distinction du type histologique (Shen et al., 2020).
Récepteur aux cannabinoïdes de type 1, <i>CNR1</i>	Surexpression dans une série GEO	Expression protéique dans 60 % des cancers et absence au niveau du tissu normal adjacent, absence d'association avec des facteurs pronostiques ou à la survie (Lakiotaki et al., 2015) ; effet cytotoxique <i>in vitro</i> d'un métabolite d'un endocannabinoïde <i>via</i> le récepteur CB1 (Cozzolino et al., 2010).

Récepteur couplé aux protéines G	Résultats dans l'article	Données existantes
Récepteur de la FSH, <i>FSHR</i>	Surexpression dans une série GEO	Absence d'expression protéique au niveau des cellules thyroïdiennes normales et expression ectopique retrouvée dans des échantillons de cancers papillaires, folliculaires et anaplasique (cellules tumorales et cellules endothéliales) (Pawlikowski et al., 2015).
<i>F2RL1/PAR2</i>	Surexpression dans les cancers réfractaires de type papillaire	Surexpression dans cancers thyroïdiens papillaires, peu différenciés et anaplasiques (Di Maro et al., 2014)
Récepteur aux kisspeptines <i>KISS1R/GPR54</i>	Surexpression dans les cancers papillaires réfractaires	Expression dans des cancers papillaires, non retrouvé dans du tissu thyroïdien sain et peu fréquemment exprimé dans les cancers folliculaires (Ringel et al., 2002).
Récepteur au NPY, <i>NPY1R</i>	Sous-expression dans les cancers réfractaires de type papillaires et cohorte du TCGA	Diminution d'expression dans le tissu tumoral en comparaison au tissu sain (Liu et al., 2019a).
Récepteur de l'acide lysophosphatidique, <i>LPAR1/EDG2</i>	Sous-expression dans 4/8 des séries GEO	pas de modification entre le tissu sain et le tissu tumoral (papillaire ou folliculaire) (Schulte et al., 2001)
Récepteur de la relaxine, <i>RXFP1/LGR7</i>	Sous-expression dans une seule série GEO	Expression protéique dans près de 70 % des cancers (Hernandez et al., 2021; Hombach-Klonisch et al., 2006) ; rôle dans la prolifération, l'invasion et la migration <i>in vitro</i> en présence de son ligand, la relaxine (Hombach-Klonisch et al., 2006).

Tableau 15 : Données des RCPG exprimés de manière différentielle dans notre travail et retrouvés dans la littérature.

Ce premier atlas humain de l'expression des RCPG dans le cancer de la thyroïde ouvre donc de multiples possibilités en pratique. Ces RCPG pourraient servir en particulier de marqueurs pronostiques ou être la cible de traitements.

3.2. Facteurs pronostiques

Des analyses de survie sans progression et de survie globale ont été réalisées. En effet, ces RCPG pourraient servir de biomarqueurs pronostiques. Cependant, dans la cohorte de patients réfractaires, le niveau d'expression de ces RCPG n'a pas montré d'impact sur la survie, probablement par manque de puissance statistique (n=17 patients). En revanche, les analyses de survie dans la cohorte du TCGA a confirmé le rôle pronostique de certains RCPG comme *LPAR5*, *AGTR1*, *ADORA1* et *AVPR1A*. En effet, une forte expression du récepteur de l'adénosine *ADORA1* avait été associée à la présence de métastases ganglionnaires, un stade tumoral avancé et une diminution de la survie spécifique (Lin et al., 2021). De même une sous-expression du récepteur de type 1 à l'angiotensine 2, *AGTR1*, était associée à une moins bonne survie sans récurrence (Jiang et al., 2020; Lin et al., 2019). Enfin, une sous-expression du récepteur de la vasopressine *AVPR1A* était associée à une moins bonne survie sans récurrence (Shen et al., 2020). Ces analyses de survie ont mis en évidence de nouveaux RCPG associés à la survie sans progression et/ou globale dans le cancer de la thyroïde.

Au-delà de l'analyse de survie sans progression, il était également intéressant de corréler les données cliniques et pathologiques (T, N, M, Stade, extension extra-thyroïdienne, extra-ganglionnaire, invasion vasculaire) avec l'expression des gènes candidats puisqu'ils ont également un impact sur le risque de récurrence et de progression. Lorsque nous avons corrélé leur expression avec le stade TNM et AJCC, seul *TSHR* était associé au stade T, N et AJCC et le récepteur d'adhésion *ADGRL2* était associé au stade T et AJCC dans la cohorte du TCGA. L'extension extra-thyroïdienne et extra-ganglionnaire ainsi que l'invasion vasculaire n'étaient pas disponibles dans la cohorte TCGA. La question de l'impact de ces RCPG sur le pronostic est particulièrement importante dans la sous-population de cancer thyroïdien réfractaire. Ainsi, bien que des gènes spécifiques n'aient pas été associés à la survie chez les 17 patients atteints de cancers de la thyroïde réfractaires, nous avons également corrélé ces gènes avec les données histopathologiques. De manière intéressante, *TSHR* et *ADGRL2* étaient également associés aux stades T, M et AJCC. Aucun RCPG n'a été associé à l'extension extra-thyroïdienne et extra-ganglionnaire, ou l'invasion vasculaire dans cette population.

3.3. Ciblage thérapeutique spécifique

Ces récepteurs pourraient également être utilisés comme cibles thérapeutiques. Les RCPG étant ciblés par près d'un tiers des médicaments sur le marché, plutôt que la conception de nouvelles molécules, la possibilité d'effectuer du repositionnement de médicaments a donc été étudiée. Parmi les 134 RCPG connus pour être la cible de médicaments approuvés, 22 faisaient partie des RCPG exprimés de manière différentielle dans la cohorte de patients réfractaires et/ou dans les données issues des analyses bio-informatiques. Pour ces récepteurs, au total, 455 molécules ciblaient ces récepteurs (1 à 139 molécules par récepteur). Pour certaines de ces molécules, elles ciblaient une famille de récepteur (ex *FTY720*/Fingolimod qui cible l'ensemble des récepteurs aux sphingosines S1PR1-5) voire plusieurs familles de récepteurs (ex : Vilazodone qui cible le récepteur à l'histamine HRH1 mais aussi le récepteur dopaminergique D2R et les récepteurs à l'histamine). Les récepteurs de l'histamine,

de la sérotonine et les récepteurs adrénérgiques étaient les RCPG les plus fréquemment ciblés, en termes de nombre de médicaments disponibles. Parmi les cibles identifiées, certaines ont déjà été étudiées dans d'autres cancers en phase pré-clinique voir clinique (De Clercq, 2019; Rosanò and Bagnato, 2016).

Nous avons également souhaité connaître le profil d'expression de ces récepteurs au-delà de la thyroïde. En effet, afin d'obtenir le ciblage le plus prometteur, c'est-à-dire à la fois efficace et sûr, il serait intéressant de ne sélectionner que des récepteurs faiblement exprimés dans les tissus sains et fortement exprimés dans les tissus tumoraux. L'exemple typique était bien sûr le récepteur de la TSH, exprimé quasi-exclusivement au niveau de la thyroïde. Un autre exemple intéressant était le récepteur de la sérotonine, surexprimé dans les cancers réfractaires et présentant une très faible expression globale dans les tissus sains.

Enfin, de manière intéressante, dans notre travail, la quasi-totalité des RCPG sur ou sous-exprimés dans les cancers réfractaires semblaient être significativement corrélés avec l'état de différenciation thyroïdienne. Les récepteurs surexprimés étaient corrélés négativement avec les marqueurs de différenciation (plus les RCPG étaient exprimés, plus la tumeur était dédifférenciée) et inversement avec les RCPG sous-exprimés. Pour les RCPG retrouvés uniquement dans les données GEO, le récepteur *ADGRG1* a montré précédemment une perte d'expression avec la dédifférenciation des tumeurs avec la quasi-disparition du récepteur dans les cancers anaplasiques et un maintien dans les cancers papillaires et folliculaires (Kaiser et al., 2021). Ainsi, ces récepteurs pourraient faire partie des cibles candidates dans les stratégies de re différenciation.

En conclusion, ce travail a présenté toutes les données disponibles à ce jour concernant les RCPG dans les cancers non médullaires de la thyroïde. Ces résultats pourraient aider à identifier de nouvelles voies potentielles à cibler, éventuellement avec des médicaments approuvés, après avoir prouvé l'impact tumoral dans des modèles précliniques. Un criblage des RCPG cliniquement pertinents avec des médicaments approuvés serait alors un outil intéressant pour l'évaluation de ces molécules dans les cancers thyroïdiens en particulier réfractaires à l'iode radioactif.

Partie II : Criblage pharmacologique des molécules ciblant les récepteurs couplés aux protéines G dans le cancer thyroïdien réfractaire à l'iode radioactif

1. Introduction

1.1. Médecine personnalisée

L'utilisation de tests à haut débit et générant un nombre important de données a révélé une grande variation interindividuelle en ce qui concerne les effets, les mécanismes et les facteurs qui contribuent aux processus pathologiques. Cela a soulevé des questions quant à la prise en compte de cette hétérogénéité dans la prise en charge d'un individu. Ceci suggère que les stratégies de traitement, de surveillance ou de prévention d'une maladie, devraient être adaptées ou "personnalisées" au profil biochimique, physiologique unique de cet individu. La médecine de précision, également appelée médecine personnalisée, vise donc à proposer au patient un traitement adapté aux caractéristiques de sa maladie.

On sait ainsi aujourd'hui qu'il n'existe pas un type de cancer par organe mais en réalité une multitude de sous-types de cancers caractérisés chacun par des anomalies particulières (mutation, profil d'expression, épigénétique...). En parallèle, on assiste ces dernières années à des évolutions technologiques majeures qui conduisent au développement d'outils d'analyse de l'ADN de plus en plus performants et rapides. Il devient alors possible d'obtenir le profil de plus en plus complet de chaque tumeur. Cette meilleure connaissance sur les mécanismes de développement des cancers permet ainsi de mettre en place de nouveaux traitements ciblant spécifiquement les anomalies observées (Maillard et al., 2022; Pauli et al., 2017).

La médecine personnalisée fait aujourd'hui partie de la prise en charge de certains cancers en routine. Elle ne remplace pas les traitements déjà en place mais vient compléter l'arsenal thérapeutique possible et offre ainsi de nouvelles possibilités thérapeutiques. L'exemple souvent cité dans la médecine personnalisée est l'imatinib. L'imatinib est utilisé pour traiter la leucémie myéloïde chronique (LMC) et a bouleversé son pronostic (Hochhaus et al., 2017). L'imatinib inhibe la protéine de fusion appelée BCR-ABL, correspondant à la fusion de deux régions génomiques, l'une englobant le proto-oncogène d'Abelson (abl) et l'autre la région de BCR (*Break Cluster Region*). Cette fusion de gènes se produit dans 95% des LMC et contribue à son développement. Par conséquent, l'imatinib n'est administré qu'aux patients atteints de LMC présentant cet événement de fusion. Un autre exemple est le trastuzumab, un anticorps anti-HER2, prescrit uniquement chez les patientes présentant un cancer du sein avec surexpression de HER2 (Slamon et al., 2001). En ce qui concerne le cancer de la thyroïde, certains traitements sont également réservés à des sous-populations de patients présentant des anomalies moléculaires précises (anti-RET, anti-NTRK...) (Doebele et al., 2020; Drilon et al., 2018; Wirth et al., 2020).

A l'heure actuelle, la médecine personnalisée ne concerne pas tous les types de cancer. Les traitements proposés dépendent des avancées de la recherche et de l'identification d'un certain nombre d'anomalies moléculaires. Même lorsque des altérations génomiques ciblables sont découvertes, les patients ne répondent pas toujours au traitement. Des stratégies permettant de confirmer l'efficacité thérapeutique ou d'identifier des options supplémentaires sont donc nécessaires. Pour répondre à ce besoin, les criblages pharmacologiques à haut débit de panels de lignées cellulaires ont permis d'évaluer la sensibilité des médicaments dans les cellules cancéreuses afin d'identifier les mécanismes d'inhibition de la croissance et de mort des cellules tumorales (Barretina et al., 2012; Shoemaker, 2006). Malheureusement, pour de nombreux types de cancer, les méthodologies traditionnelles de culture cellulaire ne permettent pas de modéliser correctement la biologie de la tumeur native. La précision des criblages pharmacologiques *in vitro* dépend donc de l'optimisation des modèles de culture

cellulaire qui doivent refléter le plus fidèlement possible la maladie du patient. Les nouvelles approches de médecine personnalisée comprennent l'utilisation de cellules et d'organoïdes dérivés de patients pour évaluer des médicaments dans les échantillons de tumeurs (Pauli et al., 2017).

1.2. Modèles cellulaires utilisés

1.2.1. Lignées cellulaires

Nous avons fait le choix dans un premier temps de travailler sur différentes lignées cellulaires dérivées de cancers de la thyroïde humains (BCPAP, NPA, XTC, ARO, FTC-133, TPC-1). La caractérisation de ces lignées thyroïdiennes a déjà permis d'établir le profil mutationnel (gènes de fusion, mutations) et l'état de différenciation thyroïdienne (Landa et al., 2019). Nous avons ainsi pu valider notre modèle. D'une part, ces lignées présentent des profils mutationnels similaires à ceux des patients atteints d'un cancer de la thyroïde réfractaire à l'iode radioactif et influençant la sensibilité aux ITK (réarrangement *RET/PTC* pour TPC-1, mutation *BRAF^{V600E}* pour BCPAP...) (Landa et al., 2019). D'autre part, elles présentaient une faible expression des marqueurs de différenciation thyroïdienne (NIS, TSH-R, TPO, TG...). De plus, l'absorption d'iode était absente ou fortement réduite dans ces lignées cellulaires pouvant ainsi les considérer comme réfractaires à l'iode radioactif (Plantinga et al., 2014). Les principales caractéristiques des lignées utilisées sont présentées dans le Tableau 16 et seront détaillées dans l'article (Tableau supplémentaire 2).

Lignées cellulaires	FTC-133	XTC	NPA	TPC-1	BCPAP	ARO
Types histologique	CFT	Oncocytaire	CPT	CPT	CPDT	CAT
Mutations/ Fusion de gène	WT	WT		<i>RET/PTC1</i>	<i>BRAF^{V600E}</i>	<i>BRAF^{V600E}</i>

Tableau 16 : Principales caractéristiques des lignées cellulaires dérivées de cancer thyroïdien humain utilisées dans ce travail.

Abréviations : CFT : cancer folliculaire de la thyroïde ; CPT : cancer papillaire de la thyroïde ; CPDT : cancer peu différencié de la thyroïde ; CAT : cancer anaplasique de la thyroïde ; WT : *wild type* (absence de mutation pour BRAF ou de réarrangement pour RET/PTC)

1.2.2. Prélèvement *ex vivo*

Ce modèle des lignées dérivées de cancer n'est pas forcément le reflet de la réponse clinique. Il est donc nécessaire de développer de nouveaux modèles adaptés, afin de tester des traitements personnalisés. Cependant, les xéno greffes ou les cultures primaires de cellules thyroïdiennes à partir de tumeurs solides ne sont toujours au point dans le cancer la thyroïde (taux d'échec important, coût élevé, longue durée d'obtention). J'ai pu également, au cours de ma thèse, mettre en culture un épanchement d'ascite métastatique issu d'un cancer thyroïdien pour évaluer la sensibilité à des médicaments. Le prélèvement provenait d'un patient de 75 ans présentant un cancer papillaire de la thyroïde muté *BRAF^{V600E}*, diagnostiqué en 2002 au stade métastatique (T3N1M1) et considéré comme réfractaire un an plus tard. Du fait de l'évolution tumorale, un traitement systémique par lenvatinib puis

cabozantinib ont été initiés à partir de 2018. Le patient a finalement échappé au traitement en août 2020 et a développé une ascite tumorale. Le liquide d'ascite excédentaire a pu être récupéré, préparé, et les cellules ont pu être mises en culture. Aucun tri cellulaire a été nécessaire, ni l'ajout de composés spécifiques au sein du milieu de culture. Nous avons pu maintenir les cellules pendant près de 10 passages en culture primaire, avec une expansion cellulaire permettant un criblage pharmacologique en format 384 puits après 15 jours de culture.

1.3. Etudes de combinaisons de traitements

À ce jour, les effets antitumoraux à long terme des ITK sont rares. Avec de multiples gènes et voies de signalisation altérés, les tumeurs peuvent bloquer l'effet d'un médicament et échapper au traitement en contournant la voie inhibée par ce médicament. Les interactions fonctionnelles, *cross-talk*, entre les RCPG et les RTK, cibles des ITK, pourraient contribuer au rôle des RCPG dans la croissance tumorale mais aussi dans la résistance au traitement par ITK (Köse, 2017). Par conséquent, l'action simultanée sur plusieurs voies des cellules tumorales pourrait aboutir à des thérapies plus efficaces.

1.3.1. Méthodologie

a) Généralités

Il existe plusieurs approches possibles pour combiner les médicaments afin d'augmenter l'efficacité et/ou lever une résistance. On pourrait simplifier ces approches en séparant des combinaisons dites « verticales » (blocage du récepteur et de ses effecteurs d'aval) et des combinaisons dites « horizontales » (blocage de plusieurs voies en parallèle) (Al-Lazikani et al., 2012).

Pour faciliter la découverte de combinaisons de médicaments, les études précliniques s'appuient souvent sur le criblage de combinaisons de médicaments dans des modèles de lignées cellulaires cancéreuses pour sélectionner les combinaisons les plus prometteuses en vue d'une recherche expérimentale plus poussée. Il est donc essentiel de bien évaluer et de hiérarchiser les meilleures combinaisons possibles. Deux propriétés importantes d'une combinaison de médicaments doivent être évaluées : la synergie et la sensibilité.

La synergie d'une combinaison de médicaments est le degré d'interactions médicamenteuses qui contribue à la sensibilité de la combinaison de médicaments, indépendamment des effets de chaque médicament. Les combinaisons de médicaments sont ainsi analysées pour détecter des interactions de type synergiques ou antagonistes. En l'absence d'interaction, l'effet est dit additif. Plusieurs méthodes mathématiques ont été proposées pour évaluer la synergie entre les molécules. Schématiquement, ils calculent l'écart entre la réponse "observée" et la réponse "attendue". Toutes ces méthodes sont basées sur un modèle d'additivité, c'est-à-dire d'absence d'interaction (l'effet « observé » correspond à l'effet « attendu »). Les trois principaux modèles utilisés sont les suivants : le HSA (*highest single agent*), le modèle d'additivité de Loewe et le score d'indépendance de Bliss (Vlot et al., 2019). Une approche plus récente, le ZIP (*zero interaction potency*), a été proposée combinant les modèles de Bliss et Loewe (Yadav et al., 2015). Ces modèles diffèrent selon la définition de l'absence d'interaction et sont résumés dans le Tableau 17.

Modèle du <i>Highest Single Agent</i>	Absence d'interaction si $E(a + b)_{\text{observé}} = \max(E(a), E(b))$ Synergie si $E(a + b)_{\text{observé}} > \max(E(a), E(b))$ Antagonisme si $E(a + b)_{\text{observé}} < \max(E(a), E(b))$
Modèle d'indépendance de Bliss	Absence d'interaction si $E(a + b) = E(a) + E(b) - E(a) \times E(b) = E(a + b)_{\text{attendu}}$ Index de combinaison = $E(a + b)_{\text{attendu}} / E(a + b)_{\text{observé}}$ Additivité si IC= 1 ; Synergie si IC<1, Antagonisme si index IC> 1
Modèle d'additivité de Loewe	$E(a+b)_{\text{attendu}} = E(a+a_b) = E(b+b_a)$ Index de combinaison = $a/(a+a_b) + b/(b+b_a)$ Additivité si IC= 1 ; Synergie si IC<1, Antagonisme si index IC> 1

Tableau 17 : Modèles utilisés pour déterminer une éventuelle synergie pour une combinaison de traitements.

Combinaison de traitements E(a) et E(b) correspondent à l'effet observé (E) après administration du médicament A ou B aux concentrations a ou b respectivement.

b) Highest single agent (HSA)

Le modèle HSA est l'un des modèles les plus simples. Dans le HSA, l'absence d'interaction est définie par un effet attendu de la combinaison de traitements égal à l'effet maximum en monothérapie d'un des médicaments présents dans la combinaison traitée à concentration équivalente (Berenbaum, 1989). Ainsi, une combinaison de médicaments sera considérée comme synergique si l'effet de la combinaison des deux molécules à une concentration donnée est plus important que l'effet de la molécule seule la plus efficace à cette même concentration.

c) Modèle de Bliss

Dans le modèle de Bliss, on suppose que les médicaments n'interagissent pas entre eux et qu'ils obtiennent leurs réponses de manière indépendante (Bliss, 1956). L'effet observé de chaque molécule prise séparément est exprimé en fonction de l'effet maximal obtenu de la combinaison. L'effet attendu de la combinaison va être calculé sur la base de la probabilité d'événements indépendants des deux molécules.

d) Modèle de Loewe

Le modèle de Loewe suppose que les médicaments ont des modes d'action similaires sur la même voie. Il repose sur deux principes, le principe d'équivalence des concentrations et le principe de « fausse » combinaison (Loewe, 1953). Le principe d'équivalence repose sur le fait que pour tout effet produit par une concentration a du médicament A il existe une concentration b_a de la molécule B qui produira le même effet. Le principe de « fausse » combinaison consiste à dire que l'on peut produire l'effet de la combinaison en combinant l'une des deux molécules avec elle-même.

Afin d'établir ce calcul de synergie, différents plans expérimentaux peuvent être utilisés. L'approche la plus simple pour estimer la synergie consiste à tester trois conditions de traitement à des concentrations uniques : le médicament A en monothérapie, le médicament B en monothérapie et la combinaison des médicaments A et B. Même si cette approche est simple, elle nécessite de connaître la concentration minimale inhibitrice des deux

médicaments en monothérapie afin d'éviter une cytotoxicité non spécifique en cas de concentration utilisée trop importante, ou au contraire une absence de réponse en cas de concentration trop faible. Ainsi, cette approche n'est pas adaptée pour des médicaments « expérimentaux », pour lesquels ces caractéristiques ne sont pas connues. La deuxième approche vise à tester un médicament approuvé à une dose validée fixe avec une gamme de concentration d'une deuxième molécule à tester. Ceci peut être utile pour la conception d'essais cliniques, où l'on compare le médicament de référence en combinaison avec une nouvelle molécule. Cependant, l'approche *in vitro* la plus complète et aujourd'hui la plus utilisée, consiste à évaluer des combinaisons de médicaments avec un nombre important de molécules en les testant selon des matrices de concentration-réponses. Ceci nécessite de nouveaux outils d'analyses mathématiques et de représentations graphiques, en utilisant les différents modèles décrits précédemment (HSA, ZIP, Loewe et Bliss) (Ianevski et al., 2017; Vlot et al., 2019). Cependant, chacun de ses modèles présentent des limites et des différences peuvent être observées entre ces scores pour une même combinaison de molécules (Vlot et al., 2019). Il est donc conseillé d'appliquer tous les modèles et de sélectionner une combinaison de médicaments qui peut montrer un score de synergie suffisant, quel que soit le modèle choisi. Cependant, une forte synergie dans une combinaison de médicaments n'est pas suffisante et l'analyse de la combinaison doit prendre en compte la réponse biologique associée, ou sensibilité.

La sensibilité d'une combinaison de médicaments est définie comme le niveau de réponse au traitement, mesuré en pourcentage d'inhibition de la viabilité cellulaire. Plusieurs seuils ont été proposés pour considérer un traitement comme efficace (% d'inhibition de croissance cellulaire $\geq 50\%$, $\geq 75\%$, $> 80\%$...) (Held et al., 2013; Shen et al., 2019). Cette sensibilité des médicaments peut être directement dérivée des courbes concentration-réponse ou faire l'objet de calculs plus complexes (Malyutina et al., 2019; Szwajda et al., 2015).

1.3.2. Validation d'une méthode de criblage pharmacologique

La première partie de ce travail a montré, via l'analyse transcriptomique par Nanostring nCounter et les analyses bio-informatiques des bases de données GEO et TCGA, que 7 RCPG étaient exprimés de manière différentielle dans les cancers de la thyroïde réfractaire ou non. Seulement 3 d'entre eux, ADORA1, CYSLTR2 et GABBR2, étaient la cible de médicaments approuvés. Ainsi, afin de ne pas restreindre notre criblage pharmacologique à trois cibles, nous avons décidé de reprendre l'ensemble des 71 RCPG exprimés de manière différentielle entre le tissu sain et tumoral (cancer papillaires et/ou folliculaires, données GEO et/ou NanoString). Afin de sélectionner les récepteurs d'intérêt, j'ai collecté des informations à partir de deux bases de données pharmacologiques en ligne, ChEMBL et DrugBank, sur les médicaments approuvés ciblant ces RCPG exprimés de manière différentielle. Au total, 25 récepteurs étaient ciblés par des médicaments approuvés, agonistes et/ou antagonistes (Tableau 18).

GPCR surexprimés	Nombre de médicaments approuvés	GPCR sous exprimés	Nombre de médicaments approuvés
ADORA1	16	CXCR7	1
ADORA3	10	AGTR1	19
CASR	7	AVPR1A	11
CNR1	7	AVPR1B	7
CYSLTR2	3	AVPR2	12
EDG5/S1PR2	1	CHRM3	100
GABBR2	3	GLP2R	2
EDNRA	4	HTR7	40
EDNRB	6	PTH1R	3
F2R	3	TSHR	3
FSHR	8		
HRH1	139		
HRH4	9		
HTR1D	48		
P2RY6	1		

Tableau 18 : Nombre de médicaments approuvés ciblant les RCPG identifiés dans deux pharmacologiques parmi les RCPG exprimés de manière différentielle entre le tissu sain et le tissu tumoral.

Nous avons choisi de tester une combinaison de ces molécules ciblant les RCPG avec deux ITK. Le premier est le lenvatinib, un ITK ayant l'AMM dans le cancer de la thyroïde. Nous avons également évalué les combinaisons de traitements avec le selumetinib, un anti-MEK, une thérapie plus ciblée, située plus en aval dans les voies de signalisation et ayant montré des effets sur la re-différenciation thyroïdienne au-delà d'un effet antitumoral (Ho et al., 2013).

L'approche choisie pour évaluer les médicaments ciblés par les RCPG est un criblage pharmacologique quantitatif à haut débit. Il s'agit d'une stratégie récente en oncologie, notamment dans le cancer de la thyroïde, visant à identifier de nouvelles indications pour des médicaments déjà approuvés (Zhang et al., 2012). Cette technologie est basée sur un dépistage automatisé en plaque 384 puits utilisant la technologie CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Madison, WI), un test recommandé pour évaluer la mort cellulaire dans une stratégie de criblage en haut débit, du fait de sa grande sensibilité (Kepp et al., 2011). Ce kit est utilisé pour déterminer les niveaux d'ATP cellulaire et évaluer la viabilité des cellules. La modification du contenu intracellulaire en ATP indique le nombre de cellules métaboliquement compétentes après traitement. Ce dépistage automatisé a été utilisé dans les hémopathies malignes réfractaires (Snijder et al., 2017). En collaboration avec le laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie du CHU d'Angers, j'ai pu mettre au point et valider le protocole automatisé d'évaluation du profil de chimio sensibilité des cellules tumorales sur différentes lignées cellulaires adhérentes de cancers thyroïdiens pour des tests de mono-exposition ou de combinaison. La Figure 19 résume les grandes étapes du protocole. Afin de valider le modèle, des ITK connus pour agir sur ces lignées ont été évalués (Figure 20).

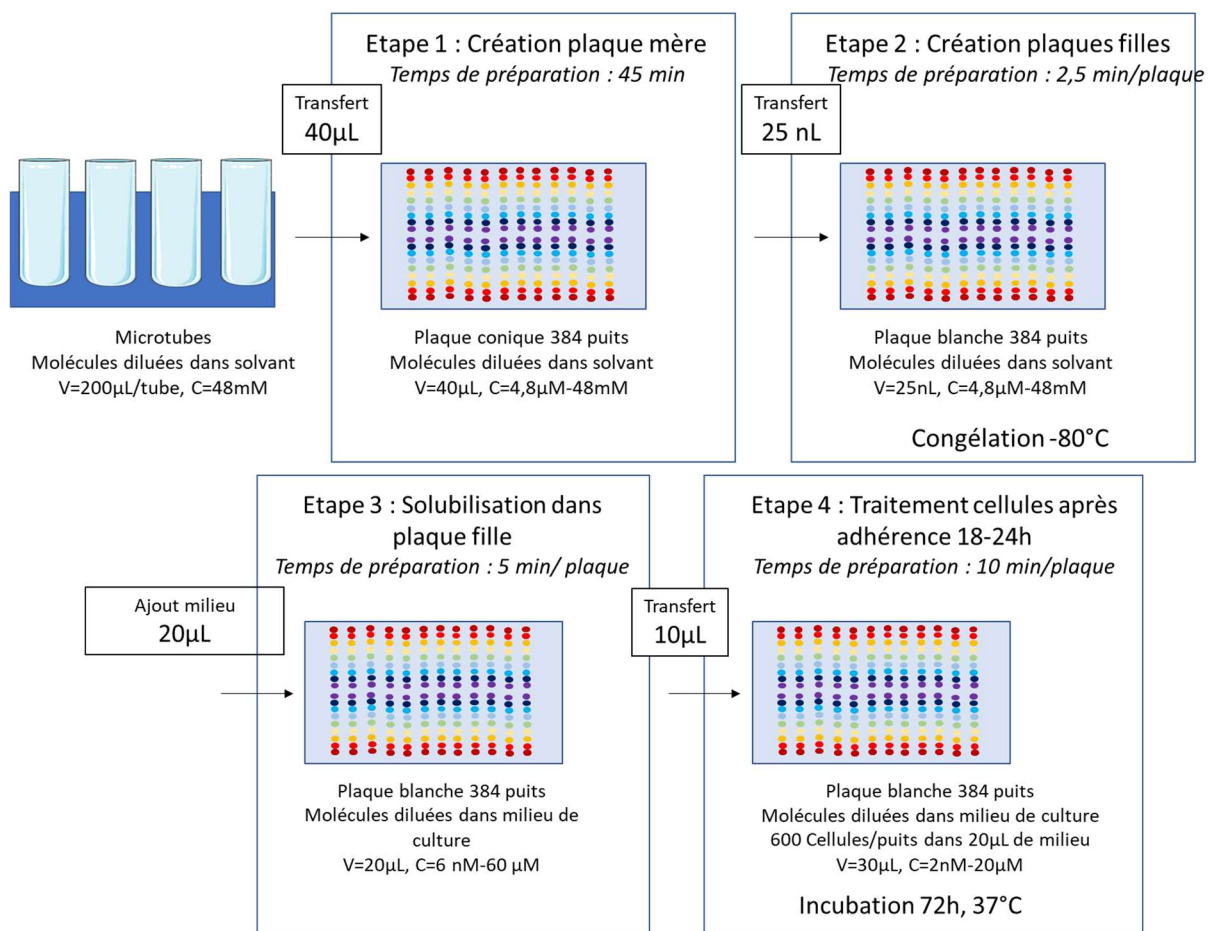


Figure 19 : Plan général de préparation automatisée des microplaques pour un criblage pharmacologique en format 384 puits.

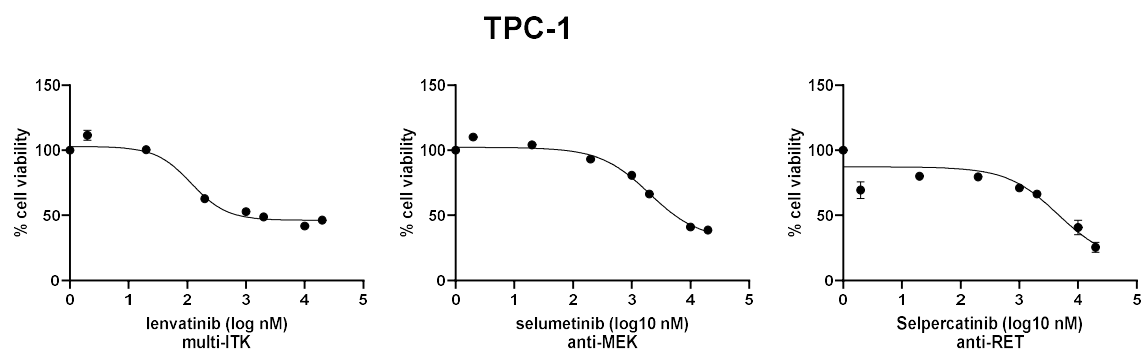


Figure 20 : Exemples de courbes dose-réponse obtenus avec l'approche utilisée.

Lignée thyroïdienne TPC-1, dérivée d'un cancer papillaire de la thyroïde, présentant un réarrangement RET/PTC.

La mesure de la viabilité cellulaire a été quantifiée avec du CelltiterGlo®, Promega.

1.4. Objectifs

L'objectif principal de cette deuxième partie de thèse était d'évaluer notre hypothèse de ciblage pharmacologique des RCPG dans les cancers thyroïdiens réfractaires à l'iode radioactif. Pour répondre à cette question, nous avons choisi d'évaluer tout d'abord la réponse de ces molécules dans un modèle *in vitro*. Au sein des lignées thyroïdiennes du laboratoire (BCPAP, NPA, XTC, ARO, FTC-133, TPC-1), nous avons ciblé 10 RCPG d'intérêt exprimés au sein de ces lignées (ADORA1, CHRM3, CXCR7, EDNRB, F2R, GABBR2, HRH1, HTR7, P2RY6, S1PR2). Nous avons testé l'effet cytotoxique d'un panel de médicaments agissant comme agonistes ou antagonistes de ces RCPG. Chaque molécule a été évaluée en termes de viabilité cellulaire selon une gamme de concentrations croissantes. Les molécules d'intérêt ont ensuite mieux été caractérisées sur le plan de la prolifération, la migration et l'invasion. Enfin, des combinaisons de traitements avec des thérapies ciblées actuellement utilisées en pratique clinique dans le cancer thyroïdien (ITK), lenvatinib et selumetinib, ont été réalisées. L'article issu de ce travail est en cours de préparation.

2. Article 2

G Protein-coupled Receptors in human thyroid carcinoma: drug repurposing to potentialize tyrosine kinase inhibitor treatment

Valentine Suteau, Mathilde Munier, Sarah Ghamrawi, Marie Briet, Philippe Guardiola, Diane Lambert, Patrice Rodien, Claire Briet

(en préparation pour soumission dans *British Journal of Pharmacology*)

G Protein–coupled Receptors in human thyroid carcinoma: drug repurposing to potentialize tyrosine kinase inhibitor treatment

Valentine Suteau^{1,2}, Mathilde Munier^{1,2,3}, Sarah Ghamrawi⁴, Marie Briet^{2,4}, Philippe Guardiola⁵, Diane Lambert⁵, Patrice Rodien^{1,2,3} and Claire Briet^{1,2,3}

Authors and affiliations

1 Département d'Endocrinologie-Diabétologie Nutrition, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) d'Angers, 49933 Angers, France; (valentine.suteau@chu-angers.fr, VS; mathilde.munier@univ-angers.fr, MM, PaRodien@chu-angers.fr, PR; claire.briet@chu-angers.fr, CB))

2 Laboratoire MITOVASC, UMR CNRS 6015, INSERM 1083, Université d'Angers, 49100 Angers, France; (VS; MM; marie.briet@chu-angers.fr, MB; PR; CB)

3 Centre de Référence des Maladies Rares de la Thyroïde et des Récepteurs Hormonaux, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) d'Angers, 49933 Angers, France (MM; PR; CB)

4 Service de Pharmacologie-Toxicologie, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) d'Angers, 49933 Angers, (sarah.elali@chu-angers.fr, SG, MB)

5 Service de Génomique Onco-Hématologique, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) d'Angers, 49933 Angers, (PhGuardiola@chu-angers.fr, PG; diane.lambert@chu-angers.fr, DL)

Corresponding author

Valentine SUTEAU
Département d'Endocrinologie-Diabétologie Nutrition,
CHU Angers,
4 rue Larrey,
49100 ANGERS,
France
valentine.suteau@chu-angers.fr

Funding statement

This research was funded by le Plan National Cancer-Inserm (France) and Pfizer, Endocrinology Reserach Price (France).

Abstract

Background and Purpose: Treatment of iodine-refractory thyroid cancers is limited. The repositioning of 'FDA approved drugs for new indications is a developing strategy, particularly in cancer. G protein-coupled receptors (GPCRs) represent the largest family of receptors that are targeted by approved drugs and many data link GPCRs to cancer including in iodine-refractory thyroid cancer. We aimed to identify, by drug screening, drugs targeting GPCRs and having antitumor effect in human thyroid carcinoma.

Experimental Approach: We assessed GPCR mRNA expression in various human thyroid carcinoma cell lines using NanoString technology. We screened 17 drugs approved that target at least one GPCRs previously demonstrated as dysregulated in thyroid carcinoma (*ADORA1*, *CHRM3*, *CXCR7*, *EDNRB*, *F2R*, *GABBR2*, *HRH1*, *HTR7*, *P2RY6*, *S1PR2*). We used cell viability, determined with the CellTiter-Glo assay, as the endpoint for drug screening assays. We also assessed drug screening with an *ex vivo* sample from human ascites-derived thyroid carcinoma.

Key Results: In a 384-well format, three agents (Vilazodone, Vortioxetine, Fingolimod) had an efficacy of greater than 60% and a 50% inhibitory concentration (IC50) in the micromolar range. We validated the results with cell proliferation and cytotoxicity assays. According to subtypes of thyroid carcinoma cell lines, these drugs also had anti-migration and anti-invasion effect.

Conclusion and Implications: To our knowledge, this is the first study that screens drugs targeting GPCR to identify candidate drugs for anticancer therapy in thyroid carcinoma. Our approach could lead to drug repurposing of others compounds with known pharmacokinetics and toxicity profiles.

Keywords

Thyroid cancer; G-Protein-Coupled Receptors; tyrosine kinase inhibitors; targeted therapies; drug repurposing

What is already known

- G protein coupled receptors are the main target of drugs
- G protein coupled receptors are dysregulated in thyroid cancer

What this study adds

- First drug screening targeting GPCRs in thyroid cancer
- New targets in thyroid cancer

Clinical significance

- Combinatorial treatment strategy for synergistic effect
- Development of personalized medicine using *ex vivo* culture

1. INTRODUCTION

Differentiated thyroid cancer (DTC) is the most common type of thyroid cancers and has an excellent overall prognosis. The standard treatment for DTC is surgery followed by iodine treatment if indicated. However, approximately 5% of these cancers develop distant metastases that do not respond to radioiodine treatment, called iodine-refractory thyroid cancers. This subtype of cancer accounts for most of the death related to thyroid cancer with a 10-year survival rate of 10% (Durante et al., 2006). Multi-tyrosine kinase inhibitors (TKIs) sorafenib and lenvatinib have been approved for the treatment of progressive iodine-refractory thyroid cancers. However, treatment of iodine-refractory thyroid cancers is limited with high toxicity and partial or transient efficacy (Babu and Kainickal, 2021). There is an urgent unmet need to identify new targets that can be drugged therapeutically. However, the discovery of new drugs is a long and costly process. An alternative approach is drug repositioning or drug repurposing, which is the exploitation of drugs that have already been approved for clinical use but in another indication (Sleire et al., 2017). Indeed, these drugs can be used for the same molecular target(s) as the primary indication or use other targets. Some drugs have been proposed for drug repurposing in thyroid cancer like metformin, statins, cannabinoids, valproic acid or lithium with interesting results *in vitro* and *in vivo*. (Chen et al., 2015; Nilubol et al., 2017; Zhao et al., 2018). Clinical studies are in progress.

G protein-coupled receptors (GPCRs) represent the largest family of membrane receptors that are targeted by approved drugs. In fact, 134 GPCRs are targets of approved drugs in the United States or the European Union and approximately 700 approved drugs target GPCRs, meaning that nearly one-third of approved drugs target GPCRs offering potential for drug repurposing (Sriram and Insel, 2018). Even though GPCRs are not genetic drivers in cancers, GPCR signaling plays an important role in tumor cells and cells of the tumor microenvironment in various cancers (Wu et al., 2019). GPCRs modulate

pathophysiology by regulating signaling pathways via 4 major classes of heterotrimeric ($\alpha\beta\gamma$) G protein, Gs, Gi/o, Gq/11 and G12/13, and/or the β -arrestin. Furthermore, data shown that cross-talk between GPCR signaling and receptor-tyrosine kinases represents a major mechanism in progression of various cancers (Köse, 2017). Expression data from omics methods for high-throughput detection of mRNA (i.e. Affymetrix arrays, RNA-seq, Nanostring nCounter) provide valuable information, especially for drug discovery, by identifying novel GPCR-targets in cancer. We previously revealed in a GPCRomic study in thyroid cancer differentially expressed GPCR genes. Among them, we identified GPCRs which were targeted by approved agents, opening the possibility of drug repurposing (Suteau et al., 2021). This suggests the potential of combinatorial therapeutic strategies targeting GPCR with current TKI therapies.

Cell lines are useful preclinical models for studying cancer mechanisms and for testing new therapies. There are about 50 cell lines derived from thyroid cancer. Some have been evaluated by the Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE). A recent work from the University of Colorado profiled over 40 cell lines (Landa et al., 2019).

Therefore, in this study, we assessed a profiling of mRNA of GPCR in thyroid cancer cell lines to select druggable GPCR and then we conducted a drug screening to identify the optimal combination of approved drugs that target GPCRs with anti-cancer therapy in human thyroid carcinoma for drug repurposing.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Thyroid cell lines culture

We used six human thyroid carcinoma cell lines from distinct histologic types and mutational profiles. Human papillary thyroid cancer cell lines TPC-1 and NPA, poorly differentiated human thyroid cancer cell line BCPAP, undifferentiated human thyroid cancer cell line ARO were maintained in Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI 1640, PAN Biotech Aidenbach,

Germany) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, EURO BIO scientific, Les Ulis France), 2 mM L-glutamine (PAN Biotech, Aidenbach, Germany), 100 UI/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (PAN Biotech, Aidenbach, Germany) in a 5% CO₂ atmosphere at 37 °C. The Follicular thyroid cancer cell line FTC-133 and the Hürthle cell carcinoma cell line XTC-1 was maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium–F12 medium (DMEM/F12, (PAN Biotech, Aidenbach, Germany) supplemented with 10% FCS, 2 mM glutamine, and 100 UI/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. The TPC-1 cell line was provided by Dr. Corinne Dupuy (Cancer Institute, Gustave Roussy, France), BCPAP was provided by Dr. C. Paulin, (University of Lyon, France), XTC-1 cell line was provided by Dr O.Clark (Fabien et al., 1994; Zielke et al., 1998). The FTC-133 was obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Cell lines were authenticated by DNA STR profiling (ATCC Cell line Authentication Service, Manassas, VA, USA). All cells were routinely tested for the presence of mycoplasma (Minerva Biolabs, Berlin, Germany). All experiments were performed with less than 10 passages of difference between the 1st and the last experiment. Cell lines were incubated at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere under 95% humidity.

2.2. RNA and DNA isolation

For RNA extraction, cells were lysed and RNA was isolated with RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Purified RNA had 260/280 ratios ~2 (via Nanodrop 2000c, ThermoFischer Scientific, Waltham, MA) and RNA integrity number score of 9.9±0.1 (via Bioanalyzer, Agilent Technologies, Santa Clara, CA). For DNA, extraction and purification were performed using the DNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Double-stranded DNA (dsDNA) was quantitated using Qubit® (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) according to manufacturer's recommendations. DNA was then stored at – 20 °C.

2.3. NanoString nCounter-based expression analysis of GPCR expression

We used a custom-targeted GPCR panel for NanoString nCounter-based expression analysis as described previously (Suteau et al., 2021). This panel included 354 nonsensory GPCRs, 17 sensory GPCRs known to have a role in cancer, 17 mRNAs related to thyroid function and 9 housekeeping genes. Probe sets were validated as previously described (Suteau et al., 2021). In brief, 100 ng of total RNA was hybridized to capture reporter probe sets and immobilized on NanoString nCounter cartridges according to the manufacturer's specifications. Data were processed with NanoString analysis software version 4.0 for quality control, as described previously (Suteau et al., 2021). First, the background correction was done by subtracting the mean + two SD of the negative controls. Counts were then normalized to the geometric mean of positive controls and reference genes as recommended by NanoString nSolver, using geNORM algorithm.

2.4. Quantitative real-time PCR

RNA extracted (1000 ng) was used to synthesize cDNA using QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Real-time PCR assays were assessed on a LightCycler 480 Instrument II (Roche, Meylan, France) using Sybr® Select Master Mix (Applied Biosystems®). Primers used for the analysis of GPCR genes were designed using the Primer designing tool from NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) and are shown in Supplementary Table 1. Relative quantification of gene expression was normalized to the expression of 18 S ribosomal RNA as ΔCt ; the results were consistent if normalized to *HPRT*. Data are expressed as $\Delta Ct = Ct_x - Ct_{18S}$ for each GPCR (x) detected.

2.5. Next-Generation Sequencing for Genetic Drivers

2.5.1. Library preparation

Library preparation for DNA hotspots regions was performed using the Ion

Ampliseq™ Library Kit 2.0 and the Ion Ampliseq™ Cancer Hotspot Panel v2 (ThermoFisher Scientific, Life Technologies, Waltham, USA) according to manufacturer's recommendations. The panel was designed to target hotspot regions of 50 oncogenes and tumor suppressor genes using 207 primer pairs in a single tube. A total of 10ng of dsDNA were target-amplified and then barcoded using the Ion Xpress Barcode Adapters 1-16 Kit (ThermoFisher Scientific, Life Technologies, Waltham, USA). Library quantity was assessed with the Agilent High-Sensitivity DNA kit on a Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA).

Library preparation for RNA fusion transcript detection was performed using the OncoPrint™ Solid Tumour Fusion Transcript Kit (ThermoFisher Scientific, Life Technologies, Waltham, USA) according to manufacturer's recommendations. The panel contains more than 60 specific designs for cancer relevant fusions to detect rearrangements involving the ALK gene, specific rearrangements for ROS-1, RET and NTRK-1. 100ng of total RNA were first reverse transcribed using the SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher Scientific, Life Technologies, Waltham, USA). Reverse-transcribed cDNA were then target-amplified and barcoded with the supplied reagents from the OncoPrint™ Solid Tumour Fusion Transcript Kit. Library quantity was assessed with the Agilent High-Sensitivity DNA kit on a Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA).

2.5.2. Automated emulsion-PCR

After quantitation, library was diluted to 10pM to detect DNA hotspot regions or 50pM to detect RNA fusion transcripts and clonally amplified on Ion Sphere™ Particles (ISPs) by PCR emulsion on a Ion One Touch 2 System (ThermoFisher Scientific, Life Technologies, Waltham, USA) using the Ion PGMT™ Hi-Q™ View OT2 Kit - 200 (ThermoFisher Scientific, Life Technologies, Waltham, USA), according to manufacturer's recommendations.

Efficiency of the emulsion PCR was assessed using Qubit IonSphere Quality control kit (ThermoFisher Scientific, Life Technologies, Waltham, USA) and a Qubit® 2.0 fluorometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA). Enrichment of template-positive ISPs was achieved with Dynabeads® MyOne™ Steptavidin C1 Beads on an Ion OneTouch™ ES (ThermoFisher Scientific, Life Technologies, Waltham, USA) according to manufacturer's recommendations.

2.5.3. DNA sequencing

The enriched template-positive ISPs were loaded on Ion 318™ Chip v2 and sequenced on a PGM instrument using the Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing Kit (ThermoFisher Scientific, Life Technologies, Waltham, USA) following the manufacturer's recommendations.

2.5.4. Sequencing analyses

Torrent server (ThermoFisher Scientific, Life Technologies, Waltham, USA) was used for all analyses, including quality controls checking, coverage analyses and identification/qualification of variants / mutations. For that last purpose, VariantCaller v5.0.4.0 within Torrent server was used to detect variants and mutations and to assess their allelic frequency as well as coverage and quality metrics.

The presence of fusion calls was confirmed with the Ion Reporter Software (ThermoFisher Scientific, Life Technologies, Waltham, USA).

2.6. RNA expression profiles from publicly repositories

We included publicly RNA expression profile from the Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE), a collaborative project to characterize ~ 1000 cancer cell lines, <http://www.broadinstitute.org/ccle/home>) using RNA Sequencing. Transcriptome-wide gene expression data for 11 thyroid cancer cell lines was generated and GPCR

expression in cell lines from these data sets was downloaded in TPM (Transcripts Per Kilobase Million) as previously described (Barretina et al., 2012). We used a TPM threshold above 1 in order to identify GPCRs that may be useful as therapeutic targets, for which higher expression is preferable (Sriram et al., 2019a). We also included 44 microarray thyroid cell lines profiles from Colorado University, from Landa and colleagues using Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 microarrays (Landa et al., 2019).

2.7. Chemicals

Pimozide, Adenosine, Pilocarpine HCl, Darifenacin hydrobromide, Levocetirizine dihydrochloride, Lenvatinib, Vorapaxar, Vortioxetine, were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Baclofen, Selumetinib (AZD6244), Lurasidone hydrochloride, Plerixafor, FTY720, Ambrisentan, Bosentan hydrate, Desloratadine, Theophylline and Vilazodone were obtained from Euromedex (Souffelweyersheim, France). Suramin was obtained from Abcam (Paris, France). All drugs were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO, Fisher scientific) except for Suramin, Baclofen and Plerixafor which were dissolved in water.

2.8. *Ex vivo* thyroid cancer culture

Human metastasis thyroid cancer sample was collected from patient diagnosed with progressive and refractory thyroid cancer and treated at the Angers University Hospital France. Institutional review board approval was obtained for research use of tissue samples (DC-2014-2224, AC-2017-2993 and CNIL2019-001). Written informed consent was obtained. Ascites was collected from paracentesis which was performed as part of the standard care to relieve the symptoms of effusion fluids. Only effusion fluid not needed for pathologic diagnosis was collected. Sample was transferred from the primary container in which it was delivered into 50 mL centrifuge tubes and centrifuged to separate cells from fluid (500 ×g, 5 min). Cell pellets were resuspended in ACK lysing buffer (Fisher Scientific, Illkirch, France) to lyse and subsequently remove

red blood cells. Cells were centrifuged, cell lysate was removed, and the cells were resuspended in complete RPMI-1640 medium (supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin). No additional supplement, such as TSH, was needed to maintain these cells. Remaining cells were frozen in FBS containing 10% DMSO in liquid nitrogen. Serial passaging and selective detachment eliminated white blood cells and stromal cells (fibroblasts). Tumour cells were characterized using phenotypic characteristics (epithelial appearance) and thyroid epithelial markers. Tumour cells were typically positive for PAX8 and TTF1 using RT-qPCR and Immunohistochemistry (Supplemental Figure 1).

2.9. Drug library screening

The libraries that were used for the screen included 17 drugs which target at least one selected GPCRs (Table 1). The compounds are FDA and/or EMA drugs-approved for use. The stock concentrations of the test compounds ranged from 5 to 144 mM diluted in DMSO except for plerixafor, suramin and baclofen which were diluted in water.

2.10. Cell viability assay

The library was first prepared in 384-well V-bottom microplate (Dutsher, Issy-les-Moulineaux, France) and then in white 384-well treatment plate (Greiner Bio-One, Les Ulis, France) in as many copies as necessary for the different experiments. Transfer of the diluted compounds in treatment plates was performed using a Cybio Felix (CysrisBio, Saint-Genis-Laval, France). Each treatment plate included positive control wells (solvent only, with cells) and negative control wells (solvent only, without cells). Treatment copies plates were maintained at -80 °C for storage until 1 of resuspended cells was dispensed into each well of white, solid-bottom, 384-well tissue culture-treated plates using a Multidrop Combi dispenser (ThermoFisher, Waltham, MA USA).

Cell viability after compound treatment was measured using a luciferase-coupled ATP

quantitation assay (CellTiter-Glo; Promega, Charbonnières-les-Bains, France) in six human thyroid carcinoma cell lines and in ascites-derived primary refractory thyroid cancer cells. The change of intracellular ATP content indicates the number of metabolically competent cells after compound treatment. Briefly, cells were harvested from T75 flask and resuspended at 30,000 cells/ml in their respective culture medium containing 10% FCS. Then 20 μ l of resuspended cells was dispensed into each well of white, clear-bottom, 384-well tissue culture-treated plates (Greiner Bio-One). After overnight culture at 37 C with 5% CO₂, a total of 10 μ l of compounds at seven selected concentrations was transferred to each well of the assay plate using a 384-head pintool and the plates were further incubated at 37 C with 5% CO₂ for 72 h. Then 18 μ l of CellTiter-Glo luminescent substrate mix (Promega) was added to each well using a Multidrop Combi dispenser. The plates were protected from light and contents were mixed using an orbital shaker at 300 rpm at room temperature for 3 min to induce cell lysis. After shaking, the plates were equilibrated at room temperature for 10 min to stabilize the luminescent signal. The adenosine triphosphate (ATP) luminescent signal (relative light units; RLUs) was measured on a Envision plate reader (PerkinElmer, Villebon-sur-Yvette, France) with clear filter. Drug inhibitory concentration (IC₅₀) curves were generated using total ATP RLUs, where controls were calculated as the average of replicates, using DMSO or Water as the normalization control. Cell viability assays were performed in duplicates. For each drug and cell line tested, the experiment was repeated at least three times.

2.11. Cell proliferation and cytotoxicity assays of confirmed hits

To assess the effect on cell proliferation and cytotoxicity, cells were seeded in 96-well black plates at a concentration of 10,000 cells per well in 100 μ l culture medium to reach a confluence of 20–30%. After overnight culture at 37 C with 5% CO₂, 100 μ l fresh complete culture medium

containing the indicated drugs or corresponding vehicles was added into each well, and CellTox Green dye (1:5000, diluted in RPMI, Promega) was added to measure cytotoxicity. The dye labels dead cells yielding green fluorescence. The plate was scanned, and fluorescent and phase-contrast images were acquired in real time every 2 hours from 72 hours post treatment using the IncuCyte system (Essen Bioscience, Sartorius, Aubagne, France). The area under the curve (AUC) of object count/mm² and object confluence over time is used to represent cytotoxicity and proliferation dataset, respectively.

2.12. Cell migration Scratch Wound Assays

Thyroid cells were seeded (30,000 to 50,000 cells/well) into ImageLock 96-well culture Plates (Sartorius, Aubagne, France) and allowed to grow for 18-24 h until confluence at 37 C with 5% CO₂ in their respective culture medium containing only 1% FCS to limit cell proliferation. Cell migration was assessed by scratch assays, made using the 96-well WoundMaker (Essen BioScience). The wells were washed three times with culture medium to remove any debris and then treated with 100 μ l of medium containing several concentrations of indicated compounds. Images of the cells invading the scratch wound were automatically visualized within the CO₂ incubator using a real-time cell imaging system (IncuCyte S3 Live-Cell analysis system, Essen Bioscience, Wide Mode, objective X10). Cells were imaged every 2 hours for 72h to monitor the treatment-induced cell migration. The relative wound density (RWD) was analyzed using the IncuCyte S3 software (Essen BioScience) calculated by measuring density in the wound area relative to the density outside the wound area at 72h. The RWD is 0% at 0h and 100% when the density inside the wound is the same as the density outside the wound, therefore normalizing for changes in density due to proliferation outside the wound. Representative images are depicted and quantification from average of at least three independent experiments in duplicate \pm SEM are shown. P-values

based on ANOVA followed by Dunnett's post hoc test for multiple comparisons correction.

2.13. Cell Invasion

After creating the wound scratches with the 96-pin WoundMaker, a layer of ECM gel (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) was added to a final concentration of 8 mg/ml. The microplate was then incubated in a 37°C CO₂ incubator for 30 minutes to allow the ECM gel to polymerise. Indicated compounds or DMSO were then added in RPMI or DMEM with 1% FBS. Phase images were collected every two hours for a total of 72 hours using the IncuCyte® acquisition software (Wide Mode, objective X10). Invasion was calculated by relative wound densities. The experiments were performed in duplicate in at least three independent experiments.

2.14. Data and statistical analysis

Data were analyzed using GraphPad PRISM 8 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) and represented mean \pm SEM of at least 3 independent experiments performed in replicate for each condition. Data are expressed as a percentage of the solvent or positive controls, where applicable. Difference of means between more of two groups was tested with Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons test. Comparison between two grouped data was tested with two-way ANOVA with Sidak's multiple comparisons test. Concentration dose-response data were fitted using a three-parameter equation. Differences were considered significant at $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) and $p < 0.0001$ (****).

3. RESULTS

3.1. Thyroid cell lines profiling for GPCR drug screening

For our study, we utilized 6 thyroid carcinoma cell lines (FTC-133, NPA, BCPAP, XTC, ARO, TPC-1). These cell lines were chosen because of their different mutational and histological profiles, representative of the diseases *in vivo*. The

main characteristics of these cell lines were summarized in Supplemental Table 2. First, we profiled transcript levels in 6 thyroid carcinoma cell lines with Nanostring nCounter technology. With this approach, a threshold > 40 counts was selected for detection of GPCR genes and > 100 counts for high expression as previously described (Bondar et al., 2020; Kuczler et al., 2022). We previously found 25 differentially expressed GPCR genes between tumoral and normal thyroid tissues with at least one approved drug in thyroid carcinoma (Suteau et al., 2021). Therefore, we then focused on these 25 GPCRs. Eleven were detected at least in a thyroid carcinoma cell lines from our lab (ADORA1, CHRM3, CXCR7, EDNRB, F2R, GABBR2, HRH1, HTR7, P2RY6, S1PR2 and TSHR). We validated expression data from Nanostring nCounter technology with RT-qPCR. GPCR mRNA expression was normalized to the Ct of 18S rRNA (whose Ct was generally ~ 21). We used a Δ Ct of 10 as the GPCR detection threshold, considering the value of 18S. Independent qPCR analyses confirmed the expression of nanostring-identified GPCRs (Figure 1A).

Finally, we included in the analysis publicly available profiles for 11 thyroid carcinoma cell lines from CCLE (all done with RNA-Seq) and 44 thyroid carcinoma cell lines (follicular, papillary, poor differentiated, anaplastic thyroid cancers) from the recent genetic characterization of human thyroid cancer cell lines from University of Colorado (all done with Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 microarrays) (Landa et al., 2019). With RNA-Seq approach, a threshold > 1 TPM was selected for detection of GPCR ARNm and an expression > 10 TPM was considered as high expression for targeted drug as previously described (7,8). With microarray, non-consensual threshold is validated. According to expression of validated genes in thyroid cell lines, arbitrarily, a cut-off at > 6.7 was applied. All 25 GPCRs were expressed in at least one cell line except for *ADORA3*, *HRH4*, *FSHR* and *PTH1R*, which were not found in any cell line. *HRH1* and *F2R* were found in the vast majority of lines (Figure 1B). We compared the GPCR expression according to the mRNA

quantification technique used. In total, 10 receptors were found with the three techniques (*ADORA1*, *CHRM3*, *CXCR7*, *EDNRB*, *F2R*, *GABBR2*, *HRH1*, *HTR7*, *P2RY6* and *TSRH*), validating results from Nanostring nCounter technologies in our six-thyroid carcinoma cell lines (Figure 1C). For the current project, we decided to exclude TSHR because of its well-known target in the thyroid. We therefore selected 10 GPCRs expressed in at least one line from our laboratory including *ADORA1*, *CHRM3*, *CXCR7*, *EDNRB*, *F2R*, *GABBR2*, *HRH1*, *HTR7*, *P2RY6*, *S1PR2*.

3.2. Screening results for single-drug dose–response assays

We first prepared a drug library included 17 drugs which target the 10 selected GPCRs. The compounds are all FDA and/or EMA drugs-approved for use. We selected if available at least one antagonist and one agonist (Table 1). Initially, we performed quantitative dose–response assays for each compound at seven concentrations in six human thyroid carcinomas cell lines using a 384-well format. We also assessed drug screening with an *ex vivo* sample from human ascites-derived thyroid carcinoma. We used cell viability, determined with the CellTiter-Glo assay, as the endpoint for the single-drug screening assays. The screening procedure identified three drugs with decreased metabolic activity in thyroid cell lines (Vilazodone, Vortioxetine, Fingolimod). (Figure 2A). Validation assays with CellTiter-Glo assay in a 96-well plates format demonstrated the ability of Vilazodone, Vortioxetine, Fingolimod to decrease the viability of different thyroid cancer cell lines with a mean IC₅₀ of 13,66±2,54µM, 11,14±4,43 µM and 7,43±0,96 µM, respectively (Figure 2 B-D).

3.3. Impact of Vilazodone, Vortioxetine, Fingolimod on proliferation, migration and invasion of thyroid cancer cells

We assessed the effect of Vilazodone, Vortioxetine, Fingolimod cell proliferation and cytotoxicity on ARO and NPA cell lines, which was the most sensitive cell lines to

the three drugs (Figure 3 A-C). Vilazodone, showed a growth arrest without cytotoxicity, indicating a cytostatic effect. For Fingolimod and Vortioxetine, we confirmed a cytotoxicity effect with an increasing in signal because of altered membrane integrity.

Based on their inhibitory effect on viability, we then evaluated the impact of Vilazodone, Vortioxetine, Fingolimod on migration at concentrations close to IC₅₀ in the six human thyroid carcinoma cell lines. In presence of Vilazodone inhibited cell migration in thyroid cell lines by up to 38%. (Figure 3D). Vortioxetine showed significantly reduced migration in NPA, XTC, ARO, TPC-1 and FTC-133 about 40 to 50% (Figure 3E). Fingolimod also inhibited migration in thyroid cell lines by 17 to 35% (Figure 3F). Representative images of the extent of scratch wound closure in response to drugs are displayed in Supplemental Figure 2.

Only TPC-1, XTC and FTC-133 displayed invasive phenotype with the scratch wound invasion assay. Therefore, we evaluated the impact of Vilazodone, Vortioxetine, Fingolimod on invasion in these thyroid carcinoma cell lines. Drugs had no effect on invasion of FTC-133. In contrast, at concentrations close to IC₅₀, they inhibited cell invasion by more than 50% in XTC and TPC-1 (Figure 3 G-I).

3.4. Combination of Vilazodone, Vortioxetine or Fingolimod with targeted therapies

Among TKIs currently available, lenvatinib is the most effective approved multi-TKI in thyroid cancer (Schlumberger et al., 2015). Selumetinib (anti-MEK) is not approved for thyroid cancer but has shown promising effects on thyroid differentiation (Ho et al., 2013). To determine the growth inhibitory effect of combination of targeted therapies with Vilazodone, Vortioxetine or Fingolimod, thyroid cancer cell lines were treated with serial dilution of Selumetinib or Lenvatinib at concentrations ranging between 2 nM and 20 µM with fixed dose of Vilazodone (13 µM), Vortioxetine (11µM) or Fingolimod (8µM), corresponding to

concentrations close to IC50. Cells were treated by continuous exposure for 3 days and cell viability was quantified by CellTiter-Glo assay in a 96-well plates format. Using this assay, we demonstrated an increase in efficacy (maximal inhibitory effect) of Selumetinib and Lenvatinib in presence of Vortioxetine or Fingolimod without modification of potency (IC50) (Table 2 and 3). Vilazodone did not significantly modify potency or efficacy of targeted therapies (Table 4).

Drug	GPCR	Mode of action	Other GPCRs	Main indication	Cmax (µM)	Solubility (mM) (solvent)
Theophylline	<i>ADORA1</i>	Antagonist	<i>ADORA2, ADORA3</i>	Bronchodilator	n.a	197.52 (DMSO)
Adenosine	<i>ADORA1</i>	Agonist	<i>ADORA2, ADORA3</i>	Tachycardia	n.a	44.90 (DMSO)
Darifenacin hydrobromide	<i>CHRM3</i>	Antagonist	-	Overactive bladder	0.0042	196.06 (DMSO)
Pilocarpin HCl	<i>CHRM3</i>	Agonist	<i>CHRM1, CHRM2</i>	Xérostomia	0.14	196.14 (DMSO)
Plerixafor	<i>CXCR7</i>	Agonist	<i>CXCR4</i>	Mobilization of hematopoietic stem cells	1.73	29.83 (H2O)
Ambrisentan	<i>EDNRB</i>	Antagonist	-	Pulmonary arterial Hypertension	2	198.18 (DMSO)
Bosentan hydrate	<i>EDNRB</i>	Antagonist	<i>EDNRA</i>	Pulmonary arterial Hypertension	1	175.55 (DMSO)
Vorapaxar	<i>F2R</i>	Antagonist	-	Anti-platelet agent	0.36	200.98 (DMSO)
Baclofene	<i>GABBR2</i>	Agonist	-	Myorelaxant	1	0.46 (H2O)
Levocetirizine dihydrochloride	<i>HRH1</i>	Antagonist	-	Allergy	0.53	199.22 (DMSO)
Desloratadine	<i>HRH1</i>	Antagonist	-	Allergy	0.0092	199.47 (DMSO)
Vilazodone	<i>HRH1</i>	Agonist	<i>D2R, HTR4, HTR1A</i>	Depression	0.2	199.31 (DMSO)
Pimozide	<i>HTR7</i>	Antagonist	<i>D2R</i>	Antipsychotic	0.0065	65 (DMSO)
Vortioxetine	<i>HTR7</i>	Antagonist	<i>HTR2A, HTR1D, HTR1B, HTR1A, HTR6, HTR7</i>	Depression	0.0502	133.92 (DMSO)
Lurasidone HCl	<i>HTR7</i>	Antagonist	<i>D2R, HTR2A, HTR1A</i>	Schizophrenia	0.26	14.21 (DMSO)
Suramine	<i>P2RY6</i>	Antagonist	<i>P2R1, P2R2, P2R11, P2R13</i>	Antiparasite	n.a	6.72 (H2O)
Fingolimod	<i>S1PR2</i>	Agonist	<i>S1PR1, S1PR3, S1PR4, S1PR5</i>	Multiple sclerosis	0.0049	42.28 (DMSO)

TABLE 1. List of drugs included in drug screening in human thyroid carcinoma cells. Abbreviations: GPCR: G-protein coupled receptor

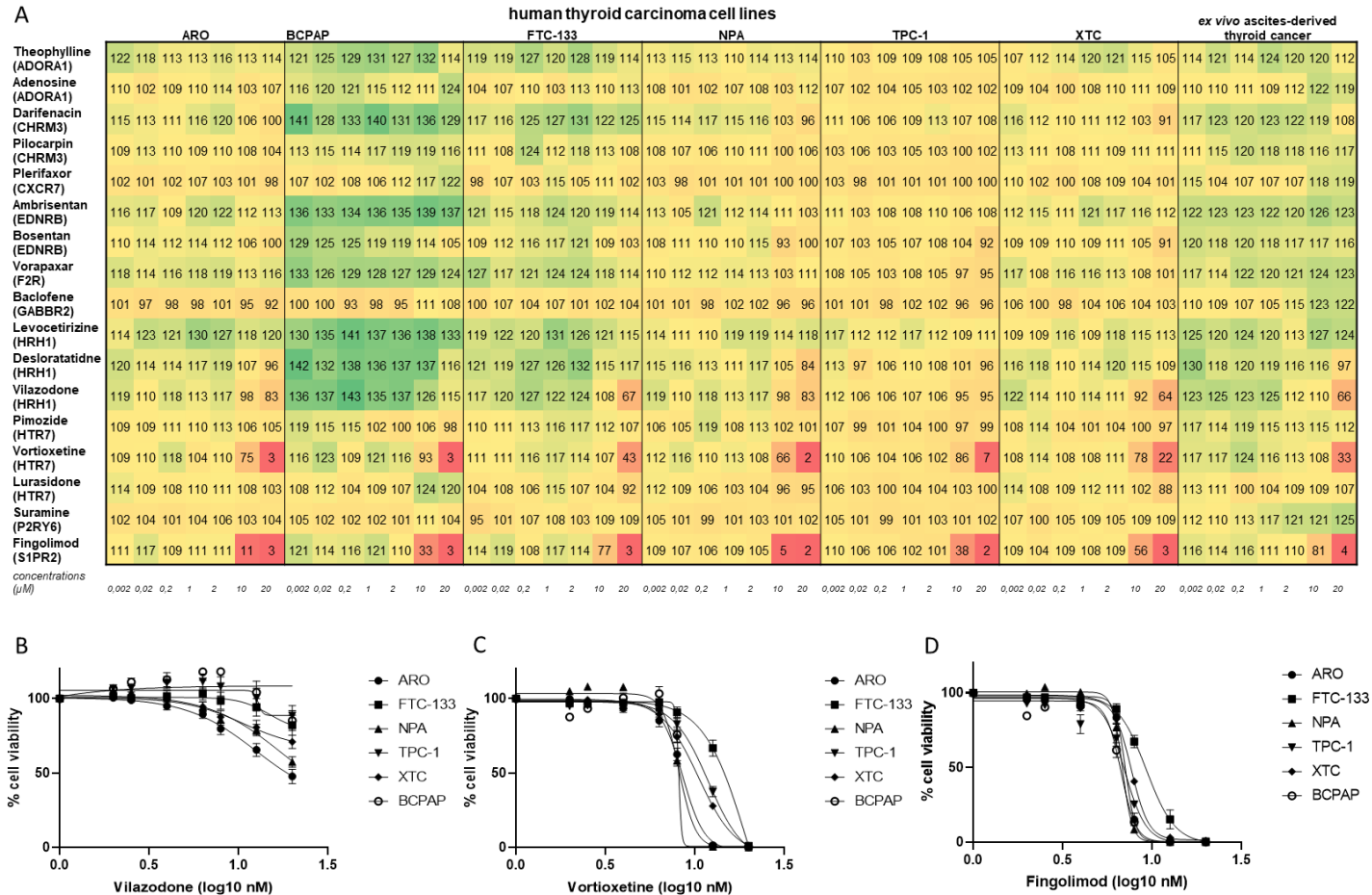


FIGURE 2. Screening results for single-drug dose–response assays. (A) Each line represents a molecule, tested in increasing concentrations (0.002 to 20 μM) in 384-well format. The different human thyroid carcinoma cell lines are represented in columns. The last column represents the *ex vivo* culture. Cell viability data are represented as % of viability of solvent alone, set to 100%, according to a color scale (green, increased viability compared to solvent ≈ 150%; yellow, no change ≈ 100%; orange, decreased viability compared to solvent ≈ 50%; red, very decreased viability compared to solvent <5%). Human thyroid carcinoma cells were treated in the presence of increasing doses of Vilazodone (B), Vortioxetine (C), Fingolimod (D) for 72 hrs and assessed for cell viability with CellTiterGlo in 96-well format. The dose-response curves were plotted and modeled by a three-parameter logistic fit yielding IC₅₀ (concentration of half-maximal inhibition) and efficacy (maximal response) values. Data represent means ± SEM of at least four independent experiments performed in duplicate.

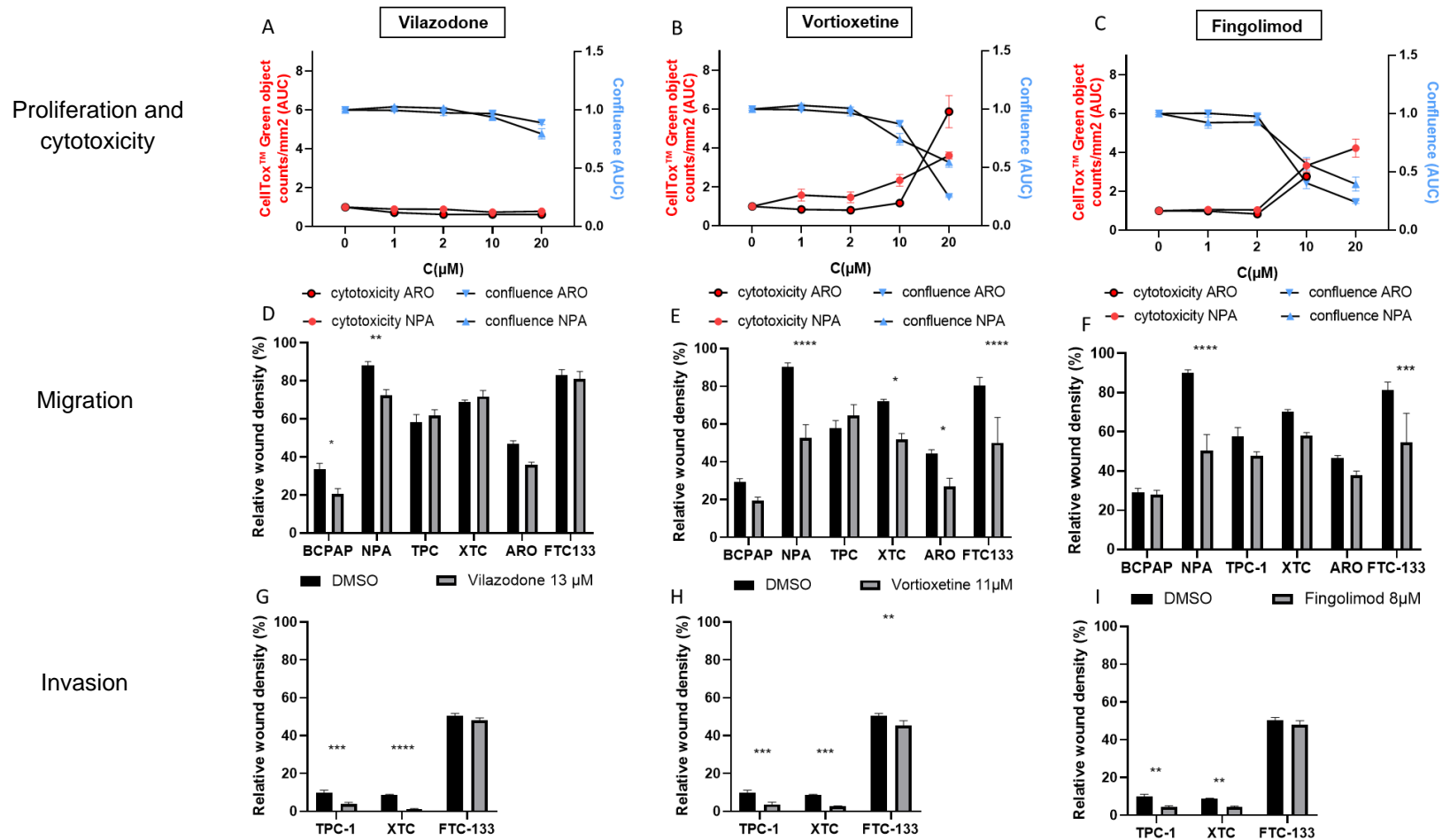


FIGURE 3. Impact of Vilazodone, Vortioxetine, Fingolimod on proliferation, migration and invasion of thyroid cancer cells. ARO and NPA cells were treated in the presence of increasing doses of Vilazodone (A), Vortioxetine (B), Fingolimod (C) for 72 hrs and assessed for cell proliferation (% confluence) and cytotoxicity (object count/mm²) with CellToxGreen in multiplex. CellTox object counts/mm² and object confluence were measured over time using IncuCyte™ ZOOM and the Area under the curve was calculated for each condition. Human thyroid carcinoma cells were treated with Vilazodone (D, G), Vortioxetine (E, H), Fingolimod (F, I) at concentrations close to IC₅₀ for 72 hrs and assessed for migration and invasion with Scratch wound assay. Wound closure was monitored over 72h using the relative wound density metric. Data represent means ± SEM of at least four independent experiments performed in duplicate. Two way ANOVA adjusted for multiple comparisons was used to determine the significance. *:p=0.05, ** p:0.01, ***p=0.001, ****p<0.001.

	Fingolimod (μ M)		Selumetinib		Lenvatinib
		Log ₁₀ (IC50) (nM)	Maximum inhibition (%)	Log ₁₀ (IC50) (nM)	Maximum inhibition (%)
NPA	0	2,53 \pm 0,39	58,47 \pm 4,96	4,13 \pm 0,41	67,98 \pm 3,20
	8	5,44 \pm 2,22	99,53 \pm 0,10 *** (p=0,0006)	3,42 \pm 1,15	99,73 \pm 0,04 *** (p=0,0001)
TPC-1	0	3,34 \pm 0,10	64,59 \pm 0,68		
	8	4,69 \pm 0,15	96,6 \pm 0,77		
XTC	0	5,16 \pm 1,51	35,76 \pm 2,35	4,36 \pm 0,84	55,71 \pm 3,80
	8	5,60 \pm 5,05	77,33 \pm 6,79 *** (p=0,0005)	3,25 \pm 2,2	85,3 \pm 5,42 ** (p=0,0029)
ARO	0	2,49 \pm 0,20	74,54 \pm 0,78	5,82 \pm 0,96	42,15 \pm 1,10
	8	2,11 \pm 0,35	98,3 \pm 0,05 * (p=0,0341)	6,40 \pm 1,30	99,01 \pm 0,03 **** (p<0,0001)
FTC-133	0	5,21 \pm 0,74	30,23 \pm 2,85	4,60 \pm 0,85	44,33 \pm 2,81
	8	2,15 \pm 0,82	61,21 \pm 8,67 *** (p=0,0009)	2,90 \pm 1,19	69,60 \pm 6,68 *** (p=0,0010)
BCPAP	0	2.45 \pm 1.03	-35 \pm 17	2.82 \pm 0.11	59,69 \pm 6.20
	8	1.36 \pm 0.02	93,65 \pm 2,70 ** (p=0,0038)	3.89 \pm 0.20 * (p=0,028)	99,39 \pm 0.09 ** (p=0,0029)
Ex vivo ascites- derived thyroid cancer	0	2.42 \pm 0.07	85,98 \pm 1.07	4.95 \pm 0.18	42,18 \pm 1.89
	8	3.92 \pm 0.11	98,9 \pm 0.24 ** (p=0,0033)	5.21 \pm 0.43	73,35 \pm 5.96 ** (p=0,0012)

TABLE 2. Effect of Fingolimod on potency (IC50) and Efficacy (maximum inhibition) of Selumetinib and Lenvatinib. Data represent means \pm SEM of at least three independent experiments performed in duplicate. The viability in the absence of compounds was set at 100%. Statistical analyses were performed with one-way Dunn's multiple comparisons test for the response in fingolimod-exposed compared with unexposed cells.

	Vortioxetine (μM)	Selumetinib		Lenvatinib	
		Log ₁₀ (IC ₅₀) (nM)	Maximum inhibition (%)	Log ₁₀ (IC ₅₀) (nM)	Maximum inhibition (%)
NPA	0	2,53 \pm 0,39	58,47 \pm 4,96	4,13 \pm 0,41	67,98 \pm 3,12
	11	3,96 \pm 0,74	99,72 \pm 0,03 **** (p<0,0001)	4,38 \pm 0,47	94,57 \pm 3,12 ** (p= 0,0018)
TPC-1	0	3,34 \pm 0,10	64,59 \pm 0,68		
	11	2,15 \pm 1,10	99,88 \pm 0,05		
XTC	0	5,16 \pm 1,51	35,76 \pm 2,35	4,36 \pm 0,84	55,71 \pm 3,80
	11	2,55 \pm 0,72	87,78 \pm 4,74 **** (p<0,0001)	2,46 \pm 0,80	88,56 \pm 4,26 *** (p=0,0004)
ARO	0	2,49 \pm 0,20	74,54 \pm 0,78	5,82 \pm 0,96	42,15 \pm 1,10
	11	2,63 \pm 0,39	98,74 \pm 0,08 *** (p=0,0002)	3,20 \pm 0,05	98,21 \pm 0,11 ** (p=0,0034)
FTC-133	0	5,21 \pm 0,74	30,23 \pm 2,85	4,60 \pm 0,85	44,33 \pm 2,81
	11	2,80 \pm 0,90	55,51 \pm 5,90 ** (p=0,0031)	6,05 \pm 1,36	73,36 \pm 6,68 ** (p=0,0055)
BCPAP	0	2.45 \pm 1.03	-35 \pm 17	2.82 \pm 0.11	59,69 \pm 6.20
	11	3.16 \pm 1.81	90,33 \pm 5.86 *** (p=0,0006)	5.07 \pm 1.50	91,01 \pm 4.39
Ex vivo ascites-derived thyroid cancer	0	2.42 \pm 0.07	85,98 \pm 1.07	4.95 \pm 0.18	42,18 \pm 1.89
	11	4.07 \pm 0.49	91,06 \pm 2.91	4.02 \pm 0.053	85,77 \pm 3.74 **** (p<0,0001)

TABLE 3. Effect of Vortioxetine on potency (IC₅₀) and efficacy (maximum inhibition) of Selumetinib and Lenvatinib. Data represent means \pm SEM of at least three independent experiments performed in duplicate. The viability in the absence of compounds was set at 100%. Statistical analyses were performed with one-way Dunn's multiple comparisons test for the response in vortioxetine-exposed compared with unexposed cells.

	Vilazodone (μM)	Selumetinib		Lenvatinib	
		Log ₁₀ (IC ₅₀) (nM)	Maximum inhibition (%)	Log ₁₀ (IC ₅₀) (nM)	Maximum inhibition (%)
NPA	0	2,53±0,39	58,47±4,96	4,13±0,41	67,98±3,12
	13	2,31±0,09	70,61±3,91	5,05±0,59	75,87±2,03
TPC-1	0	3,34±0,10	64,59±0,68		
	13	2,92±0,16	58,78±1,21		
XTC	0	5,16±1,51	35,76±2,35	4,36±0,84	55,71±3,80
	13	4,37±0,98	49,92±2,04	3,93±0,49	65,49±2,23
ARO	0	2,49±0,20	74,54±0,78	5,82±0,96	42,15±1,10
	13	2,71±0,26	77,15±1,01	4,41±0,76	56,98±4,58
FTC-133	0	5,21±0,74	30,23±2,85	4,60±0,85	44,33±2,81
	13	4,31±0,32	38,05±2,31	4,42±0,85	50,42±0,88
BCPAP	0	2.45±1.03	-35±17	2.82±0.11	59,69±6.20
	13	3.71±0.33	-41.5±9.66	3.46±0.10	20,51±7.00
Ex vivo ascites- derived thyroid cancer	0	2.42±0.07	85,98±1.07	4.95±0.18	42,18±1.89
	13	3.49±1.08	86,24±3.40	4.95±0.0.18	47,67±1.88

TABLE 4. Effect of Vilazodone on potency (IC₅₀) and Efficacy (maximum inhibition) of Selumetinib and Lenvatinib. Data represent means ± SEM of at least three independent experiments performed in duplicate. The viability in the absence of compounds was set at 100%. Statistical analyses were performed with one-way Dunn's multiple comparisons test for the response in vilazodone-exposed compared with unexposed cells

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets generated and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

AUTHOR CONTRIBUTION STATEMENT

V.S.: Conceptualization, Methodology, formal analysis, investigation, data curation, writing—original draft preparation, project administration, funding acquisition; M.M.: validation, project administration, writing—review and editing, funding acquisition; S.G.: Conceptualization, Methodology, software, investigation, data curation; M.B.: Conceptualization, Methodology, data curation; P.G.: formal analysis, investigation, data curation. D.L.: writing—original draft preparation, investigation, data curation. P.R.: Methodology; validation, writing—review and editing, supervision, project administration, funding acquisition; C.B.: validation, Methodology, writing—review and editing, supervision, project administration, funding acquisition. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors did not preregister the research in an independent, institutional registry.

We thank Jérôme Cayon for the design of the primers sequences, Jonathan Dauvé and Estelle Pedrono for RNA-Seq analyses, Audrey Rapinat for NanoString nCounter analysis. We thank also Alexandre Collin, Hichem Bouchenaki and Louis Gourdin for their technical skill in performing immunohistochemistry, automated drug screening and *in vitro* characterization, respectively.

CONFLICT OF INTEREST DISCLOSURE

The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript or in the decision to publish the results.

REFERENCES

- Babu, G., and Kainickal, C.T. (2021). Update on the systemic management of radioactive iodine refractory differentiated thyroid cancer (Review). *Mol. Clin. Oncol.* 14.
- Barretina, J., Caponigro, G., Stransky, N., Venkatesan, K., Margolin, A.A., Kim, S., et al. (2012). The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modeling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 483: 603–607.
- Bondar, G., Xu, W., Elashoff, D., Li, X., Faure-Kumar, E., Bao, T.-M., et al. (2020). Comparing NGS and NanoString platforms in peripheral blood mononuclear cell transcriptome profiling for advanced heart failure biomarker development. *J. Biol. Methods* 7: e123.
- Chen, G., Nicula, D., Renko, K., and Derwahl, M. (2015). Synergistic anti-proliferative effect of metformin and sorafenib on growth of anaplastic thyroid cancer cells and their stem cells. *Oncol. Rep.* 33: 1994–2000.
- Durante, C., Haddy, N., Baudin, E., Leboulleux, S., Hartl, D., Travagli, J.P., et al. (2006). Long-Term Outcome of 444 Patients with Distant Metastases from Papillary and Follicular Thyroid Carcinoma: Benefits and Limits of Radioiodine Therapy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91: 2892–2899.
- Fabien, N., Fusco, A., Santoro, M., Barbier, Y., Dubois, P.-M., and Paulin, C. (1994). Description of a human papillary thyroid carcinoma cell line. Morphologic study and expression of tumoral markers. *Cancer* 73: 2206–2212.
- Ho, A.L., Grewal, R.K., Leboeuf, R., Sherman, E.J., Pfister, D.G., Deandreis,

- D., et al. (2013). Selumetinib-Enhanced Radioiodine Uptake in Advanced Thyroid Cancer. *N. Engl. J. Med.* 368: 623–632.
- Insel, P.A., Sriram, K., Gorr, M.W., Wiley, S.Z., Michkov, A., Salmerón, C., et al. (2019). GPCRomics: An Approach to Discover GPCR Drug Targets. *Trends Pharmacol. Sci.* 40: 378–387.
- Köse, M. (2017). GPCRs and EGFR – Cross-talk of membrane receptors in cancer. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 27: 3611–3620.
- Kuczler, M.D., Zieren, R.C., Dong, L., Reijke, T.M. de, Pienta, K.J., and Amend, S.R. (2022). Advancements in the identification of EV derived mRNA biomarkers for liquid biopsy of clear cell renal cell carcinomas. *Urology* 160: 87–93.
- Landa, I., Pozdeyev, N., Korch, C., Marlow, L.A., Smallridge, R.C., Copland, J.A., et al. (2019). Comprehensive Genetic Characterization of Human Thyroid Cancer Cell Lines: A Validated Panel for Preclinical Studies. *Clin. Cancer Res.* 25: 3141–3151.
- Nilubol, N., Merkel, R., Yang, L., Patel, D., Reynolds, J.C., Sadowski, S.M., et al. (2017). A phase II trial of valproic acid in patients with advanced, radioiodine-resistant thyroid cancers of follicular cell origin. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 86: 128–133.
- Schlumberger, M., Tahara, M., Wirth, L.J., Robinson, B., Brose, M.S., Elisei, R., et al. (2015). Lenvatinib versus Placebo in Radioiodine-Refractory Thyroid Cancer. *N. Engl. J. Med.* 372: 621–630.
- Sleire, L., Førde, H.E., Netland, I.A., Leiss, L., Skeie, B.S., and Enger, P.Ø. (2017). Drug repurposing in cancer. *Pharmacol. Res.* 124: 74–91.
- Sriram, K., and Insel, P.A. (2018). G Protein-Coupled Receptors as Targets for Approved Drugs: How Many Targets and How Many Drugs? *Mol. Pharmacol.* 93: 251–258.
- Sriram, K., Moyung, K., Corriden, R., Carter, H., and Insel, P.A. (2019a). GPCRs show widespread differential mRNA expression and frequent mutation and copy number variation in solid tumors. *PLOS Biol.* 17: e3000434.
- Sriram, K., Wiley, S.Z., Moyung, K., Gorr, M.W., Salmerón, C., Marucut, J., et al. (2019b). Detection and Quantification of GPCR mRNA: An Assessment and Implications of Data from High-Content Methods. *ACS Omega* 4: 17048–17059.
- Suteau, V., Seegers, V., Munier, M., Ben Boubaker, R., Reyes, C., Gentien, D., et al. (2021). G Protein-Coupled Receptors in radioiodine-refractory thyroid cancer in the Era of Precision Medicine. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*
- Wu, V., Yeerna, H., Nohata, N., Chiou, J., Harismendy, O., Raimondi, F., et al. (2019). Illuminating the Onco-GPCRome: Novel G protein-coupled receptor-driven oncocrine networks and targets for cancer immunotherapy. *J. Biol. Chem.* jbc.REV119.005601.
- Zhao, J., Xu, C., Yao, J., Yu, C., Liao, L., and Dong, J. (2018). Statins and Thyroid Carcinoma: a Meta-Analysis. *Cell. Physiol. Biochem.* 47: 1422–1431.
- Zielke, A., Tezelman, S., Jossart, G.H., Wong, M., Siperstein, A.E., Duh, Q.-Y., et al. (1998). Establishment of a Highly Differentiated Thyroid Cancer Cell Line of Hürthle Cell Origin. *Thyroid* 8: 475–483.

SUPPLEMENTAL DATA

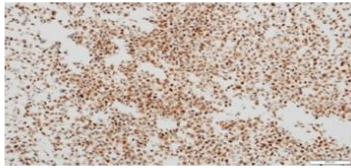
mRNA	Primer sequences
<i>ADORA1</i>	Forward ATCCTCTTCCTCTTTGCC Reverse TAGACAATGGGGTTCATGGC
<i>CHRM3</i>	Forward CAGAACTTCAGCTAAGGTACAATAAGG Reverse GTCCAGAATTGTGCTGTATGTTG
<i>CXCR7</i>	Forward GTCCAGTGACCAGGAGAAGC Reverse AGAAGATGTCCAGCAGCACC
<i>EDNRB</i>	Forward ATCGTCATTGACATCCCTATCA Reverse GCTTACACATCTCAGCTCCAAA
<i>F2R</i>	Forward CCTGCTTCAGTCTGTGCGG Reverse TGACCGGGGATCTAAGGTGG
<i>GABBR2</i>	Forward TGACGCAAGACGTTTCAGAGG Reverse GCACATCATTCCCCTTCAGC
<i>HRH1</i>	Forward TAACTGGTGGCTGCTCTTGC Reverse GCCATAGTGGTCTTGTTGCC
<i>HTR7</i>	Forward TCGATCATGACCCTGTGCG Reverse CCATGCATTTCCCATTCTGCC
<i>P2RY6</i>	Forward GAAGAACCATGGCTTTGGAA Reverse CAGGTGGGTTTCCTATGTTCA
<i>S1PR2</i>	Forward CCGAAACAGCAAGTTCCACT Reverse CCAGGAGGCTGAAGACAGAG
<i>18S</i>	Forward CGGCTACCACATCCAAGGAA Reverse CGGCTACCACATCCAAGGAA
<i>HPRT</i>	Forward TGACCTTGATTTATTTTGCATACC Reverse CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT

SUPPLEMENTAL TABLE 1. PCR primers for quantification of GPCR targeting approved drugs in thyroid cancer cells

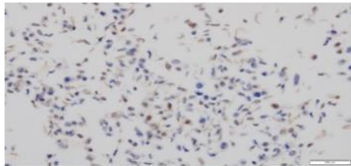
Cell lines	FTC-133	XTC	NPA	TPC-1	BCPAP	ARO
Histology						
	FTC	Hürtle	PTC	PTC	PDTC	ATC
Mutations/ Fusion						
BRAF	WT	WT	V609E	WT	V609E	V609E
RET/PTC fusion	WT	WT	WT	RET/PTC1	WT	WT
NRAS	WT	WT	WT	WT	WT	WT
KRAS	WT	WT	WT	WT	WT	WT
HRAS	WT	WT	WT	T81C	WT	WT
PI3KCA	A1066T	WT	A1066T	WT	A1066T	A1066T
TP53	WT	WT	WT	G266E	P72R	R273H
KIT	WT	WT	WT	WT	WT	M541L
PTEN	R130T	WT	D331G	WT	WT	WT
Différenciation						
<i>ANO1</i>						+
<i>ANO5</i>			+		++	
<i>CFTR</i>						+++
<i>DIO2</i>	+					
<i>DUOX1</i>						
<i>DUOX2</i>						
<i>DUOXA1</i>						
<i>DUOXA2</i>						
<i>NOX4</i>			+++	++		
<i>PAX8</i>	+++	+++		+++	+++	
<i>SLC16A2</i>		+++	+	+++		
<i>SLC26A4</i>					+	
<i>SLC5A4</i>					+	
<i>TG</i>						
<i>TPO</i>						
<i>TSHR</i>	++	+				
<i>TTF1</i>	+++	++	+++	+++	+++	+++
<i>TTF2</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++

SUPPLEMENTAL TABLE 2. Characterization of human thyroid carcinoma lines. The first part of table details the different histological types. The second part summarizes the genetic anomalies. The third part reveals the expression of thyroid differentiation genes and/or genes involved in iodine metabolism. Expression data are expressed semi-quantitatively (+ : 50-100 counts, ++ : 100-200 counts, +++ > 200 counts). Abreviations : FTC : Follicular thyroid cancer, PTC : Papillary thyroid cancer, PDTC : poor differentiated thyroid cancer, ATC : Anaplastic thyroid cancer.

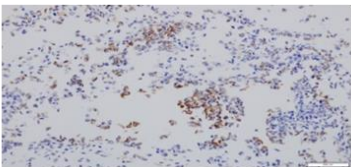
A



PAX8

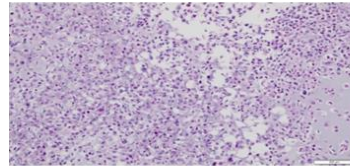


TTF1



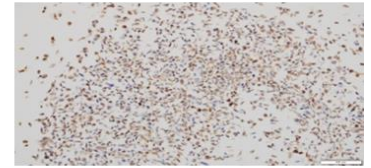
TG

B



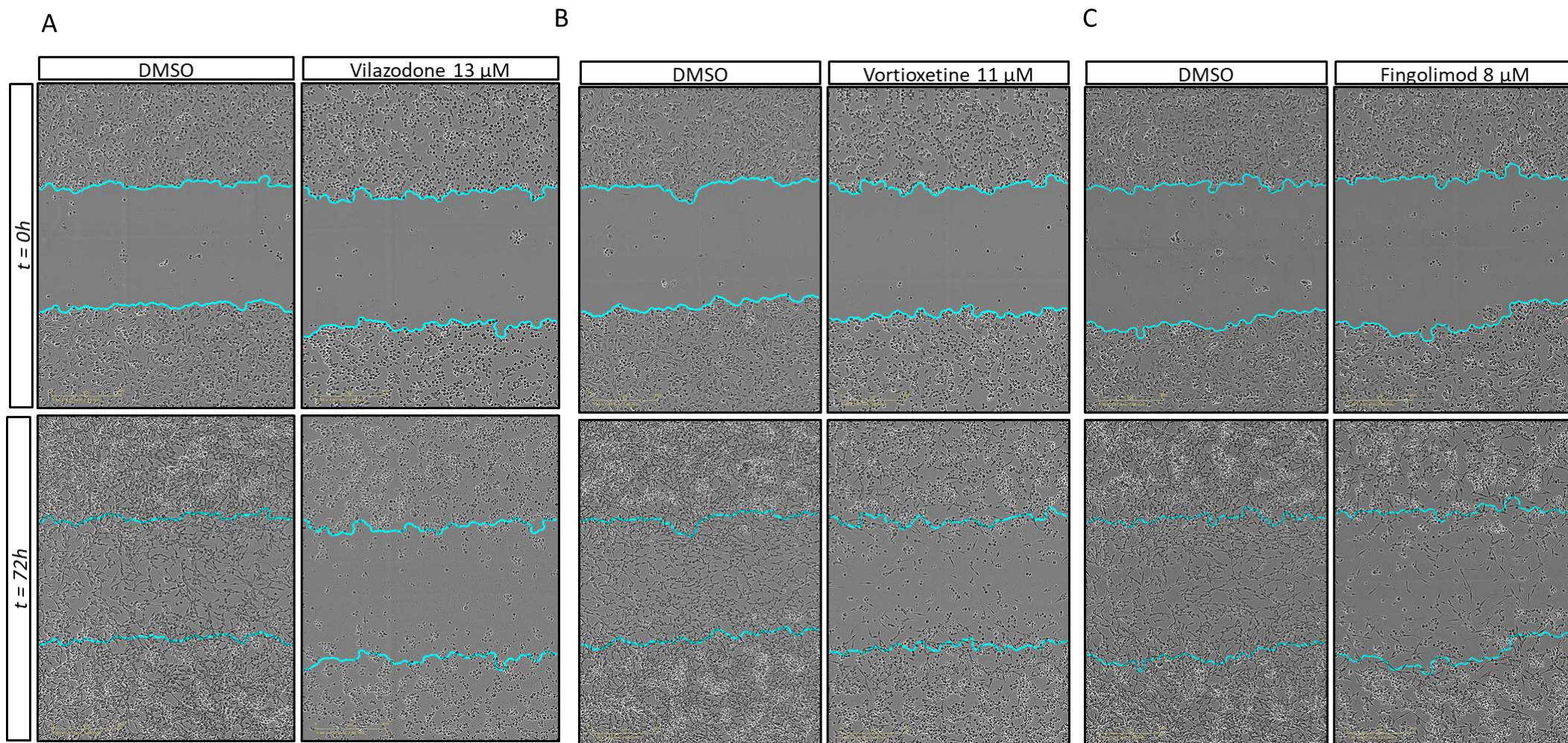
HES

C



BRAF^{V600E}

SUPPLEMENTAL FIGURE 1. Characterization of cell line derived from metastatic ascites of radioactive iodine refractory thyroid cancer. (A) Immunohistochemistry: The cells expressed PAX8, TTF1 and TG. (B) HES staining. The cells showed papillary cancer-like nuclei. (C) Immunohistochemistry. The cells were BRAF^{V600E} mutated.



SUPPLEMENTAL FIGURE 2. Representative images of scratch wound closure in NPA cells. A. Scratch wound DMSO treated cells and vilazodone treated cells at T0h and T72h. B. Scratch wound DMSO treated cells and vortioxetine treated cells at T0h and T72h. C. A. Scratch wound DMSO treated cells and Fingolimod treated cells at T0h and T72h. Scale represents 400 μm ; the blue line represents the scratch front.

3. Discussion

3.1. Résultats principaux

Dans cette étude, nous avons effectué un criblage de molécules à l'aide d'un panel de médicaments approuvés dans le but d'identifier de nouvelles thérapies qui peuvent être facilement traduites en clinique. Nous avons évalué 17 médicaments approuvés qui ciblaient au moins un des 10 RCPG dérégulés dans les tissus tumoraux, ayant une cible thérapeutique et étant exprimés au sein des lignées thyroïdiennes (*ADORA1*, *CHRM3*, *CXCR7*, *EDNRB*, *F2R*, *GABBR2*, *HRH1*, *HTR7*, *P2RY6*, *S1PR2*). Testés seuls, trois agents (Vilazodone, Vortioxétine, Fingolimod) étaient efficaces à plus de 60% sur la mortalité cellulaire à des concentrations de l'ordre du micromolaire. Selon le sous-type de lignée cellulaire, ces médicaments ont également inhibé la migration et l'invasion. En combinaison avec le lenvatinib ou le sélumétinib, la vortioxétine et le fingolimod ont augmenté l'efficacité des ITK.

3.2. Détection de l'expression de l'ARNm des RCPG dans les lignées cellulaires

3.2.1. Panel des RCPG utilisés pour le criblage pharmacologique

Dans la première partie de l'article nous avons évalué le niveau d'expression des ARNm codant pour les différents RCPG cibles dans des lignées thyroïdiennes. Nous nous sommes focalisés sur les 25 RCPG exprimés de manière différentielle entre tissu sain et tissu tumoral dans les tissus humains d'après les résultats de la première partie de la thèse et ayant une cible médicamenteuse (Suteau et al., 2021). L'objectif était d'identifier ceux pour lesquels le niveau d'expression était détectable pour un éventuel ciblage pharmacologique ultérieur. En raison de leur faible expression au niveau protéique et le manque d'anticorps validés, la détection des RCPG repose essentiellement sur l'utilisation de méthodes de quantification de l'ARNm. Nous avons récemment proposé une nouvelle méthode pour détecter et quantifier un large panel de RCPG avec la technologie Nanostring nCounter (Suteau et al., 2021). Avec cette approche, nous avons pu détecter 10 récepteurs pour lesquels le niveau d'expression de l'ARNm était suffisamment élevé dans au moins une lignée cellulaire de carcinome thyroïdien. Ainsi, nous avons sélectionné *ADORA1*, *CHRM3*, *CXCR7*, *EDNRB*, *F2R*, *GABBR2*, *HRH1*, *HTR7*, *P2RY6* et *S1PR2*.

Une difficulté de l'approche par la technologie Nanostring repose sur le fait que cette méthode est bien validée pour réaliser de l'expression différentielle de gènes mais qu'il n'existe pas de seuils clairs pour déterminer la présence ou l'absence d'expression de gènes (Bondar et al., 2020; Kuczler et al., 2022). Nous avons donc réalisé une validation par RT-qPCR avec des résultats parfois discordants. Le nombre de passages différent légèrement entre les deux analyses. Or nous savons que l'expression des RCPG peut diminuer avec le nombre de passages (Kaur et al., 2017). De nouvelles analyses avec d'autres couples d'amorces sont également en cours.

Même s'il est difficile de dessiner un profil d'expression selon la lignée pour un panel aussi restreint que 25 gènes, il semblerait que les lignées FTC-133 et XTC soient les lignées avec le plus de gènes codant pour les RCPG d'intérêt (8/25). L'ensemble des RCPG exprimés étaient communs aux deux lignées. Au niveau génétique, ces deux lignées sont considérées comme des lignées « sauvages » dans le sens où elles ne présentent pas de mutations sur BRAF ou de réarrangements de RET/PTC. Elles sont dérivées de cancers de type folliculaire (folliculaire pour FTC-133 et oncocytaire pour XTC). La seule lignée étudiée présentant un réarrangement de RET/PTC1 était la lignée TPC-1. A la différence de FTC-133 et XTC, il s'agissait de la lignée avec le moins de gènes exprimés de manière

significative (4/25). Enfin, pour les trois lignées présentant une mutation de BRAF^{V600E} (BCPAP, ARO, NPA), le profil était assez hétérogène. Une des explications vient peut-être du fait qu'elles ne présentent pas le même type histologique et le même degré de différenciation (NPA, papillaire > BCPAP, peu différencié > ARO, anaplasique). Enfin, en fonction du type histologique, la réponse aux ITK était différente. Le Tableau 19 reprend les données d'IC50 et d'efficacité maximale du lenvatinib et du selumetinib dans chacune des lignées.

	Selumetinib		Lenvatinib	
	Log ₁₀ (IC50) (nM)	Max inhibitory (%)	Log ₁₀ (IC50) (nM)	Max inhibitory (%)
NPA	2,53±0,39	58,47±4,96	4,13±0,41	67,98±3,12
TPC-1	3,34±0,10	64,59±0,68		
XTC	5,16±1,51	35,76±2,35	4,36±0,84	55,71±3,80
ARO	2,49±0,20	74,54±0,78	5,82±0,96	42,15±1,10
FTC-133	5,21±0,74	30,23±2,85	4,60±0,85	44,33±2,81
BCPAP	2.45±1.03	-35±17	2.82±0,11	59,69±6,20

Tableau 19 : Profil de sensibilité et d'efficacité du Lenvatinib et du Selumetinib dans les 6 lignées utilisées pour le criblage pharmacologique.

3.2.2. Profil d'expression des ARNm codant pour les RCPG dans les lignées thyroïdiennes

Au-delà de ces 25 RCPG, j'ai pu réaliser le profil transcriptomique complet de 371 RCPGs au sein des 6 lignées du laboratoire avec la technologie Nanostring nCounter. Avec cette approche, un seuil > 40 counts a été sélectionné pour la détection des gènes de RCPG (Kuczler et al., 2022). De façon globale, les 10 RCPG les plus exprimés étaient GPR56, GPR126, CD97, LGR4, GPRC5A, GRASP1, FZD1, FZD6, ELTD1, TM7SF1 (Figure 21).

Nous avons pu également comparer nos données à celles provenant de deux autres méthodes de détection à haut débit de l'expression de l'ARNm pour établir le profil d'expression des RCPG au sein des lignées thyroïdiennes : microarray pour les données de l'université de Colorado et RNA-Seq pour la base de données CCLE (*Cancer Cell Line Encyclopedia*). Nous avons donc à notre disposition 44 lignées provenant de l'université de Colorado (Landa et al., 2019) et 11 lignées du CCLE. Nous n'avons identifié aucun cluster en fonction du type histologique ou du profil mutationnel (RAS, BRAF, RET-PTC). Une des problématiques avec le microarray était l'absence de seuil existant pour définir la présence ou l'absence du récepteur. Les RCPG les plus exprimés étaient FZD6, GPR56, GPRC5A, ADORA2B, GPR176, CD97, FZD2, OPN3, FZD7 et, OPN1SW. Pour le RNA-Seq, un seuil > 1 TPM a été sélectionné pour la détection du GPCR ARNm. Ainsi, pour les 11 lignées cellulaires de carcinome thyroïdien de la CCLE (tous réalisés par RNA-Seq), les 10 récepteurs les plus exprimés étaient : GPR37, DRD5, CHRM5, GPR84, GPR158, FZD6, GLP1R, CCR4, AGTR1, GPR17. Nous avons comparé les 371 RCPG les plus fortement exprimés dans chacune des 3 cohortes. FZD6, F2RL1 et LGR4 étaient fortement exprimés dans toutes les lignées de cellules thyroïdiennes.

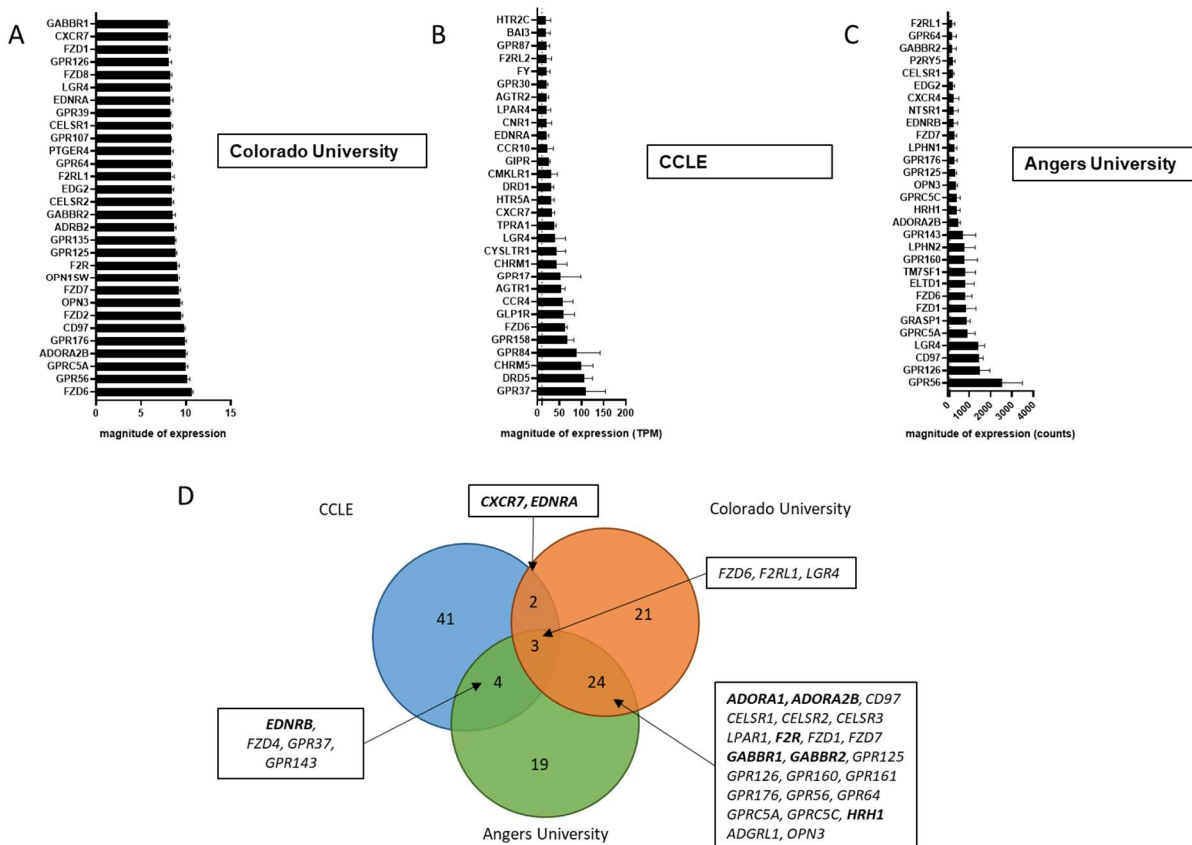


Figure 21 : Expression des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) dans 51 lignées cellulaires thyroïdiennes. Les 30 RCPG les plus exprimés ainsi que leur niveau d'expression sont représentés pour les lignées cellulaires de l'Université du Colorado (A), de la CCLE (B) et de l'Université d'Angers, correspond à notre étude (C). (D) Diagramme de Venn montrant le nombre de RCPG fortement exprimés et partagés dans les lignées cellulaires de carcinome thyroïdien isolées à partir de trois études différentes à partir d'un panel de 371 RCPG.

3.3. Criblage pharmacologique

Le traitement actuel des cancers s'oriente de plus en plus vers des traitements personnalisés. Actuellement, pour le cancer de la thyroïde, cette personnalisation du traitement passe le plus souvent par un ciblage de certaines mutations ou gènes de fusions connus. Le criblage pharmacologique à haut débit est une autre alternative permettant de tester un nombre très important de composés actifs. En association au profil génétique, cette approche est par exemple utilisée dans les hémopathies malignes pour guider le choix des traitements (Lee et al., 2018).

Pour identifier les molécules qui ciblent les RCPG et qui peuvent inhiber la viabilité des cellules cancéreuses de la thyroïde, nous avons donc développé, en collaboration avec le service de pharmacologie-toxicologie du CHU d'Angers (Pr Marie BRIET), une plateforme de criblage pharmacologique en format de plaque 384 puits. Cette étude a permis de montrer la faisabilité d'une telle approche y compris dans le cancer de la thyroïde. Plusieurs lignées cellulaires dérivées de cancers de la thyroïde avec différents types histologiques et différentes mutations génétiques ont été utilisées pour le criblage. Nous avons pu analyser simultanément 19 médicaments (17 molécules ciblant des RCPG et 2 ITK) à 8 concentrations différentes (2nM à 20 µM). L'objectif à terme étant de développer un criblage *ex vivo*, nous avons déterminé les concentrations plasmatiques retrouvées chez

l'homme dans les études de pharmacodynamie/pharmacocinétique. Ainsi, la gamme de concentrations utilisées permettait ainsi de couvrir les concentrations plasmatiques chez l'homme et les concentrations utilisées *in vitro* qui sont souvent 10 à 1000 fois plus élevées.

En réalité, peu d'études ont utilisé un criblage à haut débit de librairie de médicaments pour de nouvelles thérapies dans le cancer de la thyroïde (Zhang et al., 2012, 2015, 2016b). Dans ces études, un large panel de médicaments cliniques (de 2816 à 5200 médicaments) a été évalué sur des lignées cellulaires. Ceci nécessite une disponibilité de matériels biologiques et d'un temps important d'analyses au vu de la quantité de données générées. Dans notre travail, nous avons préféré limiter le nombre de composés testés afin de rendre ce test facilement transposable en test clinique. En effet, nous avons également pu évaluer l'effet de ces molécules sur un échantillon *ex vivo*. A notre connaissance, cette approche *ex vivo* a été peu évaluée dans le cancer de la thyroïde (Riley et al., 2019). Une des raisons est probablement la rareté des échantillons liquides et la difficulté de culture des explants solides.

Le criblage de médicaments a permis d'identifier 3 composés actifs sur les différentes lignées cellulaires. Les données en format miniaturisé, ici en 384 puits, pouvant parfois différer avec l'étude en plus grand format, nous avons, pour ces trois molécules, confirmé les données obtenues en format 384 puits en format 96 puits, validant ainsi le modèle et la possibilité d'un criblage rapide en clinique. De plus, *in vitro*, le traitement par la vilazodone, vortioxétine et fingolimod a inhibé la prolifération, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses de la thyroïde.

3.3.1. Vilazodone

La vilazodone est un inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine, utilisé comme antidépresseur. La cible principale est le récepteur de la sérotonine (récepteur 5HT1a) mais il cible également les récepteurs 5-HT4, les récepteurs de la dopamine (D2, D3) et le récepteur H1 de l'histamine qui était surexprimé dans le carcinome thyroïdien réfractaire (Heinrich et al., 2004; Suteau et al., 2021). Il n'a jamais été rapporté dans le cancer de la thyroïde. La vilazodone a été utilisée dans une seule étude dans le cancer du sein et a montré une inhibition de la prolifération cellulaire *in vitro* (Gwynne et al., 2017). Un avantage important de la vilazodone est le fait de n'avoir pas d'action sur le Cytochrome CYP3A4, qui métabolise un nombre important de chimiothérapies (Laughren et al., 2011).

Utilisée seule, dans notre étude, la vilazodone avait des effets assez modérés et variables selon les lignées étudiées (réduction de la viabilité tumorale de 15 à 50% à 20 μ M). La concentration minimale pour avoir un effet cytotoxique était de 9 μ M dans les lignées ARO et NPA. Les effets étaient non significatifs dans les lignées TPC-1, BCPAP et FTC-133. Ces résultats interrogent sur les mécanismes moléculaires sous-jacents. En effet, le gène *HRH1* était retrouvé exprimé dans l'ensemble des lignées à l'exception de la lignée NPA. Or cette lignée était l'une des plus sensibles à la Vilazodone. A l'inverse, BCPAP et FTC-133 étaient les lignées exprimant, au niveau messager, le plus le récepteur et pour lesquelles la molécule n'avait pas d'effet significatif. En reprenant les données d'expression de l'ensemble des RCPG au sein des lignées, nous voyons que *HTR1A*, la principale cible de la vilazodone, ainsi que les autres cibles *HTR4*, *DRD2*, *DRD3* n'étaient exprimés par aucune des lignées. L'effet pourrait donc passer par une autre voie, telle que l'inhibition du transporteur de la sérotonine, SERT, connu pour

être une autre cible de la vilazodone (Heinrich et al., 2004). La concentration sérique retrouvée chez l'homme est en moyenne de 0,2µM. Ainsi, la concentration efficace *in vitro* était environ 50 à 100 fois plus élevée.

La vilazodone a précédemment été testée en combinaison avec la chimiothérapie dans les xénogreffes de cancer du sein avec un effet synergique (Gwynne et al., 2017). Dans notre étude, l'efficacité et la puissance du Lenvatinib ou du Selumetinib n'ont pas été statistiquement modifiées en présence de la vilazodone.

3.3.2. Vortioxetine

La vortioxétine est également un agent antidépresseur et est approuvée pour le traitement des états dépressifs majeurs. Nous avons choisi ce médicament car il agit principalement comme un antagoniste du récepteur de la sérotonine HTR7, qui est sous-exprimé dans les cancers de la thyroïde (Bang-Andersen et al., 2011; Suteau et al., 2021). Il agit également comme antagoniste des récepteurs 5-HT2A, 5A, 6 et agoniste partiel des récepteurs 5-HT1A et 5-HT1B (Bang-Andersen et al., 2011). Il n'a jamais été rapporté dans le cancer de la thyroïde. De manière intéressante, la vortioxétine a des effets cytotoxiques sur les lignées cellulaires du cancer gastrique en induisant l'apoptose et l'autophagie par la voie PI3K/AKT (Lv et al., 2020). Au-delà de son effet antitumoral, la vortioxétine a montré un effet bénéfique sur les effets secondaires aux traitements anti-cancéreux. Par exemple, il a été montré, chez l'animal, une diminution de la neuropathie induite par les chimiothérapies (sels de platine) ou encore une amélioration des troubles cognitifs induits par les traitements anti androgéniques (Micov et al., 2020; Sharp et al., 2019).

Utilisée seule, la vortioxétine avait des effets très importants dans l'ensemble des lignées étudiées avec une réduction de la viabilité tumorale de plus de 99% à 20 µM. Les premiers effets cytotoxiques étaient observés à 9 µM. Ces effets ne semblaient pas passer par le récepteur *HTR7* puisque nous avons également inclus dans notre panel de traitements deux autres antagonistes de *HTR7*, le pimozide et la lurasidone. Or ces traitements n'avaient pas entraîné d'effets sur la viabilité cellulaire. Les autres cibles de la vortioxétine (*HTR1A*, *HTR1B*, *HTR1D*, *HTR5A*, *HTR6*) n'étaient pas exprimées par les différentes lignées. Les données d'expression pour *HTR3* et *HTR2A*, également ciblés par la vortioxétine, n'étaient pas disponibles. Du fait d'un effet non linéaire, la principale hypothèse est un effet cytotoxique non spécifique. Du fait d'un effet, probablement non spécifique, la question se pose sur la toxicité sur les autres organes et donc la survenue d'effets secondaires systémiques importants. Par ailleurs, la concentration sérique retrouvée chez les patients est très faible ($C_{max}=0,05\mu M$) montrant là aussi la nécessité d'évaluer des combinaisons avec des concentrations plus faibles.

A notre connaissance, aucune combinaison de traitement n'a été déjà évaluée avec la vortioxétine. Du fait d'une cytotoxicité importante, en association avec les ITK, l'efficacité de ces derniers ont été significativement augmentée. Nous sommes en train d'évaluer des combinaisons avec des concentrations plus faibles de vortioxétine pour pouvoir effectuer des calculs de synergie.

3.3.3. Fingolimod

Le fingolimod (FTY720) est un médicament immunosuppresseur approuvé pour le traitement de la sclérose en plaques. Nous avons cherché à identifier un modulateur du récepteur S1P2 en raison de sa surexpression dans les cancers thyroïdiens réfractaires (Suteau et al., 2021). Le fingolimod est le seul médicament disponible approuvé pour les récepteurs de la sphingosine 1 (S1P1-5) (Brinkmann et al., 2002; Sobel et al., 2015). Nous avons confirmé les résultats d'une étude précédente qui a révélé que le FTY720 inhibait la prolifération et l'invasion

des cellules cancéreuses de la thyroïde dans différentes lignées cellulaires thyroïdiennes (Kalhori et al., 2016). Des résultats discordants ont été trouvés pour l'invasion dans FTC-133. Cela peut être expliqué par l'approche utilisée (tests transwell vs Scratch Wound). L'effet antitumoral du Fingolimod a été trouvé dans plusieurs cancers et est en cours d'essai pour le traitement du cancer du sein, du glioblastome et de l'astrocytome anaplasique (White et al., 2016).

Comme pour la vortioxetine, l'effet anti-tumoral était important sur l'ensemble des lignées (réduction de la viabilité cellulaire > 99% à 20µM). Cet effet était observé dès 2,5µM pour TPC-1 et BCPAP. Le mécanisme d'action pourrait passer par un ou plusieurs sous-types de récepteurs au S1P puisque selon la lignée, le sous-type préférentiel n'était pas le même (Figure 22). De plus, il a été décrit que, selon le type cellulaire et la densité en récepteur, les effets de S1P, le ligand naturel, pourrait avoir des effets anti ou pro-tumoraux (Kalhori and Törnquist, 2015; Törnquist, 2013). Ceci n'explique cependant pas les résultats pour la lignée ARO qui n'exprimait aucun des sous-types de récepteurs au S1P. Le fingolimod est décrit comme un agoniste pour le canal potassique Kir3.4 et un inhibiteur du canal cationique TRPM7 (Koyrakh et al., 2005; Qin et al., 2013). Ces données ne sont pas connues dans le cancer de la thyroïde.

Il est intéressant de noter que le Fingolimod avait des effets synergiques dans différents cancers avec différentes chimiothérapies, y compris avec des ITK (Ota et al., 2019; Takahashi et al., 2018). Malheureusement, à la concentration testée de 8µM dans notre étude, le Fingolimod avait des effets cytotoxiques seul trop important pour étudier une éventuelle synergie avec les ITK. Comme pour la vortioxetine, nous sommes en train de tester des combinaisons avec des concentrations plus faibles d'autant plus que la concentration plasmatique chez les patients est de l'ordre du nanomolaire. Cependant, il semblerait que l'effet du Fingolimod ne soit pas linéaire avec un effet *on/off* rendant difficile l'étude de ces combinaisons.

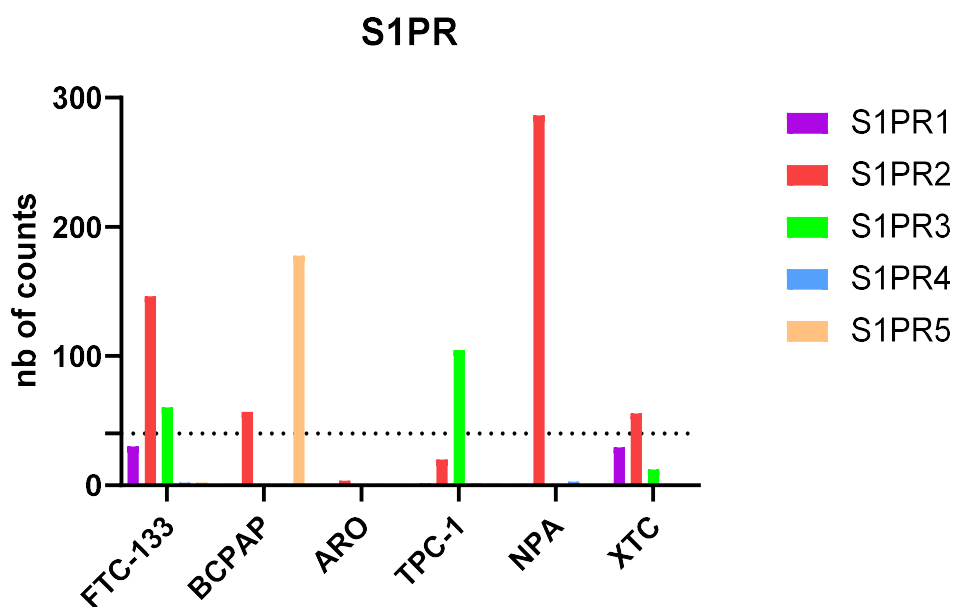


Figure 22 : Expression des récepteurs S1PR1-5 dans les différentes lignées dérivées de cancer thyroïdien. Les données transcriptomiques sont issues d'une analyse par la technologie NanoString nCounter et sont exprimés en nombre de comptage de fluorescence (seuil à 40 correspondant à une expression significative).

3.4. Du prélèvement ex-vivo à la création d'une lignée cellulaire

Le criblage pharmacologique à haut débit est une approche intéressante permettant de cribler beaucoup de composés actifs. Cependant, celui-ci est fait le plus souvent sur des lignées cellulaires humaines issues de la tumeur thyroïdienne initiale et dont la iodo-résistance a été obtenue après exposition continue à I131. Nous avons montré la faisabilité d'une mise en culture d'épanchement d'ascite métastatique issu de cancer thyroïdien pour évaluer la sensibilité à des médicaments. Nous avons donc montré la rapidité de l'approche puisqu'il a fallu moins de 15 jours entre la réception du prélèvement et le criblage pharmacologique. La principale limite réside dans la disponibilité des prélèvements. En effet, la présence d'ascite métastatique est très rare, estimée à moins de 0,1% des cancers thyroïdiens (Vyas and Harigopal, 2016). Une alternative serait l'utilisation d'épanchement pleural survenant chez environ 20% des patients avec métastases pulmonaires (Broome et al., 2020). Nous avons pu également récupérer du liquide pleural excédentaire d'un épanchement pleural issu d'un cancer anaplasique. Cependant, nous n'avons pas pu maintenir et obtenir une expansion cellulaire suffisante. La raison principale provenait de la présence très important de fibroblastes ayant une prolifération beaucoup plus importante que les cellules thyroïdiennes tumorales. Un tri cellulaire préalable semble donc nécessaire.

Du fait de la croissance spontanée des cellules issues de l'ascite tumorale, huit mois après la mise en culture du prélèvement initial, nous avons pu, après sélection clonale (2 dilutions limites), créer une véritable lignée issue d'un prélèvement métastatique et spontanée réfractaire à l'iode. Il s'agissait d'une ligne cellulaire adhérente faite de cellules présentant un rapport nucléo-cytoplasmique élevé. Cette lignée présentait également les marqueurs de différenciation thyroïdienne avec perte d'expression de *NIS* et *TPO*. Son temps de doublement était estimé à 6 jours (Figure 23). En raison du délai d'obtention, cette nouvelle lignée cellulaire dérivée d'une ascite métastatique d'un cancer thyroïdien réfractaire semble plus pouvoir être utilisée comme un nouvel outil pour la recherche dans le cancer de la thyroïde plus qu'un modèle pour de la médecine personnalisée.

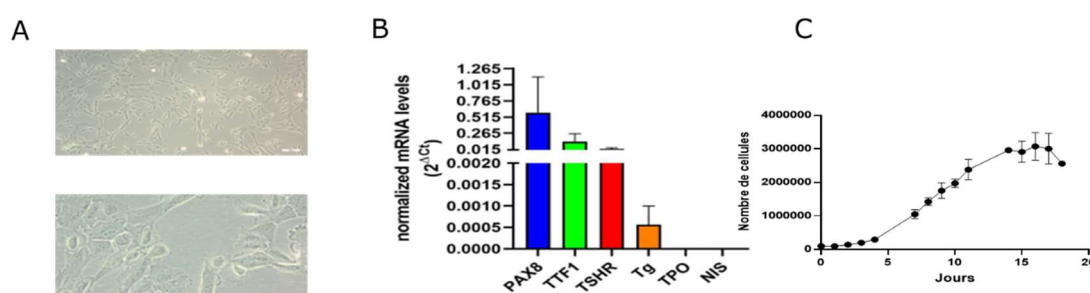


Figure 23 : Caractérisation de la lignée cellulaire dérivée de l'ascite métastatique d'un patient présentant un cancer thyroïdien réfractaire à l'iode radioactif.

(A) Aspect morphologique en microscopie optique. (B) Profil d'expression en RT-qPCR des marqueurs de différenciation thyroïdienne. (C) Courbe de croissance cellulaire (n=3) avec temps de doublement estimé à 6 jours.

Fort des premiers résultats au sein du cancer thyroïdien, choisi pour sa fréquence, nous avons souhaité transposer ce concept aux autres tumeurs endocrines, plus rares, mais aux enjeux pronostiques et thérapeutiques tout aussi important.

Partie III : Atlas des récepteurs couplés aux protéines G dans les tumeurs neuroendocrines

1. Introduction

Les analyses génétiques visant à identifier des mutations ou des modifications d'expression de certains gènes ont permis d'identifier des traitements plus spécifiques, tendant vers une médecine personnalisée ou de précision (Chae et al., 2017; Schwaederle et al., 2015). Malgré ces progrès, de nouveaux traitements sont nécessaires pour la plupart des cancers. Comme nous l'avons vu précédemment, les RCPG *via* la signalisation post-récepteur joueraient un rôle important dans la régulation des fonctions cellulaires impliquées en cancérologie (croissance/prolifération, apoptose...) (Dorsam and Gutkind, 2007; O'Hayre et al., 2013). Cependant, ils sont sous-exploités comme cibles thérapeutiques dans le cancer (Sriram and Insel, 2018). Cette sous-utilisation des RCPG en tant que cibles thérapeutiques peut être liée, du moins en partie, au manque d'information concernant leur expression par les cellules cancéreuses et les cellules du microenvironnement tumoral. Les précédentes parties de ce travail de thèse ont permis de proposer une nouvelle approche afin d'identifier des RCPG exprimés de manière différentielle dans les cancers non médullaires de la thyroïde en comparaison au tissu sain adjacent et pour lesquels des médicaments approuvés pourraient avoir un effet antitumoral. Les données génomiques de pan-cancer ont fourni des données intéressantes sur un certain nombre de cancers, en particulier dans le domaine des RCPG (Sriram et al., 2019a; Wu et al., 2019). Cependant, les tumeurs plus rares n'ont pas bénéficié de ce type de caractérisation, ce qui est le cas pour la plupart des tumeurs endocrines à l'exception des cancers papillaires de la thyroïde (Agrawal et al., 2014).

Les tumeurs endocrines sont des tumeurs qui se développent à partir de glandes endocrines (thyroïde, surrénales, parathyroïdes, hypophyse, pancréas, ovaires, testicules) ou à partir de cellules neuroendocrines situées le plus souvent dans les glandes endocrines, mais aussi dans les systèmes gastro-intestinal et broncho-pulmonaire. En dehors des cancers non médullaires de la thyroïde, on les désigne sous le terme de tumeurs neuroendocrines. Bien qu'il existe de nombreux types de tumeurs, elles sont abordées comme un groupe à part entière car les cellules de ces tumeurs ont plusieurs caractéristiques communes. En effet, ces tumeurs exposent à deux risques, sécrétoires et oncogéniques. Les tumeurs sont dites fonctionnelles si elles sécrètent une ou plusieurs hormones. Le risque tumoral est variable en fonction des tumeurs puisque la plupart sont des tumeurs bénignes même si l'évolution est souvent lente et difficilement prévisible.

L'introduction générale de cette thèse s'étant attachée aux cancers non médullaires de la thyroïde, une brève description générale des tumeurs endocrines étudiées dans cette dernière partie de la thèse sera réalisée.

1.1. Cancer médullaire de la thyroïde

Le cancer médullaire de la thyroïde (CMT) est une tumeur provenant des cellules parafolliculaires, ou cellules C, de la glande thyroïde sécrétant de la calcitonine. Il représente moins de 5 % de tous les cancers de la thyroïde, soit une incidence inférieure à 1 cas pour 100 000 (Wells et al., 2015). Environ 70 % d'entre eux présentent des métastases ganglionnaires au diagnostic et un peu moins de 10 % des patients une dissémination métastatique à distance (foie, os, poumons, cerveau principalement).

Le CMT se présente sous une forme héréditaire dans environ 20-25% des cas et comme une tumeur sporadique dans les autres cas. Le CMT sporadique a une incidence maximale dans la cinquième ou sixième décennie de la vie, tandis que les CMT héréditaires ont une incidence maximale dans la deuxième ou troisième décennie de la vie (Hirsch et al., 2018). Les mutations du proto-oncogène *RET*, un récepteur à activité tyrosine kinase, dans le tissu de la crête neurale de la glande thyroïde peuvent en effet entraîner le développement d'une hyperplasie des cellules C et d'un CMT. Ces variants pathogènes conduisent à une activation constitutive du récepteur. Vingt à 25% des CMT sont familiaux et sont associés à des mutations germinales de *RET* dans le cadre d'une Néoplasie endocrinienne multiple de type 2 (2A, 2B) ou d'un CMT familial (Wells et al., 2015). Quarante à 50% des CMT sporadiques présentent également des mutations de *RET* acquises (Wells et al., 2015). Les NEM2 sont des syndromes de transmission autosomique dominant. Dans les NEM2A, le CMT peut être associé à un phéochromocytome dans 30-50 % des cas et/ou à une hyperparathyroïdie dans 10 % des cas. Les NEM2B présentent des CMT plus agressifs et d'apparition plus précoce. Ils sont associés à un phéochromocytome dans 50 % des cas (Tableau 20) (Mathiesen et al., 2022).

Pathologie	NEM2A	CMT Familial	NEM2B
CMT	90%	100%	100%
Phéochromocytome	30-50%	Non	50%
Hyperparathyroïdie	10 %	Non	Non
Aspect Marfanoïde	Non	Non	70%
Névromes muqueux	Non	Non	10-20%
Anomalies associées (Ganglioneuromatose Anomalies gastrointestinales, urinaires Hypertrophie nerfs de la cornée...)	Non	Non	40%

Tableau 20 : Syndromes héréditaires associés au cancer médullaire de la thyroïde.

Abréviations : NEM : Néoplasie Endocrinienne multiple, CMT : Cancer médullaire de la Thyroïde

La thyroïdectomie totale est indiquée pour tous les patients atteints de CMT. La place du curage cervical central prophylactique est maintenant discuté et peut dépendre du taux de calcitonine préopératoire (Filetti et al., 2019; Wells et al., 2015). Tous les patients doivent être évalués pour détecter une hyperparathyroïdie et un phéochromocytome avant la chirurgie. En cas de maladie héréditaire, une thyroïdectomie prophylactique est proposée en cas de mutation à risque élevé avec un âge qui varie selon la mutation. Le suivi et la prise en charge seront ensuite guidés par l'évolution du taux de calcitonine et d'ACE (antigène carcinoembryonnaire) circulants. La plupart des patients ont un bon pronostic après la chirurgie dans les cas de maladie au stade précoce. Ainsi, la survie à cinq ans pour les stades I à III est de 93 %, contre 28 % pour le stade IV. En cas de maladie locorégionale non résécable ou en présence de plusieurs métastases évolutives et/ou symptomatiques, les ITK comme le vandétanib et le cabozantinib peuvent être indiqués. Le vandétanib est un inhibiteur oral des récepteurs à activité tyrosine kinase qui inhibe RET, EGFR et VEGFR. Le cabozantinib est également un inhibiteur multikinase oral qui inhibe MET, RET et VEGFR2. Ils ont montré une amélioration de la survie sans progression par rapport au placebo (Elisei et al., 2013; Wells et al., 2012). Bien que ces inhibiteurs multikinases aient fait preuve d'une certaine efficacité, les taux d'effets indésirables entraînant une réduction de dose voire l'arrêt du traitement sont généralement élevés (Tableau 21).

Molécule	Phase	Efficacité	Effets secondaires		
			Effets secondaires graves (\geq grade 3) et \geq 5%	Réduction de doses	Interruption de traitement
Cabozantinib (Elisei et al., 2013)	Phase III (contre placebo)	RP : 28% vs 0% (p<0.01) ; SSR : 11.2 vs 4 mois (p<0.01)	Diarrhée (16%), Syndrome pied-main (13%), fatigue (9%), HTA (8%),	79%	17%
Vandetanib (Wells et al., 2012)	Phase III (contre placebo)	RP : 45% vs 13% (p<0.001) ;	Diarrhée (11%), HTA (9%), QT long (8%), fatigue (6%)	35%	12%
Selpercatinib (Wirth et al., 2020)	Phase I/II	RC : 9% ; RP : 60% ; 82% sans progression à 1 an	HTA (12%), cytolysé hépatique (11%)	30%	2%
Pralsetinib (Subbiah et al., 2021a)	Phase I/II	RC : 5%, RP : 67% ; 84% sans progression à 1 an	Neutropénie (14%), HTA (17%), lymphopénie (12%)	46%	4%

Tableau 21 : Etudes cliniques évaluant l'efficacité et la tolérance d'inhibiteurs de tyrosine kinase approuvés dans le cancer thyroïdien réfractaire éligible à une thérapie ciblée.

Abréviations : RC : réponse complète, RP : réponse partielle, SSR : survie sans récurrence.

Récemment, des inhibiteurs spécifiques de RET, le selpercatinib et le pralsetinib, ont été approuvés par la FDA dans les CMT avec mutation de RET (Subbiah et al., 2021a; Wirth et al., 2020). Ces inhibiteurs de RET ont amélioré nettement le traitement d'une partie des patients atteints d'un CMT. Malgré des taux de réponse et des résultats de survie très intéressants, certains patients ne répondent pas à ces thérapies, et ceux qui y répondent présentent un échappement au traitement. Cela est dû à la présence de mécanismes de résistance (Subbiah et al., 2021b).

La connaissance croissante de la physiopathologie du CMT, ainsi que l'incorporation rapide des données de NGS dans la pratique clinique, permettent le développement de nouvelles approches thérapeutiques telles que de nouvelles combinaisons de médicaments. D'autres modalités thérapeutiques ont été mises au point, notamment l'immunothérapie, les vaccins tumoraux, l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-ACE radiomarqués ou encore la radiothérapie métabolique avec des analogues de la somatostatine marqués au Lu¹⁷⁷ ou au Y⁹⁰ (Hayes et al., 2021). Des études supplémentaires sont nécessaires dans ce contexte afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour améliorer la survie et la qualité de vie des patients.

1.2. Tumeurs neuroendocrines hypophysaires

Les adénomes hypophysaires appelés aujourd'hui tumeurs neuroendocrines hypophysaires (PitNET, *Pituitary neuroendocrine tumors*) sont parmi les tumeurs cérébrales primitives les plus fréquentes avec les méningiomes et les gliomes. Elles représentent environ 10-15% de l'ensemble des tumeurs cérébrales. Les PitNET sont classées selon leur taille et le type histologique. On désigne comme microadénomes les tumeurs faisant moins de 10 mm alors que les tumeurs de plus de 10 mm sont appelées macroadénomes voire adénomes hypophysaires géants si elles dépassent 40 mm. Les PitNET dérivent des différents types cellulaires de l'anté-hypophyse à savoir les cellules lactotropes, sécrétant la prolactine, somatotropes, sécrétant la GH (*growth hormone*), corticotropes, sécrétant l'ACTH (*Adreno CorticoTropic Hormone*), gonadotropes, sécrétant la FSH (*Follicle Stimulating Hormone*) et la LH (*Luteizing Hormone*) ou thyrotropes, sécrétant la TSH (*Thyroid Stimulating Hormone*) (Figure 24). En fonction de leur taille, de leur localisation et d'une éventuelle sécrétion, les PitNET peuvent être à l'origine de trois syndromes :

- un syndrome tumoral révélé le plus souvent par des troubles visuels (liés à la compression du chiasma optique et/ou l'envahissement du sinus caverneux),
- un syndrome d'hypersécrétion hormonale : hyperprolactinémie, acromégalie secondaire à une sécrétion anormale de GH, maladie de Cushing secondaire à une hypersécrétion d'ACTH stimulant secondairement la production de cortisol au niveau surrénalien, hyperthyroïdie centrale secondaire à une sécrétion anormale de TSH,
- un syndrome d'insuffisance antéhypophysaire pouvant toucher une ou à plusieurs hormones.

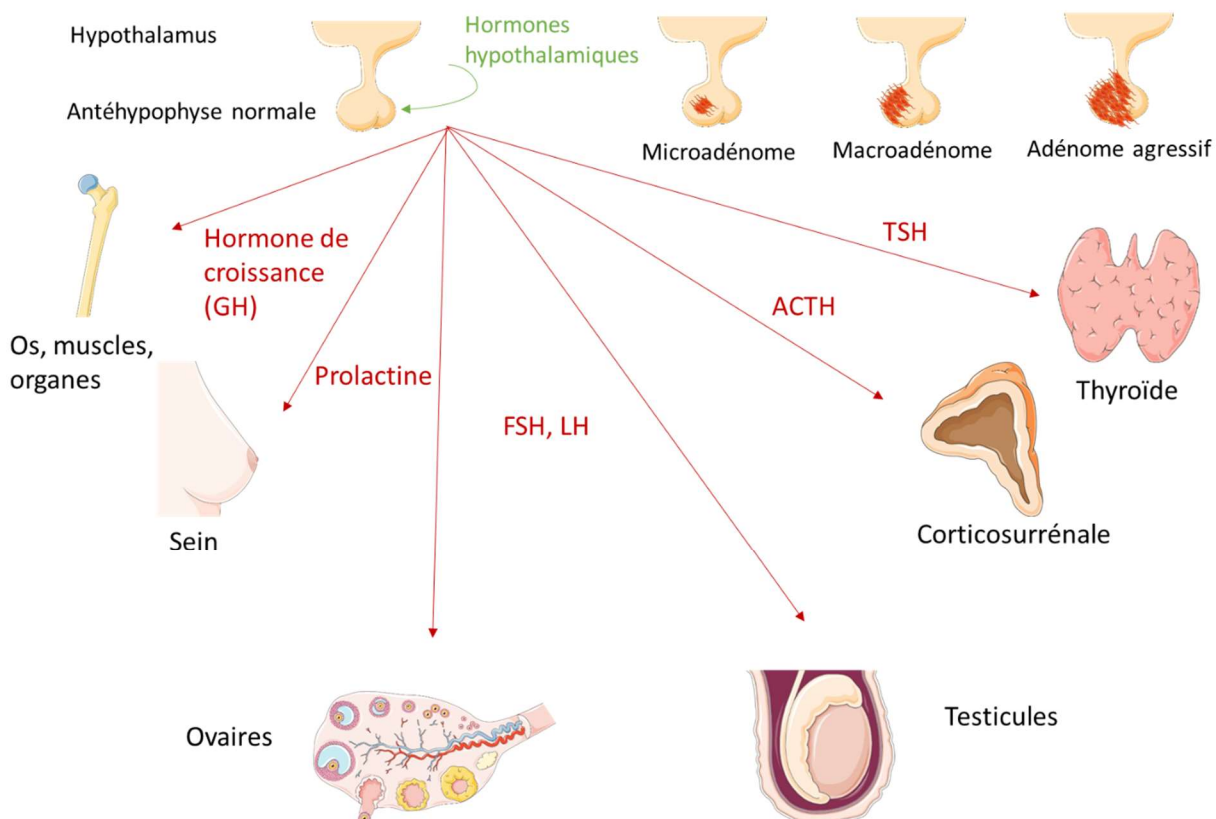


Figure 24 : Représentation schématique des adénomes hypophysaires.

Abréviations : GH : Growth Hormone, FSH : Follicle Stimulating Hormone, LH : Luteizing Hormone, ACTH : Adreno CorticoTropic Hormone, TSH : Thyroid Stimulating Hormone

La plupart des PitNET sont sporadiques puisqu'on considère que seulement 5% des tumeurs ont un terrain génétique sous-jacent (Vasilev et al., 2020). Les mutations d'*AIP* et les duplications de *GPR101* sont retrouvées dans les adénomes familiaux non syndromiques (Vasilev et al., 2020). Les autres gènes de prédisposition sont associés au développement d'adénome hypophysaire et à d'autres tumeurs : *MEN1* et la *NEM1*, *CDKN1B* dans la *NEM4*, *PRKAR1A* dans le syndrome de Carney, *SDH* et *MAX* dans les formes associées à un phéochromocytome/paragangliome (Tableau 22).

	Anomalies germinales	Autres principales composantes du syndrome
Isolé	AIP	---
	GPR101	---
Syndromique	MEN1, CDKN1B	NEM1, 4 : Hyperparathyroïdie primaire, tumeur neuroendocrine pancréatique, adénomes surrenaliens, lipomes, méningiomes...
	PRKAR1A	Complexe de Carney : Myxome, dysplasie micronodulaire des surrenales, lésions pigmentées de la peau et des muqueuses
	SDHx, MAX	3Pa : paragangliome/phéochromocytome, carcinome rénal, GIST
	DICER1	Blastome pleuropulmonaire, goitre, cancer thyroïdien, néphrome kystique, tumeur à cellules de Sertoli-Leydig.
	GNAS	McCune–Albright : Dysplasie fibreuse, endocrinopathies hyperfonctionnelles, taches café-au-lait.

Tableau 22 : Altérations génétiques dans les PitNET.

Les PitNET sont pour la plupart bénignes et de croissance lente. Leur prise en charge implique une équipe multidisciplinaire (endocrinologues, neurochirurgiens, radiologues, ophtalmologues). Dans la majorité des cas l'exérèse chirurgicale suffit à traiter la maladie. Pour environ 30% des patients on observe après le traitement standard une sécrétion hormonale résiduelle ou une récurrence (Tampourlou et al., 2017). En termes de traitement médical, deux familles de RCPG sont déjà ciblées dans la prise en charge des PitNET, à savoir les récepteurs de la somatostatine et les récepteurs de la dopamine. Les analogues de la somatostatine et les agonistes dopaminergiques ont montré leur efficacité en termes de sécrétions et/ou de réduction du volume tumoral dans les adénomes non fonctionnels, les adénomes lactotropes, somatotropes, corticotropes et thyroïdoprotropes (Illouz et al., 2021; Melmed et al., 2011; Peverelli et al., 2021). Cependant, et à l'exception des adénomes lactotropes, l'efficacité globale de ces médicaments reste modeste. En effet, une résistance aux analogues de la somatostatine a été signalée chez environ 25 % des patients acromégales (Colao et al., 2011). De plus, malgré des traitements complémentaires (chirurgie, radiothérapie, traitement médical), un petit nombre de patients (<2 % des macroadénomes) présente une évolution agressive de cette maladie. Une tumeur hypophysaire est considérée comme agressive en cas de présence d'une invasion radiologique et une évolution rapide ou lorsque la croissance tumorale est significative malgré le traitement standard optimal. Un carcinome hypophysaire est défini par la présence d'une tumeur hypophysaire avec métastases cranio-spinales et/ou systémiques (Raverot et al., 2021). La prévalence des carcinomes hypophysaires est extrêmement faible, représentant moins de 0,1% de toutes les

tumeurs hypophysaires (Raverot et al., 2018). La prédiction de cette évolution agressive reste difficile à prédire même si le score HYPOPRONOS (évaluation de l'invasion et de la prolifération) semble être une classification clinicopathologique intéressante (Raverot et al., 2017). Le temozolomide, un agent d'alkylation de l'ADN, constitue la chimiothérapie de première ligne dans le cas des PitNET agressives et des carcinomes hypophysaires. Cependant, ce traitement est associé avec d'importants effets secondaires (neutropénie sévère), une réponse antitumorale variable (un tiers de patients répondeurs) et l'apparition d'une chimiorésistance (Raverot et al., 2018). La radiothérapie interne vectorisée, les thérapies ciblées (le bevacizumab, un anti-VEGF, l'everolimus, un anti-mTOR) et l'immunothérapie (anti-PD1, anti-PDL1, anti-CTLA4) ont été utilisées chez un petit nombre de patients mais ont montré une efficacité limitée (Raverot et al., 2021). Ceci montre bien l'importance d'identifier à la fois des marqueurs pronostiques et thérapeutiques permettant d'orienter vers des stratégies thérapeutiques plus efficaces afin d'améliorer les patients présentant une maladie, certes rare, mais grave.

1.3. Phéochromocytome et paragangliome

Les phéochromocytomes et les paragangliomes sont des tumeurs rares provenant du tissu chromaffine de la crête neurale. Le terme phéochromocytome désigne les tumeurs provenant de la médullosurrénale et le terme paragangliome, des tumeurs de localisation extra-surrénalienne (Figure 25). Environ 80 à 85 % des tumeurs à cellules chromaffines sont des phéochromocytomes, tandis que 15 à 20 % sont des paragangliomes.

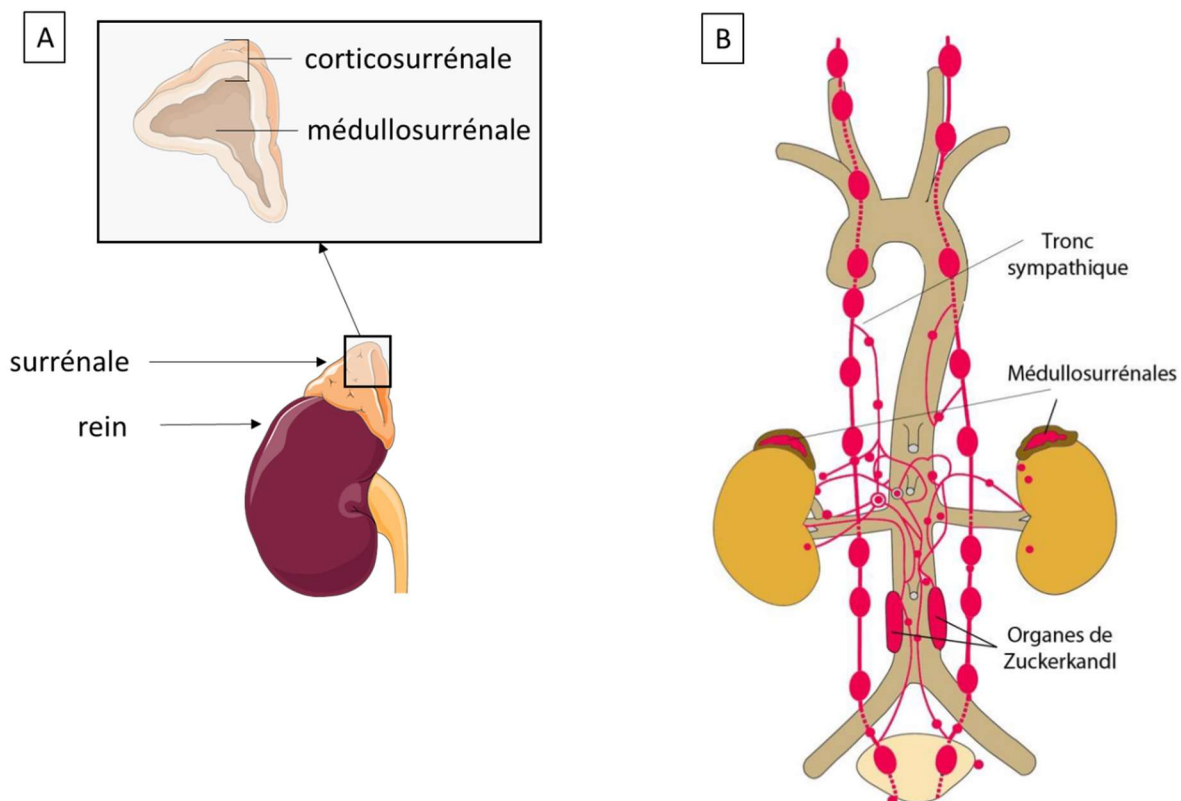


Figure 25 : Localisation anatomique des phéochromocytomes et paragangliomes.

(A) Anatomie de la glande surrénale normale. Il existe deux glandes surrénales, une au sommet de chaque rein. La partie extérieure de chaque glande est le cortex surrénalien et la partie intérieure est la médulla. (B) Anatomie du système nerveux sympathique et parasymphatique.

Le diagnostic de phéochromocytome/paragangliome est suspecté soit devant une masse surrénalienne/tissu sympathique, soit des symptômes en lien avec une sécrétion excessive de catécholamines (noradrénaline, adrénaline, dopamine), qui sera confirmée par un dosage des dérivés méthoxylés des catécholamines. Ces sécrétions de catécholamines sont à l'origine d'hypertension artérielle, de céphalées, de sueurs ou encore de palpitations (Lenders et al., 2014; Neumann et al., 2019). Il représente moins de 1% des causes d'hypertension artérielle secondaire et environ 5% des incidentalomes surrénaliens (Neumann et al., 2019). L'incidence du phéochromocytome est de 0.6 cas pour 100 000 personne-année (Hamidi et al., 2017). L'âge moyen au moment du diagnostic est de 50 ans mais varie selon la présentation clinique (incidentalome, signes cliniques, enquête génétique) avec un sex ratio de 1 dans les deux cas (Gruber et al., 2019).

Les phéochromocytomes et les paragangliomes peuvent être bénins ou malins. En l'absence d'autres critères solides, ils sont considérés comme malins en présence de métastase. Deux à 13 % des patients avec un phéochromocytome sont métastatiques et 2,5 à 50 % de ceux atteints de paragangliome (Hamidi et al., 2017). Parmi toutes ces tumeurs, on estime à environ 35 % le nombre qui surviennent dans le cadre d'une mutation génétique germinale (Fishbein et al., 2017). Certaines peuvent s'intégrer dans un syndrome (NEM2A et 2B, syndrome de von Hippel-Lindau, neurofibromatose de type 1...) ou se présenter comme des formes le plus souvent isolées héréditaires (*SDHA*, *SDHB*, *SHBC*, *SDHD*, *SDHAF2*, *FH*, *TMEM127*, *MAX*...). Les porteurs de variants pathogènes de *SDHB* ont un risque accru de développer une maladie métastatique (Tableau 23).

Maladie	Genes	Principales autres caractéristiques cliniques
Neurofibromatose de type 1	<i>NF1</i>	Café-au-lait, nodules de Lisch, lésions osseuses, gliomes optiques
Néoplasie endocrinienne de type 2	<i>RET</i>	2A : Cancer médullaire de la thyroïde, hyperparathyroïdie primaire, 2B : cancer médullaire de la thyroïde, aspect marfanoïde, névromes cutanés, ganglioneuromatose gastro-intestinale.
Maladie de von Hippel-Lindau	<i>VHL</i>	Hémangioblastomes du système nerveux central ou de la rétine, carcinome des cellules rénales, tumeurs neuroendocrines du pancréas, tumeurs du sac endolymphatique, cystadénome papillaire de l'épididyme
Paragangliomes héréditaires	<i>SDHB</i> <i>SDHD</i> <i>SDHC</i> <i>SDHA</i> <i>SDHAF2</i>	Rare cancers rénaux, GIST
Phéochromocytomes familiaux	<i>TMEM127</i> <i>MAX</i>	Rare cancers rénaux
Syndrome polycythémie-paragangliome	<i>EPAS1</i>	Polycythémie, Somatostatine
Leiomyomatose et cancer du rein	<i>FH</i>	Léiomyomes cutanés et utérins, carcinome papillaire

Tableau 23 : Anomalies génétiques associées aux phéochromocytomes et paragangliomes.

Abréviations : gastric stromal tumors

Le traitement de référence est la résection chirurgicale (surrénalectomie) encadrée par un traitement médical (α -bloquant, inhibiteur calcique en 1^{ère} intention) afin de réduire les complications cardiovasculaires périopératoires (Lenders et al., 2014). Dans le cas des phéochromocytomes/paragangliomes malins, la chirurgie peut également être utilisée comme traitement pour les tumeurs métastatiques limitées ou en réduction tumorale (*debulking*) pour les patients présentant une maladie métastatique étendue afin de réduire les symptômes et les complications liées à la taille de la tumeur. Des traitements locorégionaux comme la radiofréquence sont utilisés dans les métastases hépatiques et osseuses. La radiothérapie externe est une modalité de traitement chez les patients atteints de paragangliomes de la tête et du cou. Concernant les traitements systémiques, la radiothérapie métabolique ou des chimiothérapies peuvent être proposées dans les maladies métastatiques étendues et évolutives (Tableau 24). La radiothérapie métabolique peut être considérée comme une approche de première intention chez les patients présentant une forte captation du capteur dans toutes les lésions tumorales lorsque la tumeur est non résécable et progressive avec une charge tumorale élevée (Fassnacht et al., 2020). En ce qui concerne les chimiothérapies, aucun essai clinique de phase II ou III a été conduit pour évaluer le type de chimiothérapie. La chimiothérapie de type cyclophosphamide+vincristine+dacarbazine est souvent la première ligne de traitement proposée basée sur les résultats d'études rétrospectives (Huang et al., 2008). Une alternative est la prise de temozolomide, ayant montré une efficacité chez les patients présentant une mutation de SDHB. Des thérapies ciblées comme des ITK ou des inhibiteurs de mTOR sont en cours d'évaluation mais avec une efficacité modeste (Lenders et al., 2014). Ainsi, de nouvelles cibles thérapeutiques sont nécessaires.

Molécule	Etude	Efficacité	Effets secondaires graves (\geq grade 3)
Cyclophosphamide + vincristine + dacarbazine	Etude non randomisée, 18 ans 18 phéochromocytome/paragangliome métastatique (Huang et al., 2008)	RC : 11% RP : 44%	Neuropathie périphérique, hématototoxicité, effets gastro-intestinales
Temozolomide	Etude rétrospective, 15 phéochromocytome/paragangliome métastatique et progressif (Hadoux et al., 2014)	RP : 36%	Lymphopénie, HTA, acné, anorexie
Lutathérapie (Lu ¹⁷⁷ -DOTATATE)	Méta-analyse (12 études, 201 patients, phéochromocytome/paragangliome métastatique et/ou inopérable) (Satapathy et al., 2019)	25% de réponse objective (rémission complète ou partielle ou réponse mineure)	Neutropénie, lymphopénie, néphrotoxicité

Tableau 24 : Etudes évaluant l'efficacité et la tolérance des principaux traitements systémiques dans le phéochromocytome/paragangliome.

Abréviations : RC : réponse complète, RP : réponse partielle.

1.4. Corticosurréalome

Le corticosurréalome est une tumeur rare développée au dépend du cortex surrénalien (Figure 25). L'incidence mondiale se situe entre 0,7 et 2 cas par million d'habitants. Elle peut survenir à tout âge mais le pic d'incidence se situe entre 40 et 50 ans. Les femmes sont plus fréquemment touchées avec un sex ratio de 1.5 pour 1 (Fassnacht et al., 2018). Ces tumeurs sont révélées par une sécrétion hormonale anormale et excessive (hypercortisolisme, plus rarement une sécrétion d'androgènes) et/ou par un syndrome tumoral (douleurs abdominales, troubles digestifs...) ou sont découvertes de manière fortuite dans environ 10% des cas. Un tiers des cas environ sont diagnostiqués à des stades tardifs avec des métastases à distance. Ainsi, parmi l'ensemble des tumeurs surrénaliennes, le corticosurréalome a un mauvais pronostic, puisque moins d'un tiers des patients sont en vie à 5 ans (Fassnacht et al., 2018).

Le corticosurréalome peut être associé dans 5 à 10% des cas à des mutations germinales notamment dans la NEM1, le syndrome de Li-Fraumeni (mutation de p53) ou encore le complexe de Carney (mutation du gène *PRKAR1A*). Des variants somatiques de ces mêmes gènes ont également été retrouvés au sein des tissus tumoraux (Zheng et al., 2016). Il existe en réalité plusieurs anomalies au niveau somatique (expression ARNm, miRNA, méthylation) qui diffèrent entre les adénomes surrénaliens et les corticosurréalomes (Assié et al., 2014). La classification actuelle de l'ENSAT (Réseau européen pour l'étude des tumeurs de la surrénale) divise les corticosurréalomes en quatre stades avec une bonne performance pronostique. Les tumeurs de stade I et II sont limitées à la surrénale alors que les tumeurs de stades plus avancés sont considérées en stade III si elles sont invasives ou en stade IV si elles sont métastatiques (Fassnacht et al., 2018). Ainsi, la survie à cinq ans est de 60 à 80 % pour les tumeurs de stade I et II, diminue à 35-50 % pour les stades III, et est beaucoup plus faible en cas de maladie métastatique (0 à 28 %).

La résection chirurgicale complète est le traitement de choix pour les tumeurs localisées puisqu'il constitue le seul traitement pour espérer obtenir une guérison. Le diagnostic de corticosurréalome est affirmé par l'examen anatomopathologique. Cet examen a également une valeur pronostique puisque le risque de récurrence va être évalué selon le stade ENSAT mais aussi selon le niveau de résection chirurgicale (R0/R1) et le marqueur de prolifération Ki67. Pour les tumeurs résécables, en cas de risque important de récurrence, un traitement par Mitotane sera alors envisagé (Fassnacht et al., 2018). Pour les tumeurs non résécables ou métastatiques, la chimiothérapie (Etoposide, Doxorubicine, Cisplatine), la radiothérapie et le mitotane sont les modalités thérapeutiques actuelles (Fassnacht et al., 2018). L'association de ces traitements a montré une efficacité modeste et une forte toxicité (Tableau 25). Parmi les autres traitements systémiques, les thérapies ciblées de type ITK (sunitib, sorafenib) n'ont montré que des effets très modestes dans de petites séries (Stigliano et al., 2017). Des anticorps ciblés, comme le figitumumab (anti récepteur de l'IGF1), seuls ou en association ont été également évalués mais là encore avec une efficacité modeste. De même, l'immunothérapie n'a pas montré d'efficacité en termes de survie. En effet, les corticosurréalomes ne semblent pas être la tumeur idéale pour l'immunothérapie en raison d'une faible expression de PD-L1 ou de niveaux globalement faibles de charge mutationnelle tumorale (Stigliano et al., 2017). L'efficacité partielle des traitements actuels rend donc nécessaire l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques contre cette tumeur.

Molécule	Phase	Efficacité	Effets secondaires graves (\geq grade 3)
Etoposide-Doxorubicine- Cisplatine + Mitotane (Fassnacht et al., 2012)	Phase III (contre streptozotocine + Mitotane)	RP : 19% ; SSR : 5 vs 2.1 mois ($p < 0.01$)	Toxicité hématologique (12%), Evénements cardiovasculaire ou thrombo-embolique (7%), fatigue (5%), infection (7%)
Linsitinib (Fassnacht et al., 2015)	Phase III contre placebo	RP : 3,3% SSR : 44 jours vs 46 jours ($P = 0,3$)	Fatigue (3%), nausées (2%), hyperglycémie (2%)

Tableau 25 : Evaluation de l'efficacité et la tolérance des principaux traitement systémiques dans le corticosurréalome.

Abréviations : RP : Réponse partielle ; SSR : Survie dans récive

1.5. Objectifs

Pour chacune de ces tumeurs endocrines et en particulier les tumeurs agressives et/ou métastatiques, nous voyons les limites des traitements actuels et l'importance d'identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques avec un double objectif, améliorer la réponse clinique et limiter la survenue d'effets indésirables. Compte tenu du rôle des RCPGs dans l'initiation et la progression tumorale et d'après nos résultats obtenus à partir du cancer la thyroïde, leur ciblage pharmacologique semble être une approche pharmacologique innovante. Cependant, les travaux antérieurs pour ces tumeurs n'ont jusque-là pas permis de réaliser une analyse large des différences d'expression génique des différents RCPG entre tissu sain et tumoral, les travaux se sont limités à des données d'expression de certains récepteurs, sans comparaison systématique avec du tissu sain. Fort de notre travail précédent combinant les données transcriptomiques de plusieurs bases publiques et les données de pharmacologie, nous avons donc souhaité :

- (1) identifier des RCPG exprimés de manière différentielle entre les tissus tumoraux et le tissu sain
- (2) sélectionner les RCPG ciblés par des médicaments actuellement sur le marché pour offrir des possibilités de repositionnement moléculaire
- (3) sélectionner des RCPG pour lesquels le niveau d'expression est associé à la survie afin d'identifier de potentiels marqueurs pronostiques.

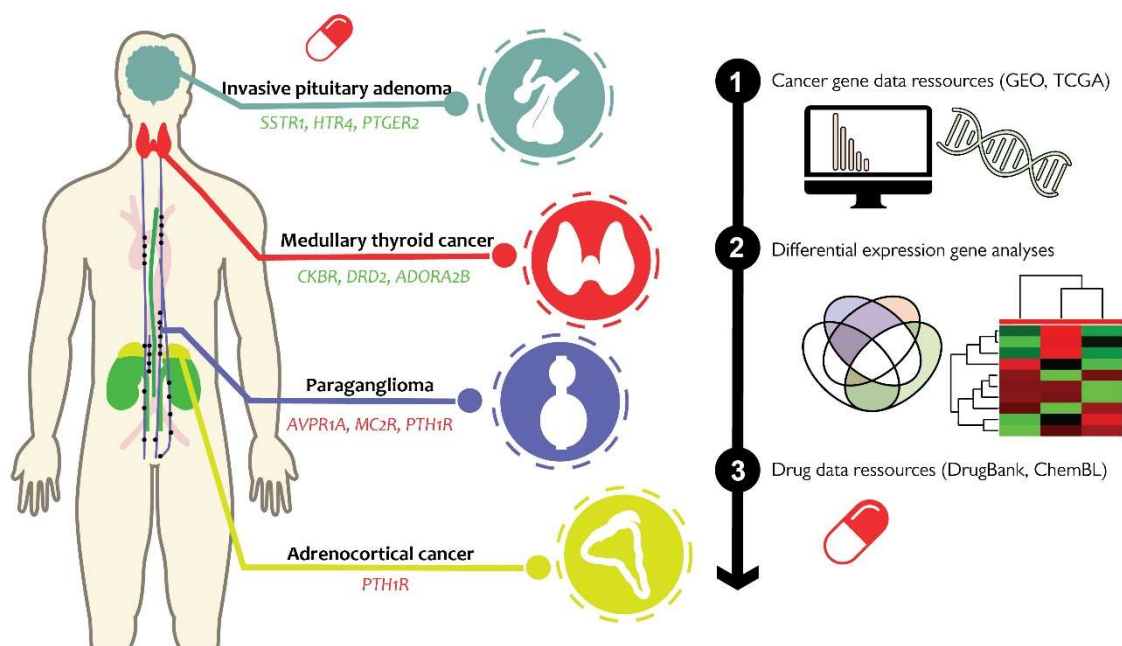
Nous présentons ici un travail d'analyses bio-informatiques mené au sein des principales tumeurs endocrines. Ce travail a été publié en 2022 dans *Cells*.

2. Article 3

Identification of dysregulated expression of G protein coupled receptors in endocrine tumors by bioinformatics analysis : potential drug targets?

Valentine Suteau, Mathilde Munier, Rym Ben Boubaker, Méline Wery, Daniel Henrion, Patrice Rodien and Claire Briet

Cells. 2022; 11(4):703. <https://doi.org/10.3390/cells11040703>



Article

Identification of Dysregulated Expression of G Protein Coupled Receptors in Endocrine Tumors by Bioinformatics Analysis: Potential Drug Targets?

Valentine Suteau ^{1,2,*}, Mathilde Munier ^{1,2,3,†}, Rym Ben Boubaker ², Méline Wery ⁴, Daniel Henrion ², Patrice Rodien ^{1,2,3,5} and Claire Briet ^{1,2,3,5}

- ¹ Département d'Endocrinologie-Diabétologie Nutrition, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) d'Angers, 49933 Angers, France; mathilde.munier@univ-angers.fr (M.M.); parodien@chu-angers.fr (P.R.); claire.briet@chu-angers.fr (C.B.)
- ² Laboratoire MITOVASC, UMR CNRS 6015, INSERM 1083, Université d'Angers, 49100 Angers, France; rym.benboubaker@univ-angers.fr (R.B.B.); daniel.henrion@univ-angers.fr (D.H.)
- ³ Centre de Référence des Maladies Rares de la Thyroïde et des Récepteurs Hormonaux, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) d'Angers, 49933 Angers, France
- ⁴ Faculté de Santé, Université d'Angers, SFR ICAT, 49100 Angers, France; meline.wery@univ-angers.fr
- ⁵ Centre de Référence des Maladies Rares de l'Hypophyse, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) d'Angers, 49933 Angers, France
- * Correspondence: valentine.suteau@chu-angers.fr
- † These authors contributed equally to this work.

Abstract: Background: Many studies link G protein-coupled receptors (GPCRs) to cancer. Some endocrine tumors are unresponsive to standard treatment and/or require long-term and poorly tolerated treatment. This study explored, by bioinformatics analysis, the tumoral profiling of the GPCR transcriptome to identify potential targets in these tumors aiming at drug repurposing. Methods: We explored the GPCR differentially expressed genes (DEGs) from public datasets (Gene Expression Omnibus (GEO) database and The Cancer Genome Atlas (TCGA)). The GEO datasets were available for two medullary thyroid cancers (MTCs), eighty-seven pheochromocytomas (PHEOs), sixty-one paragangliomas (PGLs), forty-seven pituitary adenomas and one-hundred-fifty adrenocortical cancers (ACCs). The TCGA dataset covered 92 ACCs. We identified GPCRs targeted by approved drugs from pharmacological databases (ChEMBL and DrugBank). Results: The profiling of dysregulated GPCRs was tumor specific. In MTC, we found 14 GPCR DEGs, including an upregulation of the dopamine receptor (*DRD2*) and adenosine receptor (*ADORA2B*), which were the target of many drugs. In PGL, seven GPCR genes were downregulated, including vasopressin receptor (*AVPR1A*) and PTH receptor (*PTH1R*), which were targeted by approved drugs. In ACC, *PTH1R* was also downregulated in both the GEO and TCGA datasets and was the target of osteoporosis drugs. Conclusions: We highlight specific GPCR signatures across the major endocrine tumors. These data could help to identify new opportunities for drug repurposing.

Keywords: G protein-coupled receptors; endocrine tumors; paraganglioma; pheochromocytoma; adrenocortical cancer; medullary thyroid cancer; pituitary adenoma; drug repurposing



Citation: Suteau, V.; Munier, M.; Ben Boubaker, R.; Wery, M.; Henrion, D.; Rodien, P.; Briet, C. Identification of Dysregulated Expression of G Protein Coupled Receptors in Endocrine Tumors by Bioinformatics Analysis: Potential Drug Targets? *Cells* **2022**, *11*, 703. <https://doi.org/10.3390/cells11040703>

Academic Editor: Hiroshi Miyamoto

Received: 14 January 2022

Accepted: 15 February 2022

Published: 17 February 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

G protein-coupled receptors (GPCRs) are the largest family of membrane receptors involved in many types of cellular responses. The GPCR family represents approximately 4% of the human genes, with more than 800 members [1]. GPCRs are involved in important functions, such as cardiac function, hormone regulation, immune responses and neurotransmission. Abnormal expression or activity is associated with several human diseases [2]. As a result, GPCRs are considered as therapeutic targets in many diseases. Drugs that target GPCRs account for about 34% of the current medicines, making it the

largest family of validated pharmacological targets [3], with cumulative sales for 2011 to 2015 of \$890 billion in the United States [4]. The pharmacological targeting of GPCRs is a well-established approach for treatment in many human diseases.

Recent evidence supports the involvement of many GPCRs and their ligands in controlling the initiation and progression of tumors (cell proliferation, metastasis, adhesion or angiogenesis) [5–7]. Recently, many studies revealed that GPCRs are mutated and/or their expression dysregulated in multiple cancers [5,8]. Therefore, GPCRs can be considered as attractive targets for novel therapeutic treatments of tumors or for the repurposing of approved drugs with a target-based approach.

Bioinformatics approaches have allowed for the identification of potential therapeutic and/or prognostic targets in cancer. The Gene Expression Omnibus (GEO) and The Cancer Genome Atlas (TCGA) databases are the most frequently used to identify differentially expressed genes (DEGs). GEO is a database repository of microarrays gene expression data. The Cancer Genome Atlas (TCGA) is a project that has generated publicly available genomic and clinical data for various types of cancer [9]. GPCRomic studies have been conducted for the most frequent cancers, such as prostate or breast cancer [7,10,11]. In addition, the team of P. Insel focused more specifically on pancreatic adenocarcinoma [10,12,13]. Moreover, we recently established an atlas of GPCRs in radioactive iodine-resistant thyroid cancer by compiling data from the GEO database, TCGA cohort and our transcriptomic analysis [14]. However, the dysregulation of GPCR expression has not been investigated in depth in other endocrine tumors.

Endocrine tumors include tumors in glands that produce hormones (thyroid, parathyroid, pituitary, adrenal gland) and those originated from neuroendocrine cells. Medullary thyroid cancer (MTC) is a neuroendocrine tumor and arises from parafollicular cells or C cells. For patients with progressive and multi-metastatic MTC, the first-line systemic treatment is represented by multiple tyrosine kinase inhibitors (cabozantinib, vandetanib). These treatments have shown transient and/or partial efficacy with numerous side effects. However, there is a lack of evidence for the use of other therapies, such as chemotherapy or metabolic radiotherapy. Pituitary neuroendocrine tumors (PitNETs), traditionally designated as pituitary adenomas, include different groups of neoplasms of anterior pituitary cell origin [15]. They are classified according to the expression pattern of anterior pituitary hormones, the hormone hypersecretion and the tumor mass [16]. PitNETs are mostly well controlled after surgery. However, these tumors may exhibit aggressive behavior, with resistance to conventional treatments. The current chemotherapy, temozolomide, is effective in only one-third of the patients [17]. The same is true for primary malignant adrenal tumors, including pheochromocytoma (PHEO) and adrenocortical cancer (ACC). Pheochromocytomas (PHEOs) are tumors derived from the neural crest in the adrenal medulla. They are grouped with paragangliomas (PGLs), which share the same histological origin but are located in the paraganglia of the autonomic nervous system. The management of metastatic PHEO and PGL remains a major challenge since, to date, even though they represent less than 25% of cases, there are no curative treatment options [18]. For advanced ACC, besides surgical resection and loco-regional treatments, treatment with mitotane combined with chemotherapy (etoposide, doxorubicin and cisplatin) is often proposed according to prognostic parameters [19]. This treatment is both limited by systemic toxicity and by transient or partial efficacy.

These neuroendocrine tumors (NETs) share some features, such as slow growth and poor response to standard chemotherapies. To date, the somatostatine/somatostatine receptor (SSTR) is the only hormone-GPCR with an approved indication in the treatment of NETs. The identification of new therapeutic targets is required. We, therefore, used a GPCRomic approach to identify differentially expressed GPCRs genes in several endocrine tumors in order to identify GPCRs that may be new therapeutic targets for drug repurposing.

2. Materials and Methods

2.1. Collection of GEO Datasets and TCGA Data

To comprehensively evaluate GPCRs expression between endocrine tumors and non-tumoral tissues, we incorporated the expression data of GPCRs from GEO. We selected four types of endocrine tumors: medullary thyroid cancer (MTC), pituitary neuroendocrine tumors (PitNETs), pheochromocytoma (PHEO) and paraganglioma (PGL) and adrenocortical carcinoma (ACC). An electronic search of the GEO databases was carried out with the following key terms: “medullary thyroid”, “adrenocortical”, “pituitary” “pheochromocytoma”, “paraganglioma”, AND “cancer OR carcinoma OR tumor”. The GEO datasets published before 1 April 2020 were included. We filtered data by ‘Expression profiling by array’ in ‘*homo sapiens*’. The reference lists were manually reviewed for further identification of relevant studies. We selected the studies with the following inclusion criteria: studies contained mRNA expression data in tumoral and non-tumoral tissues in previous cited endocrine tumor. The exclusion criteria were: cell lines, xenograft studies, miRNA analyses, no comparison with normal tissue, duplicate. The microarray datasets were downloaded from the GEO database for each endocrine tumor and are summarized in Table 1.

To validate transcriptomic analysis, we also obtained the GPCRs expression profile of human ACC from The Cancer Genome Atlas (TCGA, <https://cancergenome.nih.gov/>, accessed on 17 December 2021) and adrenal normal tissues from The Genotype-Tissue Expression Database (GTEx, <https://gtexportal.org/home/>, accessed on 17 December 2021) with online analysis tool (<https://insellab.github.io/>, accessed on 17 December 2021). Data for other endocrine tumors were not available.

Table 1. Gene Expression Datasets from GEO Database.

Tumor Type	Series	Contributors	Samples	Platforms
Medullary Thyroid Cancer	GSE27155	Giordano TJ [20,21]	2 MTC vs. 4 normal	GPL96: Affymetrix Human Genome U133A Array
	GSE36314	Oyesiku NM [22]	4 PitNET vs. 3 normal	GPL8300: Affymetrix Human Genome U95 Version 2 Array
Pituitary Neuroendocrine Tumor	GSE119063	Wu Z (unpublished)	5 PitNET vs. 4 normal	GPL13607: Agilent-028004 SurePrint G3 Human GE 8 × 60 K Microarray
	GSE51618	Feng J (unpublished)	8 PitNET vs. 3 normal	GPL6480: Agilent-014850 Whole Human Genome Microarray 4 × 44 K G4112F
	GSE26966	Donsom AM [23]	14 PitNET vs. 9 normal	GPL570: Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array
	GSE63357	Barry S [24–26]	16 PitNET vs. 5 normal	GPL570: Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array
	GSE50442	Shankavaram U (unpublished)	3 PHEO vs. 8 normal	GPL6244: Affymetrix Human Gene 1.0 ST Array
Pheochromocytoma	GSE39716	Shankavaram U [27–29]	21 PHEO vs. 8 normal	GPL6244: Affymetrix Human Gene 1.0 ST Array
	GSE19422	López-Jiménez E [30]	61 PHEO vs. 6 normal	GPL6480: Agilent-014850 Whole Human Genome Microarray 4 × 44 K G4112F
	GSE60459	Choi Y-L (unpublished)	2 PHEO vs. 3 normal	GPL13607: Agilent-028004 SurePrint G3 Human GE 8x60K Microarray
	GSE50442	Shankavaram U (unpublished)	4 PGL vs. 8 normal	GPL6244: Affymetrix Human Gene 1.0 ST Array
Paraganglioma	GSE39716	Shankavaram U [27–29]	24 PGL vs. 8 normal	GPL6244: Affymetrix Human Gene 1.0 ST Array
	GSE19422	López-Jiménez E [30]	23 PGL vs. 6 normal	GPL6480: Agilent-014850 Whole Human Genome Microarray 4 × 44 K G4112F
	GSE60459	Choi Y-L (unpublished)	10 PGL vs. 3 normal	GPL13607: Agilent-028004 SurePrint G3 Human GE 8x60K Microarray
	GSE90713	Fraber JM (unpublished)	57 ACC vs. 4 normal	GPL15207: Affymetrix Human Gene Expression Array
	GSE14922	Szabó PM [31]	4 ACC vs. 4 normal	GPL6480: Agilent-014850 Whole Human Genome Microarray 4 × 44 K G4112F
	GSE12368	Soon PS [32]	12 ACC vs. 6 normal	GPL570: Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array
	GSE19750	Bussey KJ [33,34]	44 ACC vs. 4 normal	GPL570: Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array
	GSE33371	Heanton JH [35]	33 ACC vs. 10 normal	GPL570: Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array

Abbreviations: Medullary thyroid cancer (MTC), Pheochromocytoma (PHEO), Paraganglioma (PGL), Pituitary neuroendocrine tumor (PitNET), Adrenocortical carcinoma (ACC).

2.2. Identification of Differentially Expressed Genes

DEGs between tumoral and normal samples were identified using the GEO2R web application (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/geo/geo2r/>, accessed on 7 January 2022). GEO2R is an interactive online tool, which compares two groups of samples (i.e., normal vs. tumoral) to obtain genes with different expressions under the same experimental conditions. It uses Bioconductor R packages to transform and analyze GEO data with GEO query and limma analyses [36]. We applied adjustment to the P-values with the Benjamini & Hochberg method (false discovery rate, FDR) and a \log_2 transformation to the data. We saved the NCBI annotations where possible. Then, we filtered, from the set of genes studied, a list of 396 GPCRs (Table S1). The DEGs with an adjusted $p < 0.05$ were considered as the cut-off criteria. Then, to strengthen the significance of the data, we chose to select DEGs obtained from all independent datasets of tumor tissue samples rather than combine the GSE data, as in previous publications [11,37]. We applied for Venn software online (<http://www.interactivenn.net/>, accessed on 26 June 2020) to obtain the common DEGs in all independent cohorts for each endocrine tumor [38].

2.3. Identification of GPCRs as Targets for Approved Drugs

We evaluated drug targets among GPCRs differentially expressed between normal and tumoral samples and the list of approved drugs for each of these receptors. This was conducted using two pharmacological databases: ChEMBL and DrugBank. DrugBank is a clinically oriented drug database that provides information about drug and drug action for more than 500,000 drugs [39]. ChEMBL is an open database containing information extracted from the medicinal chemistry literature regarding the compounds tested and their primary target [40]. Approved drugs were verified with those listed by the Food and Drug Administration (FDA) (<https://www.fda.gov>, accessed on 3 January 2022) and by the European Medicines Agency (EMA) (<https://www.ema.europa.eu>, accessed on 3 January 2022).

2.4. Survival Analysis

The GEPIA database (<http://gepia.cancer-pku.cn>, accessed on 14 February 2022) was used for survival analysis of the dysregulated GPCR genes. Data from TCGA-ACC project (88 patients with ACC) were analyzed. To analyze the prognostic value of GPCR genes, the patient samples were split into 2 groups according to the median expression of the biomarker. The two patient cohorts were compared by a Kaplan–Meier survival plot, and the logrank P value was calculated.

3. Results

3.1. Medullary Thyroid Cancer

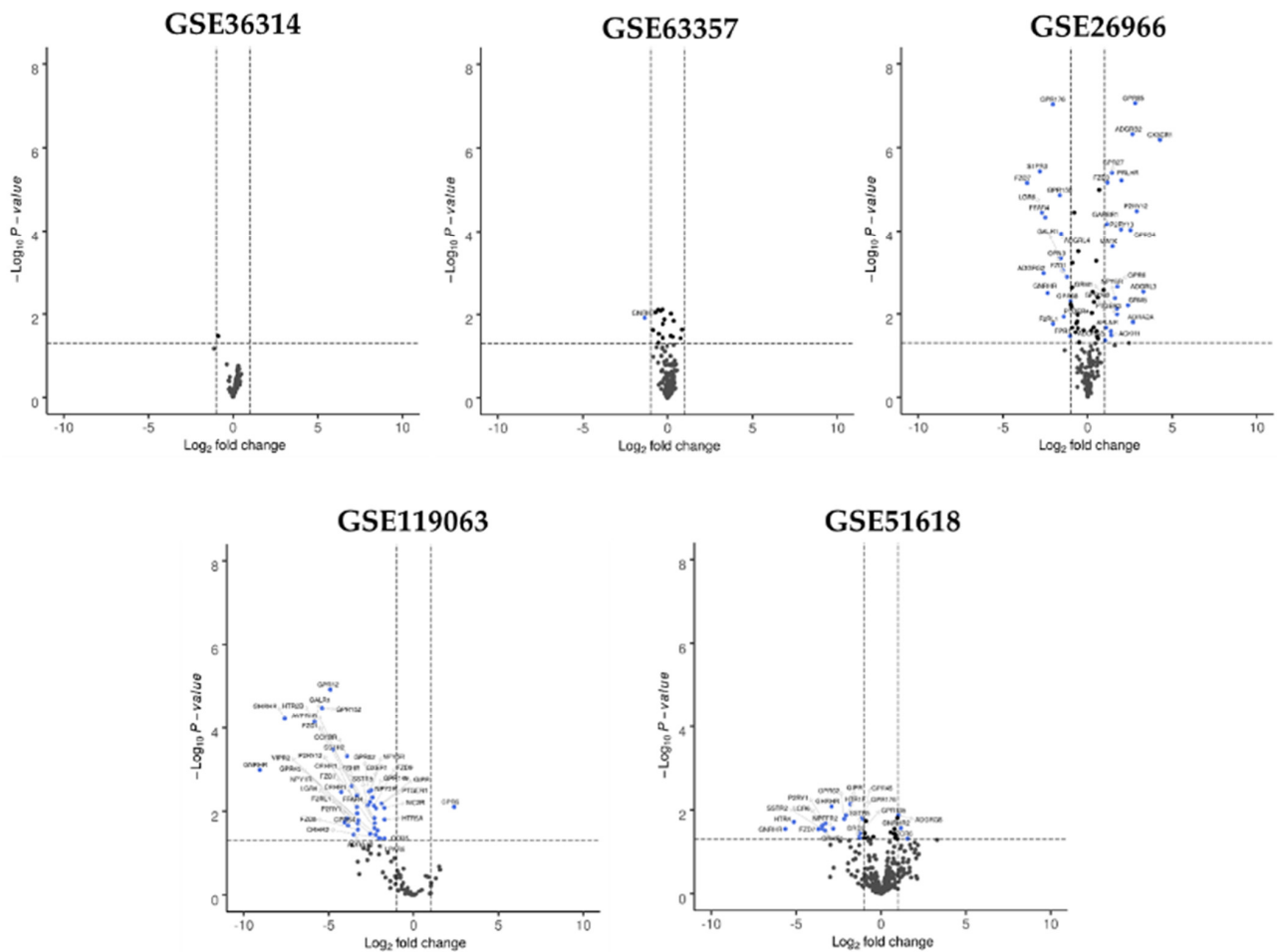
For medullary thyroid cancer (MTC), only one study was available from the GEO database (GSE27155). The samples consisted of four normal thyroid tissues and two medullary carcinomas. The analysis revealed 14 DEGs for GPCRs (seven downregulated and seven upregulated) (Table 2). The TSH receptor (*TSHR*) was the main receptor downregulated in MTC compared to normal thyroid tissue (\log_2FC : -2.22) as well as *GPRC5A*; an orphan receptor was also found to be downregulated (\log_2FC : -1.93). For the upregulated GPCRs, the majority were weakly upregulated, such as dopamine receptor (*DRD2*, \log_2FC : 0.62) and cholecystikinin receptor (*CCKBR*, \log_2FC : 0.59). The two most upregulated GPCRs compared to normal thyroid tissue were the adhesion receptor *ADGRG2* (\log_2FC : 1.42) and the receptor *LGR5* (Leucine Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor 5, \log_2FC : 1.43).

Table 2. List of DEGs Selected from Analysis of Medullary Thyroid Cancer Datasets.

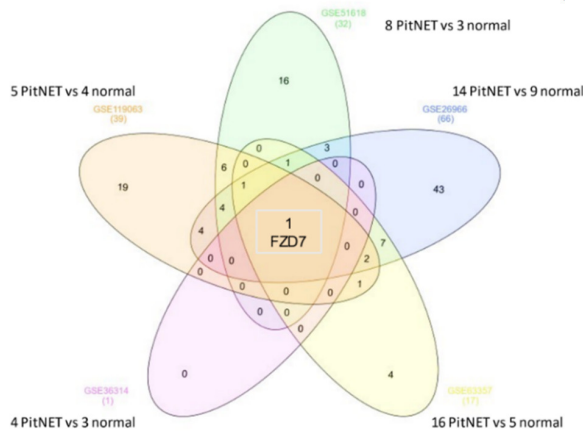
GPCR Gene Symbol	Log ₂ FC	Adj- <i>p</i> -Val
<i>TSHR</i>	−2.22	0.0001
<i>GPRC5A</i>	−1.93	0.0002
<i>OPN3</i>	−0.98	0.0011
<i>FZD1</i>	−0.89	0.0005
<i>ADGRE5</i>	−0.84	0.0014
<i>F2RL1</i>	−0.67	0.0043
<i>FZD2</i>	−0.56	0.0041
<i>CCKBR</i>	0.59	0.0025
<i>DRD2</i>	0.62	0.0030
<i>ADORA2B</i>	0.64	0.0029
<i>CELSR3</i>	0.80	0.0032
<i>GPR19</i>	0.84	0.0021
<i>ADGRG2</i>	1.42	0.0049
<i>LGR5</i>	1.43	0.0003

3.2. Pituitary Neuroendocrine Tumors (PitNETs)

For PitNETs, five gene expression profiles (GSE119063, GSE51618, GSE36314, GSE63357, GSE36966) were acquired from the GEO database. The dataset contained from four to sixteen tumor samples and from three to nine normal samples. The datasets consisted of several pathological subtypes of PitNETs (prolactinoma, non-functioning or GH adenoma). To be more representative, a specific pathological type was not selected. The analysis of these datasets revealed from one to sixty-six DEGs (Figure 1, Table S2). Among them, the Frizzled 7 receptor *FZD7* was downregulated in the five datasets (GSE119063, $\log_2FC = -4.26$, $p = 0.004$, GSE51618, $\log_2FC = -3.7$, $p = 0.029$, GSE36314, $\log_2FC = -0.88$, $p = 0.034$, GSE63357, $\log_2FC = -0.70$, $p = 0.009$, GSE36966, $\log_2FC = -3.57$, $p < 0.001$). Interestingly, in the GSE51618 dataset, we could also compare the expression profile between invasive and non-invasive nonfunctional pituitary adenomas. *SSTR1* was highly upregulated in invasive adenoma ($\log_2FC = 9.14$, $p = 0.005$) as well as the adhesion receptor *ADGRG2* ($\log_2FC = 5.26$, $p = 0.026$), the serotonin receptor *HTR4 5* ($\log_2FC = 3.68$, $p = 0.007$) and the prostaglandin receptor *PTGER2* ($\log_2FC = 3.06$, $p = 0.038$). Conversely, adhesion receptors *ADGRA1* and *ADGRL3* were downregulated in invasive tumors ($\log_2FC = -3.41$, $p = 0.040$, $\log_2FC = -5.66$, $p = 0.042$, respectively) (Figure 1).



(A)



(B)

GPCR Gene	Log ₂ FC	adj- <i>p</i> -Val
<i>ADGRL3</i>	-5.66	0.042
<i>ADGRA1</i>	-3.41	0.040
<i>ADCYAP1R1</i>	-2.51	0.003
<i>FFAR2</i>	1.27	0.042
<i>C5AR1</i>	1.44	0.037
<i>CXCR5</i>	1.85	0.029
<i>PTGER2</i>	3.06	0.038
<i>HTR4</i>	3.68	0.007
<i>ADGRG2</i>	5.26	0.026
<i>SSTR1</i>	9.14	0.005

(C)

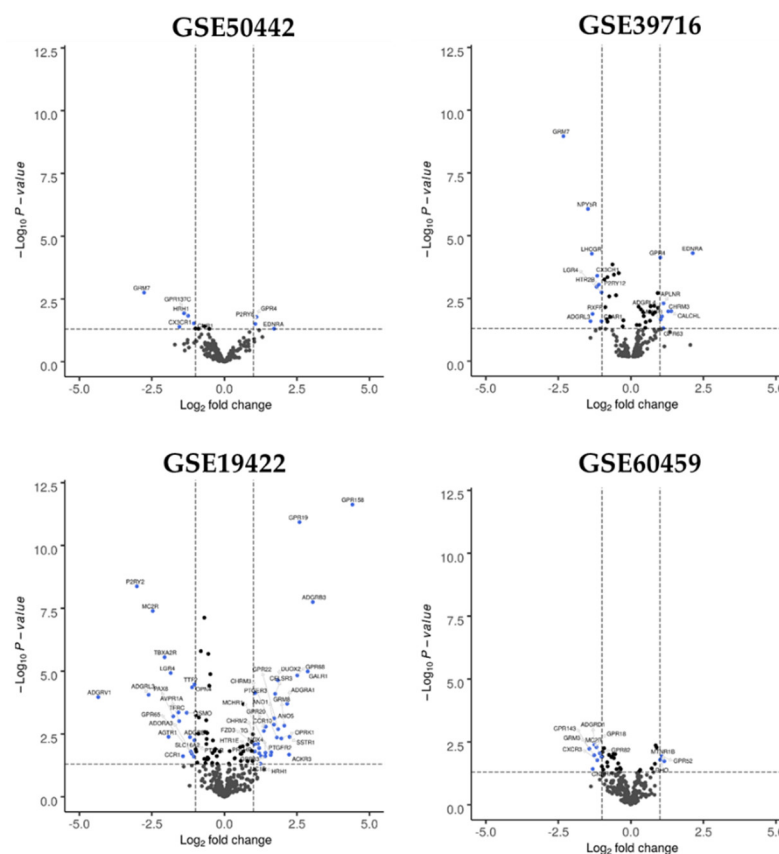
Figure 1. Dysregulated GPCR in pituitary neuroendocrine tumors. (A) Volcano plots for GSE119063, GSE51618, GSE26966, GSE63357 and GSE36314. Each GPCR transcript was represented by a spot. Log₂ fold change was plotted against the $-\log_{10} p$ -value (<0.05 , horizontal line). Differentially expressed GPCR genes were selected with adjusted $p < 0.05$ among the mRNA expression profiling datasets; (B) Venn diagram for GSE119063, GSE51618, GSE26966, GSE63357 and GSE36314 datasets. For each dataset, the number of significant DEGs was indicated in brackets. One GPCR gene (*FZD7*) was identified in the five datasets; (C) list of DEGs selected from analysis of invasive vs. non-invasive PitNETs in GSE51618 datasets. Abbreviation: PitNETs (pituitary neuroendocrine tumors), FC, fold-change.

3.3. Pheochromocytoma and Paraganglioma

Four gene expression profiles (GSE50442, GSE39716, GSE19422, GSE60459) were acquired from the GEO database for pheochromocytoma and paraganglioma. The dataset contained from two to sixty-one pheochromocytoma samples, four to twenty-four paraganglioma and from three to eight normal samples (medullar adrenal tissue). All PHEOs were non-metastatic. For PGL, GSE39716 and GSE60459 included ten and three metastatic paraganglioma, respectively.

The data for PHEO were quite heterogeneous among the four studies. The number of GPCRs with a significant difference in expression between healthy and tumor tissue varied between 12 and 86 (Figure 2, Table S3). Although there was no receptor significantly common to all four series, the angiotensin II type 2 receptor (*AGTR2*) was found to be downregulated in the tumor tissue in all the studies (GSE60459, $\log_2FC = -1.1, p = 0.03$; GSE50442, $\log_2FC = -0.56, p = 0.493$; GSE39716, $\log_2FC = -0.75, p = 0.003$; GSE19422, $\log_2FC = -0.60, p = 0.003$).

In PGL, the analysis revealed from 37 to 69 DEGs for GPCRs. Venn diagram analysis revealed that seven GPCRs were down regulated compared with normal adrenal gland in the four datasets (*AVPR1A, MC2R, NPY5R, NPY6R, RXFP1, LGR4, PTH1R*) (Figure 3, Table S4). When we compared metastatic PGL and non-metastatic PGL in GSE39716 and GSE60459, no significant DEG were found.



(A)

Figure 2. Cont.

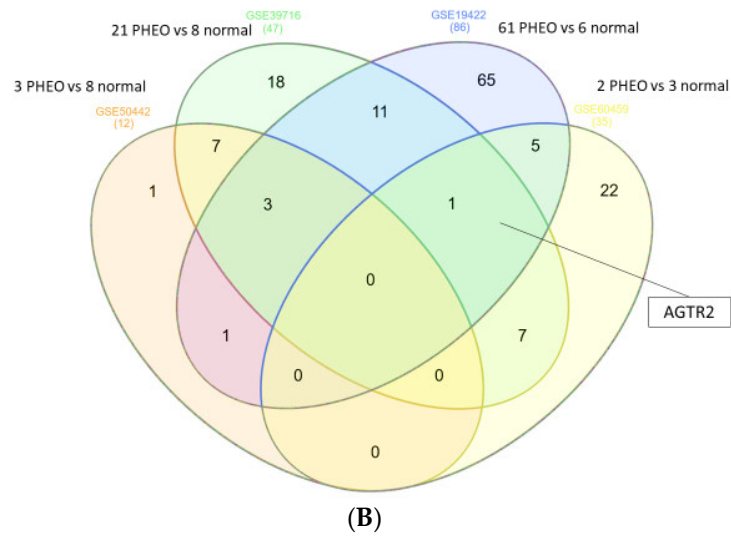


Figure 2. Dysregulated GPCR in pheochromocytoma. **(A)** Volcano plots for GSE50442, GSE39716, GSE19422, GSE60459. Each GPCR transcript was represented by a spot. Log_2 fold change was plotted against the $-\log_{10} p$ -value ($p < 0.05$, horizontal line). Differentially expressed GPCR genes were selected with adjusted $p < 0.05$ among the mRNA expression profiling datasets; **(B)** Venn diagram for GSE50442, GSE39716, GSE19422, GSE60459 datasets. For each dataset, the number of significant DEGs was indicated in brackets. Abbreviation: FC, fold-change.

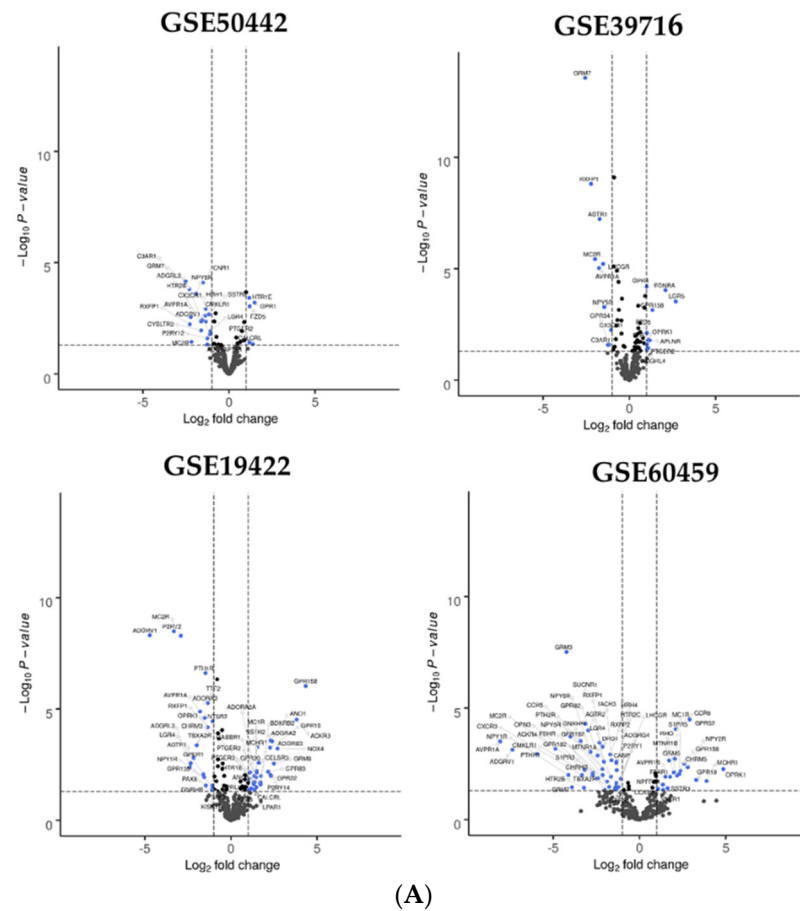


Figure 3. Cont.

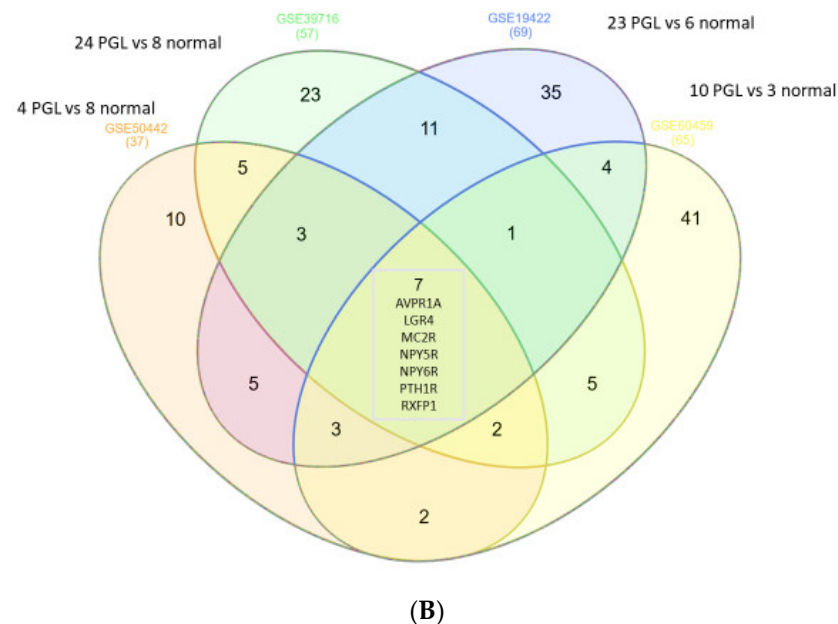


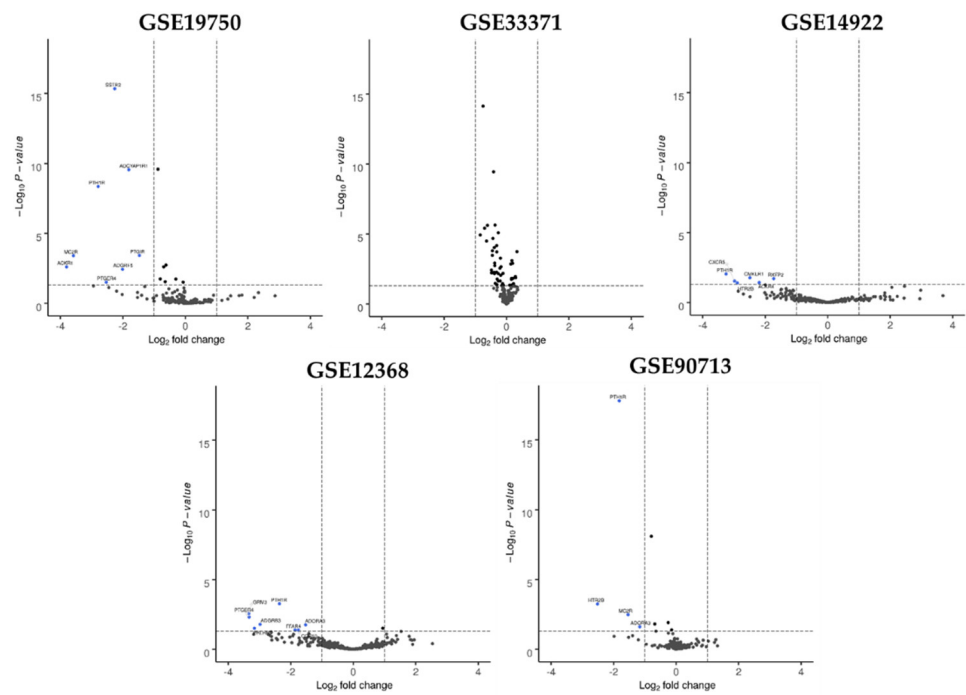
Figure 3. Dysregulated GPCR in paraganglioma. (A) Volcano plots for GSE50442, GSE39716, GSE19422, GSE60459. Each GPCR transcript was represented by a spot. Log₂ fold change was plotted against the $-\log_{10} p$ -value ($p < 0.05$, horizontal line). Differentially expressed GPCR genes were selected with adjusted $p < 0.05$ among the mRNA expression profiling datasets; (B) Venn diagram for GSE50442, GSE39716, GSE19422, GSE60459 datasets. For each dataset, the number of significant DEGs was indicated in brackets. Seven GPCR genes were identified in the four datasets. Abbreviation: PGL: paraganglioma, FC, fold-change.

3.4. Adrenocortical Carcinomas

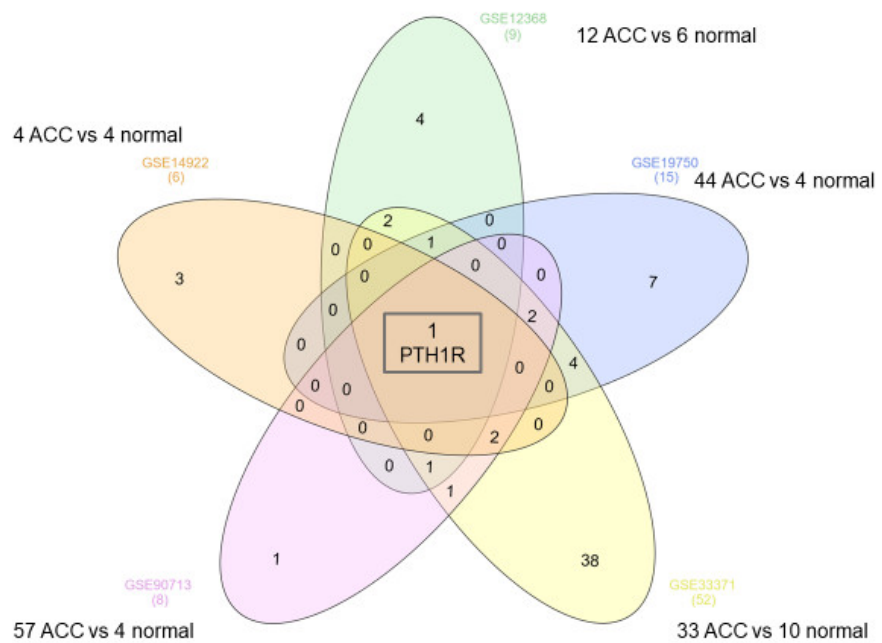
For ACC, five gene expression profiles (GSE14922, GSE90713, GSE12368, GSE19750, GSE33371) were acquired from the GEO database. The dataset contained from four to fifty-seven cancer samples and from four to ten normal samples. The analysis of these datasets revealed six, eight, fifteen, nine and fifty-two DEGs, respectively. Venn diagram analysis revealed that *PTH1R* was the only gene downregulated in the five datasets (Figure 4, Table S5). To validate this finding, TCGA data (TCGA-ACC Project) were used to quantify differential expression of *PTH1R* by comparing tumors against adrenal normal tissue from the Gene Tissue Expression Project (GTEx) database. In the TCGA cohort, *PTH1R* was also downregulated ($\log_2FC: -3.37, p < 0.0001$).

3.5. Identification of Dysregulated G Protein Coupled Receptors as Targets for Approved Drugs

Among the dysregulated GPCR, we determined which receptors were targeted by approved drugs and how many drugs were available for these targets. The data were summarized in the Table 3. In MTC, among the 14 DEG, *CCKBR*, *D2R* and Adenosine A2B receptor (*ADORA2B*) were the target of drugs. *DRD2* was the most frequently targeted receptor with over 40 anti-psychotic agents acting as *DRD2* antagonists. For PitNET, any drug did not target *FZD7*. Interestingly, three up-regulated GPCR in invasive PitNET were targeted receptor: *SSTR1*, *HTR4* and *PTGER2*. Among the seven down-regulated GPCRs in paraganglioma, Arginine Vasopressin Receptor 1A (*AVPR1A*), ACTH receptor, *MC2R*, and *PTH1R* were the target of 2 to 4 drugs each. *PTH1R* also found to be down-regulated in adrenocortical cancer, was targeted by 3 agonists used in osteoporosis or hypoparathyroidism.



(A)



(B)

Figure 4. Dysregulated GPCR in adrenocortical cancer. (A) Volcano plots for GSE14922, GSE12368, GSE19750, GSE33371, GSE90713. Each GPCR transcript was represented by a spotLog₂ fold change plotted against the $-\log_{10} p$ -value ($p < 0.05$, horizontal line). Differentially expressed GPCR genes were selected with adjusted $p < 0.05$. Differentially expressed GPCR genes were selected with adjusted $p < 0.05$ among the mRNA expression profiling datasets; (B) Venn diagram for GSE14922, GSE12368, GSE19750, GSE33371, GSE90713 datasets. For each dataset, the number of significant DEGs was indicated in brackets. One GPCR gene (*PTH1R*) was identified in the five datasets. Abbreviation: FC, fold-change.

Table 3. List of GPCRs with Approved Drugs.

GPCR	Mode of Action	Main Indication(s)
ADORA2B		
Caffeine	Antagonist	pulmonary complications of premature birth
Enprofylline	Antagonist	Asthma
Theophylline	Antagonist	Asthma
Adenosine	Agonist	supraventricular tachycardia
AVPR1A		
Atosiban	Antagonist	pre-term labour
Conivaptan	Antagonist	SIADH
Felypressin	Agonist	diabetes insipidus
Terlipressin	Agonist	bleeding caused by esophageal varices.
CCKBR		
Pentagastrin	Agonist	evaluation of gastric acid secretory function
DRD2		
>40 Drugs	Antagonist	antipsychotic agent
Alizapride	Antagonist	anti-emetic
Bromopride	Antagonist	anti-emetic
Domperidone	Antagonist	anti-emetic
Droperidol	Antagonist	anti-emetic
Metoclopramide	Antagonist	anti-emetic
8 Drugs *	Agonist	Parkinson's disease
Cabergoline	Agonist	pituitary adenoma
Quinagolide	Agonist	pituitary adenoma
HTR4		
Vilazodone	Agonist	Depressive disorder
Mosapride	Agonist	Gastroprokinetic agent
Cisapride	Agonist	Gastroprokinetic agent
Prucalopride	Agonist	Gastroprokinetic agent
Cinitapride	Agonist	Gastroprokinetic agent
Tegaserod	Agonist	Gastroprokinetic agent
Metoclopramide	Antagonist	anti-emetic
MC2R		
Corticotropin	Agonist	diagnosis agent
Tetracosactide	Agonist	diagnosis agent
PTGER2		
Alprostadi	Agonist	erectile dysfunction
Dinoprostone	Agonist	labor induction
Misoprostol	Agonist	gastric ulcer
Gemeprost	Agonist	pregnancy termination
Limaprost	Agonist	Ischemic ulcer
PTH1R		
Abaloparatide	Agonist	Osteoporosis
Parathyroid hormone	Agonist	Hypoparathyroidism
Teriparatide	Agonist	Osteoporosis
SSTR1		
Octreotide	Agonist	NeuroEndocrine tumor
Pasireotide	Agonist	NeuroEndocrine tumors

For each endocrine tumor, common dysregulated GPCR were reviewed and approved drugs were listed with their mode of action and their main indications. Abbreviations: SIADH = Syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion. *: The eight DRD2 agonist were: Amantadine, apomorphine, Levodopa, lisuride, pergolide, pramipexole, ropinirole, rotigotine.

3.6. Survival Analysis

Survival data were only available for ACC from TCGA. We, therefore, chose to study the gene expression of *PTH1R* for ACC. Using the GEPIA database to explore the association between gene expression and survival, we found that *PTH1R* expression was neither significantly correlated with overall survival nor disease-free survival of ACC patients (log-rank $p = 0.72$ and log-rank $p = 0.88$, respectively) (Figure 5).

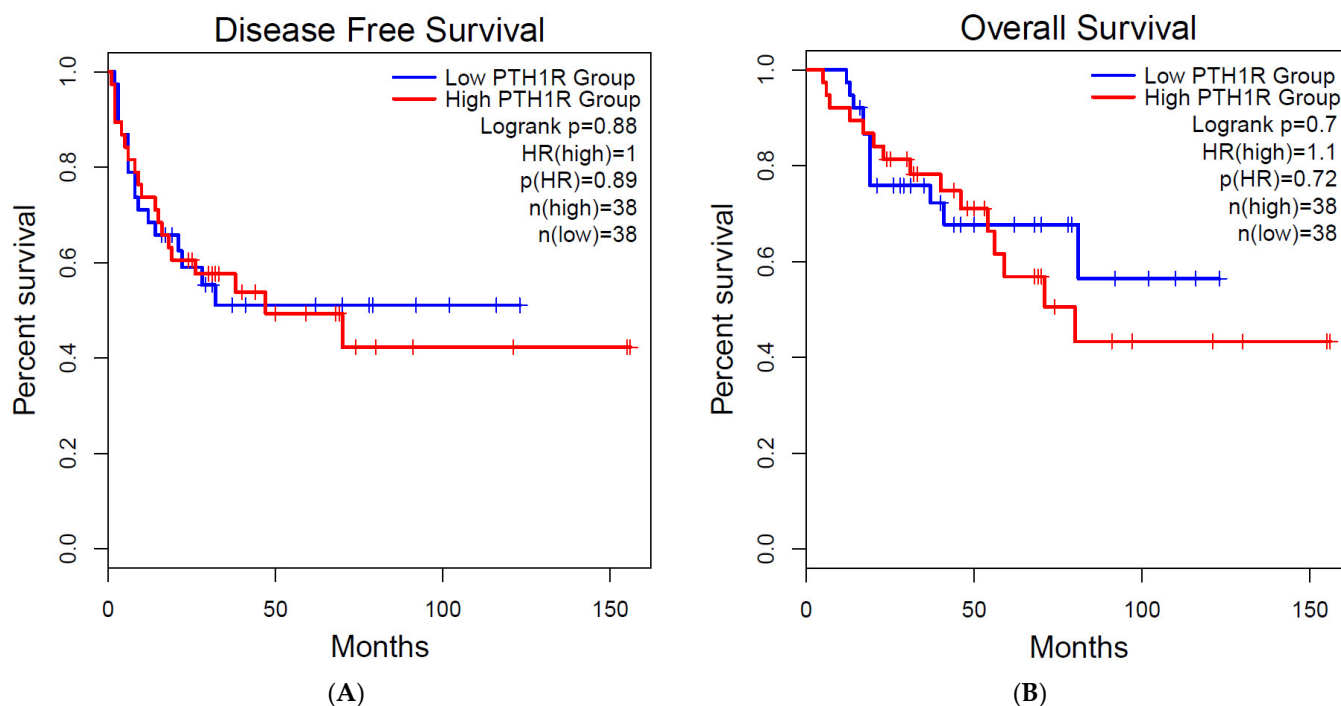


Figure 5. Survival analysis for *PTH1R* in adrenocortical cancer. To analyze the prognostic value of *PTH1R* gene expression, the patient samples are split into 2 groups according to the median expressions of the genes. The 2 patient cohorts were compared by a Kaplan–Meier survival plot, and log-rank p value was calculated. (A) Disease free survival; (B) overall survival.

4. Discussion

This study constitutes the first atlas of GPCRs within major endocrine tumors after thyroid cancer [14]. Drug repurposing strategies provided a new approach for revealing new clinical applications of an approved drug and for developing antitumor drugs. The use of GPCRomic approaches leads to the discovery of GPCRs that could contribute to cancer pathophysiology and, thus, may be therapeutic targets.

4.1. Medullary Thyroid Cancer

We confirmed the upregulation of cholecystokinin 2 receptor (*CCKBR/CCK2R*) expression in MTC, which is targeted by radiolabeled peptide analogs for molecular imaging and targeted radiotherapy of different human tumors, such as MTC [41,42]. The dopamine receptor *DRD2* was also upregulated. It is known that L-dopa inhibits calcitonin secretion in MTC, and a new chimeric somatostatin-dopamine analog has recently shown an anti-tumor effect in vitro [43]. Interestingly, *DRD2* is the target of many drugs already approved and is, therefore, accessible for drug repurposing. Like *DRD2*, the adenosine receptor *ADORA2B* was upregulated and the target of approved drugs. However, sparse data are available on the role of these treatments in thyroid cancer, although previous studies have shown a role for adenosine receptors in calcitonin secretion in C-cells [44]. *ADGRG2/GPR64* was also over-expressed in MTC ($\log_2FC = 1.42$, $p = 0.0049$) as in a number of carcinomas derived from breast cancer, parathyroid tumors, Ewing sarcomas, prostate, kidney or lung, and the inhibition of its expression promotes invasiveness and metastatic spread [45,46]. *GPRC5A* was downregulated ($\log_2FC = 1.93$, $p = 0.0002$) as previously reported in other cancers, especially in lung cancer, where it displayed a tumor suppressive role [47]. *FZD1* was also downregulated as previously described in non-medullary thyroid cancer, in which inhibition increased invasiveness, indicating a possible pathogenesis role [48]. However, to have only one study with a very small number of samples limits the significance of the findings for medullary thyroid cancer. In addition, the different histological origin

between the normal tissue (mainly of follicular origin) and tumor tissue (medullary origin) probably explains part of the results. This is the case, for example, with the downregulation of the TSH receptor (*TSH-R*), which is strongly expressed in normal thyroid tissue but was negligible in MTC, as expected [49].

4.2. Pituitary Neuroendocrine Tumors (PitNETs)

Five studies were available in the GEO database comparing pituitary adenomas and the normal pituitary. Data regarding aggressiveness were not available. Independent of tumor characteristics (secreting or non-secreting, invasive or non-invasive), Frizzled receptor 7 (*FZD7*) was downregulated in PitNETs. Interestingly, in invasive adenomas compared to the normal pituitary gland (GSE51618) *FZD7* was also found to be downregulated. To date, this data was not described before in the literature. However, *SFRP2* and 4 (secreted-frizzled related protein), Wnt antagonists, considered as tumor suppressor genes, were downregulated in pituitary adenomas, in particular in invasive tumors, suggesting a role of the Wnt pathway in the progression of PitNETs [50–52]. Among the differentially expressed GPCR genes between non-invasive and invasive tumors, the somatostatin type 1 receptor (*SSTR1*) was known and already targeted by somatostatin analogs. *HTR4* and *PTGER2* were also targeted by agonists. The antitumoral and antiangiogenic effects of *HTR4* agonists were thus shown [53,54].

4.3. Pheochromocytoma or Paraganglioma

For PHEO, no receptor was significantly common to all four series. However, even if, in one study, angiotensin II type 2 receptor (*AGTR2*) was not statistically downregulated, it was found to be downregulated in the tumoral tissue in all the studies. Indeed, the absence or a very low expression of *AGTR2* has been described in PHEO [55]. Interestingly, this receptor has been also described for its antiproliferative role in cancer, including in the pheochromocytoma PC12 cell line in response to angiotensin II [56]. However, unlike the angiotensin II type 1 receptor, no approved drug targets the *AGTR2*. In addition, it would be interesting to have metastatic pheochromocytomas to compare the profile between metastatic and non-metastatic, as for paragangliomas. However, no data were available.

For PGL, seven GPCRs were found to be downregulated when compared to normal medulla adrenal tissue. However, no data are available in the literature regarding their expression level or their role in paragangliomas. Interestingly, the arginine vasopressin receptor, *AVPR1A*, was also found to be downregulated in thyroid cancer and associated with progression-free survival, while it was upregulated in castration-resistant prostate cancer with an antitumoral effect of a selective *AVPR1A* antagonist [14,57]. Moreover, *AVPR1A* agonist and antagonists are approved drugs and could be tested as proof of concept. When we compared malignant paraganglioma and benign paraganglioma, no significant DEGs were found. The patient numbers were small in the two datasets, probably limiting the statistical power of the analyses.

4.4. Adrenocortical Carcinoma

In ACC, *PTH1R* was found downregulated in 5/5 datasets. This result was confirmed in ACC samples from the TCGA cohort. *PTH1R* is a major endocrine regulator of skeletal development and mineral homeostasis. It was also found that *PTH1R* enhanced the secretion of steroid hormones by human adrenocortical cells via a signaling mechanism involving the activation of both the Gs and Gq pathways [58]. *PTH1R* was previously immunolocalized in the cytoplasm in a normal adrenal cortex [59]. The *PTH1R* mRNA expression level was significantly higher in aldosterone-producing adenomas than in cortisol-producing adenoma [59] but seemed to be similar between ACCs and adenomas [60]. To the best of our knowledge, this is the first comparison between ACCs and a normal adrenal cortex. We found a downregulation of *PTH1R*, while PTHrp seemed to have a positive effect on the proliferation of the H295R lineage [60]. This could be explained by a downregulation of *PTH1R* by PTHrP, as described in vascular smooth muscle, osteoblastic or kidney cell

lines [61]. The role of *PTH1R* in tumor progression is still poorly understood. Indeed, *PTH1R* knockdown increased cell migration and invasion and decreased tumor differentiation in neuroblastoma but had an opposite effect in osteoblastoma [62]. Finally, the *PTH1R* expression was neither significantly correlated with overall survival nor disease-free survival in ACC patients. However, there were only 88 patients in the study, probably limiting the statistical power of the analyses. Moreover, the absence of an association with survival should not, in our opinion, compromise potential therapeutic targets, as in thyroid cancer, where TSH inhibition influences survival even though its receptor expression level in the tumor is not associated with overall survival [14,63].

RNA-seq and microarrays that assess GPCR expression have certain limitations. First, RNA expression does not necessarily reflect protein expression. However, methods to assess GPCR protein expression are limited. Immunological techniques are limited by the lack of well-validated and specific GPCR antibodies [64]. The low expression of GPCRs compared to other proteins makes detection of GPCRs complicated. Moreover, recent studies found a closer relationship between the mRNA and protein, especially for GPCRs [65,66]. Another alternative to validate GPCR expression would be cell signaling and functional assays. Second, the clinical data were not associated with the microarrays data in the GEO repository, which limits the evaluation of the prognostic impact of these GPCRs on recurrence or progression. The data from the GPCRomic analyses need to be validated by further prospective studies for specific GPCRs with clinical evaluation.

5. Conclusions

This study presented all the data available to date regarding GPCRs in endocrine tumors. The data could help to identify new potential pathways worth targeting, eventually with approved drugs after proving the tumoral impact in preclinical models. The high-throughput screening of clinically relevant GPCRs with approved drugs would then be an interesting tool for the evaluation of these molecules in endocrine tumors.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cells11040703/s1>, Table S1: List of GPCR genes included in bioinformatics analysis. Table S2: List of DEGs selected from analysis of pituitary adenoma datasets. Table S3: List of DEGs selected from analysis of pheochromocytoma datasets. Table S4. List of DEGs selected from analysis of paraganglioma datasets. Table S5: List of DEGs selected from analysis of adrenocortical cancer datasets.

Author Contributions: V.S.: Conceptualization, Methodology, formal analysis, investigation, data curation, writing—original draft preparation, project administration, funding acquisition; M.M.: validation, project administration, writing—review and editing, funding acquisition; R.B.B.: Graphical abstract, Software, formal analysis; M.W.: Software, formal analysis; D.H.: validation, writing—review and editing, project administration, resources, funding acquisition; P.R.: Methodology; validation, writing—review and editing, supervision, project administration, funding acquisition; C.B.: validation, Methodology, writing—review and editing, supervision, project administration, funding acquisition. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by le Plan National Cancer-Inserm (France) and Pfizer, Endocrinology Reserach Price (France).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The datasets generated and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript or in the decision to publish the results.

References

1. Bjarnadóttir, T.K.; Gloriam, D.E.; Hellstrand, S.H.; Kristiansson, H.; Fredriksson, R.; Schiöth, H.B. Comprehensive Repertoire and Phylogenetic Analysis of the G Protein-Coupled Receptors in Human and Mouse. *Genomics* **2006**, *88*, 263–273. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Rosenbaum, D.M.; Rasmussen, S.G.F.; Kobilka, B.K. The Structure and Function of G-Protein-Coupled Receptors. *Nature* **2009**, *459*, 356–363. [[CrossRef](#)]
3. Sriram, K.; Insel, P.A. G Protein-Coupled Receptors as Targets for Approved Drugs: How Many Targets and How Many Drugs? *Mol. Pharm.* **2018**, *93*, 251–258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Hauser, A.S.; Attwood, M.M.; Rask-Andersen, M.; Schiöth, H.B.; Gloriam, D.E. Trends in GPCR Drug Discovery: New Agents, Targets and Indications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16*, 829–842. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Dorsam, R.T.; Gutkind, J.S. G-Protein-Coupled Receptors and Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 79–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Lappano, R.; Maggiolini, M. G Protein-Coupled Receptors: Novel Targets for Drug Discovery in Cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10*, 47–60. [[CrossRef](#)]
7. Wu, V.; Yeerna, H.; Nohata, N.; Chiou, J.; Harismendy, O.; Raimondi, F.; Inoue, A.; Russell, R.B.; Tamayo, P.; Gutkind, J.S. Illuminating the Onco-GPCRome: Novel G Protein-Coupled Receptor-Driven Oncocrine Networks and Targets for Cancer Immunotherapy. *J. Biol. Chem.* **2019**, *294*, 11062–11086. [[CrossRef](#)]
8. O’Hayre, M.; Vázquez-Prado, J.; Kufareva, I.; Stawiski, E.W.; Handel, T.M.; Seshagiri, S.; Gutkind, J.S. The Emerging Mutational Landscape of G-Proteins and G-Protein Coupled Receptors in Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 412. [[CrossRef](#)]
9. Cheng, P.F.; Dummer, R.; Levesque, M.P. Data Mining The Cancer Genome Atlas in the Era of Precision Cancer Medicine. *Swiss Med. Wkly.* **2015**, *145*, w14183. [[CrossRef](#)]
10. Insel, P.A.; Sriram, K.; Wiley, S.Z.; Wilderman, A.; Katakia, T.; McCann, T.; Yokouchi, H.; Zhang, L.; Corriden, R.; Liu, D.; et al. GPCRomics: GPCR Expression in Cancer Cells and Tumors Identifies New, Potential Biomarkers and Therapeutic Targets. *Front. Pharm.* **2018**, *9*, 431. [[CrossRef](#)]
11. Kübler, E.; Albrecht, H. Large Set Data Mining Reveals Overexpressed GPCRs in Prostate and Breast Cancer: Potential for Active Targeting with Engineered Anti-Cancer Nanomedicines. *Oncotarget* **2018**, *9*, 24882–24897. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Sriram, K.; Moyung, K.; Corriden, R.; Carter, H.; Insel, P.A. GPCRs Show Widespread Differential mRNA Expression and Frequent Mutation and Copy Number Variation in Solid Tumors. *PLoS Biol.* **2019**, *17*, e3000434. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Wiley, S.Z.; Sriram, K.; Liang, W.; Chang, S.E.; French, R.; McCann, T.; Sicklick, J.; Nishihara, H.; Lowy, A.M.; Insel, P.A. GPR68, a Proton-Sensing GPCR, Mediates Interaction of Cancer-Associated Fibroblasts and Cancer Cells. *FASEB J.* **2018**, *32*, 1170–1183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Suteau, V.; Seegers, V.; Munier, M.; Ben Boubaker, R.; Reyes, C.; Gentien, D.; Wery, M.; Croué, A.; Illouz, F.; Hamy, A.; et al. G Protein-Coupled Receptors in Radioiodine-Refractory Thyroid Cancer in the Era of Precision Medicine. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2021**, *106*, 2221–2232. [[CrossRef](#)]
15. Asa, S.L.; Casar-Borota, O.; Chanson, P.; Delgrange, E.; Earls, P.; Ezzat, S.; Grossman, A.; Ikeda, H.; Inoshita, N.; Karavitaki, N.; et al. From Pituitary Adenoma to Pituitary Neuroendocrine Tumor (PitNET): An International Pituitary Pathology Club Proposal. *Endocr. Relat. Cancer* **2017**, *24*, 5–8. [[CrossRef](#)]
16. Saeger, W.; Honegger, J.; Theodoropoulou, M.; Knappe, U.J.; Schöfl, C.; Petersenn, S.; Buslei, R. Clinical Impact of the Current WHO Classification of Pituitary Adenomas. *Endocr. Pathol.* **2016**, *27*, 104–114. [[CrossRef](#)]
17. Raverot, G.; Burman, P.; McCormack, A.; Heaney, A.; Petersenn, S.; Popovic, V.; Trouillas, J.; Dekkers, O.M. European Society of Endocrinology Clinical Practice Guidelines for the Management of Aggressive Pituitary Tumours and Carcinomas. *Eur. J. Endocrinol.* **2018**, *178*, 1–24. [[CrossRef](#)]
18. Fassnacht, M.; Assie, G.; Baudin, E.; Eisenhofer, G.; de la Fouchardiere, C.; Haak, H.R.; de Krijger, R.; Porpiglia, F.; Terzolo, M.; Berruti, A. Adrenocortical Carcinomas and Malignant Pheochromocytomas: ESMO–EURACAN Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up††Approved by the ESMO Guidelines Committee: June 2020. This Publication Supersedes the Previously Published Version—Ann Oncol. 2012;23(Suppl_7):Vii131–Vii138. *Ann. Oncol.* **2020**, *31*, 1476–1490. [[CrossRef](#)]
19. Fassnacht, M.; Dekkers, O.M.; Else, T.; Baudin, E.; Berruti, A.; de Krijger, R.R.; Haak, H.R.; Mihai, R.; Assie, G.; Terzolo, M. European Society of Endocrinology Clinical Practice Guidelines on the Management of Adrenocortical Carcinoma in Adults, in Collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors. *Eur. J. Endocrinol.* **2018**, *179*, 1–46. [[CrossRef](#)]
20. Giordano, T.J.; Kuick, R.; Thomas, D.G.; Misek, D.E.; Vinco, M.; Sanders, D.; Zhu, Z.; Ciampi, R.; Roh, M.; Shedden, K.; et al. Molecular Classification of Papillary Thyroid Carcinoma: Distinct BRAF, RAS, and RET/PTC Mutation-Specific Gene Expression Profiles Discovered by DNA Microarray Analysis. *Oncogene* **2005**, *24*, 6646–6656. [[CrossRef](#)]
21. Giordano, T.J.; Au, A.Y.M.; Kuick, R.; Thomas, D.G.; Rhodes, D.R.; Wilhelm, K.G.; Vinco, M.; Misek, D.E.; Sanders, D.; Zhu, Z.; et al. Delineation, Functional Validation, and Bioinformatic Evaluation of Gene Expression in Thyroid Follicular Carcinomas with the PAX8-PPARG Translocation. *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 1983–1993. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Tong, Y.; Zheng, Y.; Zhou, J.; Oyesiku, N.M.; Koeffler, H.P.; Melmed, S. Genomic Characterization of Human and Rat Prolactinomas. *Endocrinology* **2012**, *153*, 3679–3691. [[CrossRef](#)]
23. Gump, J.M.; Donson, A.M.; Birks, D.K.; Amani, V.M.; Rao, K.K.; Griesinger, A.M.; Kleinschmidt-DeMasters, B.K.; Johnston, J.M.; Anderson, R.C.E.; Rosenfeld, A.; et al. Identification of Targets for Rational Pharmacological Therapy in Childhood Craniopharyngioma. *Acta Neuropathol. Commun.* **2015**, *3*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

24. Barry, S.; Carlsen, E.; Marques, P.; Stiles, C.E.; Gadaleta, E.; Berney, D.M.; Roncaroli, F.; Chelala, C.; Solomou, A.; Herincs, M.; et al. Tumor Microenvironment Defines the Invasive Phenotype of AIP-Mutation-Positive Pituitary Tumors. *Oncogene* **2019**, *38*, 5381–5395. [[CrossRef](#)]
25. Hernández-Ramírez, L.C.; Morgan, R.M.L.; Barry, S.; D'Acquisto, F.; Prodromou, C.; Korbonits, M. Multi-Chaperone Function Modulation and Association with Cytoskeletal Proteins Are Key Features of the Function of AIP in the Pituitary Gland. *Oncotarget* **2018**, *9*, 9177–9198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Marques, P.; Barry, S.; Carlsen, E.; Collier, D.; Ronaldson, A.; Awad, S.; Dorward, N.; Grieve, J.; Mendoza, N.; Muquit, S.; et al. Chemokines Modulate the Tumour Microenvironment in Pituitary Neuroendocrine Tumours. *Acta Neuropathol. Commun.* **2019**, *7*, 1–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Giubellino, A.; Shankavaram, U.; Bullova, P.; Schovaneck, J.; Zhang, Y.; Shen, M.; Patel, N.; Elkahloun, A.; Lee, M.-J.; Trepel, J.; et al. High-Throughput Screening for the Identification of New Therapeutic Options for Metastatic Pheochromocytoma and Paraganglioma. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e90458. [[CrossRef](#)]
28. Shankavaram, U.; Fliedner, S.M.J.; Elkahloun, A.G.; Barb, J.J.; Munson, P.J.; Huynh, T.T.; Matro, J.C.; Turkova, H.; Linehan, W.M.; Timmers, H.J.; et al. Genotype and Tumor Locus Determine Expression Profile of Pseudohypoxic Pheochromocytomas and Paragangliomas. *Neoplasia* **2013**, *15*, 435–447. [[CrossRef](#)]
29. Yang, C.; Zhuang, Z.; Fliedner, S.M.J.; Shankavaram, U.; Sun, M.G.; Bullova, P.; Zhu, R.; Elkahloun, A.G.; Kourlas, P.J.; Merino, M.; et al. Germ-Line PHD1 and PHD2 Mutations Detected in Patients with Pheochromocytoma/Paraganglioma-Polycythemia. *J. Mol. Med.* **2015**, *93*, 93–104. [[CrossRef](#)]
30. López-Jiménez, E.; Gómez-López, G.; Leandro-García, L.J.; Muñoz, I.; Schiavi, F.; Montero-Conde, C.; de Cubas, A.A.; Ramires, R.; Landa, I.; Leskelä, S.; et al. Research Resource: Transcriptional Profiling Reveals Different Pseudohypoxic Signatures in SDHB and VHL-Related Pheochromocytomas. *Mol. Endocrinol.* **2010**, *24*, 2382–2391. [[CrossRef](#)]
31. Tömböl, Z.; Szabó, P.M.; Molnár, V.; Wiener, Z.; Tölgyesi, G.; Horányi, J.; Riesz, P.; Reismann, P.; Patócs, A.; Likó, I.; et al. Integrative Molecular Bioinformatics Study of Human Adrenocortical Tumors: MicroRNA, Tissue-Specific Target Prediction, and Pathway Analysis. *Endocr. Relat. Cancer* **2009**, *16*, 895–906. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Soon, P.S.H.; Gill, A.J.; Benn, D.E.; Clarkson, A.; Robinson, B.G.; McDonald, K.L.; Sidhu, S.B. Microarray Gene Expression and Immunohistochemistry Analyses of Adrenocortical Tumors Identify IGF2 and Ki-67 as Useful in Differentiating Carcinomas from Adenomas. *Endocr. Relat. Cancer* **2009**, *16*, 573–583. [[CrossRef](#)]
33. Demeure, M.J.; Coan, K.E.; Grant, C.S.; Komorowski, R.A.; Stephan, E.; Sinari, S.; Mount, D.; Bussey, K.J. PTTG1 Over-Expression in Adrenocortical Cancer Is Associated with Poor Survival and Represents a Potential Therapeutic Target. *Surgery* **2013**, *154*, 1405–1416. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Legendre, C.R.; Demeure, M.J.; Whitsett, T.G.; Gooden, G.C.; Bussey, K.J.; Jung, S.; Waibhav, T.; Kim, S.; Salhia, B. Pathway Implications of Aberrant Global Methylation in Adrenocortical Cancer. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0150629. [[CrossRef](#)]
35. Heaton, J.H.; Wood, M.A.; Kim, A.C.; Lima, L.O.; Barlaskar, F.M.; Almeida, M.Q.; Fragoso, M.C.B.V.; Kuick, R.; Lerario, A.M.; Simon, D.P.; et al. Progression to Adrenocortical Tumorigenesis in Mice and Humans through Insulin-Like Growth Factor 2 and β -Catenin. *Am. J. Pathol.* **2012**, *181*, 1017–1033. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Barrett, T.; Wilhite, S.E.; Ledoux, P.; Evangelista, C.; Kim, I.F.; Tomashevsky, M.; Marshall, K.A.; Phillippy, K.H.; Sherman, P.M.; Holko, M.; et al. NCBI GEO: Archive for Functional Genomics Data Sets—Update. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 991–995. [[CrossRef](#)]
37. Albrecht, H.; Kübler, E. Systematic Meta-Analysis Identifies Co-Expressed Kinases and GPCRs in Ovarian Cancer Tissues Revealing a Potential for Targeted Kinase Inhibitor Delivery. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 454. [[CrossRef](#)]
38. Heberle, H.; Meirelles, G.V.; da Silva, F.R.; Telles, G.P.; Minghim, R. InteractiVenn: A Web-Based Tool for the Analysis of Sets through Venn Diagrams. *BMC Bioinform.* **2015**, *16*, 169. [[CrossRef](#)]
39. Wishart, D.S.; Knox, C.; Guo, A.C.; Cheng, D.; Shrivastava, S.; Tzur, D.; Gautam, B.; Hassanali, M. DrugBank: A Knowledgebase for Drugs, Drug Actions and Drug Targets. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 901–906. [[CrossRef](#)]
40. Gaulton, A.; Hersey, A.; Nowotka, M.; Bento, A.P.; Chambers, J.; Mendez, D.; Motow, P.; Atkinson, F.; Bellis, L.J.; Cibrián-Uhalte, E.; et al. The ChEMBL Database in 2017. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, D945–D954. [[CrossRef](#)]
41. Klingler, M.; Hörmann, A.A.; Guggenberg, E.V. Cholecystokinin-2 Receptor Targeting with Radiolabeled Peptides: Current Status and Future Directions. *Curr. Med. Chem.* **2020**, *27*, 7112–7132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Roy, J.; Putt, K.S.; Coppola, D.; Leon, M.E.; Khalil, F.K.; Centeno, B.A.; Clark, N.; Stark, V.E.; Morse, D.L.; Low, P.S. Assessment of Cholecystokinin 2 Receptor (CCK2R) in Neoplastic Tissue. *Oncotarget* **2016**, *7*, 14605–14615. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Dicitore, A.; Cantone, M.C.; Gaudenzi, G.; Saronni, D.; Carra, S.; Borghi, M.O.; Albertelli, M.; Ferone, D.; Hofland, L.J.; Persani, L.; et al. Efficacy of a Novel Second-Generation Somatostatin-Dopamine Chimera (TBR-065) in Human Medullary Thyroid Cancer: A Preclinical Study. *NEN* **2021**, *111*, 937–950. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Zink, A.; Scherübl, H.; Höflich, M.; Hescheler, J.; Raue, F. Adenosine A1-Receptors Inhibit CAMP and Ca²⁺ Mediated Calcitonin Secretion in C-Cells. *Horm. Metab. Res.* **1995**, *27*, 408–414. [[CrossRef](#)]
45. Richter, G.H.S.; Fasan, A.; Hauer, K.; Grunewald, T.G.P.; Berns, C.; Rössler, S.; Naumann, I.; Staeger, M.S.; Fulda, S.; Esposito, I.; et al. G-Protein Coupled Receptor 64 Promotes Invasiveness and Metastasis in Ewing Sarcomas through PGF and MMP1. *J. Pathol.* **2013**, *230*, 70–81. [[CrossRef](#)]

46. Peeters, M.C.; Fokkelman, M.; Boogaard, B.; Egerod, K.L.; van de Water, B.; IJzerman, A.P.; Schwartz, T.W. The Adhesion G Protein-Coupled Receptor G2 (ADGRG2/GPR64) Constitutively Activates SRE and NF κ B and Is Involved in Cell Adhesion and Migration. *Cell. Signal.* **2015**, *27*, 2579–2588. [[CrossRef](#)]
47. Jiang, X.; Xu, X.; Wu, M.; Guan, Z.; Su, X.; Chen, S.; Wang, H.; Teng, L. GPRC5A: An Emerging Biomarker in Human Cancer. *Biomed Res. Int.* **2018**, *2018*, 1823726. [[CrossRef](#)]
48. Ulivieri, A.; Lavra, L.; Dominici, R.; Giacomelli, L.; Brunetti, E.; Sciacca, L.; Trovato, M.; Barresi, G.; Foukakis, T.; Jia-Jing, L.; et al. Frizzled-1 Is down-Regulated in Follicular Thyroid Tumours and Modulates Growth and Invasiveness. *J. Pathol.* **2008**, *215*, 87–96. [[CrossRef](#)]
49. Sheils, O.M.; Sweeney, E.C. TSH Receptor Status of Thyroid Neoplasms—TaqMan RT-PCR Analysis of Archival Material. *J. Pathol.* **1999**, *188*, 87–92. [[CrossRef](#)]
50. Elston, M.S.; Gill, A.J.; Conaglen, J.V.; Clarkson, A.; Shaw, J.M.; Law, A.J.J.; Cook, R.J.; Little, N.S.; Clifton-Bligh, R.J.; Robinson, B.G.; et al. Wnt Pathway Inhibitors Are Strongly Down-Regulated in Pituitary Tumors. *Endocrinology* **2008**, *149*, 1235–1242. [[CrossRef](#)]
51. Ren, J.; Jian, F.; Jiang, H.; Sun, Y.; Pan, S.; Gu, C.; Chen, X.; Wang, W.; Ning, G.; Bian, L.; et al. Decreased Expression of SFRP2 Promotes Development of the Pituitary Corticotroph Adenoma by Upregulating Wnt Signaling. *Int. J. Oncol.* **2018**, *52*, 1934–1946. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Wu, Y.; Bai, J.; Li, Z.; Wang, F.; Cao, L.; Liu, C.; Yu, S.; Yu, G.; Zhang, Y. Low Expression of Secreted Frizzled-Related Protein 4 in Aggressive Pituitary Adenoma. *Pituitary* **2015**, *18*, 335–342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Nishikawa, T.; Tsuno, N.H.; Shuno, Y.; Sasaki, K.; Hongo, K.; Okaji, Y.; Sunami, E.; Kitayama, J.; Takahashi, K.; Nagawa, H. Antiangiogenic Effect of a Selective 5-HT₄ Receptor Agonist. *J. Surg. Res.* **2010**, *159*, 696–704. [[CrossRef](#)]
54. Zhang, L.; Song, Q.; Zhang, X.; Li, L.; Xu, X.; Xu, X.; Li, X.; Wang, Z.; Lin, Y.; Li, X.; et al. Zelnorm, an Agonist of 5-Hydroxytryptamine 4-Receptor, Acts as a Potential Antitumor Drug by Targeting JAK/STAT3 Signaling. *Investig. New Drugs* **2020**, *38*, 311–320. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Pawlikowski, M.; Winczyk, K.; Sledź, B. Immunohistochemical Detection of Angiotensin Receptors AT1 and AT2 in Adrenal Tumors. *Folia Histochem. Et Cytobiol.* **2008**, *46*, 51–55. [[CrossRef](#)]
56. Wolf, G.; Harendza, S.; Schroeder, R.; Wenzel, U.; Zahner, G.; Butzmann, U.; Freeman, R.S.; Stahl, R.A.K. Angiotensin II's Antiproliferative Effects Mediated Through AT2-Receptors Depend On Down-Regulation of SM-20. *Lab. Investig.* **2002**, *82*, 1305–1317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Zhao, N.; Peacock, S.O.; Lo, C.H.; Heidman, L.M.; Rice, M.A.; Fahrenholtz, C.D.; Greene, A.M.; Magani, F.; Copello, V.A.; Martinez, M.J.; et al. Arginine Vasopressin Receptor 1a Is a Therapeutic Target for Castration-Resistant Prostate Cancer. *Sci. Transl. Med.* **2019**, *11*, eaaw4636. [[CrossRef](#)]
58. Mazzocchi, G.; Aragona, F.; Malendowicz, L.K.; Nussdorfer, G.G. PTH and PTH-Related Peptide Enhance Steroid Secretion from Human Adrenocortical Cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2001**, *280*, 209–213. [[CrossRef](#)]
59. Gao, X.; Yamazaki, Y.; Tezuka, Y.; Onodera, Y.; Ogata, H.; Omata, K.; Morimoto, R.; Nakamura, Y.; Satoh, F.; Sasano, H. The Crosstalk between Aldosterone and Calcium Metabolism in Primary Aldosteronism: A Possible Calcium Metabolism-Associated Aberrant “Neoplastic” Steroidogenesis in Adrenals. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2019**, *193*, 105434. [[CrossRef](#)]
60. Rizk-Rabin, M.; Assie, G.; Rene-Corail, F.; Perlemonoine, K.; Hamzaoui, H.; Tissier, F.; Lieberherr, M.; Bertagna, X.; Bertherat, J.; Bouiziar, Z. Differential Expression of Parathyroid Hormone-Related Protein in Adrenocortical Tumors: Autocrine/Paracrine Effects on the Growth and Signaling Pathways in H295R Cells. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2008**, *17*, 2275–2285. [[CrossRef](#)]
61. Song, G.J.; Fiaschi-Taesch, N.; Bisello, A. Endogenous Parathyroid Hormone-Related Protein Regulates the Expression of PTH Type 1 Receptor and Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells. *Mol. Endocrinol.* **2009**, *23*, 1681–1690. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Ho, P.W.M.; Goradia, A.; Russell, M.R.; Chalk, A.M.; Milley, K.M.; Baker, E.K.; Danks, J.A.; Slavin, J.L.; Walia, M.; Crimeen-Irwin, B.; et al. Knockdown of PTHR1 in Osteosarcoma Cells Decreases Invasion and Growth and Increases Tumor Differentiation in Vivo. *Oncogene* **2015**, *34*, 2922–2933. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Jonklaas, J.; Sarlis, N.J.; Litofsky, D.; Ain, K.B.; Bigos, S.T.; Brierley, J.D.; Cooper, D.S.; Haugen, B.R.; Ladenson, P.W.; Magner, J.; et al. Outcomes of Patients with Differentiated Thyroid Carcinoma Following Initial Therapy. *Thyroid* **2006**, *16*, 1229–1242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Marchalant, Y.; Brownjohn, P.W.; Bonnet, A.; Kleffmann, T.; Ashton, J.C. Validating Antibodies to the Cannabinoid CB2 Receptor. *J. Histochem. Cytochem.* **2014**, *62*, 395–404. [[CrossRef](#)]
65. Kaiser, F.; Morawski, M.; Krohn, K.; Rayes, N.; Hsiao, C.-C.; Quaas, M.; Aust, G. Adhesion GPCR GPR56 Expression Profiling in Human Tissues. *Cells* **2021**, *10*, 3557. [[CrossRef](#)]
66. Koussounadis, A.; Langdon, S.P.; Um, I.H.; Harrison, D.J.; Smith, V.A. Relationship between Differentially Expressed MRNA and MRNA-Protein Correlations in a Xenograft Model System. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 10775. [[CrossRef](#)]

**Identification of dysregulated expression of G protein coupled receptors in endocrine tumors by
bioinformatics analysis : potential drug targets?**

**Valentine Suteau, Mathilde Munier, Rym Ben Boubaker, Méline Wery, Daniel Henrion, Patrice
Rodien and Claire Briet**

Supplemental Table 1. List of GPCR genes included in bioinformatics analysis.

<i>ACKR1</i>	<i>ADGRG7</i>	<i>BRS3</i>	<i>CHRM5</i>	<i>FFAR2</i>
<i>ACKR2</i>	<i>ADGRL1</i>	<i>C3AR1</i>	<i>CMKLR1</i>	<i>FFAR3</i>
<i>ACKR3</i>	<i>ADGRL2</i>	<i>C5AR1</i>	<i>CNR1</i>	<i>FFAR4</i>
<i>ACKR4</i>	<i>ADGRL3</i>	<i>C5AR2</i>	<i>CNR2</i>	<i>FPR1</i>
<i>ADCYAP1R1</i>	<i>ADGRL4</i>	<i>CALCR</i>	<i>CRHR1</i>	<i>FPR2</i>
<i>ADGRA1</i>	<i>ADGRV1</i>	<i>CALCRL</i>	<i>CRHR2</i>	<i>FPR3</i>
<i>ADGRA2</i>	<i>ADORA1</i>	<i>CASR</i>	<i>CX3CR1</i>	<i>FSHR</i>
<i>ADGRA3</i>	<i>ADORA2A</i>	<i>CCKAR</i>	<i>CXCR1</i>	<i>FZD1</i>
<i>ADGRB1</i>	<i>ADORA2B</i>	<i>CCKBR</i>	<i>CXCR2</i>	<i>FZD10</i>
<i>ADGRB2</i>	<i>ADORA3</i>	<i>CCR1</i>	<i>CXCR3</i>	<i>FZD2</i>
<i>ADGRB3</i>	<i>ADRA1A</i>	<i>CCR10</i>	<i>CXCR4</i>	<i>FZD3</i>
<i>ADGRD1</i>	<i>ADRA1B</i>	<i>CCR2</i>	<i>CXCR5</i>	<i>FZD4</i>
<i>ADGRE1</i>	<i>ADRA1D</i>	<i>CCR3</i>	<i>CXCR6</i>	<i>FZD5</i>
<i>ADGRE2</i>	<i>ADRA2A</i>	<i>CCR4</i>	<i>CYSLTR1</i>	<i>FZD6</i>
<i>ADGRE3</i>	<i>ADRA2B</i>	<i>CCR5</i>	<i>CYSLTR2</i>	<i>FZD7</i>
<i>ADGRE5</i>	<i>ADRA2C</i>	<i>CCR6</i>	<i>DRD1</i>	<i>FZD8</i>
<i>ADGRF1</i>	<i>ADRB1</i>	<i>CCR7</i>	<i>DRD2</i>	<i>FZD9</i>
<i>ADGRF2</i>	<i>ADRB2</i>	<i>CCR8</i>	<i>DRD3</i>	<i>GABBR1</i>
<i>ADGRF3</i>	<i>ADRB3</i>	<i>CCR9</i>	<i>DRD4</i>	<i>GABBR2</i>
<i>ADGRF4</i>	<i>AGTR1</i>	<i>CCRL2</i>	<i>DRD5</i>	<i>GALR1</i>
<i>ADGRF5</i>	<i>AGTR2</i>	<i>CELSR1</i>	<i>EDNRA</i>	<i>GALR2</i>
<i>ADGRG1</i>	<i>APLNR</i>	<i>CELSR2</i>	<i>EDNRB</i>	<i>GALR3</i>
<i>ADGRG2</i>	<i>AVPR1A</i>	<i>CELSR3</i>	<i>F2R</i>	<i>GCCR</i>
<i>ADGRG3</i>	<i>AVPR1B</i>	<i>CHRM1</i>	<i>F2RL1</i>	<i>GHRHR</i>
<i>ADGRG4</i>	<i>AVPR2</i>	<i>CHRM2</i>	<i>F2RL2</i>	<i>GHSR</i>
<i>ADGRG5</i>	<i>BDKRB1</i>	<i>CHRM3</i>	<i>F2RL3</i>	<i>GIPR</i>
<i>ADGRG6</i>	<i>BDKRB2</i>	<i>CHRM4</i>	<i>FFAR1</i>	<i>GLP1R</i>

<i>GLP2R</i>	<i>GPR160</i>	<i>GPR4</i>	<i>GRM6</i>	<i>LHCGR</i>
<i>GNRHR</i>	<i>GPR161</i>	<i>GPR45</i>	<i>GRM7</i>	<i>LPAR1</i>
<i>GNRHR2</i>	<i>GPR162</i>	<i>GPR50</i>	<i>GRM8</i>	<i>LPAR2</i>
<i>GPBAR1</i>	<i>GPR17</i>	<i>GPR52</i>	<i>GRPR</i>	<i>LPAR3</i>
<i>GPBR1</i>	<i>GPR171</i>	<i>GPR55</i>	<i>HCAR1</i>	<i>LPAR4</i>
<i>GPR1</i>	<i>GPR173</i>	<i>GPR6</i>	<i>HCAR2</i>	<i>LPAR5</i>
<i>GPR1</i>	<i>GPR174</i>	<i>GPR61</i>	<i>HCAR3</i>	<i>LPAR6</i>
<i>GPR101</i>	<i>GPR176</i>	<i>GPR62</i>	<i>HCRTR1</i>	<i>LTB4R</i>
<i>GPR107</i>	<i>GPR179</i>	<i>GPR63</i>	<i>HCRTR2</i>	<i>LTB4R2</i>
<i>GPR119</i>	<i>GPR18</i>	<i>GPR65</i>	<i>HRH1</i>	<i>MAS1</i>
<i>GPR12</i>	<i>GPR182</i>	<i>GPR68</i>	<i>HRH2</i>	<i>MAS1L</i>
<i>GPR132</i>	<i>GPR183</i>	<i>GPR75</i>	<i>HRH3</i>	<i>MC1R</i>
<i>GPR135</i>	<i>GPR19</i>	<i>GPR78</i>	<i>HRH4</i>	<i>MC2R</i>
<i>GPR137</i>	<i>GPR20</i>	<i>GPR82</i>	<i>HTR1A</i>	<i>MC3R</i>
<i>GPR139</i>	<i>GPR20</i>	<i>GPR83</i>	<i>HTR1B</i>	<i>MC4R</i>
<i>GPR141</i>	<i>GPR21</i>	<i>GPR84</i>	<i>HTR1D</i>	<i>MC5R</i>
<i>GPR142</i>	<i>GPR22</i>	<i>GPR85</i>	<i>HTR1E</i>	<i>MCHR1</i>
<i>GPR143</i>	<i>GPR25</i>	<i>GPR87</i>	<i>HTR1F</i>	<i>MCHR2</i>
<i>GPR146</i>	<i>GPR26</i>	<i>GPR88</i>	<i>HTR2A</i>	<i>MLNR</i>
<i>GPR148</i>	<i>GPR27</i>	<i>GPRC5A</i>	<i>HTR2B</i>	<i>MARGPRD</i>
<i>GPR149</i>	<i>GPR3</i>	<i>GPRC5B</i>	<i>HTR2C</i>	<i>MARGPRE</i>
<i>GPR15</i>	<i>GPR31</i>	<i>GPRC5C</i>	<i>HTR4</i>	<i>MARGPRF</i>
<i>GPR150</i>	<i>GPR32</i>	<i>GPRC5D</i>	<i>HTR5A</i>	<i>MARGPRG</i>
<i>GPR151</i>	<i>GPR33</i>	<i>GPRC6A</i>	<i>HTR6</i>	<i>MARGPRX1</i>
<i>GPR152</i>	<i>GPR34</i>	<i>GRM1</i>	<i>HTR7</i>	<i>MARGPRX2</i>
<i>GPR153</i>	<i>GPR35</i>	<i>GRM2</i>	<i>KISS1R</i>	<i>MARGPRX3</i>
<i>GPR156</i>	<i>GPR37</i>	<i>GRM3</i>	<i>LGR4</i>	<i>MARGPRX4</i>
<i>GPR157</i>	<i>GPR37L1</i>	<i>GRM4</i>	<i>LGR5</i>	<i>MTNR1A</i>
<i>GPR158</i>	<i>GPR39</i>	<i>GRM5</i>	<i>LGR6</i>	<i>MTNR1B</i>

<i>NMBR</i>	<i>OXER1</i>	<i>PTGIR</i>	<i>TAAR3</i>	<i>TAS2R39</i>
<i>NMUR1</i>	<i>OXGR1</i>	<i>PTH1R</i>	<i>TAAR5</i>	<i>TAS2R4</i>
<i>NMUR2</i>	<i>OXTR</i>	<i>PTH2R</i>	<i>TAAR6</i>	<i>TAS2R40</i>
<i>NPBWR1</i>	<i>P2RY1</i>	<i>QRFP</i>	<i>TAAR8</i>	<i>TAS2R41</i>
<i>NPBWR2</i>	<i>P2RY10</i>	<i>RXFP1</i>	<i>TAAR9</i>	<i>TAS2R42</i>
<i>NPBWR2</i>	<i>P2RY11</i>	<i>RXFP2</i>	<i>TACR1</i>	<i>TAS2R43</i>
<i>NPFFR1</i>	<i>P2RY12</i>	<i>RXFP3</i>	<i>TACR2</i>	<i>TAS2R46</i>
<i>NPFFR2</i>	<i>P2RY13</i>	<i>RXFP4</i>	<i>TACR3</i>	<i>TAS2R5</i>
<i>NPSR1</i>	<i>P2RY14</i>	<i>S1PR1</i>	<i>TAS1R1</i>	<i>TAS2R50</i>
<i>NPY1R</i>	<i>P2RY2</i>	<i>S1PR2</i>	<i>TAS1R2</i>	<i>TAS2R60</i>
<i>NPY2R</i>	<i>P2RY4</i>	<i>S1PR3</i>	<i>TAS1R3</i>	<i>TAS2R7</i>
<i>NPY4R</i>	<i>P2RY6</i>	<i>S1PR4</i>	<i>TAS2R1</i>	<i>TAS2R8</i>
<i>NPY5R</i>	<i>P2RY8</i>	<i>S1PR5</i>	<i>TAS2R10</i>	<i>TAS2R9</i>
<i>NPY6R</i>	<i>PRLHR</i>	<i>SCTR</i>	<i>TAS2R13</i>	<i>TBXA2R</i>
<i>NTSR1</i>	<i>PROKR1</i>	<i>SMO</i>	<i>TAS2R14</i>	<i>TPRA1</i>
<i>NTSR2</i>	<i>PROKR2</i>	<i>SSTR1</i>	<i>TAS2R16</i>	<i>TRHR</i>
<i>OPN3</i>	<i>PTAFR</i>	<i>SSTR2</i>	<i>TAS2R19</i>	<i>TSHR</i>
<i>OPN4</i>	<i>PTGDR</i>	<i>SSTR3</i>	<i>TAS2R19</i>	<i>UTS2R</i>
<i>OPN5</i>	<i>PTGDR2</i>	<i>SSTR4</i>	<i>TAS2R20</i>	<i>VIPR1</i>
<i>OPRD1</i>	<i>PTGER1</i>	<i>SSTR5</i>	<i>TAS2R20</i>	<i>VIPR2</i>
<i>OPRK1</i>	<i>PTGER2</i>	<i>SUCNR1</i>	<i>TAS2R3</i>	<i>XCR1</i>
<i>OPRL1</i>	<i>PTGER3</i>	<i>TAAR1</i>	<i>TAS2R30</i>	
<i>OPRM1</i>	<i>PTGER4</i>	<i>TAAR2</i>	<i>TAS2R31</i>	
<i>OR51E1</i>	<i>PTGFR</i>		<i>TAS2R38</i>	

Supplemental Table 2. List of DEG selected from analysis of Pituitary adenoma datasets

GSE119063	GSE51618	GSE36314	GSE63357	GSE26966
<i>ADRA1B</i>	<i>ADGRG5</i>	<i>FZD7</i>	<i>ADGRB3</i>	<i>ACKR1</i>
<i>AVPR1B</i>	<i>ADGRL1</i>		<i>CX3CR1</i>	<i>ADGRB2</i>
<i>CCKBR</i>	<i>CCR6</i>		<i>DRD2</i>	<i>ADGRD1</i>
<i>CCR5</i>	<i>CRHR1</i>		<i>FZD1</i>	<i>ADGRE5</i>
<i>CRHR1</i>	<i>CRHR2</i>		<i>FZD7</i>	<i>ADGRG2</i>
<i>CRHR1</i>	<i>DRD3</i>		<i>FZD9</i>	<i>ADGRL1</i>
<i>CRHR2</i>	<i>FZD7</i>		<i>GALR1</i>	<i>ADGRL3</i>
<i>FFAR4</i>	<i>GALR3</i>		<i>GNRHR</i>	<i>ADGRL4</i>
<i>FSHR</i>	<i>GHRHR</i>		<i>GPR153</i>	<i>ADORA3</i>
<i>FZD1</i>	<i>GIPR</i>		<i>GPR161</i>	<i>ADRA2A</i>
<i>FZD5</i>	<i>GNRHR</i>		<i>GPR19</i>	<i>APLNR</i>
<i>FZD7</i>	<i>GNRHR2</i>		<i>GPR26</i>	<i>CRHR1</i>
<i>FZD9</i>	<i>GPR135</i>		<i>GPR3</i>	<i>CX3CR1</i>
<i>GALR1</i>	<i>GPR137</i>		<i>GPR34</i>	<i>CYSLTR1</i>
<i>GHRHR</i>	<i>GPR176</i>		<i>GRM5</i>	<i>DRD2</i>
<i>GIPR</i>	<i>GPR45</i>		<i>LGR6</i>	<i>F2R</i>
<i>GNRHR</i>	<i>GPR62</i>		<i>MC1R</i>	<i>F2RL1</i>
<i>GPR12</i>	<i>HRH2</i>			<i>FFAR4</i>
<i>GPR149</i>	<i>HTR1F</i>			<i>FPR1</i>
<i>GPR152</i>	<i>HTR4</i>			<i>FZD1</i>
<i>GPR45</i>	<i>LGR6</i>			<i>FZD10</i>
<i>GPR54</i>	<i>MC2R</i>			<i>FZD3</i>
<i>GPR6</i>	<i>MRGPRX4</i>			<i>FZD7</i>

GSE119063 **GSE51618** **GSE36314** **GSE63357** **GSE26966**

<i>GPR62</i>	<i>NPBWR1</i>	<i>GABBR1</i>
<i>HTR2B</i>	<i>NPFFR2</i>	<i>GALR1</i>
<i>HTR5A</i>	<i>NTSR1</i>	<i>GHRHR</i>
<i>LGR4</i>	<i>P2RY1</i>	<i>GHSR</i>
<i>LPAR6</i>	<i>SSTR2</i>	<i>GNRHR</i>
<i>MC2R</i>	<i>SSTR3</i>	<i>GPR135</i>
<i>NPY1R</i>	<i>SSTR5</i>	<i>GPR143</i>
<i>NPY2R</i>	<i>TAAR8</i>	<i>GPR153</i>
<i>NPY5R</i>	<i>VN1R5</i>	<i>GPR158</i>
<i>OXER1</i>		<i>GPR160</i>
<i>P2RY1</i>		<i>GPR161</i>
<i>P2RY12</i>		<i>GPR173</i>
<i>PTGER1</i>		<i>GPR176</i>
<i>SSTR2</i>		<i>GPR22</i>
<i>SSTR5</i>		<i>GPR27</i>
<i>VIPR2</i>		<i>GPR34</i>
		<i>GPR6</i>
		<i>GPR61</i>
		<i>GPR68</i>
		<i>GPR75</i>
		<i>GPR85</i>
		<i>GPRC5C</i>
		<i>GRM1</i>
		<i>GRM5</i>

GSE119063 **GSE51618** **GSE36314** **GSE63357** **GSE26966**

GRM8

HRH3

HTR6

LGR6

LPAR6

MATK

MC1R

NPY6R

OPN3

P2RY1

P2RY12

P2RY13

PRLHR

PTGER3

PTGER4

S1PR1

S1PR3

SSTR2

TBXA2R

Supplemental Table 3. List of DEG selected from analysis of pheochromocytoma datasets

GSE50442	GSE39716	GSE19422	GSE60459
<i>GRM7</i>	<i>GRM7</i>	<i>GPR158</i>	<i>ADGRD1</i>
<i>HRH1</i>	<i>NPY5R</i>	<i>GPR19</i>	<i>S1PR5</i>
<i>GPR137C</i>	<i>EDNRA</i>	<i>P2RY2</i>	<i>GPR18</i>
<i>GPR4</i>	<i>LHCGR</i>	<i>ADGRB3</i>	<i>CCR8</i>
<i>CNR1</i>	<i>GPR4</i>	<i>MC2R</i>	<i>HTR2B</i>
<i>P2RY8</i>	<i>HCRTR1</i>	<i>ADGRF4</i>	<i>GPR143</i>
<i>ADRB2</i>	<i>ADGRF4</i>	<i>ADGRG5</i>	<i>NPY1R</i>
<i>CX3CR1</i>	<i>CHRM1</i>	<i>OR7E5P</i>	<i>GPR82</i>
<i>LHCGR</i>	<i>CX3CR1</i>	<i>TBXA2R</i>	<i>FZD1</i>
<i>EDNRA</i>	<i>CNR1</i>	<i>GALR1</i>	<i>FSHR</i>
<i>GHSR</i>	<i>HRH1</i>	<i>LGR4</i>	<i>CASR</i>
<i>ADGRF4</i>	<i>P2RY12</i>	<i>NPY6R</i>	<i>GRM3</i>
	<i>HTR2B</i>	<i>GPR68</i>	<i>GPR52</i>
	<i>LGR4</i>	<i>OPN4</i>	<i>VIPR2</i>
	<i>S1PR1</i>	<i>PTGER3</i>	<i>MC2R</i>
	<i>GHSR</i>	<i>CELSR3</i>	<i>CMKLR1</i>
	<i>AGTR2</i>	<i>ADGRL3</i>	<i>GPR182</i>
	<i>APLNR</i>	<i>ADGRV1</i>	<i>P2RY12</i>
	<i>ACKR3</i>	<i>ADGRA1</i>	<i>RHO</i>
	<i>F2RL3</i>	<i>GPR176</i>	<i>CXCR3</i>
	<i>ADGRG7</i>	<i>NTSR2</i>	<i>MTNR1B</i>
	<i>SSTR2</i>	<i>SMO</i>	<i>F2RL2</i>
	<i>GABBR2</i>	<i>GNRHR</i>	<i>TRHR</i>
	<i>CALCR</i>	<i>GRM3</i>	<i>AVPR1B</i>

GSE50442 **GSE39716** **GSE19422** **GSE60459**

<i>CALCRL</i>	<i>HCRTR1</i>	<i>HTR4</i>
<i>CHRM3</i>	<i>AVPR1A</i>	<i>AGTR2</i>
<i>BDKRB2</i>	<i>GRM8</i>	<i>CCR5</i>
<i>FZD5</i>	<i>GPR20</i>	<i>NPY2R</i>
<i>GPR20</i>	<i>GPR22</i>	<i>GNRHR</i>
<i>RXFP1</i>	<i>CCR10</i>	<i>FPR3</i>
<i>GPR21</i>	<i>FZD4</i>	<i>SMO</i>
<i>ADGRA2</i>	<i>AGTR2</i>	<i>ACKR4</i>
<i>ADGRL4</i>	<i>GPR135</i>	<i>FFAR1</i>
<i>CMKLR1</i>	<i>GPR137C</i>	<i>GPR3</i>
<i>HTR1F</i>	<i>AGTR1</i>	<i>TACR3</i>
<i>MCHR1</i>	<i>SSTR1</i>	
<i>ACKR2</i>	<i>ADGRE5</i>	
<i>P2RY8</i>	<i>CHRM3</i>	
<i>ADGRL3</i>	<i>OPRK1</i>	
<i>C3AR1</i>	<i>FZD9</i>	
<i>GPR65</i>	<i>PTH1R</i>	
<i>GPR52</i>	<i>RRH</i>	
<i>S1PR5</i>	<i>GABBR1</i>	
<i>GPR3</i>	<i>NPY5R</i>	
<i>GPR82</i>	<i>FZD3</i>	
<i>GPR17</i>	<i>GPR27</i>	
<i>GPR63</i>	<i>GRIPAP1</i>	
	<i>ADGRL1</i>	

GSE50442 GSE39716 GSE19422 GSE60459

CHRM2

GPR25

P2RY8

LPAR1

S1PR3

MCHR2

HPRT1

PRLHR

ADGRF1

OPN3

PTGER2

GPR143

HTR1E

GPR61

GPR65

F2RL3

ACKR3

MCHR1

LTB4R2

CCR1

GPR83

MC1R

ADORA3

NMUR1

GSE50442 **GSE39716** **GSE19422** **GSE60459**

CCR6

CHRM5

RXFP1

GPRC5A

FZD2

FPR2

DRD2

PTGER4

OPRM1

SUCNR1

CCR3

CCR4

HRH1

GPR119

Supplemental Table 4. List of DEG selected from analysis of paraganglioma datasets

GSE50442	GSE39716	GSE19422	GSE60459
<i>ACKR3</i>	<i>ACKR3</i>	<i>ACKR3</i>	<i>ACKR4</i>
<i>ADCYAP1R1</i>	<i>ADGRA1</i>	<i>ADGRA2</i>	<i>ADGRA3</i>
<i>ADGRE5</i>	<i>ADGRA2</i>	<i>ADGRB3</i>	<i>ADGRG4</i>
<i>ADGRG6</i>	<i>ADGRB3</i>	<i>ADGRE5</i>	<i>ADGRV1</i>
<i>ADGRL3</i>	<i>ADGRF4</i>	<i>ADGRF4</i>	<i>AGTR2</i>
<i>ADGRV1</i>	<i>ADGRG7</i>	<i>ADGRG5</i>	<i>AVPR1A</i>
<i>AVPR1A</i>	<i>ADGRL1</i>	<i>ADGRL1</i>	<i>AVPR1B</i>
<i>C3AR1</i>	<i>ADGRL4</i>	<i>ADGRL3</i>	<i>CASR</i>
<i>CALCRL</i>	<i>AGTR1</i>	<i>ADGRV1</i>	<i>CCKBR</i>
<i>CMKLR1</i>	<i>AGTR2</i>	<i>ADORA2A</i>	<i>CCR5</i>
<i>CNR1</i>	<i>APLNR</i>	<i>ADORA3</i>	<i>CCR8</i>
<i>CX3CR1</i>	<i>AVPR1A</i>	<i>AGTR1</i>	<i>CCR9</i>
<i>CYSLTR2</i>	<i>BDKRB2</i>	<i>AVPR1A</i>	<i>CHRM5</i>
<i>F2RL2</i>	<i>C3AR1</i>	<i>BDKRB1</i>	<i>CMKLR1</i>
<i>FZD5</i>	<i>CHRM1</i>	<i>BDKRB2</i>	<i>CNR2</i>
<i>GPR1</i>	<i>CHRM3</i>	<i>CALCRL</i>	<i>CXCR3</i>
<i>GPR137B</i>	<i>CX3CR1</i>	<i>CELSR3</i>	<i>DRD1</i>
<i>GPR19</i>	<i>EDNRA</i>	<i>CHRM2</i>	<i>FFAR1</i>
<i>GRM7</i>	<i>F2R</i>	<i>CHRM3</i>	<i>FSHR</i>
<i>HRH1</i>	<i>F2RL1</i>	<i>EDNRA</i>	<i>GHRHR</i>
<i>HTR1E</i>	<i>F2RL3</i>	<i>F2RL3</i>	<i>GNRHR</i>
<i>HTR2B</i>	<i>FZD10</i>	<i>FZD3</i>	<i>GPR158</i>
<i>HTR4</i>	<i>FZD5</i>	<i>FZD9</i>	<i>GPR182</i>
<i>LGR4</i>	<i>FZD6</i>	<i>GABBR1</i>	<i>GPR182</i>

GSE50442	GSE39716	GSE19422	GSE60459
<i>MC2R</i>	<i>GALR1</i>	<i>GNRHR</i>	<i>GPR19</i>
<i>MCHR1</i>	<i>GHSR</i>	<i>GPER1</i>	<i>GPR45</i>
<i>NPY5R</i>	<i>GPR137</i>	<i>GPR12</i>	<i>GPR52</i>
<i>NPY6R</i>	<i>GPR143</i>	<i>GPR135</i>	<i>GPR63</i>
<i>OPN3</i>	<i>GPR158</i>	<i>GPR137C</i>	<i>GPR82</i>
<i>OPRK1</i>	<i>GPR161</i>	<i>GPR158</i>	<i>GRM3</i>
<i>OPRM1</i>	<i>GPR173</i>	<i>GPR176</i>	<i>GRM5</i>
<i>OPRM1</i>	<i>GPR20</i>	<i>GPR19</i>	<i>GRM7</i>
<i>OXTR</i>	<i>GPR21</i>	<i>GPR20</i>	<i>HRH4</i>
<i>P2RY12</i>	<i>GPR34</i>	<i>GPR22</i>	<i>HTR2B</i>
<i>PTGER2</i>	<i>GPR4</i>	<i>GPR25</i>	<i>HTR2C</i>
<i>PTH1R</i>	<i>GPR52</i>	<i>GPR27</i>	<i>LGR4</i>
<i>RXFP1</i>	<i>GPR63</i>	<i>GPR61</i>	<i>LHCGR</i>
<i>SSTR2</i>	<i>GPR82</i>	<i>GPR78</i>	<i>MC1R</i>
	<i>GPRC5B</i>	<i>GPR83</i>	<i>MC2R</i>
	<i>GPRC5C</i>	<i>GRM8</i>	<i>MCHR1</i>
	<i>GRM7</i>	<i>HCRTR1</i>	<i>MLNR</i>
	<i>HCRTR1</i>	<i>HTR1E</i>	<i>MTNR1A</i>
	<i>HRH1</i>	<i>KISS1R</i>	<i>MTNR1B</i>
	<i>HTR2B</i>	<i>LGR4</i>	<i>NPFFR1</i>
	<i>LGR4</i>	<i>LPAR1</i>	<i>NPY1R</i>
	<i>LGR5</i>	<i>LPAR3</i>	<i>NPY2R</i>
	<i>LHCGR</i>	<i>LTB4R2</i>	<i>OPN3</i>
	<i>MC2R</i>	<i>MC1R</i>	<i>P2RY1</i>

GSE50442 **GSE39716** **GSE19422** **GSE60459**

<i>NPBWR1</i>	<i>MC2R</i>	<i>P2RY11</i>
<i>NPY5R</i>	<i>MCHR1</i>	<i>PTH2R</i>
<i>NPY6R</i>	<i>NPY1R</i>	<i>PTHR1</i>
<i>OPRK1</i>	<i>NPY5R</i>	<i>RHO</i>
<i>OPRM1</i>	<i>NPY6R</i>	<i>RXFP2</i>
<i>PTGER2</i>	<i>NTSR2</i>	<i>RXFP3</i>
<i>PTH1R</i>	<i>OPN4</i>	<i>S1PR3</i>
<i>RXFP1</i>	<i>OPRK1</i>	<i>S1PR5</i>
<i>S1PR1</i>	<i>OR7E5P</i>	<i>SSTR3</i>
	<i>P2RY14</i>	<i>SUCNR1</i>
	<i>P2RY2</i>	<i>TACR2</i>
	<i>PRLHR</i>	<i>TACR3</i>
	<i>PTGER2</i>	<i>TBXA2R</i>
	<i>PTGER3</i>	<i>VN1R1</i>
	<i>PTH1R</i>	<i>VN1R2</i>
	<i>RRH</i>	<i>NPY5R</i>
	<i>RXFP1</i>	<i>NPY6R</i>
	<i>SMO</i>	<i>RXFP1</i>
	<i>SSTR2</i>	
	<i>SSTR5</i>	
	<i>TBXA2R</i>	

Supplemental Table 5. List of DEG selected from analysis of adrenocortical cancer datasets

GSE14922	GSE12368	GSE19750	GSE33371	GSE90713
<i>ACKR4</i>	<i>ADGRB3</i>	<i>ACKR1</i>	<i>ACKR1</i>	<i>ADGRE2</i>
<i>CMKLR1</i>	<i>ADORA3</i>	<i>ADCYAP1R1</i>	<i>ACKR2</i>	<i>ADORA3</i>
<i>CXCR5</i>	<i>CCR10</i>	<i>ADGRF5</i>	<i>ADGRA1</i>	<i>CMKLR1</i>
<i>HTR2B</i>	<i>FFAR4</i>	<i>ADRB1</i>	<i>ADGRF5</i>	<i>FZD1</i>
<i>PTH1R</i>	<i>GRM3</i>	<i>CXCR2</i>	<i>ADGRG6</i>	<i>GPR182</i>
<i>RXFP2</i>	<i>MC1R</i>	<i>DRD2</i>	<i>ADGRL1</i>	<i>HTR2B</i>
	<i>PRLHR</i>	<i>GPR182</i>	<i>ADORA3</i>	<i>MC2R</i>
	<i>PTGER4</i>	<i>GPR68</i>	<i>ADRA1A</i>	<i>PTH1R</i>
	<i>PTH1R</i>	<i>GPR84</i>	<i>AGTR2</i>	
		<i>HTR4</i>	<i>C3AR1</i>	
		<i>MC2R</i>	<i>C5AR1</i>	
		<i>PTGER4</i>	<i>CCR1</i>	
		<i>PTGIR</i>	<i>CCR8</i>	
		<i>PTH1R</i>	<i>CMKLR1</i>	
		<i>SSTR2</i>	<i>FPR1</i>	
			<i>FPR3</i>	
			<i>FZD1</i>	
			<i>FZD2</i>	
			<i>FZD9</i>	
			<i>GABBR1</i>	
			<i>GLP1R</i>	
			<i>GPBAR1</i>	
			<i>GPR135</i>	
			<i>GPR137C</i>	
			<i>GPR160</i>	
			<i>GPR182</i>	

GSE14922

GSE12368

GSE19750

GSE33371

GSE90713

GPR34

GPR65

GPR82

GPR84

GRM3

HTR1E

HTR2B

LGR4

LPAR6

LTB4R

MC1R

MC2R

MCHR1

OPN5

OXTR

P2RY12

P2RY13

P2RY14

PTAFR

PTGER3

PTGER4

PTGIR

PTH1R

PTPN22

S1PR1

VN1R1

3. Discussion

3.1. Résultats principaux

Ce travail a permis de réaliser le profil transcriptomique des plus fréquentes tumeurs endocrines après celui réalisé dans le cancer non médullaire de la thyroïde (Suteau et al., 2021).

Dans le cas du CMT, nous avons trouvé 14 RCPG exprimés de manière différentielle, 7 sous-exprimés et 7 sur-exprimés. Parmi eux, trois étaient la cible de médicaments : le récepteur de la dopamine, *DRD2*, le récepteur de l'adénosine, *ADORA2B* et le récepteur à la cholécystokinine *CCKBR/CCK2R*.

Concernant les PitNET, le récepteur frizzled *FZD7* était commun à l'ensemble des 5 séries mais n'est pas actuellement ciblé par des médicaments. En revanche, parmi les adénomes invasifs, le récepteur de la somatostatine *SSTR1* était surexprimé dans les tumeurs et confirme l'utilisation actuelle des analogues de la somatostatine. Parmi les autres récepteurs surexprimés dans ce sous-type de tumeur, les récepteurs de la prostaglandine *PTGER2* et de la sérotonine *HTR4* étaient également la cible de plusieurs médicaments.

Aucun RCPG n'a été retrouvé en commun parmi les 4 études portant sur les phéochromocytomes hormis le récepteur de type 2 à l'angiotensine 1 qui avait une tendance à une sous-expression dans toutes les tumeurs. Dans les paragangliomes, sept gènes codant pour des RCPG ont été retrouvés sous-exprimés, notamment le récepteur de la vasopressine (*AVPR1A*) et le récepteur de la PTH (*PTH1R*), qui étaient ciblés par des médicaments. Enfin, dans le corticosurrénalome, le récepteur de la PTH, *PTH1R*, était également sous-exprimé dans les données GEO et validé dans la cohorte du TCGA.

3.2. Approche bio-informatique pour le profil transcriptomique des récepteurs couplés aux protéines G

Nous avons choisi d'utiliser une approche bio-informatique afin d'obtenir un profil d'expression d'un grand nombre de RCPG au sein de différentes tumeurs, plutôt que de limiter les analyses à un seul récepteur. Cette approche permet l'étude d'un nombre important d'échantillons pour des tumeurs rares. Il est cependant nécessaire de définir au préalable des critères de sélection et d'approches méthodologiques claires pour limiter les biais.

Nous avons choisi tout d'abord de ne sélectionner que les études comparant le niveau d'expression transcriptomique entre le tissu sain et le tissu tumoral. Le travail se faisant sur des bases de données publiques, la caractérisation précise de la nature des échantillons était parfois insuffisante. C'est le cas pour certaines tumeurs où l'origine histologique tient une place primordiale comme dans le CMT. En effet, la difficulté dans ce type de cancer est de pouvoir comparer le tissu tumoral à du tissu thyroïdien normal, c'est-à-dire des cellules C. Or dans la grande majorité des études, la comparaison est faite avec du tissu thyroïdien de souche folliculaire. Ceci explique probablement une partie de nos résultats comme la sous-expression du récepteur à la TSH dans notre série. Comme pour le CMT, il existe une difficulté dans la comparaison au tissu normal dans les phéochromocytomes/paragangliomes. En effet, nos analyses sont novatrices puisque la grande majorité des travaux dans ce type de tumeurs ne comparent pas le tissu tumoral au tissu médullaire normal (Assié et al., 2014; Zheng et al., 2016). Certaines études comparent les tumeurs, issues des cellules chromaffines à du tissu issu du cortex surrénalien ou à de la surrénale prise dans son ensemble, ne retrouvant pas les mêmes gènes sur ou sous-exprimés. Ainsi dans la cohorte du TCGA, en comparaison à de la glande surrénale normale, le récepteur

d'adhésion *ADGRV1* était sous-exprimé et le récepteur aux opioïdes était sur-exprimé au sein des phéochromocytomes/paragangliomes, non retrouvés dans notre analyse (Wang et al., 2020). Dans notre travail, le fait que le récepteur de l'ACTH, *MC2R*, soit sous-exprimé dans tous les paragangliomes peut, peut-être, être expliqué par une certaine hétérogénéité des échantillons normaux avec une possible contamination par du tissu de la corticosurrénale qui exprime de manière attendue *MC2R*. Cette approche de comparaison systématique avec du tissu sain n'a pas rendu possible l'analyse d'autres tumeurs neuroendocrines faute de données disponibles (carcinome parathyroïdien, carcinoïde thymique ou bronchique, tumeurs neuroendocrines digestives).

De plus, nous avons décidé de réaliser une analyse exhaustive c'est-à-dire d'inclure l'ensemble des données GEO disponibles pour chaque type de tumeur avec une comparaison au tissu sain. A notre connaissance, il s'agit de la première étude à combiner l'ensemble des données GEO disponibles pour le corticosurrénalome puisque dans la majorité des travaux antérieurs, seulement 1 à 3 séries étaient exploitées de façon concomitante (Guo et al., 2020). De même dans les PitNET, la plus grosse étude en termes d'effectifs avait été réalisée sur des données GEO mais avaient inclus seulement 2 des 5 séries utilisées dans notre travail (GSE36314 et GSE51618) et 3 autres séries ne comportant pas de tissu contrôle et donc exclues de notre travail, pour réaliser une étude intégrative du profil d'expression des gènes, non focalisée sur les RCPG, dans les PitNET (50 PitNET vs 6 contrôles). Dans cette étude, parmi les gènes avec une expression différentielle importante, 2 RCPG ont été mis en évidence, le récepteur *FZD7* ($\log_2FC = -0,42$) et le récepteur *LPAR5* ($\log_2FC = +0,14$) (Zhao et al., 2015). Dans notre travail, les analyses dans chaque série prise séparément confirment la sous-expression de *FZD7* mais ne montrent pas de différence dans l'expression du gène codant pour *LPAR5*.

Ceci met en évidence un autre point important dans la démarche méthodologique. En effet, pour renforcer la significativité des résultats, nous avons choisi de sélectionner les gènes obtenus à partir de plusieurs séries indépendantes plutôt que de combiner les données GSE. Cette approche a déjà été utilisée dans d'autres tumeurs pour sélectionner des gènes d'intérêt, en particulier des RCPG (Albrecht and Kübler, 2019; Kübler and Albrecht, 2018). Nous n'avons en effet pas choisi de réaliser une analyse intégrative, c'est-à-dire de combiner toutes les séries pour gagner en sensibilité. En effet, cela expose à de nombreux biais. Tout d'abord, les critères d'inclusion entre les études ne sont pas strictement identiques. De plus, les données acquises dans des conditions différentes peuvent varier en raison de différents paramètres indépendants (laboratoire, personnel, lot de réactif, système de mesure...). Enfin, même en supposant que les populations de cas et de contrôles soient réellement les mêmes entre les séries, il pourrait y avoir un *batch effect* très important, c'est-à-dire une différence non-biologique entre les échantillons, qui pourrait dépasser les différences d'expression de gènes observées. Ceci explique parfois les différences de résultats avec des études antérieures.

Une autre question importante est la séparation des tumeurs en fonction du sous-type histologique. En effet, nous avons précédemment montré dans la première partie de cette thèse que le profil d'expression des RCPG était différent entre les cancers différenciés de la thyroïde de type papillaire et folliculaire (Suteau et al., 2021). Pour être plus représentatif, nous avons toutefois décidé de ne pas séparer les types histologiques au sein et entre les séries des PitNET. Ceci a permis de montrer que *FZD7* était sous-exprimé quel que soit le type histologique. Cependant, de façon globale, pour les séries incluant uniquement des prolactinomes (GSE119063 et GSE36314), 100% des gènes exprimés de manière différentielle étaient sous-exprimés. Pour les gonadotropes (GSE51618, GSE26966 et 7 patients de GSE63357), 48 à 69% des gènes exprimés de manière différentielle étaient sous-exprimés. Cette notion n'était jusqu'ici pas connue. Une analyse sur cellule unique, a pu toutefois

comparer des cellules tumorales à des cellules normales (Cui et al., 2021). Ils ont pu isoler 3 types de cellules endocrines normales - somatotropes, lactotropes et gonadotropes - et les ont comparées aux tumeurs correspondantes. Même si cette étude n'était pas centrée sur les RCPG, il a été montré un profil transcriptomique global différent selon le type histologique de PitNET. La majorité des gènes exprimés de manière différentielle étaient sous-exprimés dans les tumeurs gonadotropes alors qu'ils étaient surexprimés dans les tumeurs somatotropes et lactotropes (Cui et al., 2021). La question se pose également pour les phéochromocytomes/paragangliomes. Nous avons pu analyser les données de 61 paragangliomes et 87 phéochromocytomes. D'autres études bio-informatiques utilisant une partie des données utilisées dans notre travail ont choisi de ne pas séparer les échantillons de phéochromocytomes et de paragangliomes (Shi et al., 2021). Cependant, en comparant les résultats obtenus dans notre travail entre les 2 localisations tumorales pour chaque série nous avons entre 4 et 54 gènes en communs. Parmi ces gènes aucun n'était redondant pour les 4 séries. Ainsi, nous montrons pour la première fois que le profil transcriptomique des RCPG est bien spécifique du type de tumeur. Ceci soulève la question de la nécessité de séparer les phéochromocytomes et les paragangliomes dans la prise en charge (pronostique, thérapeutique) du patient.

Enfin, notre étude ne sélectionnant qu'une liste définie a priori de 396 RCPG, nous n'avons pas utilisé d'analyse d'enrichissement fonctionnel de gènes, sélectionnant ainsi l'ensemble des gènes d'intérêt. Ceci peut expliquer les différences de résultats avec les études précédentes.

3.3. Expression différentielle des récepteurs couplés aux protéines G entre tissu sain et tissu tumoral dans les tumeurs endocrines

Pour chacune de ces tumeurs, afin d'évaluer les données disponibles dans la littérature, j'ai effectué une recherche bibliographique dans PubMed portant sur les études publiées en anglais jusqu'au 1^{er} mars 2022, portant sur les RCPG dans ces tumeurs chez l'homme. Les termes de recherche comprenaient "*G-protein-coupled-receptor*" et "*medullary thyroid cancer*" ou "*pituitary adenoma*", ou "*adrenocortical carcinoma*" ou "*pheochromocytoma*". Ces données ont été résumées pour chaque tumeur et comparées aux résultats présentés dans l'article n°3.

3.3.1. Cancer médullaire de la thyroïde

En ce qui concerne les RCPG dans les cancers médullaires de la thyroïde, aucune donnée de cartographie complète n'existe puisque les études de pan-cancer se sont plutôt concentrées sur les cancers non-médullaires de la thyroïde. Les deux RCPG les plus fréquemment retrouvés dans la littérature dans le CMT sont les récepteurs de la somatostatine (SSTR) et les récepteurs de la cholécystokinine (CCK A et CCK B). Ces deux récepteurs en dehors d'une forte expression dans les tissus tumoraux, ont déjà montré la possibilité de les cibler en imagerie fonctionnelle voire une utilisation en radiothérapie métabolique (Hayes et al., 2021; Klingler et al., 2020; de Vries et al., 2018). Le Tableau 26 liste les autres RCPG étudiés dans la littérature dans le CMT chez l'homme.

Dans notre étude, une seule série avec très peu de données étaient disponibles (2 tissus tumoraux versus 4 tissus normaux) limitant l'extrapolation des résultats. C'est le cas du récepteur *ADGRE5/CD97* qui a été retrouvé légèrement sous-exprimé dans notre série ($\log_2FC = -0.84$, $p = 0.0014$). Dans l'étude de Mustafa et al. (54 CMT et 4 échantillons de cellules C provenant de tissus non malins), tous les échantillons thyroïdiens non malins exprimaient faiblement *ADGRE5/CD97* alors qu'il était détecté dans tous les tissus de CMT. De plus, le niveau d'expression de *ADGRE5/CD97* était directement corrélé au stade histopathologique, retrouvé plus élevé dans les

stades avancés pT3/4 par rapport aux tumeurs pT1/2 (Mustafa et al., 2004). Malgré notre petit échantillon, nous confirmons la surexpression du récepteur à la cholécystokinine CCKB (Roy et al., 2016). Pour les autres RCPG exprimés à la hausse ou à la baisse, nous apportons donc de nouveaux résultats.

Récepteurs couplés aux protéines G	Résultats		Références
	Expression	Fonctionnalité	
Récepteur de la substance P (NK-1R)	<ul style="list-style-type: none"> • Surexpression 		(Isorna et al., 2020)
Récepteur du GLP1 (GLP1-R)	<ul style="list-style-type: none"> • Expression variable dans les CMT et dans les hyperplasies des cellules C, non présent dans le tissu folliculaire normal • Absence d'association avec la survie • Colocalisation avec le récepteur de la calcitonine 	<ul style="list-style-type: none"> • Possibilité de scintigraphie avec analogue GLP1 marqué 	(Waser et al., 2015) (Gier et al., 2012) (Song et al., 2017) (Pach et al., 2013)
Récepteur aux chimiokines	<ul style="list-style-type: none"> • Surexpression de CXCR7, CXCR4, CCR7, CXCR2 	<ul style="list-style-type: none"> • Corrélation de CXCR4 et CCR7 avec agressivité des tumeurs • Implication de CXCR4 dans l'invasion et la prolifération cellulaire 	(Zhu et al., 2016) (Werner et al., 2017) (Sancho et al., 2006) (Tecimer et al., 2000)
Récepteur de la calcitonine (CTR)	<ul style="list-style-type: none"> • Surexpression • Colocalisation avec le récepteur du GLP1 	<ul style="list-style-type: none"> • Absence d'association avec la survie 	(Frendo et al., 1998) (Cappagli et al., 2017) (Gier et al., 2012)
Récepteur d'adhésion CD97/ADGRE5	<ul style="list-style-type: none"> • Surexpression • <u>Sous-expression</u> 	<ul style="list-style-type: none"> • Corrélation avec le stade tumoral 	(Mustafa et al., 2004) (Suteau et al., 2022)
Récepteur de la cholécystokinine CCK2R	<ul style="list-style-type: none"> • Surexpression • <u>Surexpression</u> 		(Roy et al., 2016) (Suteau et al., 2022)

Tableau 26 : Liste des récepteurs couplés aux protéines G retrouvés dans la littérature dans le cancer médullaire de la thyroïde.

Les récepteurs communs entre la littérature et notre travail ont été soulignés et mis en gras.

3.3.2. Tumeurs neuroendocrines hypophysaires (PitNET)

Plusieurs RCPG sont déjà bien connus dans l'hypophyse du fait que les récepteurs aux hormones hypothalamiques impliquées dans la régulation des hormones antéhypophysaires soient tous des RCPG : le récepteur à la TRH, à la CRH, à la GnRH, à la dopamine, à la GHRH et à la somatostatine (Figure 26).

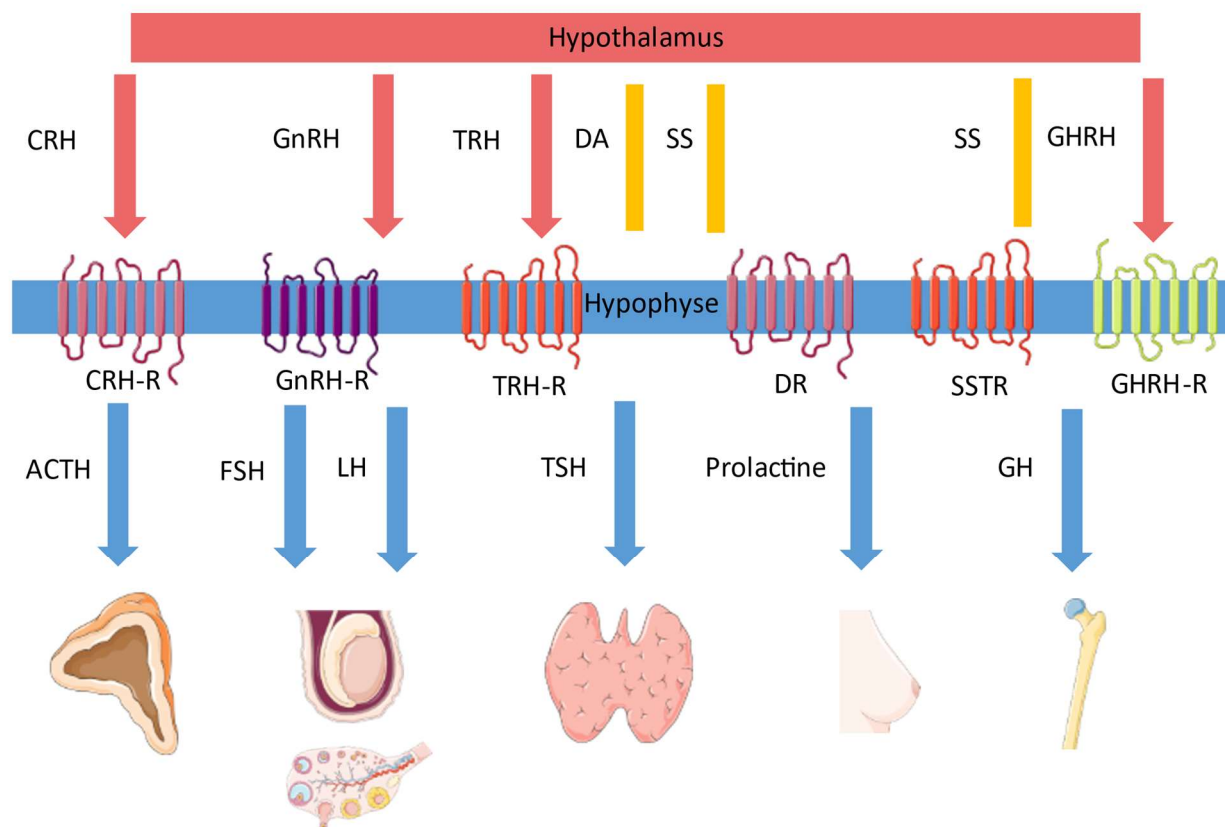


Figure 26 : Représentation schématique de la régulation hormonale hypothalamo-hypophysaire.

Les hormones hypothalamiques ayant un effet positif sur la sécrétion hypophysaire sont représentées en rouge.

Les hormones ayant un effet inhibiteur sont représentées en jaune. Abréviations : CRH : *Corticotropin-Releasing Hormone*, GnRH : *Gonadotropin-Releasing Hormone*, TRH : *Thyroid Releasing hormone*, DA : dopamine, SS : somatostatine, GHRH : *Growth Hormone Releasing Hormone*, GH : *Growth Hormone*, FSH : *Follicle Stimulating Hormone*, LH : *Luteizing Hormone*, ACTH : *Adreno CorticoTropic Hormone*, TSH : *Thyroid Stimulating Hormone*

La présence de ces récepteurs justifie leur ciblage comme test diagnostique. C'est ainsi que le test à la TRH fait partie des examens permettant de différencier un adénome thyroïdote d'une résistance aux hormones thyroïdiennes (Beck-Peccoz et al., 2013). Du fait du maintien de l'expression de CRH-1R dans les adénomes, son ciblage en imagerie fonctionnelle a été évalué dans les syndromes de Cushing ACTH dépendant par la CRH marquée au Ga⁶⁸ (Walia et al., 2021). De plus, le test à la CRH entre dans le diagnostic et l'évaluation du traitement de la maladie de Cushing (Nieman et al., 2015). Le test à la desmopressine est également utilisé dans le diagnostic de la maladie de Cushing du fait d'une surexpression du récepteur de la vasopressine V2R et/ou

l'expression aberrante des récepteurs de type V3R/V1bR dans la majorité des adénomes corticotropes (Vassiliadi and Tsagarakis, 2018). Parmi ces RCPG impliqués dans la régulation normale de l'axe hypothalamo-hypophysaire normal, notre travail concernant les PitNET a retrouvé sous-exprimés dans 3 à 4 des 5 études, les récepteurs à la GnRH, au CRH (*CRH-R1*), à la GHRH et à la somatostatine (*SSTR2*).

D'autres RCPG ont déjà été étudiés dans la littérature dans les PitNET et sont résumés dans le Tableau 27. Dans notre analyse bio-informatique, un seul récepteur était commun aux 5 séries, le récepteur au Frizzled *FZD7*, non retrouvé dans la littérature. Parmi les récepteurs listés dans le Tableau 27, certains ont été retrouvés dans une ou plusieurs séries. C'est le cas pour les récepteurs la galanine, à la cholecystokinine, aux kisspeptides, à la FSH et à la ghréline, retrouvés tous sous-exprimés dans certaines séries.

Récepteur couplé aux protéines G	Résultats		Références
	Expression	Fonctionnalité	
Récepteur aux oestrogènes GPER1	<ul style="list-style-type: none"> Plus faible expression dans les adénomes sécrétant de la GH que dans les adénomes non fonctionnels 		(Ozkaya et al., 2021)
GPR101	<ul style="list-style-type: none"> Surexpression dans le gigantisme lié à l'X-LAG 		(Trivellin et al., 2014)
Récepteur de la galanine (GAL-R)	<ul style="list-style-type: none"> Données contradictoires pour GAL1R et GAL3R en comparaison au tissu hypophysaire normal <u>Sous-expression de GAL1R dans 3/5 séries</u> <u>Sous-expression de GAL3R dans 1/5 séries</u> 		(Tofighi et al., 2012) (Falkenstetter et al., 2020) (Suteau et al., 2022)
Récepteur GPR64	<ul style="list-style-type: none"> Surexpression dans les adénomes somatotropes avec faible granulosité 	<ul style="list-style-type: none"> Favorise la prolifération cellulaire, Association avec la récurrence 	(Xie et al., 2020)
Récepteur LGR5	<ul style="list-style-type: none"> Surexpression dans adénomes hypophysaires, surtout invasifs 		(Hwang et al., 2019)
Récepteur de la ghréline GHSR1	<ul style="list-style-type: none"> Sous-expression dans les adénomes non fonctionnels en comparaison à de l'hypophyse saine Absence de différence d'expression entre les adénomes à GH et à PRL <u>Sous expression dans 1/5 série</u> 	<ul style="list-style-type: none"> Effet antisécrétoire d'un agoniste inverse sur la sécrétion de GH avec effet synergique en association avec un analogue de la somatostatine <i>in vitro</i> 	(Andrusiewicz et al., 2017) (Mear et al., 2014) (Suteau et al., 2022)

Suteau Valentine | Ciblage pharmacologique des récepteurs couplés aux protéines G dans les tumeurs endocrines pour un repositionnement moléculaire –

Récepteur couplé aux protéines G	Résultats		Références
	Expression	Fonctionnalité	
Récepteur de la FSH	<ul style="list-style-type: none"> • Expression ectopique dans les cellules tumorales et les vaisseaux intratumoraux • Expression plus importante dans les tumeurs invasives • <u>Sous-expression dans 1/5 série</u> 		(Pawlikowski et al., 2012) (Suteau et al., 2022)
Récepteur aux kisspetines	<ul style="list-style-type: none"> • Sous-expression dans les adénomes par rapport à l'hypophyse saine • Expression plus importante dans les adénomes non fonctionnels, • <u>Sous-expression dans 1/5 série</u> 	<ul style="list-style-type: none"> • Absence de corrélation avec l'invasion ou la prolifération 	(Yaron et al., 2015) (Martínez-Fuentes et al., 2011) (Suteau et al., 2022)
Récepteur aux chimiokines	<ul style="list-style-type: none"> • Surexpression dans les adénomes en comparaison avec l'hypophyse saine • Expression plus importante de CXCR4 dans les adénomes invasifs, • Faible expression de CXCR7 	<ul style="list-style-type: none"> • Effet pro-prolifératif de CXCR4 <i>in vitro</i> 	(Bing et al., 2013) (Barbieri et al., 2008)
Récepteur à la cholécystokinine	<ul style="list-style-type: none"> • Surexpression de CCKA et CCKB • <u>Sous-expression dans 1/5 série</u> 	<ul style="list-style-type: none"> • Effet positif sur la sécrétion de FSH, LH et GH dans les adénomes gonadotropes et somatotropes <i>in vitro</i> et effet inhibiteur d'un antagoniste 	(Oikonomou et al., 2007) (Suteau et al., 2022)

Récepteur couplé aux protéines G	Résultats		Références
	Expression	Fonctionnalité	
Récepteur à l'angiotensine	<ul style="list-style-type: none"> • Sous-expression du récepteur AT1R • Expression dans les vaisseaux intratumoraux de AT2R mais pas dans le tissu tumoral 		(Pawlikowski, 2006)
Récepteurs à la bombésine	<ul style="list-style-type: none"> • Expression dans les adénomes somatotropes 		(Schulz et al., 2006)

Tableau 27 : Liste des récepteurs couplés aux protéines G étudiés dans la littérature dans les tumeurs neuroendocrines hypophysaires.

Les récepteurs communs entre la littérature et notre travail ont été soulignés et mis en gras.

3.3.3. Phéochromocytome et paragangliome

Très peu de données sont disponibles concernant les RCPG dans les phéochromocytomes/paragangliomes, les travaux de caractérisation moléculaire s'étant surtout concentrés sur les mutations, germinales et somatiques, et gènes de fusion (Fishbein et al., 2017). Les données du TCGA ont permis de dresser un GPCRome complet mais sans possibilité d'une comparaison à du tissu normal puisque le tissu adjacent disponible est la plupart du temps du tissu du cortex et non de la zone médullaire de la surrénale normale (Wu et al., 2019). Comme pour la plupart des tumeurs endocrines, il a été montré une surexpression des récepteurs à la somatostatine (SSTR) et cela dès les années 1990 (Reubi et al., 1992). Ceci a aujourd'hui deux conséquences cliniques. Parmi les modalités d'imagerie fonctionnelles, la Tomographie par Emission de Positions (TEP) aux analogues de la somatostatine marqués au Ga⁶⁸ fait partie des examens de 1^{ère} ligne pour les paragangliomes (Ga⁶⁸-DOTANOC; Ga⁶⁸-DOTATATE; Ga⁶⁸-DOTATOC). Plus de 80 % des phéochromocytomes/paragangliomes sont détectables par l'imagerie basée sur la somatostatine. Ainsi, à l'image de la radiothérapie métabolique vectorisée dans les TNE gastropancréatiques, chez les patients présentant une absorption élevée des traceurs, le couplage de l'analogue de la somatostatine avec un radio-élément émetteur gamma Lutetium¹⁷⁷ (Lu¹⁷⁷) ou Yttrium⁹⁰ (Y⁹⁰) est en cours d'évaluation dans les phéochromocytomes/paragangliomes malins et pourrait être aussi efficace que le traitement à base de MétaIodoBenzylGuanidine (MIBG) (Elston et al., 2015; Severi et al., 2021; Taïeb et al., 2019). D'autres RCPG ont été étudiés au niveau du tissu tumoral humain, le plus souvent uniquement au niveau de son expression. Les résultats sont résumés dans Tableau 28. Seules les données humaines sont détaillées, les données provenant de lignées animales et en particulier de la lignée de rat PC12 ne sont pas abordées.

Dans notre travail sur le paragangliome, nous avons retrouvé 7 RCPG communs aux 4 séries, tous sous-exprimés (*PTH1R*, *MC2R*, *AVPR1A*, *NPY5R*, *NPY6R*, *RXFP1* et *LGR4*). Le récepteur de la vasopressine V1R (*AVPR1A*) a déjà été décrit aussi bien dans le cortex que dans la medulla que dans les phéochromocytomes mais n'avait pas été décrit dans le paragangliome (Grazzini et al., 1999). Dans la médullosurrénale humaine et les phéochromocytomes, les récepteurs NPY1, Y2, Y4 et Y5 sont exprimés et fonctionnels (Thouënnon et al., 2007). Le récepteur NPY6R est un pseudogène, codant pour une protéine tronquée non fonctionnelle. A notre connaissance seuls les récepteurs NPY1R et NPY2R ont déjà été décrits dans les paragangliomes (Körner et al., 2004). Concernant le récepteur de la PTH, il a été décrit dans le cortex surrénalien normal ainsi que dans les adénomes cortisoliques, les adénomes de Conn et les corticosurrénalomes mais n'avait pas été décrit dans les paragangliomes (Gao et al., 2019; Rizk-Rabin et al., 2008). Aucune donnée concernant *RXFP1* et *LGR4* était disponible pour les paragangliomes mais ils ont été décrits pour participer à la progression tumorale, à l'invasion et aux métastases dans différents cancers (Ordaz-Ramos et al., 2021; Thanasupawat et al., 2019). En ce qui concerne les phéochromocytomes, aucun récepteur était, de manière significative, retrouvé exprimé de manière différentielle dans les 4 séries. Cependant, le récepteur de l'angiotensine *AGTR2* était sous-exprimé dans les 4 études, dont une de manière non significative. Il avait été effet montré une très faible expression dans les phéochromocytomes et uniquement dans le microenvironnement tumoral (Pawlikowski et al., 2008).

Récepteur couplé aux protéines G	Résultats		Références
	Expression	Fonctionnalité	
Récepteurs à l'Orexine	<ul style="list-style-type: none"> • Expression OX2-R dans phéochromocytome 	<ul style="list-style-type: none"> • Stimulation de la sécrétion de catécholamines via voie Gq 	(Mazzocchi et al., 2001) (Blanco et al., 2002)
Récepteurs à la vasopressine	<ul style="list-style-type: none"> • Expression de V1a et V1b dans la medulla normal et dans le phéochromocytome • <u>Sous-expression de V1a dans 4/4 séries de paragangliome et 1/4 de phéochromocytomes</u> • <u>Surexpression de V1b dans 1/4 série de paragangliome et 1/4 série de phéochromocytomes</u> 		(Grazzini et al., 1999) (Isobe et al., 2003) (Reubi, 2000) (Suteau et al., 2022)
Récepteurs de la sérotonine	<ul style="list-style-type: none"> • Surexpression de HTR4 dans phéochromocytome • 20% des patients avec phéochromocytome avec une forte expression HTR1B • <u>Surexpression de HTR4 dans 1/4 série de paragangliomes</u> • <u>Sous-expression de HTR4 dans 1/4 série de phéochromocytomes</u> 	<ul style="list-style-type: none"> • Stimulation de la sécrétion de catécholamines après activation de HTR4 	(Guillemot et al., 2009) (Suteau et al., 2022)
Récepteur de l'urotensine	<ul style="list-style-type: none"> • Sous-expression 	<ul style="list-style-type: none"> • Effets pro-prolifératif de l'urotensine II <i>in vitro</i> 	(Zeng et al., 2006) (Giuliani et al., 2009) (Morimoto et al., 2008)

Récepteur couplé aux protéines G	Résultats		Références
	Expression	Fonctionnalité	
Récepteur de la dopamine	<ul style="list-style-type: none"> • Expression de D1, D2, D4, D5 (principalement D2) dans phéochromocytome • <u>Surexpression de D2 dans 1/4 série de phéochromocytomes</u> • <u>Sous-expression de D1 dans 1/4 série de paragangliomes</u> 	<ul style="list-style-type: none"> • 50% réponse partielle d'un agoniste DRD2 (ONC201, phase II) 	(Wu et al., 2001) (Anderson et al., 2022) (Peters et al., 2020) (Suteau et al., 2022)
Récepteur de la sécrétine	<ul style="list-style-type: none"> • Expression variable dans les tumeurs 	<ul style="list-style-type: none"> • Association avec la prolifération cellulaire 	(Lee et al., 2012)
Récepteurs de l'angiotensine II	<ul style="list-style-type: none"> • Faible expression d'AT1R • Expression d'AT2R dans les vaisseaux intra tumoraux et dans le tissu interstitiel • <u>Sous-expression d'AT1R dans 2/4 séries de paragangliomes et 1/4 de phéochromocytomes</u> • <u>Sous-expression d'AT2R dans 3/4 séries</u> 		(Pawlikowski et al., 2008) (Suteau et al., 2022)
Récepteur de la FSH	<ul style="list-style-type: none"> • Expression ectopique dans phéochromocytome (absence dans tissu sain) • <u>Sous-expression dans 1/4 série de paragangliomes</u> 		(Pawlikowski et al., 2012) (Suteau et al., 2022)

Récepteur couplé aux protéines G	Résultats	Fonctionnalité	Références
Récepteurs du NPY	<p>Expression</p> <ul style="list-style-type: none"> • Expression dans 35% des phéochromocytomes et 60% des paragangliomes, surtout NPY2R • Expression variable dans la medulla normale • Sous-expression de NPY5R et NPY6R dans 4/4 séries de paragangliomes • <u>Sous-expression de NPY1R dans 2/4 séries de paragangliomes et 1/4 série de phéochromocytomes</u> • <u>Sous-expression de NPY2R dans 1/4 série de paragangliomes et 1/4 série de phéochromocytomes</u> 		<p>(Thouënnon et al., 2010) (Körner et al., 2004) (Suteau et al., 2022)</p>

Tableau 28 : Liste des récepteurs couplés aux protéines G étudiés dans la littérature dans les phéochromocytomes/paragangliomes.
Les récepteurs communs entre la littérature et notre travail ont été soulignés et mis en gras.

3.3.4. Corticosurréalome

De façon intéressante, de nombreux travaux ont été réalisés afin de comprendre le paysage génomique des corticosurréalomes (Assié et al., 2014; Zheng et al., 2016). En ce qui concerne les RCPG, nous savons qu'au sein de la corticosurrénale, la régulation de la production de cortisol et de l'aldostérone est exercée principalement par deux RCPG : le récepteur de l'ACTH, MC2R, et le récepteur de l'angiotensine, AGTR1, respectivement (Figure 27).

De plus, il a été montré qu'en situation pathologique, il peut exister une surexpression ou une expression aberrante de divers récepteurs et notamment certains RCPG dans les hyperplasies macronodulaires des surrénales, les adénomes mais aussi pour certains corticosurréalomes (Arnaldi et al., 1998; Costa et al., 2009; Louiset et al., 2008; St-Jean et al., 2018). Les données concernant les principaux RCPG étudiés chez l'homme sont synthétisées dans le Tableau 29.

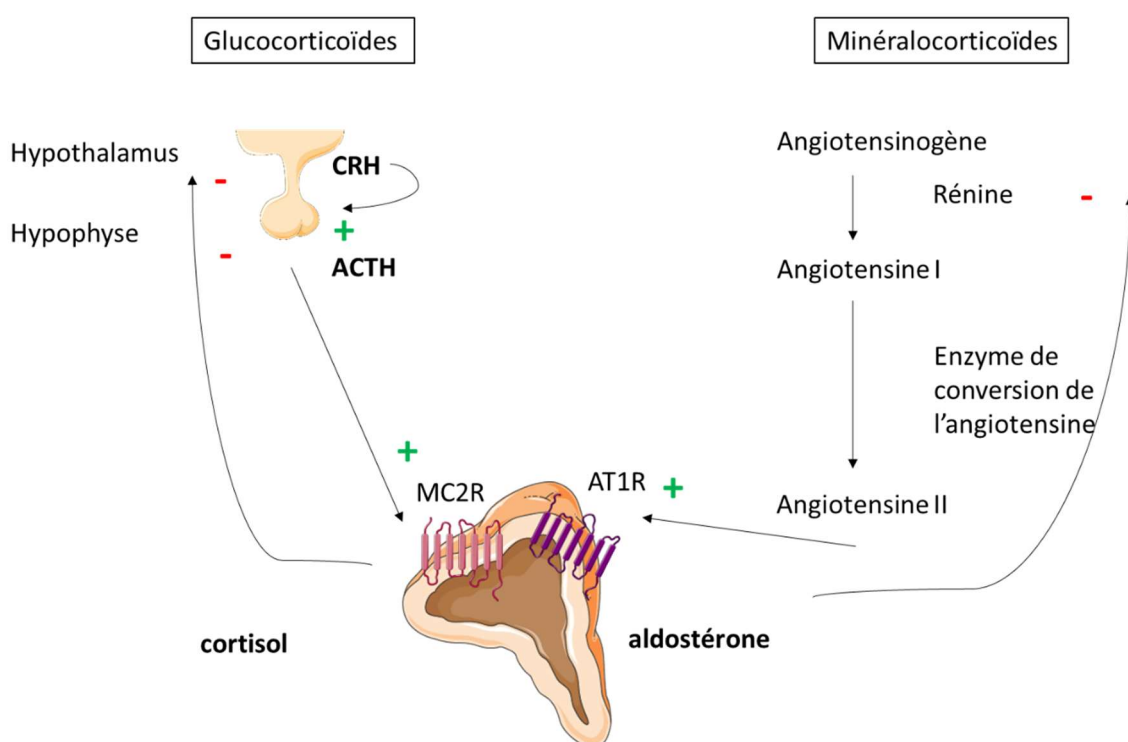


Figure 27 : Représentation schématique de la régulation hormonale hypothalamo-hypophysaire.

La sécrétion du cortisol est sous la dépendance de l'axe hypothalamo-hypophysaire via le récepteur de l'ACTH, *MC2R*, alors que la sécrétion d'aldostérone est sous la dépendance du système rénine-angiotensine, via le récepteur de type 1 à l'angiotensine II (*AT1R*). Abréviations : CRH : *Corticotropin-Releasing Hormone*, ACTH : *Adreno CorticoTropic Hormone*

Notre travail sur 5 séries de patients présentant un corticosurréalome a permis de dessiner le profil transcriptomique en RCPG de près de 150 corticosurréalomes. Le récepteur à la PTH, *PTH1R*, était retrouvé sous exprimé dans toutes les séries. Cette sous-expression du récepteur était également retrouvée dans les 92 corticosurréalomes de la cohorte du TCGA. Ce récepteur n'avait jusqu'ici pas été sélectionné dans les travaux antérieurs comparant le tissu tumoral au tissu sain. Parmi les RCPG connus dans le corticosurréalome, certains ont été retrouvés exprimés de façon différentielle dans une ou plusieurs séries. C'est le cas notamment pour le récepteur de l'ACTH, *MC2R*, sous-exprimé dans 2/5 séries, peut-être par dédifférenciation de la tumeur. De

même, le récepteur de la sérotonine *HTR2B* était retrouvé sous-exprimé en comparaison à la surrenale normale dans 4/5 séries alors qu'il avait été retrouvé surexprimé en comparaison aux adénomes surrenaliens (Fernandez-Ranvier et al., 2008).

Récepteur couplé aux protéines G	Résultats		Références
	Expression	Fonctionnalité	
Récepteur aux chimiokines	<ul style="list-style-type: none"> Forte expression CXCR4 et CXCR7, absence de corrélation avec la survie ou la présence de métastase, Expression assez semblable au tissu normal 	<ul style="list-style-type: none"> Utilisation d'un antagoniste marqué de CXCR4 pour la visualisation de métastases à distance Effet sur la migration et l'invasion d'un antagoniste de CXCR4 	(Chifu et al., 2020) (Weiss et al., 2017) (Kitawaki et al., 2019)
Récepteur au GABA _B	<ul style="list-style-type: none"> Présence des 2 dimères GABBR1 et GABBR2 Sous-expression de GABBR1 par rapport au tissu normal <u>Sous expression de GABBR1 dans 1/5 série</u> 	<ul style="list-style-type: none"> Effet pro-prolifératif de son ligand (Adropine) <i>in vitro</i> 	(Knott and Leidenheimer, 2020) (Suteau et al., 2022)
GPR19	<ul style="list-style-type: none"> Surexpression dans tissu tumoral en comparaison au tissu normal Forte expression associée avec moins bonne survie 		(Stelcer et al., 2020)
Récepteur à la somatostatine	<ul style="list-style-type: none"> Expression des différents sous-types de récepteur (de 30% pour SSTR2 et 5 à 80% pour SSTR4) Association de l'expression de SSTR5 avec une diminution de la survie globale <u>Sous-expression de SSTR2 dans 1/5 série</u> 	<ul style="list-style-type: none"> Absence d'effet du pasiréotide seul sur la prolifération mais effet synergique avec le mitotane <i>in vitro</i> 	(Germano et al., 2017) (Suteau et al., 2022)

Récepteur couplé aux protéines G	Résultats		Références
	Expression	Fonctionnalité	
GPER	<ul style="list-style-type: none"> • Surexpression dans tissu tumoral en comparaison à du tissu sain 	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution prolifération <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> avec agoniste spécifique 	(Chimento et al., 2015)
Récepteur au GIP	<ul style="list-style-type: none"> • Surexpression dans tumeur adulte et pédiatrique vs tissu normal et tumeur bénigne 	<ul style="list-style-type: none"> • Effet inhibiteur d'un antagoniste d'HTR7 sur la sécrétion de cortisol 	(Costa et al., 2009)
Récepteur à la LH/hCG	<ul style="list-style-type: none"> • Sous-expression dans corticosurrénaome adulte 		(Costa et al., 2009)
Récepteur à la sérotonine (HTR)	<ul style="list-style-type: none"> • Surexpression de HTR2B dans les corticosurrénaomes versus les adénomes surrénaux • Expression de HTR7 dans un corticosurrénaome sécrétant • <u>Sous-expression de HTR2B dans 4/5 séries en comparaison au tissu normal</u> • <u>Sous-expression de HTR4 dans 1/5 série</u> 		(Fernandez-Ranvier et al., 2008) (Louiset et al., 2008) (Suteau et al., 2022)
Récepteur au CRH	<ul style="list-style-type: none"> • Expression de CRH-R1 		(Willenberg et al., 2005)
Récepteur de la ghréline	<ul style="list-style-type: none"> • Sous-expression du récepteur GHS-R1a et surexpression de GHS-R1 	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibition de la prolifération cellulaire par la ghréline <i>in vitro</i> 	(Barzon et al., 2005)

Récepteur couplé aux protéines G	Résultats		Références
	Expression	Fonctionnalité	
Récepteur à l'urotensine	<ul style="list-style-type: none"> • Expression identique dans le tissu sain et tumoral 	<ul style="list-style-type: none"> • Effet pro-prolifératif de l'urotensine <i>in vitro</i> 	(Takahashi et al., 2010)
Récepteur à la vasopressine	<ul style="list-style-type: none"> • Expression de V1R (<i>AVPR1A</i>) dans le tissu tumoral et le tissu sain mais sous-expression par rapport aux adénomes • Absence d'expression de V3R (<i>AVPR1B</i>) dans le tissu tumoral et le tissu sain 		(Arnaldi et al., 1998)
LGR5	<ul style="list-style-type: none"> • Sous-expression dans les corticosurrénales versus les adénomes surrénaliens 		(Fernandez-Ranvier et al., 2008)

Tableau 29 : Liste des récepteurs couplés aux protéines G étudiés dans la littérature dans les corticosurrénales.

Les récepteurs communs entre la littérature et notre travail ont été soulignés et mis en gras.

3.3.5. Récepteurs communs entre les tumeurs

Ce profil transcriptomique effectué dans chacune des tumeurs endocrines met en évidence un certain nombre de récepteurs communs entre les différents types de tumeurs. Les récepteurs communs aux CMT, PitNET, phéochromocytomes/paragangliomes et corticosurrénales sont les récepteurs de la somatostatine (SSTR). En réalité, l'ensemble des tumeurs neuroendocrines dérivées des cellules neuroendocrines expriment un ou plusieurs isotypes des récepteurs de la somatostatine (tractus gastro-intestinal, tumeurs pancréatiques, broncho-pulmonaires...). En effet, il a été montré que les analogues de la somatostatine étaient capables d'inhiber la sécrétion de différentes hormones et représentent donc une part importante dans la prise en charge des syndromes sécrétoires des tumeurs endocrines. De plus, l'activation de certaines voies de signalisation *via* l'activation du récepteur peut conduire à un effet sur la croissance tumorale (apoptose, arrêt du cycle cellulaire). Ceci a été montré notamment pour les SSTR2 et SSTR3 (Veenstra et al., 2013)

Les autres récepteurs partagés par plusieurs tumeurs sont en réalité retrouvés dans d'autres tumeurs au-delà du système endocrine. Ils ont montré leur rôle dans l'initiation ou la progression tumorale. C'est le cas pour le récepteur de type 1 à angiotensine II, les récepteurs à la vasopressine, aux chimiokines, à la dopamine, à la sérotonine et plus récemment le récepteur LGR5 (Karmakar and Lal, 2021; Mollica Poeta et al., 2019; Molteni et al.; North, 2000; Weissenrieder et al., 2019; Xu et al., 2019a).

3.4. Repositionnement moléculaire des RCPG dans les tumeurs endocrines

Nous avons collecté les informations issues de deux bases de données pharmacologiques, ChEMBL et DrugBank, concernant les médicaments approuvés et ciblant les RCPG exprimés de manière différentielle.

Notre étude a montré que parmi les 14 récepteurs exprimés de manière différentielle entre le tissu tumoral et le tissu sain dans le CMT, les récepteurs CCKBR, DRD2 et le récepteur d'adénosine A2B (ADORA2B) étaient la cible des médicaments actuellement disponibles, ouvrant des perspectives de repositionnement moléculaire. DRD2 était le récepteur le plus fréquemment ciblé avec plus de 40 agents antipsychotiques agissant comme des antagonistes de DRD2 ainsi qu'une dizaine d'agonistes. A notre connaissance, au-delà de son ciblage pharmacologique en médecine nucléaire, aucune étude a évalué l'intérêt d'un ciblage pharmacologique de RCPG en association avec un ITK dans le CMT. Nous avons pu dans notre travail sur la caractérisation des lignées thyroïdiennes, effectuer le profil transcriptomique des RCPGs au sein de la lignée cellulaire dérivée de cancer médullaire TT (Figure 28). Les récepteurs *CCKBR*, *DRD2* et *ADORA2B* ont été retrouvés exprimés au niveau transcriptomique. Ainsi, il sera possible d'évaluer cette hypothèse *in vitro*.

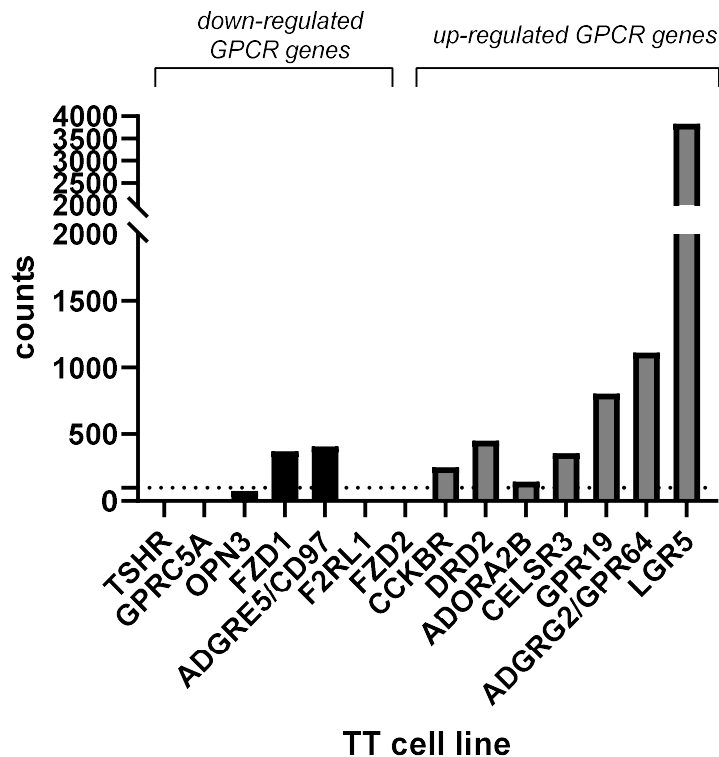


Figure 28 : Expression dans la lignée cellulaire TT (dérivée d'un cancer médullaire de la thyroïde) des 14 récepteurs couplés aux protéines G sélectionnés dans l'étude sur échantillons humains.

Les récepteurs retrouvés sous-exprimés sont représentés sous la forme d'un histogramme noir et les récepteurs sur-exprimés sont représentés en gris. Les données transcriptomiques sont issues d'une analyse par la technologie NanoString nCounter et sont exprimés en nombre de comptage de fluorescence (seuil à 100 correspondant à une expression significative).

De façon intéressante, alors que le récepteur FZD7 commun à toutes les PiTNET n'était pas ciblé par des médicaments, le récepteur à la somatostatine *SSTR1* était surexprimé dans les adénomes invasifs confirmant le ciblage possible par les analogues de la somatostatine étant donné la bonne corrélation entre l'expression des récepteurs et la réponse biologique (Peverelli et al., 2021). Le récepteur de la sérotonine HTR4 a également été retrouvé surexprimé dans ce sous-type de tumeur. L'utilisation d'antagoniste de HTR4 n'a pas été étudiée mais des antagonistes de HTR2 ont été proposés dans le traitement médical de la maladie de Cushing avec cependant des résultats limités en terme de durée de réponse et du taux de patients répondeurs (Ferone et al., 2014). Enfin, dans les hyperplasies et tumeurs surrenaliennes les RCPG ont principalement été décrits pour leur rôle dans la régulation de la sécrétion de cortisol voire d'aldostérone ou d'androgènes et donc comme cibles thérapeutiques potentielles (Assie et al., 2010; St-Jean et al., 2018). Au-delà d'un ciblage antisécrétoire, il serait intéressant de cibler ces récepteurs dans un but antitumoral. En effet, il a été montré qu'une modification de l'expression de certains RCPG au sein du tissu tumoral pourrait également participer au développement tumoral, comme pour le récepteur au GIP (Mazzuco et al., 2007). Même si notre travail a révélé que *PTH1R* était sous-

exprimé par rapport aux tissus normaux, il a déjà été trouvé exprimé dans les tissus tumoraux (Rizk-Rabin et al., 2008). Il est maintenant important de déterminer si sa modulation positive ou négative pourrait avoir un impact sur la progression tumorale. Il a été montré que la PTHrP (1-34) stimulait la croissance tumorale sein de la lignée humaine de corticosurrénaome H295R (Rizk-Rabin et al., 2008). Il serait donc possible d'évaluer l'effet à la fois des molécules agonistes, utilisées dans l'ostéoporose mais aussi des nouveaux ligands du récepteur de la PTH agissant comme des antagonistes ou agonistes inverses (Arai et al., 2020; Noda et al., 2020). Au-delà d'un simple ciblage, il serait également intéressant de tester ces traitements en association avec le mitotane seul ou avec les différentes chimiothérapies actuellement utilisées (Etoposide, Doxorubicine, Cisplatine) en évaluant différents mélanges. En effet, peu d'études ont évalué des combinaisons de traitements avec le mitotane en dehors d'autres chimiothérapies ayant également des toxicités importantes comme des agents alkylants ou des antimétabolites (Abate et al., 2020; Germano et al., 2014). De plus, il a été montré récemment que le mélange Mitotane+Etoposide+Doxorubicine avait un effet synergique antiprolifératif de puissance équivalente à celle du protocole complet, c'est-à-dire avec l'ajout de la cisplatine, *in vitro* (Subramanian et al., 2021). Ainsi la suppression ou la diminution de la dose de certaines molécules pourrait réduire la toxicité tout en maintenant l'efficacité anticancéreuse.

3.5. Facteurs associés aux profils d'expression différentielles des RCPG

Notre travail a été réalisé initialement dans le but d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques cependant d'autres implications de ces analyses différentielles de gènes peuvent être envisagées. En effet, une autre question importante est l'évaluation pronostique et en particulier du risque de récurrence de ces tumeurs.

Dans le corticosurrénaome par exemple, une évolution agressive est possible mais très variable entre les patients. Il est donc essentiel de pouvoir bien évaluer le pronostic des patients après résection chirurgicale afin de guider notamment la fréquence du suivi et l'indication ou non d'un traitement adjuvant. Dans notre travail, les analyses de survie n'ont pu être faites que pour ce type de tumeur puisque les données cliniques de survie étaient disponibles pour les patients de la cohorte du TCGA contrairement aux données GEO. Nous avons choisi de ne tester que *PTH1R* dans les analyses de survie car il s'agissait du seul récepteur commun à toutes les études (5/5 GSE). Le niveau d'expression au sein de la tumeur n'était associé ni à la survie sans récurrence, ni à la survie globale. Ceci peut être dû au manque de puissance statistique ou à la nécessité de le combiner avec d'autres facteurs. En effet, de nombreuses études se sont attachées à l'établissement de signatures pronostiques, notamment grâce à des analyses différentielles de gènes dans la cohorte du TCGA et/ou via les données GEO. Il a notamment été montré que certains RCPG étaient associés à la survie. Ainsi, une faible expression de *CX3CR1* ou de *SSTR1* était associée à une moins bonne survie globale et spécifique alors qu'une forte expression de *HCAR2* était au contraire associée à une diminution de la survie (Ma et al., 2021). D'autres signatures pronostiques ont été établies à partir de gènes liés à l'immunité. Parmi les gènes entrant dans ces scores, on retrouve des récepteurs aux chimiokines ou encore le récepteur au VIP (Fu et al., 2020).

De la même manière que dans le corticosurrénaome, un autre enjeu dans la prise en charge des phéochromocytomes et paragangliomes est la prédiction de l'évolution de ces tumeurs. En effet, il n'existe

actuellement aucun marqueur clinique – en dehors de la présence des métastases- histopathologique ou moléculaire spécifique permettant de différencier la malignité de la bénignité. Dans notre travail, nous ne disposons pas d'échantillon de phéochromocytomes métastatiques. Plusieurs études comparant des phéochromocytomes bénins et malins ne semblent toutefois pas isoler de RCPG comme gènes candidats dans la distinction bénins/malins (Suh et al., 2009; Thouënon et al., 2007). Pour les PGL, deux séries (GSE39716 et (GSE60459) comprenaient respectivement dix et trois paragangliomes métastatiques. Nous n'avons pas trouvé de différence de profil d'expression concernant les RCPG. Ceci peut être expliqué d'une part à un manque de puissance statistique. D'autre part, l'absence de métastases à un moment donné du suivi du patient ne permet pas de conclure aisément à la bénignité de la tumeur. Toutes ces tumeurs ont un potentiel malin. Cependant, nous n'avons pas les informations cliniques quant à l'évolution de ces tumeurs pour pouvoir répondre à cette question. Contrairement au corticosurrénalome, les données cliniques du TCGA associées aux phéochromocytomes et paragangliomes ne disposaient pas d'information sur l'évolution des patients. Nous n'avons donc pas pu analyser les données de survie via la base de données GEPIA. Cependant, l'impact pronostique des gènes exprimés de manière différentielle a été vérifiée à l'aide du Kaplan-Meier Plotter (<https://kmplot.com/analysis>), un outil en ligne utilisant les bases de données GEO, EGA et TCGA. Même si cet outil ne sépare pas les phéochromocytomes des paragangliomes, de manière intéressante une expression importante du récepteur LGR4 était associée à une moins bonne survie sans récurrence (Figure 29). Il n'y avait pas de différence pour la survie globale. De même, il n'y avait pas d'association avec la survie globale ou la survie sans progression pour les autres RCPG exprimés de manière différentielle (AVPR1A, MC2R, NPY5R, NPY6R, RXFP1 et PTH1R).

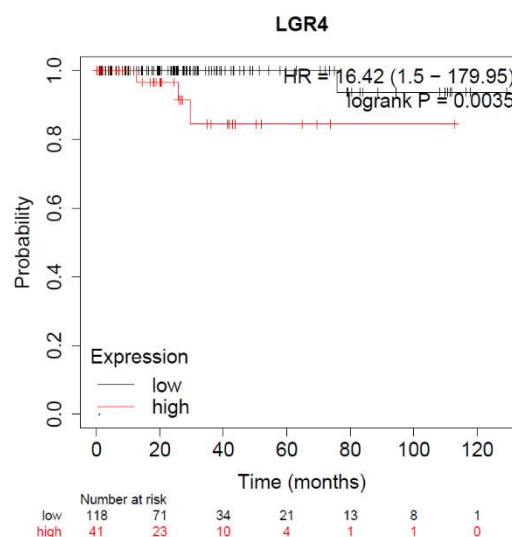


Figure 29 : Association de LGR4 à la survie sans progression.

Pour analyser la valeur pronostique de l'expression de LGR4, les échantillons de patients sont divisés en 2 groupes selon les expressions médianes du gène. Les 2 cohortes de patients ont été comparées par selon une courbe de survie de Kaplan-Meier et la valeur Pa été calculée par un test de log-rank.

Dans les PitNET, le score clinicopathologique HYPOPRONOS semble bien prédire le risque de tumeur agressive. Ce score intégrant l'invasion et les marqueurs de prolifération tumorale, nous avons souhaité savoir si le profil d'expression de RCPG variait selon ces critères. Cependant, aucune donnée était disponible dans les séries analysées concernant le caractère prolifératif ou non. Nous avons pu évaluer le profil d'expression entre les tumeurs invasives et non invasives. De façon intéressante, nous avons identifié 3 RCPG sous-exprimés (*ADGRL3*, *ADGRA1*, *ADCYAP1R1*) et 7 RCPG surexprimés (*FFAR2*, *C5AR1*, *CXCR5*, *PTGER2*, *HTR4*, *ADGRG2*, *SSTR1*). Enfin, dans le CMT, certaines mutations germinales, notamment les mutations M918T exposent à un risque plus important de tumeurs agressives. De façon intéressante, dans la base de données GEO, une autre série d'échantillons étaient disponibles (GSE32662) ne comparant pas cette fois-ci le tissu tumoral au tissu sain mais comparant les CMT mutés au niveau germinale (918, n=16, 634 n=9, autres mutations n=4) et les CMT sporadiques (n=20) (Maliszewska et al., 2013). Notre analyse n'a pas révélé de différence significative dans le profil transcriptionnel des RCPG entre les CMT mutés et non mutés y compris après stratification selon le type de mutation (Figure 30).

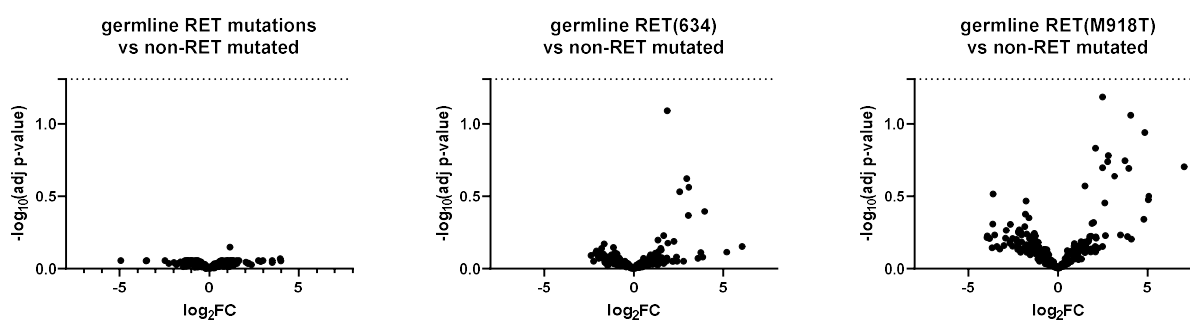


Figure 30 : Volcano plot pour la série GSE32662.

Chaque point représente un GPCR. Les données sont exprimées en fold-change par rapport aux cancers médullaires de la thyroïdes (CMT) non mutés. La ligne horizontale représente le seuil de significativité statistique ($p < 0,005$).

3.6. Conclusion

En conclusion, ce travail a permis pour la première fois d'identifier un panel large de RCPG exprimés de manière différentielle entre les tissus tumoraux et le tissu sain. Ces données appuient des résultats antérieurs mais surtout mettent en évidence un certain nombre de nouvelles autres cibles potentielles. Nous avons ainsi pu sélectionner des récepteurs éligibles à du repositionnement moléculaire. Ceci nécessitera bien évidemment des analyses fonctionnelles plus approfondies. Enfin, au-delà du ciblage pharmacologique, certains récepteurs ont été associés à des marqueurs pronostiques et pourraient être proposés, après validation, comme outils complémentaires dans les prises de décisions thérapeutiques par exemple.

Discussion générale et perspectives

Ce travail de thèse a porté sur la recherche d'une possibilité de ciblage pharmacologique des RCPG en association aux thérapies actuelles au sein des tumeurs endocrines pour effectuer du repositionnement moléculaire. Au vu de la fréquence des cancers thyroïdiens, en comparaison aux autres tumeurs endocrines, nous avons choisi de prendre comme principal modèle le cancer de la thyroïde. Parmi les cancers de la thyroïde, nous avons souhaité nous focaliser sur les cancers thyroïdiens métastatiques, réfractaires à l'iode radioactif et évolutifs. En effet, il s'agit de la population de patients pour laquelle les traitements actuels par ITK ne sont pas satisfaisants. Nous avons donc fait l'hypothèse d'une alternative possible en s'intéressant aux RCPG. Grâce à différentes approches combinant la transcriptomique et les analyses de bases de données, nous avons pu mettre en évidence que les RCPG, via leur expression différentielle, pouvaient être une cible dans le cancer thyroïdien réfractaire (article 1, (Suteau et al., 2021)). Ensuite, nous avons pu tester notre hypothèse *in vitro* et *ex vivo* grâce à un criblage pharmacologique impliquant différentes techniques (viabilité cellulaire, prolifération, cytotoxicité, migration, invasion) (article 2, en préparation). Enfin, nous avons voulu transposer ce modèle au sein des tumeurs endocrines. Nous avons pour cela travaillé sur les données existantes de la littérature en nous focalisant sur les RCPG dans les adénomes hypophysaires, cancers médullaires de la thyroïde, phéochromocytomes/paragangliomes et corticosurrénales (article 3, (Suteau et al., 2022)).

Dans un premier temps nous avons réalisé un atlas des RCPG au sein des cancers thyroïdiens. En effet, avant d'envisager la possibilité d'un ciblage pharmacologique des RCPG, il était important de choisir les cibles les plus pertinentes possibles. En l'absence de données disponibles dans la littérature, le premier axe de mon travail a donc été de répertorier les RCPG potentiellement impliqués dans le développement du cancer thyroïdien réfractaire à l'iode radioactif. Pour cela, notre critère de sélection a été l'expression différentielle des RCPG entre tissu tumoral et tissu sain adjacent. Nous avons ainsi pu mettre en évidence un certain nombre de cibles potentielles. Ces résultats soulèvent alors de nombreuses questions :

- Comment ces récepteurs exprimés de façon différentielle sont impliqués dans le développement ou la progression tumorale ?
- Ces récepteurs peuvent-ils être envisagés comme marqueurs pronostiques ?
- Ces récepteurs peuvent-ils être considérés comme cibles thérapeutiques ?

Tout d'abord, le critère d'expression différentielle de gènes est souvent le premier critère utilisé actuellement pour sélectionner des gènes candidats, en s'appuyant sur l'hypothèse qu'un changement d'expression entre le tissu sain et le tissu pathologique est un argument pour impliquer ce gène dans un processus pathologique. Nous nous sommes donc basés sur ce critère pour la sélection de nos RCPG d'intérêt. Afin d'évaluer l'implication de ces RCPG dans l'initiation ou la progression tumorale, il serait également intéressant de mettre en évidence un lien plus direct entre le RCPG potentiel et des éléments comme la prolifération, la migration ou l'invasion en utilisant des agents pharmacologiques spécifiques ou par une extinction de gènes par siRNA par exemple. Une étude *in vivo* par xénogreffe pourrait également être envisagée. Par ailleurs, ces analyses transcriptomiques ont porté sur une analyse de la tumeur prise en totalité. Il est possible que le profil d'expression retrouvé soit la moyenne des profils d'expression de diverses cellules. Ceci pourrait masquer des différences entre les composants de la tumeur. Il serait donc intéressant d'étudier la composition cellulaire, en particulier du microenvironnement tumoral. Le

séquençage de l'ARN à l'échelle d'une cellule, ou *single-cell RNA-Seq*, pourrait par exemple permettre de quantifier les caractéristiques des cellules de manière individuelle afin d'identifier le profil d'expression des RCPG au sein des cellules thyroïdiennes et au sein du stroma. Ceci permettrait ainsi de mieux comprendre les interactions entre la cellule tumorale et son environnement.

Ensuite, de nombreuses études ont souhaité déterminer l'impact pronostique du profil d'expression de certains gènes dans le cancer de la thyroïde. Nos analyses de survie ont mis en évidence que l'expression génique de certains RCPG était associée à la survie sans progression et/ou globale dans le cancer de la thyroïde tout stade confondu. Cependant, aucun RCPG était associé à la survie dans les cancers réfractaires de notre série. Pour gagner en sensibilité, des scores pronostiques basés sur l'évaluation du profil d'expression de plusieurs gènes dont des RCPG pourraient être important à évaluer. Il serait également intéressant de comparer le profil d'expression de la tumeur primitive et des métastases à distance au sein des cancers thyroïdiens réfractaires y compris entre les différents sites métastatiques. En effet, notre première étude a permis de dresser un premier atlas des données d'expression génique des RCPG au sein des tumeurs primitives des cancers différenciés de la thyroïde. Les données d'analyses différentielles entre les données du TCGA (96% de cancers à risque faible ou intermédiaire) et les 17 patients ayant un cancer thyroïdien métastatique, réfractaire et évolutif ont révélé que le profil n'était pas superposable avec seulement 21 RCPGs communs. Nous avons donc le projet de constituer une bio collection de tissus provenant de patients suivis pour un cancer thyroïdien métastatique et réfractaire à l'iode radioactif. Pour chaque patient, un tissu fixé et inclus en paraffine proviendrait de la tumeur primaire et d'une ou plusieurs métastases à distance. L'analyse d'expression différentielle de gènes codant pour des RCPG au sein de ces cancers serait réalisée par la technologie Nanostring nCounter (NanoString Technologies) *via* notre panel validé ciblant 371 RCPG.

Enfin, les RCPG étant la cible d'un grand nombre de médicaments actuellement sur le marché, leur ciblage offre des possibilités de repositionnement moléculaire plutôt qu'une stratégie de développement de nouvelles molécules pour une maladie rare. A partir de bases de données pharmacologiques, nous avons pu identifier 25 RCPG qui étaient ciblés par au moins un médicament potentiel. L'enjeu est ensuite de pouvoir tester ces hypothèses dans un modèle adapté, à des concentrations cohérentes.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons souhaité tester l'hypothèse *in vitro* d'un ciblage pharmacologique de sensibilité des cellules tumorales à des médicaments ciblant des RCPG seuls puis en association avec les ITK. Parmi les 25 RCPG d'intérêts, nous n'avons pu en tester que dix du fait du profil d'expression des lignées de notre laboratoire. Il serait intéressant d'élargir le choix des modèles pour pouvoir tester les autres RCPG potentiels. Nous avons pu développer un système de criblage pharmacologique à haut débit des médicaments ciblant les RCPG sur différentes lignées cellulaires (FTC-133, NPA, XTC, BCPAP, TPC-1, ARO) par quantification de la viabilité cellulaire puis par l'étude de l'effet sur la prolifération, la migration et l'invasion. Notre étude a montré une approche intéressante pour identifier de nouvelles thérapies dans le cancer de la thyroïde. Cette stratégie présente plusieurs avantages. Premièrement, elle offre une approche rentable pour identifier des médicaments prometteurs pour une maladie rare et mortelle qu'est le cancer de la thyroïde réfractaire à l'iode radioactif. Deuxièmement, cette approche permet aux cibles potentielles identifiées en laboratoire d'être rapidement amenées à un traitement clinique possible. En effet, pour ces molécules, les différentes phases de développement du médicament ont déjà été réalisées. Troisièmement, l'utilisation de

plusieurs lignées cellulaires présentant différentes mutations génétiques impliquées dans le cancer peut faciliter la sélection des candidats. En effet, l'hétérogénéité génétique entre et dans les tumeurs est l'une des raisons pour lesquelles l'efficacité des médicaments anticancéreux peut être limitée.

Même si cette partie d'étude n'est pas totalement achevée, elle ouvre à différentes questions :

- Quel(s) mécanisme(s) moléculaire(s) sous-jacent explique(ent) les effets antitumoraux observés ?
- Quelle(s) combinaison(s) de traitements est (sont) envisageable(s) pour augmenter la sensibilité des cellules tumorales thyroïdiennes aux ITKs ?
- Quels nouveaux modèles sont à penser pour une thérapie personnalisée ?
- Au-delà du repositionnement de médicaments, quel ciblage thérapeutique spécifique pourrait être envisagé ?

Nous avons pu, en effet, montrer que trois molécules, la vilazodone, la vortioxetine et le fingolimod, avaient des effets antitumoraux en diminuant la prolifération cellulaire mais aussi l'invasion et la migration. Cependant, en reprenant les cibles potentielles, il semblerait que les effets observés ne semblent pas passer par ces RCPG, bien que ces derniers présentent une expression différentielle entre tissu sain et tissu tumoral. Ainsi, il serait donc intéressant de comprendre quel est le mécanisme sous-jacent et la cible précise.

Nous souhaitons identifier des combinaisons de traitements associant une thérapie ciblée de type ITK et une molécule qui aurait un effet synergique avec ce dernier pour augmenter la sensibilité des cellules tumorales thyroïdiennes aux ITKs et ainsi diminuer la dose d'ITK et réduire les effets secondaires. Nous avons donc testé des combinaisons avec une gamme de concentrations croissantes d'ITK (lenvatinib ou selumetinib) avec une dose fixe de chacune de ces trois molécules. Aucun effet synergique n'a été pour le moment observé. Des combinaisons avec des concentrations plus faibles sont en train d'être testées pour pouvoir évaluer une éventuelle synergie. En effet, il serait intéressant d'évaluer les combinaisons les plus optimales. Une autre stratégie serait peut-être d'évaluer des molécules ciblant les RCPG n'ayant pas d'effet seules mais dont la combinaison aurait un effet synergique. Ceci permettrait peut-être de limiter les effets secondaires liés à un ciblage non spécifique des RCPG. Le modèle des lignées dérivées de cancer utilisé ne semble pas forcément être le reflet de la réponse clinique. Nous avons en particulier montré que le profil d'expression des RCPG semblait assez spécifique à chaque individu. De plus, les profils étaient différents entre les prélèvements de patients et les lignées cellulaires. Il est donc nécessaire de développer de nouveaux modèles adaptés, afin de tester des traitements personnalisés. Divers modèles ont été conçus pour préserver le microenvironnement tumoral natif, notamment des xénogreffes de tumeurs dérivées de patients et des stratégies de culture d'organoïdes (Hu et al., 2021). De plus, nous avons pu mettre en culture un prélèvement provenant d'une ascite métastatique avec la possibilité de tester *ex vivo* un panel de traitement immédiatement et après congélation/décongélation. L'enjeu maintenant est de déployer cette technique probablement à partir de prélèvements issus d'épanchements pleuraux, moins rares que les prélèvements d'ascite. Les objectifs seraient d'évaluer la réponse cytotoxique *ex vivo* mais aussi d'évaluer la prédiction de la réponse aux traitements en comparaison aux résultats obtenus chez le patient. Ce système pourrait aider à adapter la thérapie à chaque patient en fonction la réponse des cellules cancéreuses de l'épanchement. Des médicaments ciblés non encore approuvés et leurs combinaisons pourraient être ainsi testés en toute sécurité en utilisant ces épanchements malins afin d'estimer le bénéfice clinique potentiel de ces médicaments. Au-delà de cette évaluation *ex vivo*, la détermination du nombre minimal de cellules permettrait

secondairement d'étendre cette approche à des prélèvements solides de petite taille (biopsies, ponction cytologique en milieu liquide).

Enfin, l'utilisation de médicaments à diffusion systémique expose à des effets secondaires. Les RCPG sélectionnés, ont parfois un profil d'expression non spécifique à la tumeur avec une distribution parfois ubiquitaire. Par ailleurs ces médicaments ciblant les RCPG sont le plus souvent des agents multicybles. Ce ciblage non spécifique peut concourir à la survenue d'effets secondaires. Ainsi, au-delà du repositionnement moléculaire, du fait de leur présence au niveau membranaire et de leur capacité d'internalisation, ces récepteurs pourraient être la cible d'autres approches thérapeutiques comme de la nanovectorisation. Cette technique permet d'administrer des concentrations significatives de médicaments (ITK, par exemple) aux tissus cibles, avec une spécificité élevée, et avec des effets *off-target* minimales, dans le but d'augmenter l'indice thérapeutique. Cette approche repose sur différents types de nanoparticules ciblées par un ligand spécifique d'un récepteur et permet de délivrer spécifiquement l'agent cytotoxique à la cellule tumorale en épargnant les tissus sains. Le premier liposome approuvé permettait de délivrer de la doxorubicine spécifiquement aux tissus tumoraux, limitant ainsi la cardiotoxicité importante de cette chimiothérapie (Duggan and Keating, 2011). La Figure 31 tente de schématiser ce concept de nanovectorisation en utilisant les RCPG.

Double ciblage pharmacologique

Autres alternatives possibles de ciblage spécifiques utilisant les RCPG

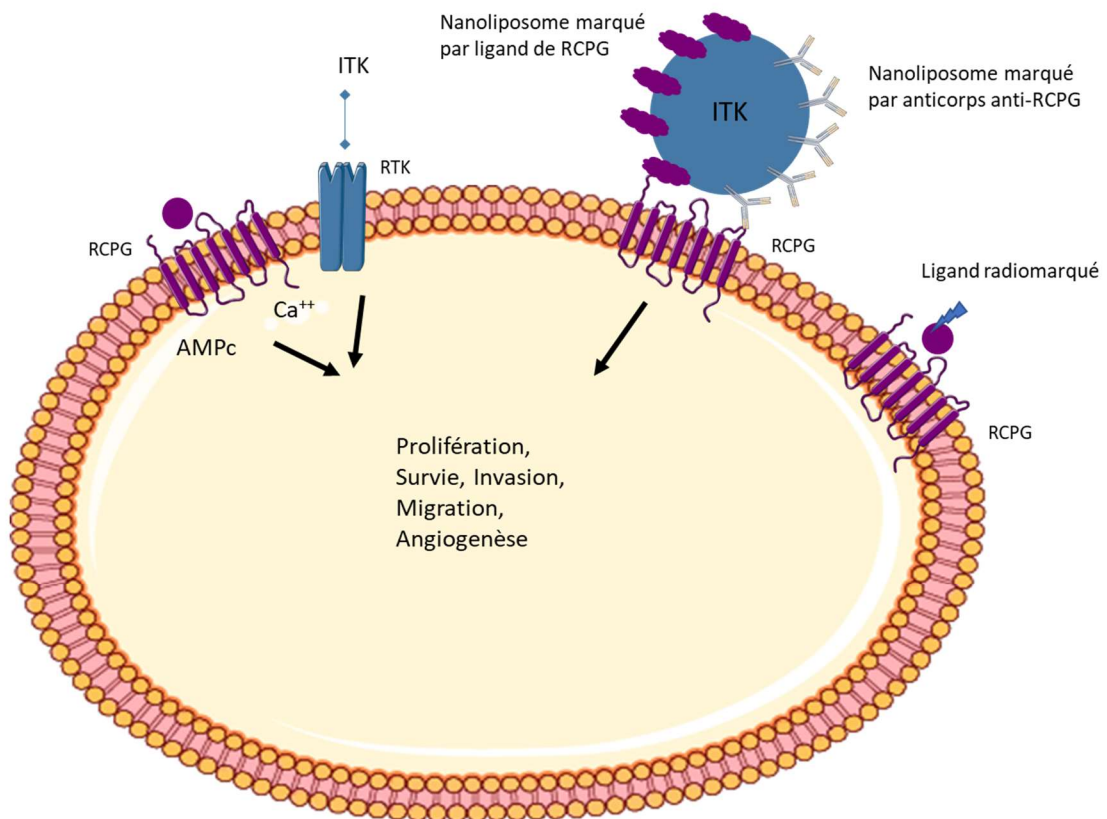


Figure 31 : Schéma décrivant le ciblage théranostique actuel et futur des RCPG dans les cancers de la thyroïde.

Parmi les RCPG présentant une expression différentielle, certains étaient surexprimés. Ceci soulève également la question d'un ciblage par imagerie fonctionnelle. En effet, à l'image du récepteur de la somatostatine, surexprimé dans les tumeurs neuroendocrines, d'autres RCPG surexprimés dans le cancer thyroïdien avec une expression faible dans la plupart des autres organes pourraient être des récepteurs d'intérêt pour un « radiociblage » en imagerie fonctionnelle voire accessible à de la radiothérapie métabolique.

Dans la troisième partie de ce travail, nous avons voulu, au-delà du cancer thyroïdien réfractaire à l'iode radioactif, tenter d'identifier les RCPG exprimés de manière différentielle dans les autres tumeurs endocrines et de sélectionner ceux pour lesquels du repositionnement moléculaire serait envisageable. A l'image du cancer thyroïdien, nous souhaitons également nous diriger vers des combinaisons de traitements avec un effet synergique dans ces tumeurs endocrines. Par exemple, dans les PitNET, à notre connaissance peu de traitements ont été évalués en combinaison avec le témozolomide. Dans le glioblastome, où le témozolomide est également utilisé, de nombreuses combinaisons ont été testées et en particulier avec des molécules ciblant des RCPG. C'est le cas du récepteur de la dopamine. L'halopéridol et la rispéridone, deux antagonistes du récepteur de type 2 à la dopamine, ont montré un effet synergique antitumoral en combinaison avec le témozolomide *in vitro* (Liu et al., 2019b). Ainsi, la combinaison de médicaments avec un ciblage d'un RCPG pourrait permettre de réduire les doses de témozolomide et donc les toxicités associées. Au-delà du repositionnement moléculaire, il a également été montré un effet antitumoral d'une molécule chimère somatostatine-dopamine dans le CMT (Dicitore et al., 2021).

En conclusion, ce travail, grâce à des approches complémentaires, devrait contribuer à une meilleure compréhension de l'implication des RCPG dans les tumeurs endocrines et d'une possibilité thérapeutique de ciblage spécifique des RCPG en combinaison au traitement standard dans un double objectif, améliorer la réponse clinique et limiter l'incidence des effets indésirables. Ce travail offre des perspectives intéressantes dans la connaissance des RCPG et dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Au-delà des cancers endocriniens et même de la cancérologie, la mise au point de notre mesure d'expression par une « carte » spécifiquement dédiée aux RCPG pourrait être utile dans d'autres domaines comme dans le cadre des maladies métaboliques. Ceci permettrait là encore d'autres utilisations (biomarqueurs, traitements...).

Bibliographie

- Abate, A., Rossini, E., Bonini, S.A., Fragni, M., Cosentini, D., Tiberio, G.A.M., Benetti, D., Hantel, C., Laganà, M., Grisanti, S., et al. (2020). Cytotoxic Effect of Trabectedin In Human Adrenocortical Carcinoma Cell Lines and Primary Cells. *Cancers* 12, 928. <https://doi.org/10.3390/cancers12040928>.
- Adasme, M.F., Parisi, D., Sveshnikova, A., and Schroeder, M. (2020). Structure-based Drug repositioning: Potential and Limits. *Semin. Cancer Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.01.010>.
- Agrawal, N., Akbani, R., Aksoy, B.A., Ally, A., Arachchi, H., Asa, S.L., Auman, J.T., Balasundaram, M., Balu, S., Baylin, S.B., et al. (2014). Integrated Genomic Characterization of Papillary Thyroid Carcinoma. *Cell* 159, 676–690. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.050>.
- Ahmed, M., Barbachano, Y., Riddell, A., Hickey, J., Newbold, K.L., Viros, A., Harrington, K.J., Marais, R., and Nutting, C.M. (2011). Analysis of the efficacy and toxicity of sorafenib in thyroid cancer: a phase II study in a UK based population. *Eur. J. Endocrinol.* 165, 315–322. <https://doi.org/10.1530/EJE-11-0129>.
- Akekawatchai, C., Holland, J.D., Kochetkova, M., Wallace, J.C., and McColl, S.R. (2005). Transactivation of CXCR4 by the Insulin-like Growth Factor-1 Receptor (IGF-1R) in Human MDA-MB-231 Breast Cancer Epithelial Cells. *J. Biol. Chem.* 280, 39701–39708. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509829200>.
- Albrecht, H., and Kübler, E. (2019). Systematic Meta-Analysis Identifies Co-Expressed Kinases and GPCRs in Ovarian Cancer Tissues Revealing a Potential for Targeted Kinase Inhibitor Delivery. *Pharmaceutics* 11. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11090454>.
- Aldinucci, D., and Colombatti, A. (2014). The Inflammatory Chemokine CCL5 and Cancer Progression. *Mediators Inflamm.* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/292376>.
- Alexander, S.P., Christopoulos, A., Davenport, A.P., Kelly, E., Mathie, A., Peters, J.A., Veale, E.L., Armstrong, J.F., Faccenda, E., Harding, S.D., et al. (2019). THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2019/20: G protein-coupled receptors. *Br. J. Pharmacol.* 176, S21–S141. <https://doi.org/10.1111/bph.14748>.
- Alexandre, J., Kahatt, C., Bertheault-Cvitkovic, F., Faivre, S., Shibata, S., Hilgers, W., Goldwasser, F., Lokiec, F., Raymond, E., Weems, G., et al. (2007). A phase I and pharmacokinetic study of irofulven and capecitabine administered every 2 weeks in patients with advanced solid tumors. *Invest. New Drugs* 25, 453–462. <https://doi.org/10.1007/s10637-007-9071-6>.
- Al-Lazikani, B., Banerji, U., and Workman, P. (2012). Combinatorial drug therapy for cancer in the post-genomic era. *Nat. Biotechnol.* 30, 679–692. <https://doi.org/10.1038/nbt.2284>.
- Ananias, H.J.K., Yu, Z., Dierckx, R.A., van der Wiele, C., Helfrich, W., Wang, F., Yan, Y., Chen, X., de Jong, I.J., and Elsinga, P.H. (2011). 99mTechnetium-HYNIC(tricine/TPPTS)-Aca-Bombesin(7–14) as a Targeted Imaging Agent with MicroSPECT in a PC-3 Prostate Cancer Xenograft Model. *Mol. Pharm.* 8, 1165–1173. <https://doi.org/10.1021/mp200014h>.
- Anderson, P.M., Trucco, M.M., Tarapore, R.S., Zahler, S., Thomas, S., Gortz, J., Mian, O., Stoignew, M., Prabhu, V., Morrow, S., et al. (2022). Phase II Study of ONC201 in Neuroendocrine Tumors including Pheochromocytoma-Paraganglioma and Desmoplastic Small Round Cell Tumor. *Clin. Cancer Res.* OF1–OF10. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-21-4030>.
- Andrusiewicz, M., Komarowska, H., Skibińska, I., Chmielewska, M., Jaskuła-Świtek, M., Liebert, W., Waśko, R., and Kotwicka, M. (2017). Expression of ghrelin and ghrelin functional receptor GHSR1a in human pituitary adenomas. *Pol. Arch. Intern. Med.* 127, 163–169. <https://doi.org/10.20452/pamw.3967>.
- Antonelli, A., Ferrari, S.M., and Fallahi, P. (2018). Current and future immunotherapies for thyroid cancer. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 18, 149–159. <https://doi.org/10.1080/14737140.2018.1417845>.

- Antwi, K., Nicolas, G., Fani, M., Heye, T., Pattou, F., Grossman, A., Chanson, P., Reubi, J.C., Perren, A., Gloor, B., et al. (2019). 68Ga-Exendin-4 PET/CT Detects Insulinomas in Patients With Endogenous Hyperinsulinemic Hypoglycemia in MEN-1. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *104*, 5843–5852. <https://doi.org/10.1210/jc.2018-02754>.
- Arai, Y., Kiyotsuka, Y., Kagechika, K., Nishi, T., Inui, M., Nagamochi, M., Oyama, K., and Izumi, M. (2020). Discovery of novel, potent, and orally bioavailable pyrido[2,3-d][1]benzazepin-6-one antagonists for parathyroid hormone receptor 1. *Bioorg. Med. Chem.* *28*, 115524. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115524>.
- Arnaldi, G., Gasc, J.-M., de Keyzer, Y., Raffin-Sanson, M.-L., Perraudin, V., Kuhn, J.-M., Raux-Demay, M.-C., Luton, J.-P., Clauser, E., and Bertagna, X. (1998). Variable Expression of the V1 Vasopressin Receptor Modulates the Phenotypic Response of Steroid-Secreting Adrenocortical Tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *83*, 2029–2035. <https://doi.org/10.1210/jcem.83.6.4873>.
- Asghar, M.Y., Kemppainen, K., Lassila, T., and Törnquist, K. (2018). Sphingosine 1-phosphate attenuates MMP2 and MMP9 in human anaplastic thyroid cancer C643 cells: Importance of S1P2. *PLoS ONE* *13*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196992>.
- Assie, G., Louiset, E., Sturm, N., René-Corail, F., Groussin, L., Bertherat, J., Thomas, M., Lefebvre, H., Feige, J.-J., Clauser, E., et al. (2010). Systematic Analysis of G Protein-Coupled Receptor Gene Expression in Adrenocorticotropin-Independent Macronodular Adrenocortical Hyperplasia Identifies Novel Targets for Pharmacological Control of Adrenal Cushing's Syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *95*, E253–E262. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-2281>.
- Assié, G., Letouzé, E., Fassnacht, M., Jouinot, A., Luscap, W., Barreau, O., Omeiri, H., Rodriguez, S., Perlemoine, K., René-Corail, F., et al. (2014). Integrated genomic characterization of adrenocortical carcinoma. *Nat. Genet.* *46*, 607–612. <https://doi.org/10.1038/ng.2953>.
- Aust, G., Eichler, W., Laue, S., Lehmann, I., Heldin, N.-E., Lotz, O., Scherbaum, W.A., Dralle, H., and Hoang-Vu, C. (1997). CD97: A Dedifferentiation Marker in Human Thyroid Carcinomas. *Cancer Res.* *57*, 1798–1806. .
- Axelsson, M., Liu, K., Jiang, X., He, K., Wang, J., Zhao, H., Kufrin, D., Palmby, T., Dong, Z., Russell, A.M., et al. (2013). U.S. Food and Drug Administration Approval: Vismodegib for Recurrent, Locally Advanced, or Metastatic Basal Cell Carcinoma. *Clin. Cancer Res.* *19*, 2289–2293. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-1956>.
- Bagnato, A., and Rosanò, L. (2019). New Routes in GPCR/ β -Arrestin-Driven Signaling in Cancer Progression and Metastasis. *Front. Pharmacol.* *10*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00114>.
- Balijepalli, P., Sitton, C.C., and Meier, K.E. (2021). Lysophosphatidic Acid Signaling in Cancer Cells: What Makes LPA So Special? *Cells* *10*, 2059. <https://doi.org/10.3390/cells10082059>.
- Baloch, Z.W., Asa, S.L., Barletta, J.A., Ghossein, R.A., Juhlin, C.C., Jung, C.K., LiVolsi, V.A., Papotti, M.G., Sobrinho-Simões, M., Tallini, G., et al. (2022). Overview of the 2022 WHO Classification of Thyroid Neoplasms. *Endocr. Pathol.* *33*, 27–63. <https://doi.org/10.1007/s12022-022-09707-3>.
- Bang-Andersen, B., Ruhland, T., Jørgensen, M., Smith, G., Frederiksen, K., Jensen, K.G., Zhong, H., Nielsen, S.M., Hogg, S., Mørk, A., et al. (2011). Discovery of 1-[2-(2,4-Dimethylphenylsulfanyl)phenyl]piperazine (Lu AA21004): A Novel Multimodal Compound for the Treatment of Major Depressive Disorder. *J. Med. Chem.* *54*, 3206–3221. <https://doi.org/10.1021/jm101459g>.
- Barbaro, D., Grosso, M., Boni, G., Lapi, P., Pasquini, C., Orsini, P., Turco, A., Meucci, G., Marzola, M.C., Berti, P., et al. (2010). Recombinant human TSH and ablation of post-surgical thyroid remnants in differentiated thyroid cancer: the effect of pre-treatment with furosemide and furosemide plus lithium. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* *37*, 242–249. <https://doi.org/10.1007/s00259-009-1254-2>.
- Barbieri, F., Bajetto, A., Stumm, R., Pattarozzi, A., Porcile, C., Zona, G., Dorcaratto, A., Ravetti, J.-L., Minuto, F., Spaziante, R., et al. (2008). Overexpression of Stromal Cell-Derived Factor 1 and Its Receptor CXCR4 Induces Autocrine/Paracrine Cell Proliferation in Human Pituitary Adenomas. *Clin. Cancer Res.* *14*, 5022–5032. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4717>.

- Barretina, J., Caponigro, G., Stransky, N., Venkatesan, K., Margolin, A.A., Kim, S., Wilson, C.J., Lehár, J., Kryukov, G.V., Sonkin, D., et al. (2012). The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modeling of anticancer drug sensitivity. *Nature* *483*, 603–607. <https://doi.org/10.1038/nature11003>.
- Barrett, T., Wilhite, S.E., Ledoux, P., Evangelista, C., Kim, I.F., Tomashevsky, M., Marshall, K.A., Phillippy, K.H., Sherman, P.M., Holko, M., et al. (2013). NCBI GEO: archive for functional genomics data sets—update. *Nucleic Acids Res.* *41*, D991–D995. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1193>.
- Barzon, L., Pacenti, M., Masi, G., Stefani, A.-L., Fincati, K., and Palù, G. (2005). Loss of Growth Hormone Secretagogue Receptor 1a and Overexpression of Type 1b Receptor Transcripts in Human Adrenocortical Tumors. *Oncology* *68*, 414–421. <https://doi.org/10.1159/000086983>.
- Beck-Peccoz, P., Lania, A., Beckers, A., Chatterjee, K., and Wemeau, J.-L. (2013). 2013 European Thyroid Association Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Thyrotropin-Secreting Pituitary Tumors. *Eur. Thyroid J.* *2*, 76–82. <https://doi.org/10.1159/000351007>.
- Benredjem, B., Gallion, J., Pelletier, D., Dallaire, P., Charbonneau, J., Cawkill, D., Nagi, K., Gosink, M., Lukasheva, V., Jenkinson, S., et al. (2019). Exploring use of unsupervised clustering to associate signaling profiles of GPCR ligands to clinical response. *Nat. Commun.* *10*. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11875-6>.
- Berenbaum, M.C. (1989). What is synergy? *Pharmacol. Rev.* *41*, 93–141. .
- Bhat, R.R., Yadav, P., Sahay, D., Bhargava, D.K., Creighton, C.J., Yazdanfard, S., Al-rawi, A., Yadav, V., Qin, L., Nanda, S., et al. (2018). GPCRs profiling and identification of GPR110 as a potential new target in HER2+ breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* *170*, 279–292. <https://doi.org/10.1007/s10549-018-4751-9>.
- Bible, K.C., Suman, V.J., Molina, J.R., Smallridge, R.C., Maples, W.J., Menefee, M.E., Rubin, J., Karlin, N., Sideras, K., Morris, J.C., et al. (2014). A Multicenter Phase 2 Trial of Pazopanib in Metastatic and Progressive Medullary Thyroid Carcinoma: MC057H. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *99*, 1687–1693. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-3713>.
- Bikas, A., Kundra, P., Desale, S., Mete, M., O’Keefe, K., Clark, B.G., Wray, L., Gandhi, R., Barrett, C., Jelinek, J.S., et al. (2016). Phase 2 clinical trial of sunitinib as adjunctive treatment in patients with advanced differentiated thyroid cancer. *Eur. J. Endocrinol.* *174*, 373–380. <https://doi.org/10.1530/EJE-15-0930>.
- Bing, X., Guo, K.Y., Yong, Y. a. O., Wei, L., Zhi, W.R., and Yuan, R.Z. (2013). Study on the Expression Levels of CXCR4, CXCL12, CD44, and CD147 and Their Potential Correlation with Invasive Behaviors of Pituitary Adenomas. *Biomed. Environ. Sci.* *26*, 592–598. <https://doi.org/10.3967/0895-3988.2013.07.011>.
- Bjarnadóttir, T.K., Gloriam, D.E., Hellstrand, S.H., Kristiansson, H., Fredriksson, R., and Schiöth, H.B. (2006). Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse. *Genomics* *88*, 263–273. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2006.04.001>.
- Blanco, M., García-Caballero, T., Fraga, M., Gallego, R., Cuevas, J., Forteza, J., Beiras, A., and Diéguez, C. (2002). Cellular localization of orexin receptors in human adrenal gland, adrenocortical adenomas and pheochromocytomas. *Regul. Pept.* *104*, 161–165. [https://doi.org/10.1016/S0167-0115\(01\)00359-7](https://doi.org/10.1016/S0167-0115(01)00359-7).
- Bliss, C.I. (1956). THE CALCULATION OF MICROBIAL ASSAYS. *Bacteriol. Rev.* *20*, 243–258. .
- Bond, R.A., and IJzerman, A.P. (2006). Recent developments in constitutive receptor activity and inverse agonism, and their potential for GPCR drug discovery. *Trends Pharmacol. Sci.* *27*, 92–96. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2005.12.007>.
- Bondar, G., Xu, W., Elashoff, D., Li, X., Faure-Kumar, E., Bao, T.-M., Grogan, T., Moose, J., and Deng, M.C. (2020). Comparing NGS and NanoString platforms in peripheral blood mononuclear cell transcriptome profiling for advanced heart failure biomarker development. *J. Biol. Methods* *7*, e123. <https://doi.org/10.14440/jbm.2020.300>.

Boos, L.A., Dettmer, M., Schmitt, A., Rudolph, T., Steinert, H., Moch, H., Sobrinho-Simões, M., Komminoth, P., and Perren, A. (2013). Diagnostic and prognostic implications of the PAX8-PPAR γ translocation in thyroid carcinomas—a TMA-based study of 226 cases. *Histopathology* 63, 234–241. <https://doi.org/10.1111/his.12150>.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., and Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* 68, 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.

Brinkmann, V., Davis, M.D., Heise, C.E., Albert, R., Cottens, S., Hof, R., Bruns, C., Prieschl, E., Baumruker, T., Hiestand, P., et al. (2002). The Immune Modulator FTY720 Targets Sphingosine 1-Phosphate Receptors*. *J. Biol. Chem.* 277, 21453–21457. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200176200>.

Broome, D.T., Gadre, G.B., Fayazzadeh, E., Bena, J.F., and Nasr, C. (2020). Pleural effusion as a novel prognostic factor in metastatic thyroid carcinoma. *Endocr. Connect.* 9, 812–823. <https://doi.org/10.1530/EC-20-0193>.

Brose, M.S., Nutting, C.M., Jarzab, B., Elisei, R., Siena, S., Bastholt, L., de la Fouchardiere, C., Pacini, F., Paschke, R., Shong, Y.K., et al. (2014). Sorafenib in radioactive iodine-refractory, locally advanced or metastatic differentiated thyroid cancer: a randomised, double-blind, phase 3 trial. *The Lancet* 384, 319–328. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60421-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60421-9).

Brose, M.S., Cabanillas, M.E., Cohen, E.E.W., Wirth, L.J., Riehl, T., Yue, H., Sherman, P.S.I., and Sherman, E.J. (2016). Vemurafenib in patients with BRAFV600E-positive metastatic or unresectable papillary thyroid cancer refractory to radioactive iodine: a non-randomised, multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 17, 1272–1282. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30166-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30166-8).

Brose, M.S., Robinson, B., Sherman, S.I., Krajewska, J., Lin, C.-C., Vaisman, F., Hoff, A.O., Hitre, E., Bowles, D.W., Hernando, J., et al. (2021a). Cabozantinib for radioiodine-refractory differentiated thyroid cancer (COSMIC-311): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 22, 1126–1138. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(21\)00332-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(21)00332-6).

Brose, M.S., Panaseykin, Y., Konda, B., de la Fouchardiere, C., Hughes, B.G.M., Gianoukakis, A.G., Joo Park, Y., Romanov, I., Krzyzanowska, M.K., Leboulleux, S., et al. (2021b). A Randomized Study of Lenvatinib 18 mg vs 24 mg in Patients With Radioiodine-Refractory Differentiated Thyroid Cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 107, 776–787. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgab731>.

Burman, K.D., and Wartofsky, L. (2015). Thyroid Nodules. *N. Engl. J. Med.* 373, 2347–2356. <https://doi.org/10.1056/NEJMcp1415786>.

Cabanillas, M.E., Brose, M.S., Holland, J., Ferguson, K.C., and Sherman, S.I. (2014). A Phase I Study of Cabozantinib (XL184) in Patients with Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid* 24, 1508–1514. <https://doi.org/10.1089/thy.2014.0125>.

Cabanillas, M.E., Schlumberger, M., Jarzab, B., Martins, R.G., Pacini, F., Robinson, B., McCaffrey, J.C., Shah, M.H., Bodenner, D.L., Topliss, D., et al. (2015). A phase 2 trial of lenvatinib (E7080) in advanced, progressive, radioiodine-refractory, differentiated thyroid cancer: A clinical outcomes and biomarker assessment. *Cancer* 121, 2749–2756. <https://doi.org/10.1002/cncr.29395>.

Cabanillas, M.E., de Souza, J.A., Geyer, S., Wirth, L.J., Menefee, M.E., Liu, S.V., Shah, K., Wright, J., and Shah, M.H. (2017). Cabozantinib As Salvage Therapy for Patients With Tyrosine Kinase Inhibitor-Refractory Differentiated Thyroid Cancer: Results of a Multicenter Phase II International Thyroid Oncology Group Trial. *J. Clin. Oncol.* 35, 3315–3321. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.73.0226>.

Camacho, C.P., Latini, F.R.M., Oler, G., Hojaj, F.C., Maciel, R.M.B., Riggins, G.J., and Cerutti, J.M. (2009). Down-regulation of NR4A1 in follicular thyroid carcinomas is restored following lithium treatment. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 70, 475–483. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2008.03349.x>.

Capdevila, J., Trigo, J.M., Aller, J., Manzano, J.L., Adrián, S.G., Llopis, C.Z., Reig, Ò., Bohn, U., Cajal, T.R. y, Duran-Poveda, M., et al. (2017). Axitinib treatment in advanced RAI-resistant differentiated thyroid cancer (DTC)

and refractory medullary thyroid cancer (MTC). *Eur. J. Endocrinol.* 177, 309–317. <https://doi.org/10.1530/EJE-17-0243>.

Caplin, M.E., Pavel, M., Ćwikła, J.B., Phan, A.T., Raderer, M., Sedláčková, E., Cadiot, G., Wolin, E.M., Capdevila, J., Wall, L., et al. (2014). Lanreotide in Metastatic Enteropancreatic Neuroendocrine Tumors. *N. Engl. J. Med.* 371, 224–233. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1316158>.

Cappagli, V., Potes, C.S., Ferreira, L.B., Tavares, C., Eloy, C., Elisei, R., Sobrinho-Simões, M., Wookey, P.J., and Soares, P. (2017). Calcitonin receptor expression in medullary thyroid carcinoma. *PeerJ* 5, e3778. <https://doi.org/10.7717/peerj.3778>.

Carducci, M.A., Saad, F., Abrahamsson, P.-A., Dearnaley, D.P., Schulman, C.C., North, S.A., Sleep, D.J., Isaacson, J.D., Nelson, J.B., and Institutions, for the A.P.I.S.G. (2007). A phase 3 randomized controlled trial of the efficacy and safety of atrasentan in men with metastatic hormone-refractory prostate cancer. *Cancer* 110, 1959–1966. <https://doi.org/10.1002/cncr.22996>.

Carr, L.L., Mankoff, D.A., Goulart, B.H., Eaton, K.D., Capell, P.T., Kell, E.M., Bauman, J.E., and Martins, R.G. (2010). Phase II Study of Daily Sunitinib in FDG-PET-Positive, Iodine-Refractory Differentiated Thyroid Cancer and Metastatic Medullary Carcinoma of the Thyroid with Functional Imaging Correlation. *Clin. Cancer Res.* 16, 5260–5268. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-0994>.

Catalani, S., Palma, F., Battistelli, S., Nuvoli, B., Galati, R., and Benedetti, S. (2017). Reduced cell viability and apoptosis induction in human thyroid carcinoma and mesothelioma cells exposed to cidofovir. *Toxicol. In Vitro* 41, 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.02.008>.

Catalano, M.G., Pugliese, M., Gallo, M., Brignardello, E., Milla, P., Orlandi, F., Limone, P.P., Arvat, E., Boccuzzi, G., and Piovesan, A. (2016). Valproic Acid, a Histone Deacetylase Inhibitor, in Combination with Paclitaxel for Anaplastic Thyroid Cancer: Results of a Multicenter Randomized Controlled Phase II/III Trial. *Int. J. Endocrinol.* 2016, 2930414. <https://doi.org/10.1155/2016/2930414>.

Cha, Y., Erez, T., Reynolds, I.J., Kumar, D., Ross, J., Koytiger, G., Kusko, R., Zeskind, B., Risso, S., Kagan, E., et al. (2018). Drug repurposing from the perspective of pharmaceutical companies. *Br. J. Pharmacol.* 175, 168–180. <https://doi.org/10.1111/bph.13798>.

Chae, Y.K., Pan, A.P., Davis, A.A., Patel, S.P., Carneiro, B.A., Kurzrock, R., and Giles, F.J. (2017). Path toward Precision Oncology: Review of Targeted Therapy Studies and Tools to Aid in Defining “Actionability” of a Molecular Lesion and Patient Management Support. *Mol. Cancer Ther.* 16, 2645–2655. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-0597>.

Chambers, A.F., Groom, A.C., and MacDonald, I.C. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat. Rev. Cancer* 2, 563–572. <https://doi.org/10.1038/nrc865>.

Chan, T.A., Yarchoan, M., Jaffee, E., Swanton, C., Quezada, S.A., Stenzinger, A., and Peters, S. (2019). Development of tumor mutation burden as an immunotherapy biomarker: utility for the oncology clinic. *Ann. Oncol.* 30, 44–56. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy495>.

Chau, I., Cunningham, D., Russell, C., Norman, A.R., Kurzwinski, T., Harper, P., Harrison, P., Middleton, G., Daniels, F., Hickish, T., et al. (2006). Gastrazole (JB95008), a novel CCK2/gastrin receptor antagonist, in the treatment of advanced pancreatic cancer: results from two randomised controlled trials. *Br. J. Cancer* 94, 1107–1115. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603058>.

Chen, G., Nicula, D., Renko, K., and Derwahl, M. (2015). Synergistic anti-proliferative effect of metformin and sorafenib on growth of anaplastic thyroid cancer cells and their stem cells. *Oncol. Rep.* 33, 1994–2000. <https://doi.org/10.3892/or.2015.3805>.

Cheng, P.F., Dummer, R., and Levesque, M.P. (2015). Data mining The Cancer Genome Atlas in the era of precision cancer medicine. *Swiss Med. Wkly.* <https://doi.org/10.4414/smw.2015.14183>.

- Chifu, I., Heinze, B., Fuss, C.T., Lang, K., Kroiss, M., Kircher, S., Ronchi, C.L., Altieri, B., Schirbel, A., Fassnacht, M., et al. (2020). Impact of the Chemokine Receptors CXCR4 and CXCR7 on Clinical Outcome in Adrenocortical Carcinoma. *Front. Endocrinol.* *11*, 597878. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.597878>.
- Chimento, A., Sirianni, R., Casaburi, I., Zolea, F., Rizza, P., Avena, P., Malivindi, R., De Luca, A., Campana, C., Martire, E., et al. (2015). GPER agonist G-1 decreases adrenocortical carcinoma (ACC) cell growth in vitro and in vivo. *Oncotarget* *6*, 19190–19203. .
- Chitikova, Z., Pusztaszeri, M., Makhlof, A.-M., Berczy, M., Delucinge-Vivier, C., Triponez, F., Meyer, P., Philippe, J., and Dibner, C. (2015). Identification of new biomarkers for human papillary thyroid carcinoma employing NanoString analysis. *Oncotarget* *6*, 10978–10993. .
- Choi, C., Thi Thao Tran, N., Van Ngu, T., Park, S.W., Song, M.S., Kim, S.H., Bae, Y.-U., Ayudthaya, P.D.N., Munir, J., Kim, E., et al. (2018). Promotion of tumor progression and cancer stemness by MUC15 in thyroid cancer via the GPCR/ERK and integrin-FAK signaling pathways. *Oncogenesis* *7*. <https://doi.org/10.1038/s41389-018-0094-y>.
- Chow, M.T., and Luster, A.D. (2014). Chemokines in Cancer. *Cancer Immunol. Res.* *2*, 1125–1131. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0160>.
- Colao, A., Auriemma, R.S., Lombardi, G., and Pivonello, R. (2011). Resistance to Somatostatin Analogs in Acromegaly. *Endocr. Rev.* *32*, 247–271. <https://doi.org/10.1210/er.2010-0002>.
- Cole, S.W., and Sood, A.K. (2012). Molecular Pathways: Beta-Adrenergic Signaling in Cancer. *Clin. Cancer Res.* *18*, 1201–1206. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-0641>.
- Costa, M.H.S., Latronico, A.C., Martin, R.M., Barbosa, A.S., Almeida, M.Q., Lotfi, C.F.P., Valassi, H.P.L., Nishi, M.Y., Lucon, A.M., Siqueira, S.A., et al. (2009). Expression profiles of the glucose-dependent insulinotropic peptide receptor and LHCGR in sporadic adrenocortical tumors. *J. Endocrinol.* *200*, 167–175. <https://doi.org/10.1677/JOE-08-0395>.
- Cozzolino, R., Cali, G., Bifulco, M., and Laccetti, P. (2010). A metabolically stable analogue of anandamide, Met-F-AEA, inhibits human thyroid carcinoma cell lines by activation of apoptosis. *Invest. New Drugs* *28*, 115–123. <https://doi.org/10.1007/s10637-009-9221-0>.
- Cui, Y., Li, C., Jiang, Z., Zhang, S., Li, Q., Liu, X., Zhou, Y., Li, R., Wei, L., Li, L., et al. (2021). Single-cell transcriptome and genome analyses of pituitary neuroendocrine tumors. *Neuro-Oncol.* *23*, 1859–1871. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab102>.
- Davis, S.L., Cardin, D.B., Shahda, S., Lenz, H.-J., Dotan, E., O’Neil, B.H., Kapoun, A.M., Stagg, R.J., Berlin, J., Messersmith, W.A., et al. (2020). A phase 1b dose escalation study of Wnt pathway inhibitor vantictumab in combination with nab-paclitaxel and gemcitabine in patients with previously untreated metastatic pancreatic cancer. *Invest. New Drugs* *38*, 821–830. <https://doi.org/10.1007/s10637-019-00824-1>.
- De Clercq, E. (2019). Mozobil® (Plerixafor, AMD3100), 10 years after its approval by the US Food and Drug Administration. *Antivir. Chem. Chemother.* *27*, 2040206619829382. <https://doi.org/10.1177/2040206619829382>.
- De Francesco, E.M., Sotgia, F., Clarke, R.B., Lisanti, M.P., and Maggiolini, M. (2017). G Protein-Coupled Receptors at the Crossroad between Physiologic and Pathologic Angiogenesis: Old Paradigms and Emerging Concepts. *Int. J. Mol. Sci.* *18*. <https://doi.org/10.3390/ijms18122713>.
- Demetri, G.D., van Oosterom, A.T., Garrett, C.R., Blackstein, M.E., Shah, M.H., Verweij, J., McArthur, G., Judson, I.R., Heinrich, M.C., Morgan, J.A., et al. (2006). Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: a randomised controlled trial. *The Lancet* *368*, 1329–1338. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69446-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69446-4).

- Di Maro, G., Orlandella, F.M., Bencivenga, T.C., Salerno, P., Ugolini, C., Basolo, F., Maestro, R., and Salvatore, G. (2014). Identification of Targets of Twist1 Transcription Factor in Thyroid Cancer Cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *99*, E1617–E1626. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-3799>.
- Diamond, J.R., Becerra, C., Richards, D., Mita, A., Osborne, C., O’Shaughnessy, J., Zhang, C., Henner, R., Kapoun, A.M., Xu, L., et al. (2020). Phase Ib clinical trial of the anti-frizzled antibody vantictumab (OMP-18R5) plus paclitaxel in patients with locally advanced or metastatic HER2-negative breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* *184*, 53–62. <https://doi.org/10.1007/s10549-020-05817-w>.
- Dicitore, A., Cantone, M.C., Gaudenzi, G., Saronni, D., Carra, S., Borghi, M.O., Albertelli, M., Ferone, D., Hofland, L.J., Persani, L., et al. (2021). Efficacy of a Novel Second-Generation Somatostatin-Dopamine Chimera (TBR-065) in Human Medullary Thyroid Cancer: A Preclinical Study. *Neuroendocrinology* *111*, 937–950. <https://doi.org/10.1159/000512366>.
- DiPersio, J.F., Stadtmauer, E.A., Nademanee, A., Micallef, I.N.M., Stiff, P.J., Kaufman, J.L., Maziarz, R.T., Hosing, C., Früehauf, S., Horwitz, M., et al. (2009). Plerixafor and G-CSF versus placebo and G-CSF to mobilize hematopoietic stem cells for autologous stem cell transplantation in patients with multiple myeloma. *Blood* *113*, 5720–5726. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-08-174946>.
- Dobashi, Y., Sugimura, H., Sakamoto, A., Mernyei, M., Mori, M., Oyama, T., and Machinami, R. (1994). Stepwise participation of p53 gene mutation during dedifferentiation of human thyroid carcinomas. *Diagn. Mol. Pathol. Am. J. Surg. Pathol. Part B* *3*, 9–14. <https://doi.org/10.1097/00019606-199403010-00003>.
- Doebele, R.C., Drilon, A., Paz-Ares, L., Siena, S., Shaw, A.T., Farago, A.F., Blakely, C.M., Seto, T., Cho, B.C., Tosi, D., et al. (2020). Entrectinib in patients with advanced or metastatic NTRK fusion-positive solid tumours: integrated analysis of three phase 1–2 trials. *Lancet Oncol.* *21*, 271–282. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30691-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30691-6).
- Dorsam, R.T., and Gutkind, J.S. (2007). G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat. Rev. Cancer* *7*, 79–94. <https://doi.org/10.1038/nrc2069>.
- Downes, G.B., and Gautam, N. (1999). The G Protein Subunit Gene Families. *Genomics* *62*, 544–552. <https://doi.org/10.1006/geno.1999.5992>.
- Drilon, A., Laetsch, T.W., Kummar, S., DuBois, S.G., Lassen, U.N., Demetri, G.D., Nathanson, M., Doebele, R.C., Farago, A.F., Pappo, A.S., et al. (2018). Efficacy of Larotrectinib in TRK Fusion-Positive Cancers in Adults and Children. *N. Engl. J. Med.* *378*, 731–739. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1714448>.
- Duah, E., Teegala, L.R., Kondeti, V., Adapala, R.K., Keshamouni, V.G., Kanaoka, Y., Austen, K.F., Thodeti, C.K., and Paruchuri, S. (2019). Cysteinyl leukotriene 2 receptor promotes endothelial permeability, tumor angiogenesis, and metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *116*, 199–204. <https://doi.org/10.1073/pnas.1817325115>.
- Duggan, S.T., and Keating, G.M. (2011). Pegylated Liposomal Doxorubicin. *Drugs* *71*, 2531–2558. <https://doi.org/10.2165/11207510-000000000-00000>.
- Dunn, L.A., Sherman, E.J., Baxi, S.S., Tchekmedyan, V., Grewal, R.K., Larson, S.M., Pentlow, K.S., Haque, S., Tuttle, R.M., Sabra, M.M., et al. (2018). Vemurafenib Redifferentiation of BRAF Mutant, RAI-Refractory Thyroid Cancers. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *104*, 1417–1428. <https://doi.org/10.1210/jc.2018-01478>.
- Durante, C., Haddy, N., Baudin, E., Leboulleux, S., Hartl, D., Travagli, J.P., Caillou, B., Ricard, M., Lumbroso, J.D., De Vathaire, F., et al. (2006). Long-Term Outcome of 444 Patients with Distant Metastases from Papillary and Follicular Thyroid Carcinoma: Benefits and Limits of Radioiodine Therapy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *91*, 2892–2899. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-2838>.
- Durante, C., Montesano, T., Torlontano, M., Attard, M., Monzani, F., Tumino, S., Costante, G., Meringolo, D., Bruno, R., Trulli, F., et al. (2013). Papillary Thyroid Cancer: Time Course of Recurrences During Postsurgery Surveillance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *98*, 636–642. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-3401>.

- Eder, J., Sedrani, R., and Wiesmann, C. (2014). The discovery of first-in-class drugs: origins and evolution. *Nat. Rev. Drug Discov.* *13*, 577–587. <https://doi.org/10.1038/nrd4336>.
- Elisei, R., Schlumberger, M.J., Müller, S.P., Schöffski, P., Brose, M.S., Shah, M.H., Licitra, L., Jarzab, B., Medvedev, V., Kreissl, M.C., et al. (2013). Cabozantinib in Progressive Medullary Thyroid Cancer. *J. Clin. Oncol.* *31*, 3639–3646. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.48.4659>.
- Elston, M.S., Meyer-Rochow, G.Y., Conaglen, H.M., Clarkson, A., Clifton-Bligh, R.J., Conaglen, J.V., and Gill, A.J. (2015). Increased SSTR2A and SSTR3 expression in succinate dehydrogenase-deficient pheochromocytomas and paragangliomas. *Hum. Pathol.* *46*, 390–396. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2014.11.012>.
- Eng, C. (2002). Role of PTEN, a Lipid Phosphatase Upstream Effector of Protein Kinase B, in Epithelial Thyroid Carcinogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *968*, 213–221. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04337.x>.
- Espinal-Enríquez, J., Muñoz-Montero, S., Imaz-Rosshandler, I., Huerta-Verde, A., Mejía, C., and Hernández-Lemus, E. (2015). Genome-wide expression analysis suggests a crucial role of dysregulation of matrix metalloproteinases pathway in undifferentiated thyroid carcinoma. *BMC Genomics* *16*, 207. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1372-0>.
- Ezzat, S., Sarti, D.A., Cain, D.R., and Braunstein, G.D. (1994). Thyroid Incidentalomas: Prevalence by Palpation and Ultrasonography. *Arch. Intern. Med.* *154*, 1838–1840. <https://doi.org/10.1001/archinte.1994.00420160075010>.
- Falchook, G.S., Millward, M., Hong, D., Naing, A., Piha-Paul, S., Waguespack, S.G., Cabanillas, M.E., Sherman, S.I., Ma, B., Curtis, M., et al. (2015). BRAF Inhibitor Dabrafenib in Patients with Metastatic BRAF-Mutant Thyroid Cancer. *Thyroid* *25*, 71–77. <https://doi.org/10.1089/thy.2014.0123>.
- Falkenstetter, S., Leitner, J., Brunner, S.M., Rieder, T.N., Kofler, B., and Weis, S. (2020). Galanin System in Human Glioma and Pituitary Adenoma. *Front. Endocrinol.* *11*, 155. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00155>.
- Fassnacht, M., Terzolo, M., Allolio, B., Baudin, E., Haak, H., Berruti, A., Welin, S., Schade-Brittinger, C., Lacroix, A., Jarzab, B., et al. (2012). Combination Chemotherapy in Advanced Adrenocortical Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* *366*, 2189–2197. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1200966>.
- Fassnacht, M., Berruti, A., Baudin, E., Demeure, M.J., Gilbert, J., Haak, H., Kroiss, M., Quinn, D.I., Hesselstine, E., Ronchi, C.L., et al. (2015). Linsitinib (OSI-906) versus placebo for patients with locally advanced or metastatic adrenocortical carcinoma: a double-blind, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol.* *16*, 426–435. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)70081-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)70081-1).
- Fassnacht, M., Dekkers, O.M., Else, T., Baudin, E., Berruti, A., Krijger, R.R. de, Haak, H.R., Mihai, R., Assie, G., and Terzolo, M. (2018). European Society of Endocrinology Clinical Practice Guidelines on the management of adrenocortical carcinoma in adults, in collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors. *Eur. J. Endocrinol.* *179*, G1–G46. <https://doi.org/10.1530/EJE-18-0608>.
- Fassnacht, M., Assie, G., Baudin, E., Eisenhofer, G., de la Fouchardiere, C., Haak, H.R., de Krijger, R., Porpiglia, F., Terzolo, M., and Berruti, A. (2020). Adrenocortical carcinomas and malignant pheochromocytomas: ESMO–EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up††Approved by the ESMO Guidelines Committee: June 2020. This publication supersedes the previously published version—*Ann Oncol.* *2012;23(suppl_7):vii131-vii138. Ann. Oncol.* *31*, 1476–1490. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.08.2099>.
- Feng, F., Han, H., Wu, S., and Wang, H. (2021). Crosstalk Between Abnormal TSHR Signaling Activation and PTEN/PI3K in the Dedifferentiation of Thyroid Cancer Cells. *Front. Oncol.* *11*, 718578. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.718578>.
- Fernandez-Ranvier, G.G., Weng, J., Yeh, R.-F., Khanafshar, E., Suh, I., Barker, C., Duh, Q.Y., Clark, O.H., and Kebebew, E. (2008). Identification of Biomarkers of Adrenocortical Carcinoma Using Genomewide Gene Expression Profiling. *Arch. Surg.* *143*, 841–846. <https://doi.org/10.1001/archsurg.143.9.841>.

Ferone, D., Pivonello, C., Vitale, G., Zatelli, M.C., Colao, A., and Pivonello, R. (2014). Molecular basis of pharmacological therapy in Cushing's disease. *Endocrine* 46, 181–198. <https://doi.org/10.1007/s12020-013-0098-5>.

Fève, M., Saliou, J.-M., Zeniou, M., Lennon, S., Carapito, C., Dong, J., Van Dorselaer, A., Junier, M.-P., Chneiweiss, H., Cianféroni, S., et al. (2014). Comparative Expression Study of the Endo-G Protein Coupled Receptor (GPCR) Repertoire in Human Glioblastoma Cancer Stem-like Cells, U87-MG Cells and Non Malignant Cells of Neural Origin Unveils New Potential Therapeutic Targets. *PLoS ONE* 9, e91519. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091519>.

Filetti, S., Durante, C., Hartl, D., Leboulleux, S., Locati, L.D., Newbold, K., Papotti, M.G., and Berruti, A. (2019). Thyroid cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up++Approved by the ESMO Guidelines Committee: February 2008, last update September 2019. This publication supersedes the previously published version—*Ann Oncol* 2012; 23(Suppl 7): vii110–vii119. *Ann. Oncol.* 30, 1856–1883. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz400>.

Fishbein, L., Leshchiner, I., Walter, V., Danilova, L., Robertson, A.G., Johnson, A.R., Lichtenberg, T.M., Murray, B.A., Ghayee, H.K., Else, T., et al. (2017). Comprehensive Molecular Characterization of Pheochromocytoma and Paraganglioma. *Cancer Cell* 31, 181–193. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.01.001>.

Fizazi, K., Higano, C.S., Nelson, J.B., Gleave, M., Miller, K., Morris, T., Nathan, F.E., McIntosh, S., Pemberton, K., and Moul, J.W. (2013). Phase III, Randomized, Placebo-Controlled Study of Docetaxel in Combination With Zibotentan in Patients With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *J. Clin. Oncol.* 31, 1740–1747. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.46.4149>.

Frendo, J.L., Delage-Mourroux, R., Cohen, R., Pichaud, F., Pidoux, E., Guliana, J.M., and Jullienne, A. (1998). Calcitonin receptor mRNA is expressed in human medullary thyroid carcinoma. *Thyroid Off. J. Am. Thyroid Assoc.* 8, 141–147. <https://doi.org/10.1089/thy.1998.8.141>.

Fu, Y., Sun, S., Bi, J., and Kong, C. (2020). Construction of a risk signature for adrenocortical carcinoma using immune-related genes. *Transl. Androl. Urol.* 9, 1920–1930. <https://doi.org/10.21037/tau-20-485>.

Ganly, I., Makarov, V., Deraje, S., Dong, Y., Reznik, E., Seshan, V., Nanjangud, G., Eng, S., Bose, P., Kuo, F., et al. (2018). Integrated genomic analysis of Hürthle cell cancer reveals oncogenic drivers, recurrent mitochondrial mutations, and unique chromosomal landscapes. *Cancer Cell* 34, 256–270.e5. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.07.002>.

Gao, X., Yamazaki, Y., Tezuka, Y., Onodera, Y., Ogata, H., Omata, K., Morimoto, R., Nakamura, Y., Satoh, F., and Sasano, H. (2019). The crosstalk between aldosterone and calcium metabolism in primary aldosteronism: A possible calcium metabolism-associated aberrant “neoplastic” steroidogenesis in adrenals. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 193, 105434. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.105434>.

George, A.J., Hannan, R.D., and Thomas, W.G. (2013). Unravelling the molecular complexity of GPCR-mediated EGFR transactivation using functional genomics approaches. *FEBS J.* 280, 5258–5268. <https://doi.org/10.1111/febs.12509>.

Germano, A., Rapa, I., Volante, M., Lo Buono, N., Carturan, S., Berruti, A., Terzolo, M., and Papotti, M. (2014). Cytotoxic activity of gemcitabine, alone or in combination with mitotane, in adrenocortical carcinoma cell lines. *Mol. Cell. Endocrinol.* 382, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.08.023>.

Germano, A., Rapa, I., Duregon, E., Votta, A., Giorcelli, J., Buttigliero, C., Scagliotti, G.V., Volante, M., Terzolo, M., and Papotti, M. (2017). Tissue Expression and Pharmacological In Vitro Analyses of mTOR and SSTR Pathways in Adrenocortical Carcinoma. *Endocr. Pathol.* 28, 95–102. <https://doi.org/10.1007/s12022-017-9473-8>.

Ghobrial, I.M., Liu, C.-J., Redd, R.A., Perez, R.P., Baz, R., Zavidij, O., Sklavenitis-Pistofidis, R., Richardson, P.G., Anderson, K.C., Laubach, J., et al. (2020). A Phase Ib/II Trial of the First-in-Class Anti-CXCR4 Antibody Ulocuplumab in Combination with Lenalidomide or Bortezomib Plus Dexamethasone in Relapsed Multiple Myeloma. *Clin. Cancer Res.* 26, 344–353. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-0647>.

- Giannini, R., Moretti, S., Ugolini, C., Macerola, E., Menicali, E., Nucci, N., Morelli, S., Colella, R., Mandarano, M., Sidoni, A., et al. (2019). Immune Profiling of Thyroid Carcinomas Suggests the Existence of Two Major Phenotypes: An ATC-Like and a PDTC-Like. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *104*, 3557–3575. <https://doi.org/10.1210/jc.2018-01167>.
- Gier, B., Butler, P.C., Lai, C.K., Kirakossian, D., DeNicola, M.M., and Yeh, M.W. (2012). Glucagon Like Peptide-1 Receptor Expression in the Human Thyroid Gland. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *97*, 121–131. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-2407>.
- Gilbert-Sirieix, M., Makoukji, J., Kimura, S., Talbot, M., Caillou, B., Massaad, C., and Massaad-Massade, L. (2011). Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway Is a Direct Enhancer of Thyroid Transcription Factor-1 in Human Papillary Thyroid Carcinoma Cells. *PLoS ONE* *6*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022280>.
- Giuliani, L., Lenzini, L., Antonello, M., Aldighieri, E., Belloni, A.S., Fassina, A., Gomez-Sanchez, C., and Rossi, G.P. (2009). Expression and Functional Role of Urotensin-II and Its Receptor in the Adrenal Cortex and Medulla: Novel Insights for the Pathophysiology of Primary Aldosteronism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *94*, 684–690. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-1131>.
- González, H.E., Leiva, A., Tobar, H., Böhmwald, K., Tapia, G., Torres, J., Mosso, L.M., Bueno, S.M., Gonzalez, P., Kalergis, A.M., et al. (2009). Altered Chemokine Receptor Expression in Papillary Thyroid Cancer. *Thyroid* *19*, 957–965. <https://doi.org/10.1089/thy.2008.0432>.
- Grazzini, E., Breton, C., Derick, S., Andres, M., Raufaste, D., Rickwaert, F., Boccara, G., Colson, P., Guérineau, N.C., Serradeil-Le Gal, C., et al. (1999). Vasopressin Receptors in Human Adrenal Medulla and Pheochromocytoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *84*, 2195–2203. <https://doi.org/10.1210/jcem.84.6.5775>.
- Gruber, L.M., Hartman, R.P., Thompson, G.B., McKenzie, T.J., Lyden, M.L., Dy, B.M., Young, W.F., Jr, and Bancos, I. (2019). Pheochromocytoma Characteristics and Behavior Differ Depending on Method of Discovery. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *104*, 1386–1393. <https://doi.org/10.1210/jc.2018-01707>.
- Guillemot, J., Compagnon, P., Cartier, D., Thouennon, E., Bastard, C., Lihrmann, I., Pichon, P., Thuillez, C., Plouin, P.-F., Bertherat, J., et al. (2009). Metoclopramide stimulates catecholamine- and granin-derived peptide secretion from pheochromocytoma cells through activation of serotonin type 4 (5-HT₄) receptors. *Endocr. Relat. Cancer* *16*, 281–290. <https://doi.org/10.1677/ERC-08-0190>.
- Guo, J., Gu, Y., Ma, X., Zhang, L., Li, H., Yan, Z., Han, Y., Xie, L., and Guo, X. (2020). Identification of hub genes and pathways in adrenocortical carcinoma by integrated bioinformatic analysis. *J. Cell. Mol. Med.* *24*, 4428–4438. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15102>.
- Gupta-Abramson, V., Troxel, A.B., Nellore, A., Puttaswamy, K., Redlinger, M., Ransone, K., Mandel, S.J., Flaherty, K.T., Loevner, L.A., O'Dwyer, P.J., et al. (2008). Phase II Trial of Sorafenib in Advanced Thyroid Cancer. *J. Clin. Oncol.* *26*, 4714–4719. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.16.3279>.
- Guth, S., Theune, U., Aberle, J., Galach, A., and Bamberger, C.M. (2009). Very high prevalence of thyroid nodules detected by high frequency (13 MHz) ultrasound examination. *Eur. J. Clin. Invest.* *39*, 699–706. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2009.02162.x>.
- Gutzmer, R., and Solomon, J.A. (2019). Hedgehog Pathway Inhibition for the Treatment of Basal Cell Carcinoma. *Target. Oncol.* *14*, 253–267. <https://doi.org/10.1007/s11523-019-00648-2>.
- Gwynne, W.D., Hallett, R.M., Girgis-Gabardo, A., Bojovic, B., Dvorkin-Gheva, A., Aarts, C., Dias, K., Bane, A., and Hassell, J.A. (2017). Serotonergic system antagonists target breast tumor initiating cells and synergize with chemotherapy to shrink human breast tumor xenografts. *Oncotarget* *8*, 32101–32116. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16646>.
- Haag, G.M., Springfield, C., Grün, B., Apostolidis, L., Zschäbitz, S., Dietrich, M., Berger, A.-K., Weber, T.F., Zoernig, I., Schaaf, M., et al. (2022). Pembrolizumab and maraviroc in refractory mismatch repair proficient/microsatellite-stable metastatic colorectal cancer – The PICCASSO phase I trial. *Eur. J. Cancer* *167*, 112–122. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2022.03.017>.

Hadoux, J., Favier, J., Scoazec, J.-Y., Leboulleux, S., Al Ghuzlan, A., Caramella, C., Déandreis, D., Borget, I., Lorient, C., Chougnet, C., et al. (2014). SDHB mutations are associated with response to temozolomide in patients with metastatic pheochromocytoma or paraganglioma. *Int. J. Cancer* *135*, 2711–2720. <https://doi.org/10.1002/ijc.28913>.

Halama, N., Zoernig, I., Berthel, A., Kahlert, C., Klupp, F., Suarez-Carmona, M., Suetterlin, T., Brand, K., Krauss, J., Lasitschka, F., et al. (2016). Tumoral Immune Cell Exploitation in Colorectal Cancer Metastases Can Be Targeted Effectively by Anti-CCR5 Therapy in Cancer Patients. *Cancer Cell* *29*, 587–601. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.03.005>.

Hamann, J., Aust, G., Araç, D., Engel, F.B., Formstone, C., Fredriksson, R., Hall, R.A., Harty, B.L., Kirchhoff, C., Knapp, B., et al. (2015). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCIV. Adhesion G Protein-Coupled Receptors. *Pharmacol. Rev.* *67*, 338–367. <https://doi.org/10.1124/pr.114.009647>.

Hamidi, O., Young, W.F., Jr., Iñiguez-Ariza, N.M., Kittah, N.E., Gruber, L., Bancos, C., Tamhane, S., and Bancos, I. (2017). Malignant Pheochromocytoma and Paraganglioma: 272 Patients Over 55 Years. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *102*, 3296–3305. <https://doi.org/10.1210/jc.2017-00992>.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* *144*, 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.

Hanly, E.K., Bednarczyk, R.B., Tuli, N.Y., Moscatello, A.L., Halicka, H.D., Li, J., Geliebter, J., Darzynkiewicz, Z., and Tiwari, R.K. (2015). mTOR inhibitors sensitize thyroid cancer cells to cytotoxic effect of vemurafenib. *Oncotarget* *6*, 39702–39713. .

Hanna, G.J., Busaidy, N.L., Chau, N.G., Wirth, L.J., Barletta, J.A., Calles, A., Haddad, R.I., Kraft, S., Cabanillas, M.E., Rabinowits, G., et al. (2018). Genomic Correlates of Response to Everolimus in Aggressive Radioiodine-refractory Thyroid Cancer: A Phase II Study. *Clin. Cancer Res.* *24*, 1546–1553. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-2297>.

Harmar, A.J. (2001). Family-B G-protein-coupled receptors. *Genome Biol.* *2*, reviews3013.1-reviews3013.10. .

Harmar, A.J., Hills, R.A., Rosser, E.M., Jones, M., Buneman, O.P., Dunbar, D.R., Greenhill, S.D., Hale, V.A., Sharman, J.L., Bonner, T.I., et al. (2009). IUPHAR-DB: the IUPHAR database of G protein-coupled receptors and ion channels. *Nucleic Acids Res.* *37*, D680–D685. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn728>.

Haugen, B.R., and Sherman, S.I. (2013). Evolving Approaches to Patients with Advanced Differentiated Thyroid Cancer. *Endocr. Rev.* *34*, 439. <https://doi.org/10.1210/er.2012-1038>.

Haugen, B.R., Alexander, E.K., Bible, K.C., Doherty, G.M., Mandel, S.J., Nikiforov, Y.E., Pacini, F., Randolph, G.W., Sawka, A.M., Schlumberger, M., et al. (2016). 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid* *26*, 1–133. <https://doi.org/10.1089/thy.2015.0020>.

Hauser, A.S., Attwood, M.M., Rask-Andersen, M., Schiöth, H.B., and Gloriam, D.E. (2017). Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nat. Rev. Drug Discov.* *16*, 829–842. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.178>.

Hayes, A.R., Crawford, A., Al Riyami, K., Tang, C., Bomanji, J., Baldeweg, S.E., Wild, D., Morganstein, D., Harry, A., Grozinsky-Glasberg, S., et al. (2021). Metastatic Medullary Thyroid Cancer: The Role of 68Gallium-DOTA-Somatostatin Analogue PET/CT and Peptide Receptor Radionuclide Therapy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *106*, e4903–e4916. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgab588>.

Hayes, D.N., Lucas, A.S., Tanvetyanon, T., Krzyzanowska, M.K., Chung, C.H., Murphy, B.A., Gilbert, J., Mehra, R., Moore, D.T., Sheikh, A., et al. (2012). Phase II Efficacy and Pharmacogenomic Study of Selumetinib (AZD6244; ARRY-142886) in Iodine-131 Refractory Papillary Thyroid Carcinoma with or without Follicular Elements. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *18*, 2056–2065. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-0563>.

- He, Y., Cao, L., Wang, L., Liu, L., Huang, Y., and Gong, X. (2020). Metformin Inhibits Proliferation of Human Thyroid Cancer TPC-1 Cells by Decreasing LRP2 to Suppress the JNK Pathway. *OncoTargets Ther.* 13, 45–50. <https://doi.org/10.2147/OTT.S227915>.
- Heeneman, S., Haendeler, J., Saito, Y., Ishida, M., and Berk, B.C. (2000). Angiotensin II Induces Transactivation of Two Different Populations of the Platelet-derived Growth Factor β Receptor KEY ROLE FOR THE p66 ADAPTOR PROTEIN Shc. *J. Biol. Chem.* 275, 15926–15932. <https://doi.org/10.1074/jbc.M909616199>.
- Heinrich, T., Böttcher, H., Gericke, R., Bartoszyk, G.D., Anzali, S., Seyfried, C.A., Greiner, H.E., and van Amsterdam, C. (2004). Synthesis and Structure–Activity Relationship in a Class of Indolebutylpiperazines as Dual 5-HT_{1A} Receptor Agonists and Serotonin Reuptake Inhibitors. *J. Med. Chem.* 47, 4684–4692. <https://doi.org/10.1021/jm040793q>.
- Held, M.A., Langdon, C.G., Platt, J.T., Graham-Steed, T., Liu, Z., Chakraborty, A., Bacchiocchi, A., Koo, A., Bosenberg, M.W., and Stern, D.F. (2013). Genotype-Selective Combination Therapies for Melanoma Identified by High Throughput Drug Screening. *Cancer Discov.* 3, 52–67. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0408>.
- Hernandez, B.Y., Rahman, M., Loo, L.W.M., Chan, O.T.M., Horio, D., Morita, S., and Bryant-Greenwood, G. (2021). BRAFV600E, hypothyroidism, and human relaxin in thyroid carcinogenesis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 147, 183–194. <https://doi.org/10.1007/s00432-020-03401-9>.
- Herrlich, A., Daub, H., Knebel, A., Herrlich, P., Ullrich, A., Schultz, G., and Gudermann, T. (1998). Ligand-independent activation of platelet-derived growth factor receptor is a necessary intermediate in lysophosphatidic acid-stimulated mitogenic activity in L cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 8985–8990. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.15.8985>.
- Hiller, J.G., Cole, S.W., Crone, E.M., Byrne, D.J., Shackelford, D.M., Pang, J.-M.B., Henderson, M.A., Nightingale, S.S., Ho, K.M., Myles, P.S., et al. (2019). Preoperative β -Blockade with Propranolol Reduces Biomarkers of Metastasis in Breast Cancer: A Phase II Randomized Trial. *Clin. Cancer Res.* <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-2641>.
- Hirsch, D., Twito, O., Levy, S., Bachar, G., Robenshtok, E., Gross, D.J., Mazeh, H., Benbassat, C., and Grozinsky-Glasberg, S. (2018). Temporal Trends in the Presentation, Treatment, and Outcome of Medullary Thyroid Carcinoma: An Israeli Multicenter Study. *Thyroid* 28, 369–376. <https://doi.org/10.1089/thy.2017.0371>.
- Ho, A.L., Grewal, R.K., Leboeuf, R., Sherman, E.J., Pfister, D.G., Deandreis, D., Pentlow, K.S., Zanzonico, P.B., Haque, S., Gavane, S., et al. (2013). Selumetinib-Enhanced Radioiodine Uptake in Advanced Thyroid Cancer. *N. Engl. J. Med.* 368, 623–632. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1209288>.
- Hoang-Vu, C., Bull, K., Schwarz, I., Krause, G., Schmutzler, C., Aust, G., Köhrle, J., and Dralle, H. (1999). Regulation of CD97 protein in thyroid carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 1104–1109. <https://doi.org/10.1210/jcem.84.3.5557>.
- Hochhaus, A., Larson, R.A., Guilhot, F., Radich, J.P., Branford, S., Hughes, T.P., Baccarani, M., Deininger, M.W., Cervantes, F., Fujihara, S., et al. (2017). Long-Term Outcomes of Imatinib Treatment for Chronic Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 376, 917–927. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1609324>.
- Hofland, J., Kaltsas, G., and de Herder, W.W. (2020). Advances in the Diagnosis and Management of Well-Differentiated Neuroendocrine Neoplasms. *Endocr. Rev.* 41. <https://doi.org/10.1210/endo/bnz004>.
- Hohenhaus, D.M., Schaale, K., Le Cao, K.-A., Seow, V., Iyer, A., Fairlie, D.P., and Sweet, M.J. (2013). An mRNA atlas of G protein-coupled receptor expression during primary human monocyte/macrophage differentiation and lipopolysaccharide-mediated activation identifies targetable candidate regulators of inflammation. *Immunobiology* 218, 1345–1353. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2013.07.001>.
- Hombach-Klonisch, S., Bialek, J., Trojanowicz, B., Weber, E., Holzhausen, H.-J., Silvertown, J.D., Summerlee, A.J., Dralle, H., Hoang-Vu, C., and Klonisch, T. (2006). Relaxin Enhances the Oncogenic Potential of Human Thyroid Carcinoma Cells. *Am. J. Pathol.* 169, 617–632. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.050876>.

Hozhabri, H., Ghasemi Dehkohneh, R.S., Razavi, S.M., Razavi, S.M., Salarian, F., Rasouli, A., Azami, J., Ghasemi Shiran, M., Kardan, Z., Farrokhzad, N., et al. (2022). Comparative analysis of protein-protein interaction networks in metastatic breast cancer. *PLoS ONE* 17, e0260584. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260584>.

Hu, L.-F., Yang, X., Lan, H.-R., Fang, X.-L., Chen, X.-Y., and Jin, K.-T. (2021). Preclinical tumor organoid models in personalized cancer therapy: Not everyone fits the mold. *Exp. Cell Res.* 408, 112858. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2021.112858>.

Huang, C., Zhang, N., Xiong, H., Wang, N., Chen, Z., Ni, Z., Liu, X., Lin, B., Ge, B., Du, B., et al. (2022). Multi-Omics Analysis for Transcriptional Regulation of Immune-Related Targets Using Epigenetic Data: A New Research Direction. *Front. Immunol.* 12, 741634. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.741634>.

Huang, H., Abraham, J., Hung, E., Averbuch, S., Merino, M., Steinberg, S.M., Pacak, K., and Fojo, T. (2008). Treatment of Malignant Pheochromocytoma/Paraganglioma With Cyclophosphamide, Vincristine, and Dacarbazine. *Cancer* 113, 2020–2028. <https://doi.org/10.1002/cncr.23812>.

Huang, J., Chen, M.-N., Du, J., Liu, H., He, Y.-J., Li, G.-L., Li, S.-Y., Liu, W.-P., and Long, X.-Y. (2016). Differential Expression of Adenosine P1 Receptor ADORA1 and ADORA2A Associated with Glioma Development and Tumor-Associated Epilepsy. *Neurochem. Res.* 41, 1774–1783. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-1893-1>.

Hwang, M., Han, M.-H., Park, H.-H., Choi, H., Lee, K.-Y., Lee, Y.J., Kim, J.M., Cheong, J.H., Ryu, J.I., Min, K.-W., et al. (2019). LGR5 and Downstream Intracellular Signaling Proteins Play Critical Roles in the Cell Proliferation of Neuroblastoma, Meningioma and Pituitary Adenoma. *Exp. Neurobiol.* 28, 628–641. <https://doi.org/10.5607/en.2019.28.5.628>.

Ianevski, A., He, L., Aittokallio, T., and Tang, J. (2017). SynergyFinder: a web application for analyzing drug combination dose–response matrix data. *Bioinformatics* 33, 2413–2415. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx162>.

Ibrahimspasic, T., Ghossein, R., Carlson, D.L., Nixon, I., Palmer, F.L., Shaha, A.R., Patel, S.G., Tuttle, R.M., Shah, J.P., and Ganly, I. (2014). Outcomes in Patients With Poorly Differentiated Thyroid Carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99, 1245–1252. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-3842>.

Illouz, F., Chanson, P., Sonnet, E., Brue, T., Ferriere, A., Sanson, M.-L.R., Vantyghem, M.-C., Raverot, G., Munier, M., Rodien, P., et al. (2021). Somatostatin receptor ligands induce TSH deficiency in thyrotropin-secreting pituitary adenoma. *Eur. J. Endocrinol.* 184, 1–8. <https://doi.org/10.1530/EJE-20-0484>.

Im, J.H., Kang, K.W., Kim, S.Y., Kim, Y.G., An, Y.J., Park, S., Jeong, B.H., Choi, S.-Y., Lee, J.-S., and Kang, K.W. (2018). GPR119 agonist enhances gefitinib responsiveness through lactate-mediated inhibition of autophagy. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* CR 37. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0949-2>.

Insel, P.A., Sriram, K., Wiley, S.Z., Wilderman, A., Katakia, T., McCann, T., Yokouchi, H., Zhang, L., Corriden, R., Liu, D., et al. (2018). GPCRomics: GPCR Expression in Cancer Cells and Tumors Identifies New, Potential Biomarkers and Therapeutic Targets. *Front. Pharmacol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00431>.

Insel, P.A., Sriram, K., Gorr, M.W., Wiley, S.Z., Michkov, A., Salmerón, C., and Chinn, A.M. (2019). GPCRomics: An Approach to Discover GPCR Drug Targets. *Trends Pharmacol. Sci.* 40, 378–387. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2019.04.001>.

Iorio, F., Rittman, T., Ge, H., Menden, M., and Saez-Rodriguez, J. (2013). Transcriptional data: a new gateway to drug repositioning? *Drug Discov. Today* 18, 350–357. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.07.014>.

Isobe, K., Tatsuno, I., Yashiro, T., Nanmoku, T., Takekoshi, K., Kawakami, Y., and Nakai, T. (2003). Expression of mRNA for PACAP and its receptors in intra- and extra-adrenal human pheochromocytomas and their relationship to catecholamine synthesis. *Regul. Pept.* 110, 213–217. [https://doi.org/10.1016/S0167-0115\(02\)00209-4](https://doi.org/10.1016/S0167-0115(02)00209-4).

Isorna, I., Esteban, F., Solanellas, J., Coveñas, R., and Muñoz, M. (2020). The substance P and neurokinin-1 receptor system in human thyroid cancer: An immunohistochemical study. *Eur. J. Histochem. EJM* 64, 3117. <https://doi.org/10.4081/ejm.2020.3117>.

- Jenkinson, D.H., Barnard, E.A., Hoyer, D., Humphrey, P.P., Leff, P., and Shankley, N.P. (1995). International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. IX. Recommendations on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacol. Rev.* *47*, 255–266. .
- Jensen, K., Bikas, A., Patel, A., Kushchayeva, Y., Costello, J., McDaniel, D., Burman, K., and Vasko, V. (2017). Nelfinavir inhibits proliferation and induces DNA damage in thyroid cancer cells. *Endocr. Relat. Cancer* *24*, 147–156. <https://doi.org/10.1530/ERC-16-0568>.
- Jiang, Q., Feng, W., Xiong, C., and Lv, Y. (2020). Integrated bioinformatics analysis of the association between apolipoprotein E expression and patient prognosis in papillary thyroid carcinoma. *Oncol. Lett.* *19*, 2295–2305. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.11316>.
- Jonklaas, J., Sarlis, N.J., Litofsky, D., Ain, K.B., Bigos, S.T., Brierley, J.D., Cooper, D.S., Haugen, B.R., Ladenson, P.W., Magner, J., et al. (2006). Outcomes of patients with differentiated thyroid carcinoma following initial therapy. *Thyroid Off. J. Am. Thyroid Assoc.* *16*, 1229–1242. <https://doi.org/10.1089/thy.2006.16.1229>.
- Jung, K., Heishi, T., Incio, J., Huang, Y., Beech, E.Y., Pinter, M., Ho, W.W., Kawaguchi, K., Rahbari, N.N., Chung, E., et al. (2017). Targeting CXCR4-dependent immunosuppressive Ly6Clow monocytes improves antiangiogenic therapy in colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *114*, 10455–10460. <https://doi.org/10.1073/pnas.1710754114>.
- Kaiser, F., Morawski, M., Krohn, K., Rayes, N., Hsiao, C.-C., Quaas, M., and Aust, G. (2021). Adhesion GPCR GPR56 Expression Profiling in Human Tissues. *Cells* *10*, 3557. <https://doi.org/10.3390/cells10123557>.
- Kalhuri, V., and Törnquist, K. (2015). MMP2 and MMP9 participate in S1P-induced invasion of follicular ML-1 thyroid cancer cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* *404*, 113–122. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.01.037>.
- Kalhuri, V., Magnusson, M., Asghar, M.Y., Pulli, I., and Törnquist, K. (2016). FTY720 (Fingolimod) attenuates basal and sphingosine-1-phosphate-evoked thyroid cancer cell invasion. *Endocr. Relat. Cancer* *23*, 457–468. <https://doi.org/10.1530/ERC-16-0050>.
- Kan, Z., Jaiswal, B.S., Stinson, J., Janakiraman, V., Bhatt, D., Stern, H.M., Yue, P., Haverty, P.M., Bourgon, R., Zheng, J., et al. (2010). Diverse somatic mutation patterns and pathway alterations in human cancers. *Nature* *466*, 869–873. <https://doi.org/10.1038/nature09208>.
- Karmakar, S., and Lal, G. (2021). Role of serotonin receptor signaling in cancer cells and anti-tumor immunity. *Theranostics* *11*, 5296–5312. <https://doi.org/10.7150/thno.55986>.
- Karunamurthy, A., Panebianco, F., Hsiao, S.J., Vorhauer, J., Nikiforova, M.N., Chiosea, S., and Nikiforov, Y.E. (2016). Prevalence and phenotypic correlations of EIF1AX mutations in thyroid nodules. *Endocr. Relat. Cancer* *23*, 295–301. <https://doi.org/10.1530/ERC-16-0043>.
- Kaur, H., Carvalho, J., Looso, M., Singh, P., Chennupati, R., Preussner, J., Günther, S., Albarrán-Juárez, J., Tischner, D., Classen, S., et al. (2017). Single-cell profiling reveals heterogeneity and functional patterning of GPCR expression in the vascular system. *Nat. Commun.* *8*, 15700. <https://doi.org/10.1038/ncomms15700>.
- Kefford, R.F., Clingan, P.R., Brady, B., Ballmer, A., Morganti, A., and Hersey, P. (2010). A randomized, double-blind, placebo-controlled study of high-dose bosentan in patients with stage IV metastatic melanoma receiving first-line dacarbazine chemotherapy. *Mol. Cancer* *9*, 69. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-69>.
- Kepp, O., Galluzzi, L., Lipinski, M., Yuan, J., and Kroemer, G. (2011). Cell death assays for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* *10*, 221–237. <https://doi.org/10.1038/nrd3373>.
- Khorsand, M., Mostafavi-Pour, Z., Razban, V., Khajeh, S., and Zare, R. (2022). Combinatorial effects of telmisartan and docetaxel on cell viability and metastatic gene expression in human prostate and breast cancer cells. *Mol. Biol. Res. Commun.* *11*, 11–20. <https://doi.org/10.22099/mbr.2022.42638.1700>.

- Kim, Y.H., Choi, Y.W., Han, J.H., Lee, J., Soh, E.Y., Park, S.H., Kim, J.-H., and Park, T.J. (2014). TSH Signaling Overcomes B-RafV600E-Induced Senescence in Papillary Thyroid Carcinogenesis through Regulation of DUSP6. *Neoplasia* 16, 1107–1120. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2014.10.005>.
- Kitamura, Y., Shimizu, K., Nagahama, M., Sugino, K., Ozaki, O., Mimura, T., Ito, K., Ito, K., and Tanaka, S. (1999). Immediate Causes of Death in Thyroid Carcinoma: Clinicopathological Analysis of 161 Fatal Cases. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 4043–4049. <https://doi.org/10.1210/jcem.84.11.6115>.
- Kitawaki, Y., Morimoto, R., Satoh, F., and Sasano, H. (2019). SUN-335 The Chemokine Receptor 4 (CXCR4) Plays an Important Role in Adrenocortical Carcinoma Cell Proliferation. *J. Endocr. Soc.* 3, SUN-335. <https://doi.org/10.1210/js.2019-SUN-335>.
- Klingler, M., Hörmann, A.A., and Guggenberg, E.V. (2020). Cholecystokinin-2 receptor targeting with radiolabeled peptides: current status and future directions. *Curr. Med. Chem.* <https://doi.org/10.2174/0929867327666200625143035>.
- Kloos, R.T., Ringel, M.D., Knopp, M.V., Hall, N.C., King, M., Stevens, R., Liang, J., Wakely, P.E., Vasko, V.V., Saji, M., et al. (2009). Phase II Trial of Sorafenib in Metastatic Thyroid Cancer. *J. Clin. Oncol.* 27, 1675–1684. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.18.2717>.
- Knauf, J.A., Ma, X., Smith, E.P., Zhang, L., Mitsutake, N., Liao, X.-H., Refetoff, S., Nikiforov, Y.E., and Fagin, J.A. (2005). Targeted Expression of BRAFV600E in Thyroid Cells of Transgenic Mice Results in Papillary Thyroid Cancers that Undergo Dedifferentiation. *Cancer Res.* 65, 4238–4245. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0047>.
- Knott, E.L., and Leidenheimer, N.J. (2020). A Targeted Bioinformatics Assessment of Adrenocortical Carcinoma Reveals Prognostic Implications of GABA System Gene Expression. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 8485. <https://doi.org/10.3390/ijms21228485>.
- Kolakowski, L.F. (1994). GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels* 2, 1–7. .
- Kommaddi, R.P., and Shenoy, S.K. (2013). Chapter Seven - Arrestins and Protein Ubiquitination. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, L.M. Luttrell, ed. (Academic Press), pp. 175–204.
- Körner, M., Waser, B., and Reubi, J.C. (2004). High Expression of Neuropeptide Y Receptors in Tumors of the Human Adrenal Gland and Extra-Adrenal Paraganglia. *Clin. Cancer Res.* 10, 8426–8433. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0821>.
- Köse, M. (2017). GPCRs and EGFR – Cross-talk of membrane receptors in cancer. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 27, 3611–3620. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.07.002>.
- Koyrakh, L., Roman, M.I., Brinkmann, V., and Wickman, K. (2005). The Heart Rate Decrease Caused by Acute FTY720 Administration Is Mediated by the G Protein-Gated Potassium Channel IKACH. *Am. J. Transplant.* 5, 529–536. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2005.00754.x>.
- Krenning, E.P., Breeman, W.A.P., Kooij, P.P.M., Lameris, J.S., Bakker, W.H., Koper, J.W., Ausema, L., Reubi, J.C., and Lamberts, S.W.J. (1989). LOCALISATION OF ENDOCRINE-RELATED TUMOURS WITH RADIOIODINATED ANALOGUE OF SOMATOSTATIN. *The Lancet* 333, 242–244. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(89\)91258-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(89)91258-0).
- Kroll, T.G., Sarraf, P., Pecciarini, L., Chen, C.-J., Mueller, E., Spiegelman, B.M., and Fletcher, J.A. (2000). PAX8-PPAR γ 1 Fusion in Oncogene Human Thyroid Carcinoma. *Science* 289, 1357–1360. <https://doi.org/10.1126/science.289.5483.1357>.
- Krupnick, J.G., Goodman, O.B., Keen, J.H., and Benovic, J.L. (1997). Arrestin/Clathrin Interaction LOCALIZATION OF THE CLATHRIN BINDING DOMAIN OF NONVISUAL ARRESTINS TO THE CARBOXYL TERMINUS. *J. Biol. Chem.* 272, 15011–15016. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.23.15011>.

Kübler, E., and Albrecht, H. (2018). Large set data mining reveals overexpressed GPCRs in prostate and breast cancer: potential for active targeting with engineered anti-cancer nanomedicines. *Oncotarget* 9, 24882–24897. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25427>.

Kuczler, M.D., Zieren, R.C., Dong, L., de Reijke, T.M., Pienta, K.J., and Amend, S.R. (2022). Advancements in the identification of EV derived mRNA biomarkers for liquid biopsy of clear cell renal cell carcinomas. *Urology* 160, 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2021.11.002>.

Kuzumaki, N., Suzuki, A., Narita, M., Hosoya, T., Nagasawa, A., Imai, S., Yamamizu, K., Morita, H., Suzuki, T., Okada, Y., et al. (2012). Multiple Analyses of G-Protein Coupled Receptor (GPCR) Expression in the Development of Gefitinib-Resistance in Transforming Non-Small-Cell Lung Cancer. *PLoS ONE* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044368>.

Lacroix, A., Gu, F., Gallardo, W., Pivonello, R., Yu, Y., Witek, P., Boscaro, M., Salvatori, R., Yamada, M., Tauchmanova, L., et al. (2018). Efficacy and safety of once-monthly pasireotide in Cushing's disease: a 12 month clinical trial. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 6, 17–26. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(17\)30326-1](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(17)30326-1).

Laetitia, G., Sven, S., and Fabrice, J. (2020). Combinatorial Therapies in Thyroid Cancer: An Overview of Preclinical and Clinical Progresses. *Cells* 9, 830. <https://doi.org/10.3390/cells9040830>.

Lakiotaki, E., Giaginis, C., Tolia, M., Alexandrou, P., Delladetsima, I., Giannopoulou, I., Kyrgias, G., Patsouris, E., and Theocharis, S. (2015). Clinical Significance of Cannabinoid Receptors CB1 and CB2 Expression in Human Malignant and Benign Thyroid Lesions. *BioMed Res. Int.* 2015, 839403. <https://doi.org/10.1155/2015/839403>.

Lamb, J., Crawford, E.D., Peck, D., Modell, J.W., Blat, I.C., Wrobel, M.J., Lerner, J., Brunet, J.-P., Subramanian, A., Ross, K.N., et al. (2006). The Connectivity Map: Using Gene-Expression Signatures to Connect Small Molecules, Genes, and Disease. *Science* 313, 1929–1935. <https://doi.org/10.1126/science.1132939>.

Landa, I., Ganly, I., Chan, T.A., Mitsutake, N., Matsuse, M., Ibrahimasic, T., Ghossein, R.A., and Fagin, J.A. (2013). Frequent Somatic TERT Promoter Mutations in Thyroid Cancer: Higher Prevalence in Advanced Forms of the Disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98, E1562–E1566. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-2383>.

Landa, I., Ibrahimasic, T., Boucai, L., Sinha, R., Knauf, J.A., Shah, R.H., Dogan, S., Ricarte-Filho, J.C., Krishnamoorthy, G.P., Xu, B., et al. (2016). Genomic and transcriptomic hallmarks of poorly differentiated and anaplastic thyroid cancers. *J. Clin. Invest.* 126, 1052. <https://doi.org/10.1172/JCI85271>.

Landa, I., Pozdeyev, N., Korch, C., Marlow, L.A., Smallridge, R.C., Copland, J.A., Henderson, Y.C., Lai, S.Y., Clayman, G.L., Onoda, N., et al. (2019). Comprehensive Genetic Characterization of Human Thyroid Cancer Cell Lines: A Validated Panel for Preclinical Studies. *Clin. Cancer Res.* 25, 3141–3151. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-2953>.

Lange, A.M., and Lo, H.-W. (2018). Inhibiting TRK Proteins in Clinical Cancer Therapy. *Cancers* 10. <https://doi.org/10.3390/cancers10040105>.

Langedijk, J., Mantel-Teeuwisse, A.K., Slijkerman, D.S., and Schutjens, M.-H.D.B. (2015). Drug repositioning and repurposing: terminology and definitions in literature. *Drug Discov. Today* 20, 1027–1034. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.05.001>.

Lappano, R., and Maggiolini, M. (2011). G protein-coupled receptors: novel targets for drug discovery in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 47–60. <https://doi.org/10.1038/nrd3320>.

Lappano, R., and Maggiolini, M. (2017). Pharmacotherapeutic Targeting of G Protein-Coupled Receptors in Oncology: Examples of Approved Therapies and Emerging Concepts. *Drugs* 77, 951–965. <https://doi.org/10.1007/s40265-017-0738-9>.

Laughren, T.P., Gobburu, J., Temple, R.J., Unger, E.F., Bhattaram, A., Dinh, P.V., Fossom, L., Hung, H.M.J., Klimek, V., Lee, J.E., et al. (2011). Vilazodone: Clinical Basis for the US Food and Drug Administration's Approval of a New Antidepressant. *J. Clin. Psychiatry* 72, 22216. <https://doi.org/10.4088/JCP.11r06984>.

Leboulleux, S., Bastholt, L., Krause, T., Fouchardiere, C. de la, Tennvall, J., Awada, A., Gómez, J.M., Bonichon, F., Leenhardt, L., Soufflet, C., et al. (2012). Vandetanib in locally advanced or metastatic differentiated thyroid cancer: a randomised, double-blind, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 13, 897–905. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70335-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70335-2).

Leboulleux, S., Dupuy, C., Lacroix, L., Attard, M., Grimaldi, S., Corre, R., Ricard, M., Nasr, S., Berdelou, A., Hadoux, J., et al. (2019). Redifferentiation of a BRAFK601E-Mutated Poorly Differentiated Thyroid Cancer Patient with Dabrafenib and Trametinib Treatment. *Thyroid* 29, 735–742. <https://doi.org/10.1089/thy.2018.0457>.

Leboulleux, S., Bournaud, C., Chougnet, C.N., Zerdoud, S., Al Ghuzlan, A., Catargi, B., Do Cao, C., Kelly, A., Barge, M.-L., Lacroix, L., et al. (2022). Thyroidectomy without Radioiodine in Patients with Low-Risk Thyroid Cancer. *N. Engl. J. Med.* 386, 923–932. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2111953>.

Lecarpentier, Y., Schussler, O., Hébert, J.-L., and Vallée, A. (2019). Multiple Targets of the Canonical WNT/ β -Catenin Signaling in Cancers. *Front. Oncol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01248>.

Lee, J.-H., Miele, M.E., Hicks, D.J., Phillips, K.K., Trent, J.M., Weissman, B.E., and Welch, D.R. (1996). KiSS-1, a Novel Human Malignant Melanoma Metastasis-Suppressor Gene. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 88, 1731–1737. <https://doi.org/10.1093/jnci/88.23.1731>.

Lee, M., Waser, B., Reubi, J.-C., and Pellegata, N.S. (2012). Secretin Receptor Promotes the Proliferation of Endocrine Tumor Cells Via the PI3K/AKT Pathway. *Mol. Endocrinol.* 26, 1394–1405. <https://doi.org/10.1210/me.2012-1055>.

Lee, S.G., Lee, W.K., Lee, H.S., Moon, J., Lee, C.R., Kang, S.W., Jeong, J.J., Nam, K.-H., Chung, W.Y., Jo, Y.S., et al. (2016). Practical Performance of the 2015 American Thyroid Association Guidelines for Predicting Tumor Recurrence in Patients with Papillary Thyroid Cancer in South Korea. *Thyroid* 27, 174–181. <https://doi.org/10.1089/thy.2016.0252>.

Lee, S.-I., Celik, S., Logsdon, B.A., Lundberg, S.M., Martins, T.J., Oehler, V.G., Estey, E.H., Miller, C.P., Chien, S., Dai, J., et al. (2018). A machine learning approach to integrate big data for precision medicine in acute myeloid leukemia. *Nat. Commun.* 9. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02465-5>.

Leenhardt, L., Bernier, M.O., Boin-Pineau, M.H., Devolx, B.C., Marechaud, R., Niccoli-Sire, P., Nocaudie, M., Orgiazzi, J., Schlumberger, M., Wemeau, J.L., et al. (2004). Advances in diagnostic practices affect thyroid cancer incidence in France. *Eur. J. Endocrinol.* 150, 133–139. .

Lei, Q.-Y., Zhang, H., Zhao, B., Zha, Z.-Y., Bai, F., Pei, X.-H., Zhao, S., Xiong, Y., and Guan, K.-L. (2008). TAZ Promotes Cell Proliferation and Epithelial-Mesenchymal Transition and Is Inhibited by the Hippo Pathway. *Mol. Cell. Biol.* 28, 2426–2436. <https://doi.org/10.1128/MCB.01874-07>.

Lenders, J.W.M., Duh, Q.-Y., Eisenhofer, G., Gimenez-Roqueplo, A.-P., Grebe, S.K.G., Murad, M.H., Naruse, M., Pacak, K., and Young, W.F. (2014). Pheochromocytoma and Paraganglioma: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99, 1915–1942. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-1498>.

Leonart, L.P., Ferreira, V.L., Tonin, F.S., Fernandez-Llimos, F., and Pontarolo, R. (2018). Medical Treatments for Acromegaly: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. *Value Health* 21, 874–880. <https://doi.org/10.1016/j.jval.2017.12.014>.

Li, A.Y., McCusker, M.G., Russo, A., Scilla, K.A., Gittens, A., Arensmeyer, K., Mehra, R., Adamo, V., and Rolfo, C. (2019). RET fusions in solid tumors. *Cancer Treat. Rev.* 81, 101911. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2019.101911>.

Li, M., Brito, J.P., and Vaccarella, S. (2020). Long-Term Declines of Thyroid Cancer Mortality: An International Age–Period–Cohort Analysis. *Thyroid* <https://doi.org/10.1089/thy.2019.0684>.

Lim, S.M., Chang, H., Yoon, M.J., Hong, Y.K., Kim, H., Chung, W.Y., Park, C.S., Nam, K.H., Kang, S.W., Kim, M.K., et al. (2013). A multicenter, phase II trial of everolimus in locally advanced or metastatic thyroid cancer of all histologic subtypes. *Ann. Oncol.* 24, 3089–3094. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt379>.

- Lim, S.M., Chung, W.Y., Nam, K.-H., Kang, S.-W., Lim, J.Y., Kim, H.-G., Shin, S.H., Sun, J.-M., Kim, S.-G., Kim, J.-H., et al. (2015). An open label, multicenter, phase II study of dovitinib in advanced thyroid cancer. *Eur. J. Cancer* *51*, 1588–1595. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2015.05.020>.
- Limonta, P., Marelli, M.M., Mai, S., Motta, M., Martini, L., and Moretti, R.M. (2012). GnRH Receptors in Cancer: From Cell Biology to Novel Targeted Therapeutic Strategies. *Endocr. Rev.* *33*, 784–811. <https://doi.org/10.1210/er.2012-1014>.
- Lin, P., Guo, Y., Shi, L., Li, X., Yang, H., He, Y., Li, Q., Dang, Y., Wei, K., and Chen, G. (2019). Development of a prognostic index based on an immunogenomic landscape analysis of papillary thyroid cancer. *Aging* *11*, 480–500. <https://doi.org/10.18632/aging.101754>.
- Lin, X., Wang, Z.-Y., Xue, G., Qin, X.-J., Wu, J.-F., and Zhang, G. (2021). ADORA1 is a diagnostic-related biomarker and correlated with immune infiltrates in papillary thyroid carcinoma. *J. Cancer* *12*, 3997–4010. <https://doi.org/10.7150/jca.50743>.
- Lin, Y., Qin, S., Li, Z., Yang, H., Fu, W., Li, S., Chen, W., Gao, Z., Miao, W., Xu, H., et al. (2022). Apatinib vs Placebo in Patients With Locally Advanced or Metastatic, Radioactive Iodine-Refractory Differentiated Thyroid Cancer. *JAMA Oncol.* *8*, 242–250. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2021.6268>.
- Lin, Y.-S., Yang, H., Ding, Y., Cheng, Y.-Z., Shi, F., Tan, J., Deng, Z.-Y., Chen, Z.-D., Wang, R.-F., Ji, Q.-H., et al. (2020). Donafenib in Progressive Locally Advanced or Metastatic Radioactive Iodine-Refractory Differentiated Thyroid Cancer: Results of a Randomized, Multicenter Phase II Trial. *Thyroid* <https://doi.org/10.1089/thy.2020.0235>.
- Lindemann, M., Moldovan, R.-P., Hinz, S., Deuther-Conrad, W., Gündel, D., Dukic-Stefanovic, S., Toussaint, M., Teodoro, R., Juhl, C., Steinbach, J., et al. (2020). Development of a Radiofluorinated Adenosine A2B Receptor Antagonist as Potential Ligand for PET Imaging. *Int. J. Mol. Sci.* *21*. <https://doi.org/10.3390/ijms21093197>.
- Liotti, F., Pizzol, M.D., Allegretti, M., Prevete, N., and Melillo, R.M. (2017). Multiple anti-tumor effects of Reparixin on thyroid cancer. *Oncotarget* *8*, 35946–35961. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16412>.
- Liu, G., Wu, D., Wen, Y., and Cang, S. Immune-associated molecular occurrence and prognosis predictor of hepatocellular carcinoma: an integrated analysis of GEO datasets. *Bioengineered* *12*, 5253–5265. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1962147>.
- Liu, L., He, C., Zhou, Q., Wang, G., Lv, Z., and Liu, J. (2019a). Identification of key genes and pathways of thyroid cancer by integrated bioinformatics analysis. *J. Cell. Physiol.* *0*. <https://doi.org/10.1002/jcp.28932>.
- Liu, Z., Jiang, X., Gao, L., Liu, X., Li, J., Huang, X., and Zeng, T. (2019b). Synergistic Suppression of Glioblastoma Cell Growth by Combined Application of Temozolomide and Dopamine D2 Receptor Antagonists. *World Neurosurg.* *128*, e468–e477. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2019.04.180>.
- Loewe, S. (1953). The problem of synergism and antagonism of combined drugs. *Arzneimittelforschung.* *3*, 285–290. .
- Louiset, E., Isvi, K., Gasc, J.M., Duparc, C., Cauliez, B., Laquerrière, A., Kuhn, J.M., and Lefebvre, H. (2008). Ectopic expression of serotonin7 receptors in an adrenocortical carcinoma co-secreting renin and cortisol. *Endocr. Relat. Cancer* *15*, 1025–1034. <https://doi.org/10.1677/ERC-08-0085>.
- Lü, B., Xu, J., Chen, J., Yu, J., Xu, E., and Lai, M. (2008). TaqMan low density array is roughly right for gene expression quantification in colorectal cancer. *Clin. Chim. Acta* *389*, 146–151. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2007.12.009>.
- Lu, C., Zhao, L., Ying, H., Willingham, M.C., and Cheng, S. (2010). Growth Activation Alone Is Not Sufficient to Cause Metastatic Thyroid Cancer in a Mouse Model of Follicular Thyroid Carcinoma. *Endocrinology* *151*, 1929–1939. <https://doi.org/10.1210/en.2009-1017>.

- Luo, J., and Yu, F.-X. (2019). GPCR-Hippo Signaling in Cancer. *Cells* 8, 426. <https://doi.org/10.3390/cells8050426>.
- Lv, G., Wang, T., Zhu, H., Wang, H., Sun, W., and Zhao, L. (2020). Vortioxetine induces apoptosis and autophagy of gastric cancer AGS cells via the PI3K/AKT pathway. *FEBS Open Bio* 10, 2157–2165. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12944>.
- Ma, C., Xiong, J., Su, H., and Li, H. (2021). The underlying molecular mechanism and drugs for treatment in adrenal cortical carcinoma. *Int. J. Med. Sci.* 18, 3026–3038. <https://doi.org/10.7150/ijms.60261>.
- Macerola, E., Poma, A.M., and Basolo, F. (2020). NanoString in the screening of genetic abnormalities associated with thyroid cancer. *Semin. Cancer Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.10.004>.
- Maillard, M., Louveau, B., Vilquin, P., Goldwirt, L., Thomas, F., and Mourah, S. (2022). Pharmacogenomics in solid cancers and hematologic malignancies: Improving personalized drug prescription. *Therapies* 77, 171–183. <https://doi.org/10.1016/j.therap.2021.11.003>.
- Maliszewska, A., Leandro-Garcia, L.J., Castelblanco, E., Macià, A., Cubas, A. de, Gómez-López, G., Inglada-Pérez, L., Álvarez-Escolá, C., Vega, L.D. la, Letón, R., et al. (2013). Differential Gene Expression of Medullary Thyroid Carcinoma Reveals Specific Markers Associated with Genetic Conditions. *Am. J. Pathol.* 182, 350–362. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.10.025>.
- Malyutina, A., Majumder, M.M., Wang, W., Pessia, A., Heckman, C.A., and Tang, J. (2019). Drug combination sensitivity scoring facilitates the discovery of synergistic and efficacious drug combinations in cancer. *PLoS Comput. Biol.* 15. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006752>.
- Mamillapalli, R., VanHouten, J., Zawalich, W., and Wysolmerski, J. (2008). Switching of G-protein Usage by the Calcium-sensing Receptor Reverses Its Effect on Parathyroid Hormone-related Protein Secretion in Normal Versus Malignant Breast Cells. *J. Biol. Chem.* 283, 24435–24447. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801738200>.
- Martínez-Fuentes, A.J., Molina, M., Vázquez-Martínez, R., Gahete, M.D., Jiménez-Reina, L., Moreno-Fernández, J., Benito-López, P., Quintero, A., Riva, A. de la, Diéguez, C., et al. (2011). Expression of functional KISS1 and KISS1R system is altered in human pituitary adenomas: evidence for apoptotic action of kisspeptin-10. *Eur. J. Endocrinol.* 164, 355–362. <https://doi.org/10.1530/EJE-10-0905>.
- Mathiesen, J.S., Effraimidis, G., Rossing, M., Rasmussen, Å.K., Hojberg, L., Bastholt, L., Godballe, C., Oturai, P., and Feldt-Rasmussen, U. (2022). Multiple endocrine neoplasia type 2: A review. *Semin. Cancer Biol.* 79, 163–179. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.03.035>.
- Mazzaferri, E.L., and Jhiang, S.M. (1994). Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. *Am. J. Med.* 97, 418–428. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(94\)90321-2](https://doi.org/10.1016/0002-9343(94)90321-2).
- Mazzocchi, G., Malendowicz, L.K., Aragona, F., Rebuffat, P., Gottardo, L., and Nussdorfer, G.G. (2001). Human Pheochromocytomas Express Orexin Receptor Type 2 Gene and Display an in Vitro Secretory Response to Orexins A and B. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 4818–4821. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.10.7929>.
- Mazzuco, T.L., Chabre, O., Feige, J.J., and Thomas, M. (2007). Aberrant GPCR expression is a sufficient genetic event to trigger adrenocortical tumorigenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 265–266, 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2006.12.034>.
- McGriff, N.J., Csako, G., Gourgiotis, L., Guthrie, L.C., Pucino, F., and Sarlis, N.J. (2002). Effects of thyroid hormone suppression therapy on adverse clinical outcomes in thyroid cancer. *Ann. Med.* 34, 554–564. <https://doi.org/10.1080/078538902321117760>.
- Mear, Y., Blanchard, M.-P., Defilles, C., Brue, T., Figarella-Branger, D., Graillon, T., Manavela, M., Barlier, A., Enjalbert, A., and Thirion, S. (2014). Ghrelin Receptor (GHS-R1a) and Its Constitutive Activity in Somatotroph Adenomas: A New Co-targeting Therapy Using GHS-R1a Inverse Agonists and Somatostatin Analogs. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99, E2463–E2471. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-2753>.

Mehnert, J.M., Varga, A., Brose, M.S., Aggarwal, R.R., Lin, C.-C., Prawira, A., de Braud, F., Tamura, K., Doi, T., Piha-Paul, S.A., et al. (2019). Safety and antitumor activity of the anti-PD-1 antibody pembrolizumab in patients with advanced, PD-L1-positive papillary or follicular thyroid cancer. *BMC Cancer* 19. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5380-3>.

Melmed, S., Casanueva, F.F., Hoffman, A.R., Kleinberg, D.L., Montori, V.M., Schlechte, J.A., and Wass, J.A.H. (2011). Diagnosis and Treatment of Hyperprolactinemia: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96, 273–288. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-1692>.

Micov, A.M., Tomić, M.A., Todorović, M.B., Vuković, M.J., Pecikoza, U.B., Jasnic, N.I., Djordjevic, J.D., and Stepanović-Petrović, R.M. (2020). Vortioxetine reduces pain hypersensitivity and associated depression-like behavior in mice with oxaliplatin-induced neuropathy. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 103, 109975. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2020.109975>.

Miller, K., Moul, J.W., Gleave, M., Fizazi, K., Nelson, J.B., Morris, T., Nathan, F.E., McIntosh, S., Pemberton, K., and Higano, C.S. (2013). Phase III, randomized, placebo-controlled study of once-daily oral zibotentan (ZD4054) in patients with non-metastatic castration-resistant prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 16, 187–192. <https://doi.org/10.1038/pcan.2013.2>.

Möhle, R., and Drost, A.C. (2012). G protein-coupled receptor crosstalk and signaling in hematopoietic stem and progenitor cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1266, 63–67. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06559.x>.

Molitch, M.E. (2017). Diagnosis and Treatment of Pituitary Adenomas: A Review. *JAMA* 317, 516–524. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.19699>.

Mollica Poeta, V., Massara, M., Capucetti, A., and Bonecchi, R. (2019). Chemokines and Chemokine Receptors: New Targets for Cancer Immunotherapy. *Front. Immunol.* 10, 379. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00379>.

Molteni, A., Heffelfinger, S., Moulder, J.E., Uhal, B., and Castellani, W.J. Potential Deployment of Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitors and of Angiotensin II Type 1 and Type 2 Receptor Blockers in Cancer Chemotherapy. *Anticancer Agents Med. Chem.* 6, 451–460. .

Montero-Conde, C., Ruiz-Llorente, S., Dominguez, J.M., Knauf, J.A., Viale, A., Sherman, E.J., Ryder, M., Ghossein, R.A., Rosen, N., and Fagin, J.A. (2013). Relief of Feedback Inhibition of HER3 Transcription by RAF and MEK Inhibitors Attenuates Their Antitumor Effects in BRAF-Mutant Thyroid Carcinomas. *Cancer Discov.* 3, 520–533. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0531>.

Moody, T.W., Nuche-Berenguer, B., and Jensen, R.T. (2016). VIP/PACAP, and their receptors and cancer. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 23, 38–47. <https://doi.org/10.1097/MED.000000000000218>.

Morello, S., Petrella, A., Festa, M., Popolo, A., Monaco, M., Vuttariello, E., Chiappetta, G., Parente, L., and Pinto, A. (2008). CI-IB-MECA inhibits human thyroid cancer cell proliferation independently of A3 adenosine receptor activation. *Cancer Biol. Ther.* 7, 278–284. <https://doi.org/10.4161/cbt.7.2.5301>.

Morimoto, R., Satoh, F., Murakami, O., Totsune, K., Arai, Y., Suzuki, T., Sasano, H., Ito, S., and Takahashi, K. (2008). Immunolocalization of urotensin II and its receptor in human adrenal tumors and attached non-neoplastic adrenal tissues. *Peptides* 29, 873–880. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.06.025>.

Mustafa, T., Klonisch, T., Hombach-Klonisch, S., Kehlen, A., Schmutzler, C., Koehle, J., Gimm, O., Dralle, H., and Hoang-Vu, C. (2004). Expression of CD97 and CD55 in human medullary thyroid carcinomas. *Int. J. Oncol.* 24, 285–294. <https://doi.org/10.3892/ijo.24.2.285>.

Naoum, G.E., Morkos, M., Kim, B., and Arafat, W. (2018). Novel targeted therapies and immunotherapy for advanced thyroid cancers. *Mol. Cancer* 17, 51. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0786-0>.

Nelson, J.B., Love, W., Chin, J.L., Saad, F., Schulman, C.C., Sleep, D.J., Qian, J., Steinberg, J., and Carducci, M. (2008). Phase 3, Randomized Controlled Trial of Atrasentan in Patients with Nonmetastatic Hormone-Refractory Prostate Cancer. *Cancer* 113, 2478–2487. <https://doi.org/10.1002/cncr.23864>.

- Nelson, J.B., Fizazi, K., Miller, K., Higano, C., Moul, J.W., Akaza, H., Morris, T., McIntosh, S., Pemberton, K., and Gleave, M. (2012). Phase 3, randomized, placebo-controlled study of zibotentan (ZD4054) in patients with castration-resistant prostate cancer metastatic to bone. *Cancer* *118*, 5709–5718. <https://doi.org/10.1002/cncr.27674>.
- Nelson, M.R., Tipney, H., Painter, J.L., Shen, J., Nicoletti, P., Shen, Y., Floratos, A., Sham, P.C., Li, M.J., Wang, J., et al. (2015). The support of human genetic evidence for approved drug indications. *Nat. Genet.* *47*, 856–860. <https://doi.org/10.1038/ng.3314>.
- Neumann, H.P.H., Young, W.F., and Eng, C. (2019). Pheochromocytoma and Paraganglioma. *N. Engl. J. Med.* *381*, 552–565. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1806651>.
- Ni, S., Wei, Q., and Yang, L. (2020). ADORA1 Promotes Hepatocellular Carcinoma Progression via PI3K/AKT Pathway. *OncoTargets Ther.* *13*, 12409–12419. <https://doi.org/10.2147/OTT.S272621>.
- Nieman, L.K., Biller, B.M.K., Findling, J.W., Murad, M.H., Newell-Price, J., Savage, M.O., and Tabarin, A. (2015). Treatment of Cushing’s Syndrome: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *100*, 2807–2831. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-1818>.
- Nieto Gutierrez, A., and McDonald, P.H. (2018). GPCRs: Emerging anti-cancer drug targets. *Cell. Signal.* *41*, 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.09.005>.
- Nikiforova, M.N., Lynch, R.A., Biddinger, P.W., Alexander, E.K., Dorn, G.W., Tallini, G., Kroll, T.G., and Nikiforov, Y.E. (2003). RAS Point Mutations and PAX8-PPAR γ Rearrangement in Thyroid Tumors: Evidence for Distinct Molecular Pathways in Thyroid Follicular Carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *88*, 2318–2326. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-021907>.
- Nilubol, N., Merkel, R., Yang, L., Patel, D., Reynolds, J.C., Sadowski, S.M., Neychev, V., and Kebebew, E. (2017). A phase II trial of valproic acid in patients with advanced, radioiodine-resistant thyroid cancers of follicular cell origin. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* *86*, 128–133. <https://doi.org/10.1111/cen.13154>.
- Noda, H., Guo, J., Khatri, A., Dean, T., Reyes, M., Armanini, M., Brooks, D.J., Martins, J.S., Schipani, E., Boussein, M.L., et al. (2020). An Inverse Agonist Ligand of the PTH Receptor Partially Rescues Skeletal Defects in a Mouse Model of Jansen’s Metaphyseal Chondrodysplasia. *J. Bone Miner. Res.* *35*, 540–549. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3913>.
- North, W.G. (2000). Gene regulation of vasopressin and vasopressin receptors in cancer. *Exp. Physiol.* *85 Spec No*, 27S–40S. <https://doi.org/10.1111/j.1469-445x.2000.tb00005.x>.
- Nugent, A., and Proia, R.L. (2017). The role of G protein-coupled receptors in lymphoid malignancies. *Cell. Signal.* *39*, 95–107. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.08.002>.
- Nusse, R., and Clevers, H. (2017). Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell* *169*, 985–999. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.016>.
- Oakley, R.H., Laporte, S.A., Holt, J.A., Barak, L.S., and Caron, M.G. (2001). Molecular Determinants Underlying the Formation of Stable Intracellular G Protein-coupled Receptor- β -Arrestin Complexes after Receptor Endocytosis*. *J. Biol. Chem.* *276*, 19452–19460. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101450200>.
- O’Hayre, M., Vázquez-Prado, J., Kufareva, I., Stawiski, E.W., Handel, T.M., Seshagiri, S., and Gutkind, J.S. (2013). The Emerging Mutational Landscape of G-proteins and G-protein Coupled Receptors in Cancer. *Nat. Rev. Cancer* *13*, 412. <https://doi.org/10.1038/nrc3521>.
- Oikonomou, E., Charlton, A., Buchfelder, M., and Adams, E.F. (2007). Cholecystokinin (CCK) receptor and CCK gene expression in human pituitary adenomas and in vitro effects of CCK peptides on GH and gonadotrophin secretion. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes Off. J. Ger. Soc. Endocrinol. Ger. Diabetes Assoc.* *115*, 683–689. <https://doi.org/10.1055/s-2007-985362>.

Ordaz-Ramos, A., Rosales-Gallegos, V.H., Melendez-Zajgla, J., Maldonado, V., and Vazquez-Santillan, K. (2021). The Role of LGR4 (GPR48) in Normal and Cancer Processes. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 4690. <https://doi.org/10.3390/ijms22094690>.

Ota, K., Okuma, T., Lorenzo, A.D., Yokota, A., Hino, H., Kazama, H., Moriya, S., Takano, N., Hiramoto, M., and Miyazawa, K. (2019). Fingolimod sensitizes EGFR wild-type non-small cell lung cancer cells to lapatinib or sorafenib and induces cell cycle arrest. *Oncol. Rep.* 42, 231–242. <https://doi.org/10.3892/or.2019.7140>.

Ozkaya, H.M., Sayitoglu, M., Comunoglu, N., Sun, E., Keskin, F.E., Ozata, D., Hocaoglu, R.H., Khodzaev, K., Firtina, S., Tanriover, N., et al. (2021). G-protein Coupled Estrogen Receptor Expression in Growth Hormone Secreting and Non-Functioning Adenomas. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 129, 634–643. <https://doi.org/10.1055/a-1274-1330>.

Pach, D., Sowa-Staszczak, A., Jabrocka-Hybel, A., Stefańska, A., Tomaszuk, M., Mikołajczak, R., Janota, B., Trofimiuk-Müldner, M., Przybylik-Mazurek, E., and Hubalewska-Dydejczyk, A. (2013). Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Imaging with [Lys40(Ahx-HYNIC-99mTc/EDDA)NH2]-Exendin-4 for the Diagnosis of Recurrence or Dissemination of Medullary Thyroid Cancer: A Preliminary Report. *Int. J. Endocrinol.* 2013, 384508. <https://doi.org/10.1155/2013/384508>.

Pacini, F., Schlumberger, M., Dralle, H., Elisei, R., Smit, J.W.A., and Wiersinga, W. (2006). European consensus for the management of patients with differentiated thyroid carcinoma of the follicular epithelium. *Eur. J. Endocrinol.* 154, 787–803. <https://doi.org/10.1530/eje.1.02158>.

Pan, S., Liang, S., and Wang, X. (2021). ADORA1 promotes nasopharyngeal carcinoma cell progression through regulation of PI3K/AKT/GSK-3 β / β -catenin signaling. *Life Sci.* 278, 119581. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119581>.

Pan, W., Zhou, L., Ge, M., Zhang, B., Yang, X., Xiong, X., Fu, G., Zhang, J., Nie, X., Li, H., et al. (2016). Whole exome sequencing identifies lncRNA GAS8-AS1 and LPAR4 as novel papillary thyroid carcinoma driver alternations. *Hum. Mol. Genet.* 25, 1875–1884. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw056>.

Panzer-Grümayer, R., Köhrer, S., and Haas, O.A. (2017). The enigmatic role(s) of P2RY8-CRLF2. *Oncotarget* 8, 96466–96467. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22098>.

Parisi, D., Adasme, M.F., Sveshnikova, A., Moreau, Y., and Schroeder, M. (2019). Drug repositioning or target repositioning: a structural perspective of drug-target-indication relationship for available repurposed drugs. *BioRxiv* 715094. <https://doi.org/10.1101/715094>.

Pauli, C., Hopkins, B.D., Prandi, D., Shaw, R., Fedrizzi, T., Sboner, A., Sailer, V., Augello, M., Puca, L., Rosati, R., et al. (2017). Personalized In Vitro and In Vivo Cancer Models to Guide Precision Medicine. *Cancer Discov.* 7, 462–477. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-1154>.

Pawlikowski, M. (2006). Immunohistochemical detection of angiotensin receptors AT1 and AT2 in normal rat pituitary gland, estrogen-induced rat pituitary tumor and human pituitary adenomas. *Folia Histochem. Cytobiol.* 44, 173–177. .

Pawlikowski, M., Winczyk, K., and Sledź, B. (2008). Immunohistochemical detection of angiotensin receptors AT1 and AT2 in adrenal tumors. *Folia Histochem. Cytobiol.* 46, 51–55. <https://doi.org/10.2478/v10042-008-0006-7>.

Pawlikowski, M., Pisarek, H., Kubiak, R., Jaranowska, M., and Stępień, H. (2012). Immunohistochemical detection of FSH receptors in pituitary adenomas and adrenal tumors. *Folia Histochem. Cytobiol.* 50, 325–330. <https://doi.org/10.5603/FHC.2012.0044>.

Pawlikowski, M., Jaranowska, M., Pisarek, H., Kubiak, R., Fuss-Chmielewska, J., and Winczyk, K. (2015). Ectopic expression of follicle-stimulating hormone receptors in thyroid tumors. *Arch. Med. Sci. AMS* 11, 1314–1317. <https://doi.org/10.5114/aoms.2015.56357>.

- Pestova, T.V., Kolupaeva, V.G., Lomakin, I.B., Pilipenko, E.V., Shatsky, I.N., Agol, V.I., and Hellen, C.U.T. (2001). Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 7029–7036. <https://doi.org/10.1073/pnas.111145798>.
- Peters, M.A.M., Meijer, C., Fehrmann, R.S.N., Walenkamp, A.M.E., Kema, I.P., de Vries, E.G.E., Hollema, H., and Oosting, S.F. (2020). Serotonin and Dopamine Receptor Expression in Solid Tumours Including Rare Cancers. *Pathol. Oncol. Res.* *26*, 1539–1547. <https://doi.org/10.1007/s12253-019-00734-w>.
- Peterson, Y.K., and Luttrell, L.M. (2017). The Diverse Roles of Arrestin Scaffolds in G Protein–Coupled Receptor Signaling. *Pharmacol. Rev.* *69*, 256–297. <https://doi.org/10.1124/pr.116.013367>.
- Peverelli, E., Treppiedi, D., Mangili, F., Catalano, R., Spada, A., and Mantovani, G. (2021). Drug resistance in pituitary tumours: from cell membrane to intracellular signalling. *Nat. Rev. Endocrinol.* *17*, 560–571. <https://doi.org/10.1038/s41574-021-00514-0>.
- Plantinga, T.S., Heinhuis, B., Gerrits, D., Netea, M.G., Joosten, L.A.B., Hermus, A.R.M.M., Oyen, W.J.G., Scheppe, R.E., Haugen, B.R., Boerman, O.C., et al. (2014). mTOR Inhibition Promotes TTF1-Dependent Redifferentiation and Restores Iodine Uptake in Thyroid Carcinoma Cell Lines. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *99*, E1368–E1375. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-1171>.
- Poma, A.M., Giannini, R., Piaggi, P., Ugolini, C., Materazzi, G., Miccoli, P., Vitti, P., and Basolo, F. (2017). A six-gene panel to label follicular adenoma, low- and high-risk follicular thyroid carcinoma. *Endocr. Connect.* *7*, 124–132. <https://doi.org/10.1530/EC-17-0261>.
- Pozdeyev, N., Gay, L.M., Sokol, E., Hartmaier, R., Deaver, K.E., Davis, S., French, J.D., Borre, P.V., LaBarbera, D.V., Tan, A.-C., et al. (2018). Genetic analysis of 779 advanced differentiated and anaplastic thyroid cancers. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *24*, 3059–3068. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-0373>.
- Puppini, C., D’Aurizio, F., D’Elia, A.V., Cesaratto, L., Tell, G., Russo, D., Filetti, S., Ferretti, E., Tosi, E., Mattei, T., et al. (2005). Effects of Histone Acetylation on Sodium Iodide Symporter Promoter and Expression of Thyroid-Specific Transcription Factors. *Endocrinology* *146*, 3967–3974. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0128>.
- Pusapati, G.V., Kong, J.H., Patel, B.B., Gouti, M., Sagner, A., Sircar, R., Luchetti, G., Ingham, P.W., Briscoe, J., and Rohatgi, R. (2018). G-protein coupled receptors control the sensitivity of cells to the morphogen Sonic Hedgehog. *Sci. Signal.* *11*. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aao5749>.
- Pushpakom, S., Iorio, F., Eyers, P.A., Escott, K.J., Hopper, S., Wells, A., Doig, A., Guilliams, T., Latimer, J., McNamee, C., et al. (2019). Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nat. Rev. Drug Discov.* *18*, 41–58. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.168>.
- Pusztaszeri, M., Rossi, E.D., Auger, M., Baloch, Z., Bishop, J., Bongiovanni, M., Chandra, A., Cochand-Priollet, B., Fadda, G., Hirokawa, M., et al. (2016). The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology: Proposed Modifications and Updates for the Second Edition from an International Panel. *Acta Cytol.* *60*, 399–405. <https://doi.org/10.1159/000451020>.
- Pylayeva-Gupta, Y., Grabocka, E., and Bar-Sagi, D. (2011). RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat. Rev. Cancer* *11*, 761–774. <https://doi.org/10.1038/nrc3106>.
- Qin, X., Yue, Z., Sun, B., Yang, W., Xie, J., Ni, E., Feng, Y., Mahmood, R., Zhang, Y., and Yue, L. (2013). Sphingosine and FTY720 are potent inhibitors of the transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) channels. *Br. J. Pharmacol.* *168*, 1294–1312. <https://doi.org/10.1111/bph.12012>.
- Quinn, D.I., Tangen, C.M., Hussain, M., Lara, P.N., Goldkorn, A., Moinpour, C.M., Garzotto, M.G., Mack, P.C., Carducci, M.A., Monk, J.P., et al. (2013). Docetaxel and atrasentan versus docetaxel and placebo for men with advanced castration-resistant prostate cancer (SWOG S0421): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* *14*, 893–900. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70294-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70294-8).

- Rauch Bernhard H., Millette Esther, Kenagy Richard D., Daum Guenter, and Clowes Alexander W. (2004). Thrombin- and Factor Xa-Induced DNA Synthesis Is Mediated by Transactivation of Fibroblast Growth Factor Receptor-1 in Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Circ. Res.* 94, 340–345. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000111805.09592.D8>.
- Ravaud, A., Fouchardière, C. de la, Caron, P., Doussau, A., Cao, C.D., Asselineau, J., Rodien, P., Pouessel, D., Nicolli-Sire, P., Klein, M., et al. (2017). A multicenter phase II study of sunitinib in patients with locally advanced or metastatic differentiated, anaplastic or medullary thyroid carcinomas: mature data from the THYSU study. *Eur. J. Cancer* 76, 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.01.029>.
- Raverot, G., Dantony, E., Beauvy, J., Vasiljevic, A., Mikolasek, S., Borson-Chazot, F., Jouanneau, E., Roy, P., and Trouillas, J. (2017). Risk of Recurrence in Pituitary Neuroendocrine Tumors: A Prospective Study Using a Five-Tiered Classification. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 102, 3368–3374. <https://doi.org/10.1210/jc.2017-00773>.
- Raverot, G., Burman, P., McCormack, A., Heaney, A., Petersenn, S., Popovic, V., Trouillas, J., and Dekkers, O.M. (2018). European Society of Endocrinology Clinical Practice Guidelines for the management of aggressive pituitary tumours and carcinomas. *Eur. J. Endocrinol.* 178, G1–G24. <https://doi.org/10.1530/EJE-17-0796>.
- Raverot, G., Ilie, M.D., Lasolle, H., Amodru, V., Trouillas, J., Castinetti, F., and Brue, T. (2021). Aggressive pituitary tumours and pituitary carcinomas. *Nat. Rev. Endocrinol.* 17, 671–684. <https://doi.org/10.1038/s41574-021-00550-w>.
- Reck, M., Rodríguez-Abreu, D., Robinson, A.G., Hui, R., Csósz, T., Fülöp, A., Gottfried, M., Peled, N., Tafreshi, A., Cuffe, S., et al. (2016). Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* 375, 1823–1833. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1606774>.
- Reubi, J.C. (1995). Neuropeptide Receptors in Health and Disease: The Molecular Basis for In Vivo Imaging. *J. Nucl. Med.* 36, 1825–1835. .
- Reubi, J.C. (2000). In Vitro Evaluation of VIP/PACAP Receptors in Healthy and Diseased Human Tissues: Clinical Implications. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 921, 1–25. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06946.x>.
- Reubi, J.C., Waser, B., Khosla, S., Kvolz, L., Goellner, J.R., Krenning, E., and Lamberts, S. (1992). In vitro and in vivo detection of somatostatin receptors in pheochromocytomas and paragangliomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 74, 1082–1089. <https://doi.org/10.1210/jcem.74.5.1349024>.
- Riley, A., Green, V., Cheah, R., McKenzie, G., Karsai, L., England, J., and Greenman, J. (2019). A novel microfluidic device capable of maintaining functional thyroid carcinoma specimens ex vivo provides a new drug screening platform. *BMC Cancer* 19, 259. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5465-z>.
- Ringel, M.D., Hardy, E., Bernet, V.J., Burch, H.B., Schuppert, F., Burman, K.D., and Saji, M. (2002). Metastin Receptor Is Overexpressed in Papillary Thyroid Cancer and Activates MAP Kinase in Thyroid Cancer Cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 2399–2402. <https://doi.org/10.1210/jcem.87.5.8626>.
- Rinke, A., Müller, H.-H., Schade-Brittinger, C., Klose, K.-J., Barth, P., Wied, M., Mayer, C., Aminossadati, B., Pape, U.-F., Bläker, M., et al. (2009). Placebo-Controlled, Double-Blind, Prospective, Randomized Study on the Effect of Octreotide LAR in the Control of Tumor Growth in Patients With Metastatic Neuroendocrine Midgut Tumors: A Report From the PROMID Study Group. *J. Clin. Oncol.* <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.22.8510>.
- Rizk-Rabin, M., Assie, G., Rene-Corail, F., Perlemonne, K., Hamzaoui, H., Tissier, F., Lieberherr, M., Bertagna, X., Bertherat, J., and Bouizar, Z. (2008). Differential Expression of Parathyroid Hormone-Related Protein in Adrenocortical Tumors: Autocrine/Paracrine Effects on the Growth and Signaling Pathways in H295R Cells. *Cancer Epidemiol. Prev. Biomark.* 17, 2275–2285. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-07-2924>.
- Robert, C., Schachter, J., Long, G.V., Arance, A., Grob, J.J., Mortier, L., Daud, A., Carlino, M.S., McNeil, C., Lotem, M., et al. (2015). Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 372, 2521–2532. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1503093>.

- Rollins, B.J. (2006). Inflammatory chemokines in cancer growth and progression. *Eur. J. Cancer* 42, 760–767. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2006.01.002>.
- Rønnekleiv, O.K., Fang, Y., Zhang, C., Nestor, C.C., Mao, P., and Kelly, M.J. (2014). Research Resource: Gene Profiling of G Protein–Coupled Receptors in the Arcuate Nucleus of the Female. *Mol. Endocrinol.* 28, 1362–1380. <https://doi.org/10.1210/me.2014-1103>.
- Rosanò, L., and Bagnato, A. (2016). Endothelin therapeutics in cancer: Where are we? *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 310, R469–R475. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00532.2015>.
- Rosanò, L., Castro, V.D., Spinella, F., Tortora, G., Nicotra, M.R., Natali, P.G., and Bagnato, A. (2007). Combined Targeting of Endothelin A Receptor and Epidermal Growth Factor Receptor in Ovarian Cancer Shows Enhanced Antitumor Activity. *Cancer Res.* 67, 6351–6359. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0883>.
- Rosenbaum, D.M., Rasmussen, S.G.F., and Kobilka, B.K. (2009). The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* 459, 356–363. <https://doi.org/10.1038/nature08144>.
- Rottenburger, C., Nicolas, G.P., McDougall, L., Kaul, F., Cachovan, M., Vija, A.H., Schibli, R., Geistlich, S., Schumann, A., Rau, T., et al. (2020). Cholecystokinin 2 Receptor Agonist ¹⁷⁷Lu-PP-F11N for Radionuclide Therapy of Medullary Thyroid Carcinoma: Results of the Lumed Phase 0a Study. *J. Nucl. Med.* 61, 520–526. <https://doi.org/10.2967/jnumed.119.233031>.
- Rovati, G.E., Capra, V., and Neubig, R.R. (2007). The Highly Conserved DRY Motif of Class A G Protein-Coupled Receptors: Beyond the Ground State. *Mol. Pharmacol.* 71, 959–964. <https://doi.org/10.1124/mol.106.029470>.
- Rowe, C.W., Paul, J.W., Gedye, C., Tolosa, J.M., Bendinelli, C., McGrath, S., and Smith, R. (2017). Targeting the TSH receptor in thyroid cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 24, R191–R202. <https://doi.org/10.1530/ERC-17-0010>.
- Roy, J., Putt, K.S., Coppola, D., Leon, M.E., Khalil, F.K., Centeno, B.A., Clark, N., Stark, V.E., Morse, D.L., and Low, P.S. (2016). Assessment of cholecystokinin 2 receptor (CCK2R) in neoplastic tissue. *Oncotarget* 7, 14605–14615. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7522>.
- Saint-Martin, C., Dramé, M., Dabakuyo, S., Kanagaratnam, L., Arveux, P., and Schwartz, C. (2017). Overdiagnosis of thyroid cancer in the Marne and Ardennes Departments of France from 1975 to 2014. *Ann. Endocrinol.* 78, 27–32. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2016.07.005>.
- Sancho, M., Vieira, J.M., Casalou, C., Mesquita, M., Pereira, T., Cavaco, B.M., Dias, S., and Leite, V. (2006). Expression and function of the chemokine receptor CCR7 in thyroid carcinomas. *J. Endocrinol.* 191, 229–238. <https://doi.org/10.1677/joe.1.06688>.
- Satapathy, S., Mittal, B.R., and Bhansali, A. (2019). 'Peptide receptor radionuclide therapy in the management of advanced pheochromocytoma and paraganglioma: A systematic review and meta-analysis.' *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 91, 718–727. <https://doi.org/10.1111/cen.14106>.
- Schiöth, H.B., and Fredriksson, R. (2005). The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *Gen. Comp. Endocrinol.* 142, 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2004.12.018>.
- Schlumberger, M. (2011). Prise en charge des cancers réfractaires de la thyroïde. *Ann. Endocrinol.* 72, 149–157. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2011.03.020>.
- Schlumberger, M., Catargi, B., Borget, I., Deandreis, D., Zerdoud, S., Bridji, B., Bardet, S., Leenhardt, L., Bastie, D., Schwartz, C., et al. (2012). Strategies of Radioiodine Ablation in Patients with Low-Risk Thyroid Cancer. *N. Engl. J. Med.* 366, 1663–1673. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1108586>.
- Schlumberger, M., Tahara, M., Wirth, L.J., Robinson, B., Brose, M.S., Elisei, R., Habra, M.A., Newbold, K., Shah, M.H., Hoff, A.O., et al. (2015). Lenvatinib versus Placebo in Radioiodine-Refractory Thyroid Cancer. *N. Engl. J. Med.* 372, 621–630. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1406470>.

Schmidt, A., Iglesias, L., Klain, M., Pitoia, F., Schlumberger, M.J., Schmidt, A., Iglesias, L., Klain, M., Pitoia, F., and Schlumberger, M.J. (2017). Radioactive iodine-refractory differentiated thyroid cancer: an uncommon but challenging situation. *Arch. Endocrinol. Metab.* 61, 81–89. <https://doi.org/10.1590/2359-399700000245>.

Schneider, T.C., Abdulrahman, R.M., Corssmit, E.P., Morreau, H., Smit, J.W.A., and Kapiteijn, E. (2012). Long-term analysis of the efficacy and tolerability of sorafenib in advanced radio-iodine refractory differentiated thyroid carcinoma: final results of a phase II trial. *Eur. J. Endocrinol.* 167, 643–650. <https://doi.org/10.1530/EJE-12-0405>.

Schneider, T.C., de Wit, D., Links, T.P., van Erp, N.P., van der Hoeven, J.J.M., Gelderblom, H., Roozen, I.C.F.M., Bos, M., Corver, W.E., van Wezel, T., et al. (2017). Everolimus in Patients With Advanced Follicular-Derived Thyroid Cancer: Results of a Phase II Clinical Trial. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 102, 698–707. <https://doi.org/10.1210/jc.2016-2525>.

Schulte, G. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXX. The Class Frizzled Receptors. *Pharmacol. Rev.* 62, 632–667. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002931>.

Schulte, K.-M., Beyer, A., Köhrer, K., Oberhäuser, S., and Röher, H.-D. (2001). Lysophosphatidic acid, a novel lipid growth factor for human thyroid cells: Over-expression of the high-affinity receptor *edg4* in differentiated thyroid cancer. *Int. J. Cancer* 92, 249–256. [https://doi.org/10.1002/1097-0215\(200102\)9999:9999<::AID-IJC1166>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/1097-0215(200102)9999:9999<::AID-IJC1166>3.0.CO;2-D).

Schulten, H.-J., Al-Mansouri, Z., Baghallab, I., Bagatian, N., Subhi, O., Karim, S., Al-Aradati, H., Al-Mutawa, A., Johary, A., Meccawy, A.A., et al. (2015). Comparison of microarray expression profiles between follicular variant of papillary thyroid carcinomas and follicular adenomas of the thyroid. *BMC Genomics* 16, S7. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-16-S1-S7>.

Schulz, S., Röcken, C., and Schulz, S. (2006). Immunohistochemical detection of bombesin receptor subtypes GRP-R and BRS-3 in human tumors using novel antipeptide antibodies. *Virchows Arch.* 449, 421–427. <https://doi.org/10.1007/s00428-006-0265-7>.

Schwaederle, M., Zhao, M., Lee, J.J., Eggermont, A.M., Schilsky, R.L., Mendelsohn, J., Lazar, V., and Kurzrock, R. (2015). Impact of Precision Medicine in Diverse Cancers: A Meta-Analysis of Phase II Clinical Trials. *J. Clin. Oncol.* 33, 3817–3825. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.61.5997>.

Severi, S., Bongiovanni, A., Ferrara, M., Nicolini, S., Di Mauro, F., Sansovini, M., Lolli, I., Tardelli, E., Cittanti, C., Di Iorio, V., et al. (2021). Peptide receptor radionuclide therapy in patients with metastatic progressive pheochromocytoma and paraganglioma: long-term toxicity, efficacy and prognostic biomarker data of phase II clinical trials. *ESMO Open* 6, 100171. <https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2021.100171>.

Seye, C.I., Yu, N., González, F.A., Erb, L., and Weisman, G.A. (2004). The P2Y2 Nucleotide Receptor Mediates Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression through Interaction with VEGF Receptor-2 (KDR/Flk-1). *J. Biol. Chem.* 279, 35679–35686. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401799200>.

Sharp, A.M., Lertphinyowong, S., Yee, S.S., Paredes, D., Gelfond, J., Johnson-Pais, T.L., Leach, R.J., Liss, M., Risinger, A.L., Sullivan, A.C., et al. (2019). Vortioxetine reverses medial prefrontal cortex-mediated cognitive deficits in male rats induced by castration as a model of androgen deprivation therapy for prostate cancer. *Psychopharmacology (Berl.)* 236, 3183–3195. <https://doi.org/10.1007/s00213-019-05274-4>.

Shen, J., Li, L., Yang, T., Cheng, N., and Sun, G. (2019). Drug Sensitivity Screening and Targeted Pathway Analysis Reveal a Multi-Driver Proliferative Mechanism and Suggest a Strategy of Combination Targeted Therapy for Colorectal Cancer Cells. *Molecules* 24, 623. <https://doi.org/10.3390/molecules24030623>.

Shen, Y., Dong, S., Liu, J., Zhang, L., Zhang, J., Zhou, H., and Dong, W. (2020). Identification of Potential Biomarkers for Thyroid Cancer Using Bioinformatics Strategy: A Study Based on GEO Datasets. *BioMed Res. Int.* 2020, 9710421. <https://doi.org/10.1155/2020/9710421>.

Sherman, S.I. (2010). Cytotoxic Chemotherapy for Differentiated Thyroid Carcinoma. *Clin. Oncol.* 22, 464–468. <https://doi.org/10.1016/j.clon.2010.03.014>.

- Sherman, E.J., Dunn, L., Ho, A.L., Baxi, S., Ghossein, R.A., Fury, M.G., Haque, S., Sima, C., Cullen, G., Fagin, J., et al. (2017). Phase II Study Evaluating the Combination of Sorafenib and Temsirolimus in the Treatment of Radioactive Iodine-Refractory Thyroid Cancer. *Cancer* 123, 4114–4121. <https://doi.org/10.1002/cncr.30861>.
- Sherman, E.J., Ho, A.L., Fagin, J.A., Haque, S., Robinson, C., Ghossein, R.A., Chen, H.X., and Pfister, D.G. (2018). Combination of dabrafenib (DAB) and lapatinib (LAP) for the treatment of BRAF-mutant thyroid cancer. *J. Clin. Oncol.* 36, 6087–6087. https://doi.org/10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.6087.
- Sherman, S.I., Wirth, L.J., Droz, J.-P., Hofmann, M., Bastholt, L., Martins, R.G., Licitra, L., Eschenberg, M.J., Sun, Y.-N., Juan, T., et al. (2009). Motesanib Diphosphate in Progressive Differentiated Thyroid Cancer.
- Shi, Y., Zou, M., Baitei, E.Y., Alzahrani, A.S., Parhar, R.S., Al-Makhalafi, Z., and Al-Mohanna, F.A. (2008). Cannabinoid 2 receptor induction by IL-12 and its potential as a therapeutic target for the treatment of anaplastic thyroid carcinoma. *Cancer Gene Ther.* 15, 101–107. <https://doi.org/10.1038/sj.cgt.7701101>.
- Shi, Z., Kong, X., Li, C., Liu, H., Aliagan, A.I., Liu, L., Shi, Y., Shi, X., Ma, B., Jin, R., et al. (2021). Bioinformatic analysis of differentially expressed genes as prognostic markers in pheochromocytoma and paraganglioma tumors. *Genes Genet. Syst.* 96, 55–69. <https://doi.org/10.1266/ggs.20-00057>.
- Shoemaker, R.H. (2006). The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nat. Rev. Cancer* 6, 813–823. <https://doi.org/10.1038/nrc1951>.
- Slamon, D.J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., et al. (2001). Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against HER2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med.* 344, 783–792. <https://doi.org/10.1056/NEJM200103153441101>.
- Sleire, L., Førde, H.E., Netland, I.A., Leiss, L., Skeie, B.S., and Enger, P.Ø. (2017). Drug repurposing in cancer. *Pharmacol. Res.* 124, 74–91. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.07.013>.
- Smrcka, A.V., and Fisher, I. (2019). G-protein $\beta\gamma$ subunits as multi-functional scaffolds and transducers in G-protein-coupled receptor signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* 76, 4447–4459. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03275-2>.
- Snijder, B., Vladimer, G.I., Krall, N., Miura, K., Schmolke, A.-S., Kornauth, C., Lopez de la Fuente, O., Choi, H.-S., van der Kouwe, E., Gültekin, S., et al. (2017). Image-based ex-vivo drug screening for patients with aggressive haematological malignancies: interim results from a single-arm, open-label, pilot study. *Lancet Haematol.* 4, e595–e606. [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(17\)30208-9](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(17)30208-9).
- Sobel, K., Monnier, L., Menyhart, K., Bolinger, M., Studer, R., Nayler, O., and Gatfield, J. (2015). FTY720 Phosphate Activates Sphingosine-1-Phosphate Receptor 2 and Selectively Couples to G $\alpha_{12/13}$ /Rho/ROCK to Induce Myofibroblast Contraction. *Mol. Pharmacol.* 87, 916–927. <https://doi.org/10.1124/mol.114.097261>.
- Sobolesky, P.M., and Moussa, O. (2013). Chapter Fifteen - The Role of β -Arrestins in Cancer. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, L.M. Luttrell, ed. (Academic Press), pp. 395–411.
- Soh, E.Y., Duh, Q.-Y., Sobhi, S.A., Young, D.M., Epstein, H.D., Wong, M.G., Garcia, Y.K., Min, Y.D., Grossman, R.F., Siperstein, A.E., et al. (1997). Vascular Endothelial Growth Factor Expression Is Higher in Differentiated Thyroid Cancer than in Normal or Benign Thyroid1. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 3741–3747. <https://doi.org/10.1210/jcem.82.11.4340>.
- Song, Y., Zhou, M., Cao, Y., Qi, J., Geng, J., and Liu, X. (2017). Expression of GLP-1 receptor and CD26 in human thyroid C-cells: The association of thyroid C-cell tumorigenesis with incretin-based medicine. *Oncol. Lett.* 13, 2684–2690. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.5752>.
- Sponziello, M., Verrienti, A., Rosignolo, F., De Rose, R.F., Pecce, V., Maggisano, V., Durante, C., Bulotta, S., Damante, G., Giacomelli, L., et al. (2015). PDE5 expression in human thyroid tumors and effects of PDE5 inhibitors on growth and migration of cancer cells. *Endocrine* 50, 434–441. <https://doi.org/10.1007/s12020-015-0586-x>.

- Sriram, K., and Insel, P.A. (2018). G Protein-Coupled Receptors as Targets for Approved Drugs: How Many Targets and How Many Drugs? *Mol. Pharmacol.* *93*, 251–258. <https://doi.org/10.1124/mol.117.111062>.
- Sriram, K., Moyung, K., Corriden, R., Carter, H., and Insel, P.A. (2019a). GPCRs show widespread differential mRNA expression and frequent mutation and copy number variation in solid tumors. *PLOS Biol.* *17*, e3000434. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000434>.
- Sriram, K., Wiley, S.Z., Moyung, K., Gorr, M.W., Salmerón, C., Marucut, J., French, R.P., Lowy, A.M., and Insel, P.A. (2019b). Detection and Quantification of GPCR mRNA: An Assessment and Implications of Data from High-Content Methods. *ACS Omega* *4*, 17048–17059. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b02811>.
- Stein, L., Rothschild, J., Luce, J., Cowell, J.K., Thomas, G., Bogdanova, T.I., Tronko, M.D., and Hawthorn, L. (2009). Copy Number and Gene Expression Alterations in Radiation-Induced Papillary Thyroid Carcinoma from Chernobyl Pediatric Patients. *Thyroid* *20*, 475–487. <https://doi.org/10.1089/thy.2009.0008>.
- Stelcer, E., Milecka, P., Komarowska, H., Jopek, K., Tyczewska, M., Szyszka, M., Lesniczak, M., Suchorska, W., Bekova, K., Szczepaniak, B., et al. (2020). Adropin Stimulates Proliferation and Inhibits Adrenocortical Steroidogenesis in the Human Adrenal Carcinoma (HAC15) Cell Line. *Front. Endocrinol.* *11*, 561370. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.561370>.
- Stigliano, A., Cerquetti, L., Lardo, P., Petrangeli, E., and Toscano, V. (2017). New insights and future perspectives in the therapeutic strategy of adrenocortical carcinoma (Review). *Oncol. Rep.* *37*, 1301–1311. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5427>.
- St-Jean, M., Ghorayeb, N.E., Bourdeau, I., and Lacroix, A. (2018). Aberrant G-protein coupled hormone receptor in adrenal diseases. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* *32*, 165–187. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2018.01.003>.
- Strosberg, J., El-Haddad, G., Wolin, E., Hendifar, A., Yao, J., Chasen, B., Mittra, E., Kunz, P.L., Kulke, M.H., Jacene, H., et al. (2017). Phase 3 Trial of 177Lu-Dotatate for Midgut Neuroendocrine Tumors. *N. Engl. J. Med.* *376*, 125–135. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1607427>.
- Subbiah, V., Kreitman, R.J., Wainberg, Z.A., Cho, J.Y., Schellens, J.H.M., Soria, J.-C., Wen, P.Y., Zielinski, C., Urbanowitz, G., Mookerjee, B., et al. (2017). Efficacy of dabrafenib (D) and trametinib (T) in patients (pts) with BRAF V600E-mutated anaplastic thyroid cancer (ATC). *J. Clin. Oncol.* *35*, 6023–6023. https://doi.org/10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.6023.
- Subbiah, V., Hu, M.I., Wirth, L.J., Schuler, M., Mansfield, A.S., Curigliano, G., Brose, M.S., Zhu, V.W., Leboulleux, S., Bowles, D.W., et al. (2021a). Pralsetinib for patients with advanced or metastatic RET-altered thyroid cancer (ARROW): a multi-cohort, open-label, registrational, phase 1/2 study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* *9*, 491–501. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(21\)00120-0](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(21)00120-0).
- Subbiah, V., Shen, T., Terzyan, S.S., Liu, X., Hu, X., Patel, K.P., Hu, M., Cabanillas, M., Behrang, A., Meric-Bernstam, F., et al. (2021b). Structural basis of acquired resistance to selpercatinib and pralsetinib mediated by non-gatekeeper RET mutations. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* *32*, 261–268. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.10.599>.
- Subramanian, C., McCallister, R., Kuszynski, D., and Cohen, M.S. (2021). Re-Evaluation of Combinational Efficacy and Synergy of the Italian Protocol In Vitro: Are We Truly Optimizing Benefit or Permitting Unwanted Toxicity? *Biomedicines* *9*, 1190. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9091190>.
- Suh, I., Shibru, D., Eisenhofer, G., Pacak, K., Duh, Q.-Y., Clark, O.H., and Kebebew, E. (2009). Candidate Genes Associated With Malignant Pheochromocytomas by Genome-Wide Expression Profiling. *Ann. Surg.* *250*, 983–990. <https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e3181b248bb>.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., and Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* *71*, 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.

Suteau, V., Seegers, V., Munier, M., Ben Boubaker, R., Reyes, C., Gentien, D., Wery, M., Croué, A., Illouz, F., Hamy, A., et al. (2021). G Protein-Coupled Receptors in radioiodine-refractory thyroid cancer in the Era of Precision Medicine. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* <https://doi.org/10.1210/clinem/dgab343>.

Suteau, V., Munier, M., Ben Boubaker, R., Wery, M., Henrion, D., Rodien, P., and Briet, C. (2022). Identification of Dysregulated Expression of G Protein Coupled Receptors in Endocrine Tumors by Bioinformatics Analysis: Potential Drug Targets? *Cells* *11*, 703. <https://doi.org/10.3390/cells11040703>.

Suzuki, N., Hajicek, N., and Kozasa, T. (2009). Regulation and Physiological Functions of G12/13-Mediated Signaling Pathways. *Neurosignals* *17*, 55–70. <https://doi.org/10.1159/000186690>.

Szwajda, A., Gautam, P., Karhinen, L., Jha, S.K., Saarela, J., Shakyawar, S., Turunen, L., Yadav, B., Tang, J., Wennerberg, K., et al. (2015). Systematic Mapping of Kinase Addiction Combinations in Breast Cancer Cells by Integrating Drug Sensitivity and Selectivity Profiles. *Chem. Biol.* *22*, 1144–1155. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.06.021>.

Tabatabai, E., Khazaei, M., Asgharzadeh, F., Nazari, S.E., Shakour, N., Fuji, H., Ziaemehr, A., Mostafapour, A., Parizadeh, M.R., Nouri, M., et al. (2021). Inhibition of angiotensin II type 1 receptor by candesartan reduces tumor growth and ameliorates fibrosis in colorectal cancer. *EXCLI J.* *20*, 863–878. <https://doi.org/10.17179/excli2021-3421>.

Taïeb, D., Jha, A., Treglia, G., and Pacak, K. (2019). Molecular imaging and radionuclide therapy of pheochromocytoma and paraganglioma in the era of genomic characterization of disease subgroups. *Endocr. Relat. Cancer* *26*, R627–R652. <https://doi.org/10.1530/ERC-19-0165>.

Takahashi, K., Shoji, I., Shibasaki, A., Kato, I., Hiraishi, K., Yamamoto, H., Kaneko, K., Murakami, O., Morimoto, R., Satoh, F., et al. (2010). Presence of Kisspeptin-like Immunoreactivity in Human Adrenal Glands and Adrenal Tumors. *J. Mol. Neurosci.* *41*, 138–144. <https://doi.org/10.1007/s12031-009-9306-4>.

Takahashi, T., Abe, N., Kanoh, H., Banno, Y., and Seishima, M. (2018). Synergistic effects of vemurafenib and fingolimod (FTY720) in vemurafenib-resistant melanoma cell lines. *Mol. Med. Rep.* *18*, 5151–5158. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9537>.

Tampourlou, M., Ntali, G., Ahmed, S., Arlt, W., Ayuk, J., Byrne, J.V., Chavda, S., Cudlip, S., Gittoes, N., Grossman, A., et al. (2017). Outcome of Nonfunctioning Pituitary Adenomas That Regrow After Primary Treatment: A Study From Two Large UK Centers. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *102*, 1889–1897. <https://doi.org/10.1210/jc.2016-4061>.

Tan, D.S.W., Lassen, U.N., Albert, C.M., Kummar, S., van Tilburg, C., Dubois, S.G., Georger, B., Mascarenhas, L., Federman, N., Basu-Mallick, A., et al. (2018). 690 - Larotrectinib efficacy and safety in TRK fusion cancer: An expanded clinical dataset showing consistency in an age and tumor agnostic approach. *Ann. Oncol.* *29*, ix23. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy430>.

Tang, C., Yang, L., Wang, N., Li, L., Xu, M., Chen, G.G., and Liu, Z.-M. (2014). High expression of GPER1, EGFR and CXCR1 is associated with lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* *7*, 3213–3223. .

Tang, J., Kong, D., Cui, Q., Wang, K., Zhang, D., Yuan, Q., Liao, X., Gong, Y., and Wu, G. (2018). Bioinformatic analysis and identification of potential prognostic microRNAs and mRNAs in thyroid cancer. *PeerJ* *6*. <https://doi.org/10.7717/peerj.4674>.

Tanimoto, T., Jin, Z.-G., and Berk, B.C. (2002). Transactivation of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Receptor Flk-1/KDR Is Involved in Sphingosine 1-Phosphate-stimulated Phosphorylation of Akt and Endothelial Nitric-oxide Synthase (eNOS). *J. Biol. Chem.* *277*, 42997–43001. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204764200>.

Tecimer, T., Dlott, J., Chuntharapai, A., Martin, A.W., and Peiper, S.C. (2000). Expression of the Chemokine Receptor CXCR2 in Normal and Neoplastic Neuroendocrine Cells. *Arch. Pathol. Lab. Med.* *124*, 520–525. <https://doi.org/10.5858/2000-124-0520-EOTCRC>.

- Thakur, S., Tobey, A., and Klubo-Gwiezdzinska, J. (2019). The Role of Lithium in Management of Endocrine Tumors—A Comprehensive Review. *Front. Oncol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01092>.
- Thanasupawat, T., Glogowska, A., Nivedita-Krishnan, S., Wilson, B., Klonisch, T., and Hombach-Klonisch, S. (2019). Emerging roles for the relaxin/RXFP1 system in cancer therapy. *Mol. Cell. Endocrinol.* 487, 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.02.001>.
- Thouënnon, E., Elkahlon, A.G., Guillemot, J., Gimenez-Roqueplo, A.-P., Bertherat, J., Pierre, A., Ghzili, H., Grumolato, L., Muresan, M., Klein, M., et al. (2007). Identification of Potential Gene Markers and Insights into the Pathophysiology of Pheochromocytoma Malignancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 4865–4872. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-1253>.
- Thouënnon, E., Pierre, A., Yon, L., and Anouar, Y. (2010). Expression of Trophic Peptides and Their Receptors in Chromaffin Cells and Pheochromocytoma. *Cell. Mol. Neurobiol.* 30, 1383–1389. <https://doi.org/10.1007/s10571-010-9594-9>.
- Tirò, E., Martorana, F., Romano, C., Vitale, S.R., Motta, G., Di Gregorio, S., Massimino, M., Pennisi, M.S., Stella, S., Puma, A., et al. (2019). Molecular Alterations in Thyroid Cancer: From Bench to Clinical Practice. *Genes* 10, 709. <https://doi.org/10.3390/genes10090709>.
- Tofighi, R., Barde, S., Palkovits, M., Höög, A., Hökfelt, T., Ceccatelli, S., and Hulting, A.-L. (2012). Galanin and its three receptors in human pituitary adenoma. *Neuropeptides* 46, 195–201. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2012.07.003>.
- Törnquist, K. (2013). Sphingosine 1-Phosphate and Cancer: Lessons from Thyroid Cancer Cells. *Biomolecules* 3, 303–315. <https://doi.org/10.3390/biom3020303>.
- Torregrossa, L., Giannini, R., Borrelli, N., Sensi, E., Melillo, R.M., Leocata, P., Materazzi, G., Miccoli, P., Santoro, M., and Basolo, F. (2012). CXCR4 expression correlates with the degree of tumor infiltration and BRAF status in papillary thyroid carcinomas. *Mod. Pathol.* 25, 46–55. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2011.140>.
- Traynelis, S.F., Wollmuth, L.P., McBain, C.J., Menniti, F.S., Vance, K.M., Ogden, K.K., Hansen, K.B., Yuan, H., Myers, S.J., and Dingledine, R. (2010). Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacol. Rev.* 62, 405–496. <https://doi.org/10.1124/pr.109.002451>.
- Trivedi, L.U., Femnou Mbuntum, L., Halm, E.A., and Mansi, I. (2021). Is Statin Use Associated With Risk of Thyroid Diseases? Results of a Retrospective Cohort Study. *Ann. Pharmacother.* 1060028020986552. <https://doi.org/10.1177/1060028020986552>.
- Trivellin, G., Daly, A.F., Faucz, F.R., Yuan, B., Rostomyan, L., Larco, D.O., Scherthaner-Reiter, M.H., Szarek, E., Leal, L.F., Caberg, J.-H., et al. (2014). Gigantism and Acromegaly Due to Xq26 Microduplications and GPR101 Mutation. *N. Engl. J. Med.* 371, 2363–2374. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1408028>.
- Tsang, H.-F., Xue, V.W., Koh, S.-P., Chiu, Y.-M., Ng, L.P.-W., and Wong, S.-C.C. (2017). NanoString, a novel digital color-coded barcode technology: current and future applications in molecular diagnostics. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 17, 95–103. <https://doi.org/10.1080/14737159.2017.1268533>.
- Tsopanoglou, N.E., and Maragoudakis, M.E. (2004). Role of Thrombin in Angiogenesis and Tumor Progression. *Semin. Thromb. Hemost.* 30, 63–69. <https://doi.org/10.1055/s-2004-822971>.
- Tuttle, R.M., Haugen, B., and Perrier, N.D. (2017). Updated American Joint Committee on Cancer/Tumor-Node-Metastasis Staging System for Differentiated and Anaplastic Thyroid Cancer (Eighth Edition): What Changed and Why? *Thyroid* 27, 751–756. <https://doi.org/10.1089/thy.2017.0102>.
- Ueda, R. (2015). Clinical Application of Anti-CCR4 Monoclonal Antibody. *Oncology* 89, 16–21. <https://doi.org/10.1159/000431059>.

- Vaccarella, S., Franceschi, S., Bray, F., Wild, C.P., Plummer, M., and Dal Maso, L. (2016). Worldwide Thyroid-Cancer Epidemic? The Increasing Impact of Overdiagnosis. *N. Engl. J. Med.* *375*, 614–617. <https://doi.org/10.1056/NEJMp1604412>.
- Vasilev, V., Daly, A.F., Trivellin, G., Stratakis, C.A., Zacharieva, S., and Beckers, A. (2020). HEREDITARY ENDOCRINE TUMOURS: CURRENT STATE-OF-THE-ART AND RESEARCH OPPORTUNITIES: The roles of AIP and GPR101 in familial isolated pituitary adenomas (FIPA). *Endocr. Relat. Cancer* *27*, T77–T86. <https://doi.org/10.1530/ERC-20-0015>.
- Vassiliadi, D.A., and Tsagarakis, S. (2018). DIAGNOSIS OF ENDOCRINE DISEASE: The role of the desmopressin test in the diagnosis and follow-up of Cushing's syndrome. *Eur. J. Endocrinol.* *178*, R201–R214. <https://doi.org/10.1530/EJE-18-0007>.
- Veenstra, M.J., de Herder, W.W., Feelders, R.A., and Hofland, L.J. (2013). Targeting the somatostatin receptor in pituitary and neuroendocrine tumors. *Expert Opin. Ther. Targets* *17*, 1329–1343. <https://doi.org/10.1517/14728222.2013.830711>.
- van Velsen, E.F.S., Stegenga, M.T., van Kemenade, F.J., Kam, B.L.R., van Ginhoven, T.M., Visser, W.E., and Peeters, R.P. (2019). Evaluating the 2015 American Thyroid Association Risk Stratification System in High-Risk Papillary and Follicular Thyroid Cancer Patients. *Thyroid* *29*, 1073–1079. <https://doi.org/10.1089/thy.2019.0053>.
- Violin, J.D., Crombie, A.L., Soergel, D.G., and Lark, M.W. (2014). Biased ligands at G-protein-coupled receptors: promise and progress. *Trends Pharmacol. Sci.* *35*, 308–316. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2014.04.007>.
- Vlot, A.H.C., Aniceto, N., Menden, M.P., Ulrich-Merzenich, G., and Bender, A. (2019). Applying synergy metrics to combination screening data: agreements, disagreements and pitfalls. *Drug Discov. Today* *24*, 2286–2298. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.09.002>.
- Volante, M., Collini, P., Nikiforov, Y.E., Sakamoto, A.M., Kakudo, K., Katoh, R.M., Lloyd, R.V.M., LiVolsi, V.A., Papotti, M., Sobrinho-Simoes, M., et al. (2007). Poorly Differentiated Thyroid Carcinoma: The Turin Proposal for the Use of Uniform Diagnostic Criteria and an Algorithmic Diagnostic Approach. *J. Surg. Pathol.* *31*, 1256–1264. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3180309e6a>.
- de Vries, L.H., Lodewijk, L., Willems, S.M., Dreijerink, K.M.A., de Keizer, B., van Diest, P.J., Schepers, A., Bonenkamp, H.J., van Engen-van Grunsven, I.A.C.H., Kruijff, S., et al. (2018). SSTR2A expression in medullary thyroid carcinoma is correlated with longer survival. *Endocrine* *62*, 639–647. <https://doi.org/10.1007/s12020-018-1706-1>.
- Vyas, M., and Harigopal, M. (2016). Metastatic thyroid carcinoma presenting as malignant pleural effusion: A cytologic review of 5 cases. *Diagn. Cytopathol.* *44*, 1085–1089. <https://doi.org/10.1002/dc.23547>.
- Walia, R., Gupta, R., Bhansali, A., Pivonello, R., Kumar, R., Singh, H., Ahuja, C., Chhabra, R., Singh, A., Dhandapani, S., et al. (2021). Molecular Imaging Targeting Corticotropin-releasing Hormone Receptor for Corticotropinoma: A Changing Paradigm. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *106*, 1816–1826. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa755>.
- Wan, P.T.C., Garnett, M.J., Roe, S.M., Lee, S., Niculescu-Duvaz, D., Good, V.M., Project, C.G., Jones, C.M., Marshall, C.J., Springer, C.J., et al. (2004). Mechanism of Activation of the RAF-ERK Signaling Pathway by Oncogenic Mutations of B-RAF. *Cell* *116*, 855–867. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00215-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00215-6).
- Wang, Z., Li, Y., Zhong, Y., Wang, Y., and Peng, M. (2020). Comprehensive Analysis of Aberrantly Expressed Competitive Endogenous RNA Network and Identification of Prognostic Biomarkers in Pheochromocytoma and Paraganglioma. *OncoTargets Ther.* *13*, 11377–11395. <https://doi.org/10.2147/OTT.S271417>.
- Ward, Y., Lake, R., Martin, P.L., Killian, K., Salerno, P., Wang, T., Meltzer, P., Merino, M., Cheng, S., Santoro, M., et al. (2013). CD97 amplifies LPA receptor signaling and promotes thyroid cancer progression in a mouse model. *Oncogene* *32*, 2726. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.301>.

- Waser, B., Blank, A., Karamitopoulou, E., Perren, A., and Reubi, J.C. (2015). Glucagon-like-peptide-1 receptor expression in normal and diseased human thyroid and pancreas. *Mod. Pathol.* 28, 391–402. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2014.113>.
- Weathers, S.-P., Rood-Breithaupt, J., de Groot, J., Thomas, G., Manfrini, M., Penas-Prado, M., Puduvalli, V.K., Zwingelstein, C., and Yung, W.K.A. (2021). Results of a phase I trial to assess the safety of macitentan in combination with temozolomide for the treatment of recurrent glioblastoma. *Neuro-Oncol. Adv.* 3, vdab141. <https://doi.org/10.1093/noajnl/vdab141>.
- Weiss, I.D., Huff, L.M., Evbuomwan, M.O., Xu, X., Dang, H.D., Velez, D.S., Singh, S.P., Zhang, H.H., Gardina, P.J., Lee, J.-H., et al. (2017). Screening of cancer tissue arrays identifies CXCR4 on adrenocortical carcinoma: correlates with expression and quantification on metastases using ⁶⁴Cu-plerixafor PET. *Oncotarget* 8, 73387–73406. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19945>.
- Weissenrieder, J.S., Neighbors, J.D., Mailman, R.B., and Hohl, R.J. (2019). Cancer and the Dopamine D2 Receptor: A Pharmacological Perspective. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 370, 111–126. <https://doi.org/10.1124/jpet.119.256818>.
- Wells, S.A., Robinson, B.G., Gagel, R.F., Dralle, H., Fagin, J.A., Santoro, M., Baudin, E., Elisei, R., Jarzab, B., Vasselli, J.R., et al. (2012). Vandetanib in Patients With Locally Advanced or Metastatic Medullary Thyroid Cancer: A Randomized, Double-Blind Phase III Trial. *J. Clin. Oncol.* 30, 134–141. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.35.5040>.
- Wells, S.A., Asa, S.L., Dralle, H., Elisei, R., Evans, D.B., Gagel, R.F., Lee, N., Machens, A., Moley, J.F., Pacini, F., et al. (2015). Revised American Thyroid Association Guidelines for the Management of Medullary Thyroid Carcinoma. *Thyroid* 25, 567–610. <https://doi.org/10.1089/thy.2014.0335>.
- Werner, T.A., Forster, C.M., Dizdar, L., Verde, P.E., Raba, K., Schott, M., Knoefel, W.T., and Krieg, A. (2017). CXCR4/CXCR7/CXCL12 axis promotes an invasive phenotype in medullary thyroid carcinoma. *Br. J. Cancer* 117, 1837–1845. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.364>.
- White, C., Alshaker, H., Cooper, C., Winkler, M., and Pchejetski, D. (2016). The emerging role of FTY720 (Fingolimod) in cancer treatment. *Oncotarget* 7, 23106–23127. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7145>.
- Willenberg, H.S., Haase, M., Papewalis, C., Schott, M., Scherbaum, W.A., and Bornstein, S.R. (2005). Corticotropin-Releasing Hormone Receptor Expression on Normal and Tumorous Human Adrenocortical Cells. *Neuroendocrinology* 82, 274–281. <https://doi.org/10.1159/000093126>.
- Wirth, L.J., Sherman, E., Robinson, B., Solomon, B., Kang, H., Lorch, J., Worden, F., Brose, M., Patel, J., Leboulleux, S., et al. (2020). Efficacy of Selpercatinib in RET-Altered Thyroid Cancers. *N. Engl. J. Med.* <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2005651>.
- Wishart, D.S., Knox, C., Guo, A.C., Cheng, D., Shrivastava, S., Tzur, D., Gautam, B., and Hassanali, M. (2008). DrugBank: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets. *Nucleic Acids Res.* 36, D901–D906. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm958>.
- Witteveen, P.O., van der Mij, K.J.C., Los, M., Kronemeijer, R.H., Groenewegen, G., and Voest, E.E. (2010). Phase 1/2 study of atrasentan combined with pegylated liposomal doxorubicin in platinum-resistant recurrent ovarian cancer. *Neoplasia N. Y. N* 12, 941–945. <https://doi.org/10.1593/neo.10582>.
- Wong, S.K.-F. (2003). G Protein Selectivity Is Regulated by Multiple Intracellular Regions of GPCRs. *Neurosignals* 12, 1–12. <https://doi.org/10.1159/000068914>.
- Wootten, D., Christopoulos, A., and Sexton, P.M. (2013). Emerging paradigms in GPCR allostery: implications for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 630–644. <https://doi.org/10.1038/nrd4052>.
- Wu, C.-Y., Zheng, C., Xia, E.-J., Quan, R.-D., Hu, J., Zhang, X.-H., and Hao, R.-T. (2020). Lysophosphatidic Acid Receptor 5 (LPAR5) Plays a Significance Role in Papillary Thyroid Cancer via Phosphatidylinositol 3-

- Kinase/Akt/Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Pathway. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* 26, e919820-1-e919820-12. <https://doi.org/10.12659/MSM.919820>.
- Wu, K.-D., Chen, Y.-M., Chu, T.-S., Chueh, S.-C., Wu, M.-H., and Bor-Shen, H. (2001). Expression and Localization of Human Dopamine D2 and D4 Receptor mRNA in the Adrenal Gland, Aldosterone-Producing Adenoma, and Pheochromocytoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 4460–4467. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.9.7859>.
- Wu, V., Yeerna, H., Nohata, N., Chiou, J., Harismendy, O., Raimondi, F., Inoue, A., Russell, R.B., Tamayo, P., and Gutkind, J.S. (2019). Illuminating the Onco-GPCRome: Novel G protein-coupled receptor-driven oncocrine networks and targets for cancer immunotherapy. *J. Biol. Chem.* jbc.REV119.005601. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.005601>.
- Xia, W., and Jie, W. (2020). ZEB1-AS1/miR-133a-3p/LPAR3/EGFR axis promotes the progression of thyroid cancer by regulating PI3K/AKT/mTOR pathway. *Cancer Cell Int.* 20. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-1098-1>.
- Xia, Y., Xie, J., Zhao, J., Lou, Y., and Cao, D. (2021). Screening and Identification of Key Biomarkers in Melanoma: Evidence from Bioinformatic Analyses. *J. Comput. Biol.* 28, 317–329. <https://doi.org/10.1089/cmb.2019.0400>.
- Xie, T., Tang, Y., Luo, R., Zhang, X., Wu, S., Gu, Y., Liu, T., and Hu, F. (2020). GPR64 promotes cAMP pathway in tumor aggressiveness in sparsely granulated growth hormone cell adenomas. *Endocrine* 68, 629–639. <https://doi.org/10.1007/s12020-020-02263-y>.
- Xing, M. (2010). Genetic Alterations in the Phosphatidylinositol-3 Kinase/Akt Pathway in Thyroid Cancer. *Thyroid* 20, 697–706. <https://doi.org/10.1089/thy.2010.1646>.
- Xing, M. (2013). Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. *Nat. Rev. Cancer* 13, 184–199. <https://doi.org/10.1038/nrc3431>.
- Xu, L., Lin, W., Wen, L., and Li, G. (2019a). Lgr5 in cancer biology: functional identification of Lgr5 in cancer progression and potential opportunities for novel therapy. *Stem Cell Res. Ther.* 10, 219. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1288-8>.
- Xu, W., Nelson-Maney, N.P., Bálint, L., Kwon, H.-B., Davis, R.B., Dy, D.C.M., Dunleavey, J.M., St. Croix, B., and Caron, K.M. (2022). Orphan G-Protein Coupled Receptor GPRC5B Is Critical for Lymphatic Development. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 5712. <https://doi.org/10.3390/ijms23105712>.
- Xu, X., Long, H., Xi, B., Ji, B., Li, Z., Dang, Y., Jiang, C., Yao, Y., and Yang, J. (2019b). Molecular Network-Based Drug Prediction in Thyroid Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20020263>.
- Xu, Y., Xu, D., Zhu, S.-J., Ye, B., Dong, J.-D., Zhang, Y.-L., and Zhang, Y. (2015). Induction of apoptosis and autophagy in metastatic thyroid cancer cells by valproic acid (VPA). *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8, 8291–8297. .
- Xu, Z., Liu, N., Wang, X., Ding, B., Zhang, H., Li, Y., Sun, W., and Wei, W. (2021). Effect of PLC-β1/CaM signaling pathway mediated by AT1R on the occurrence and development of hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell Int.* 21, 587. <https://doi.org/10.1186/s12935-021-02261-8>.
- Yadav, B., Wennerberg, K., Aittokallio, T., and Tang, J. (2015). Searching for Drug Synergy in Complex Dose-Response Landscapes Using an Interaction Potency Model. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 13, 504–513. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2015.09.001>.
- Yang, S.P., and Ngeow, J. (2016). Familial non-medullary thyroid cancer: unraveling the genetic maze. *Endocr. Relat. Cancer* 23, R577–R595. <https://doi.org/10.1530/ERC-16-0067>.
- Yang, Z., Yang, F., Zhang, D., Liu, Z., Lin, A., Liu, C., Xiao, P., Yu, X., and Sun, J.-P. (2017). Phosphorylation of G Protein-Coupled Receptors: From the Barcode Hypothesis to the Flute Model. *Mol. Pharmacol.* 92, 201–210. <https://doi.org/10.1124/mol.116.107839>.

- Yaron, M., Renner, U., Gilad, S., Stalla, G.K., Stern, N., and Greenman, Y. (2015). KISS1 receptor is preferentially expressed in clinically non-functioning pituitary tumors. *Pituitary* 18, 306–311. <https://doi.org/10.1007/s11102-014-0572-y>.
- Yi, H., Ye, T., Ge, M., Yang, M., Zhang, L., Jin, S., Ye, X., Long, B., and Li, L. (2018). Inhibition of autophagy enhances the targeted therapeutic effect of sorafenib in thyroid cancer. *Oncol. Rep.* 39, 711–720. <https://doi.org/10.3892/or.2017.6118>.
- Yu, J., Tao, S., Hu, P., Wang, R., Fang, C., Xu, Y., Qi, D., Wei, Z., Zhang, J., and Tan, Q. (2017). CCR7 promote lymph node metastasis via regulating VEGF-C/D-R3 pathway in lung adenocarcinoma. *J. Cancer* 8, 2060–2068. <https://doi.org/10.7150/jca.19069>.
- Zanconato, F., Cordenonsi, M., and Piccolo, S. (2016). YAP/TAZ at the Roots of Cancer. *Cancer Cell* 29, 783–803. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.05.005>.
- Zeng, Z.-P., Liu, G.-Q., Li, H.-Z., Fan, X.-R., Liu, D.-M., Tong, A.-L., Zheng, X., and Liu, C. (2006). The Effects of Urotensin-II on Proliferation of Pheochromocytoma Cells and mRNA Expression of Urotensin-II and Its Receptor in Pheochromocytoma Tissues. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1073, 284–289. <https://doi.org/10.1196/annals.1353.032>.
- Zhang, H., Yang, L., Teng, X., Liu, Z., Liu, C., Zhang, L., and Liu, Z. (2016a). The chemokine receptor CXCR7 is a critical regulator for the tumorigenesis and development of papillary thyroid carcinoma by inducing angiogenesis in vitro and in vivo. *Tumor Biol.* 37, 2415–2423. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4051-5>.
- Zhang, L., He, M., Zhang, Y., Nilubol, N., Shen, M., and Kebebew, E. (2012). Quantitative High-Throughput Drug Screening Identifies Novel Classes of Drugs with Anticancer Activity in Thyroid Cancer Cells: Opportunities for Repurposing. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97, E319–E328. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-2671>.
- Zhang, L., Zhang, Y., Mehta, A., Boufraquech, M., Davis, S., Wang, J., Tian, Z., Yu, Z., Boxer, M.B., Kiefer, J.A., et al. (2015). Dual inhibition of HDAC and EGFR signaling with CUDC-101 induces potent suppression of tumor growth and metastasis in anaplastic thyroid cancer. *Oncotarget* 6, 9073–9085. .
- Zhang, L., Yang, Z., Granieri, L., Pasculescu, A., Datti, A., Asa, S.L., Xu, Z., and Ezzat, S. (2016b). High-throughput drug library screening identifies colchicine as a thyroid cancer inhibitor. *Oncotarget* 7, 19948–19959. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7890>.
- Zhang, X., Zhang, R., Zheng, Y., Shen, J., Xiao, D., Li, J., Shi, X., Huang, L., Tang, H., Liu, J., et al. (2013). Expression of gamma-aminobutyric acid receptors on neoplastic growth and prediction of prognosis in non-small cell lung cancer. *J. Transl. Med.* 11, 102. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-102>.
- Zhao, J., Xu, C., Yao, J., Yu, C., Liao, L., and Dong, J. (2018). Statins and Thyroid Carcinoma: a Meta-Analysis. *Cell. Physiol. Biochem.* 47, 1422–1431. <https://doi.org/10.1159/000490832>.
- Zhao, L., Yu, Z., and Zhao, B. (2019). Mechanism of VIPR1 gene regulating human lung adenocarcinoma H1299 cells. *Med. Oncol.* 36, 91. <https://doi.org/10.1007/s12032-019-1312-y>.
- Zhao, P., Hu, W., Wang, H., Yu, S., Li, C., Bai, J., Gui, S., and Zhang, Y. (2015). Identification of Differentially Expressed Genes in Pituitary Adenomas by Integrating Analysis of Microarray Data. *Int. J. Endocrinol.* 2015, 164087. <https://doi.org/10.1155/2015/164087>.
- Zheng, S., Cherniack, A.D., Dewal, N., Moffitt, R.A., Danilova, L., Murray, B.A., Lerario, A.M., Else, T., Knijnenburg, T.A., Ciriello, G., et al. (2016). Comprehensive Pan-Genomic Characterization of Adrenocortical Carcinoma. *Cancer Cell* 29, 723–736. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.04.002>.
- Zhou, D., Wang, J., and Liu, X. (2022). Development of six immune-related lncRNA signature prognostic model for smoking-positive lung adenocarcinoma. *J. Clin. Lab. Anal.* 36, e24467. <https://doi.org/10.1002/jcla.24467>.
- Zhu, X., Bai, Q., Lu, Y., Lu, Y., Zhu, L., Zhou, X., and Wu, L. (2016). Expression and function of CXCL12/CXCR4/CXCR7 in thyroid cancer. *Int. J. Oncol.* 48, 2321–2329. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3485>.

Zlotnik, A. (2008). New insights on the role of CXCR4 in cancer metastasis. *J. Pathol.* *215*, 211–213. <https://doi.org/10.1002/path.2350>.

(2016). Synthesis and evaluation of Lys1(α,γ -Folate)Lys3(177Lu-DOTA)-Bombesin(1-14) as a potential theranostic radiopharmaceutical for breast cancer. *Appl. Radiat. Isot.* *107*, 214–219. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2015.10.030>.

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS	9
GLOSSAIRE MEDICAL.....	11
AVANT-PROPOS	13
INTRODUCTION GENERALE	15
1. Cancer de la thyroïde.....	17
1.1. Physiologie de la thyroïde	17
1.2. Epidémiologie.....	18
1.3. Classification histologique.....	19
1.4. Anomalies génétiques du cancer différencié de la thyroïde	22
1.4.1. Mutations constitutionnelles.....	22
1.4.2. Anomalies génétiques somatiques	22
a) Généralités.....	22
b) Mutations de RAS	24
c) Mutation de BRAF	24
d) Mutation de EIF1AX.....	25
e) Réarrangements de RET/PTC	25
f) Réarrangements de PPARγ-PAX8	26
g) Autres anomalies génétiques.....	26
1.5. Facteurs pronostiques	27
1.5.1. Facteurs associés à la mortalité lié au cancer de la thyroïde.....	27
1.5.2. Facteurs associés à la persistance ou la récurrence du cancer thyroïdien	29
1.6. Traitement standard du cancer différencié de la thyroïde	31
1.6.1. Traitement initial	31
a) Chirurgie.....	31
b) Radiothérapie métabolique	32
c) Hormonothérapie	32
1.6.2. Traitement des récurrences loco-régionales	32
1.6.3. Traitement des métastases à distance	32
1.7. Cancer thyroïdien métastatique réfractaire à l'iode radioactif	33
1.7.1. Définition.....	33
1.7.2. Traitement.....	33
a) Indication à l'initiation d'un traitement systémique.....	33
b) Traitement systémique par thérapies ciblées	34
c) Immunothérapie	47
d) Redifférenciation thyroïdienne	47
1.8. Combinaison de traitements dans le cancer thyroïdien réfractaire.....	47
1.8.1. Combinaison de traitements en cancérologie	47
1.8.2. Combinaisons testées dans le traitement du cancer thyroïdien réfractaire	48
a) Combinaisons avec une chimiothérapie classique	48
b) Combinaison d'inhibiteurs de kinases	48
c) Immunothérapie	48
d) Autres combinaisons de traitement.....	49
2. Les récepteurs couplés aux protéines G et cancer	50
2.1. Généralités sur les RCPG	50
2.1.1. Structure	50
2.1.2. Classification	51
a) Classe A (« Rhodopsin-like »)	52
b) Classe B (« Secretin-like »).....	52
c) Récepteurs d'Adhésion	53
d) Classe C (Glutamate)	53
e) Classe F (Frizzled).....	53
2.2. Anomalies génétiques des RCPG associés au cancer	54
2.3. Modifications d'expression des RCPG associées au cancer	54
2.4. Implication des RCPG dans le processus tumoral.....	55

2.4.1.	Rôle des RCPG dans le développement du cancer.....	55
2.4.2.	Rôle des RCPG dans l'angiogenèse tumorale.....	55
2.4.3.	Rôle des RCPG dans le développement des métastases	56
2.5.	Voies de signalisation des RCPG impliquées dans le cancer	56
2.5.1.	Voies de signalisation couplées aux protéines G	57
2.5.2.	Voies de signalisation de la bêta-arrestine.....	59
2.5.3.	Voie WNT-β-caténine	61
2.5.4.	Voie Sonic HedgeHog	62
2.5.5.	Voie Hippo	62
2.5.6.	Transactivation des récepteurs à activité tyrosine kinase	62
2.6.	Pharmacologie des RCPG	63
2.6.1.	Différents modes d'action des médicaments	64
	a) Agoniste	64
	b) Agoniste inverse	65
	c) Antagoniste.....	65
	d) Modulateur allostérique	65
	e) Ligand biaisé	65
2.6.2.	Médicaments sur le marché ciblant les RCPG	66
2.6.3.	Médicaments ciblant les RCPG en cancérologie	66
2.6.4.	Peptides radiomarqués	69

HYPOTHESES ET OBJECTIFS DE TRAVAIL 73

PARTIE I : ETUDE DE L'EXPRESSION DES RECEPTEURS COUPLES AUX PROTEINES G DANS LE CANCER THYROÏDIEN REFRACTAIRE A L'IODE RADIOACTIF 75

1.	Introduction	77
1.1.	Récepteurs couplés aux protéines G et cancer de la thyroïde.....	77
1.1.1.	Récepteur de la TSH	77
1.1.2.	Le récepteur CD97/ADGRE5.....	77
1.1.3.	Récepteurs aux chimiokines.....	78
1.1.4.	Récepteurs aux phospholipides	78
1.1.5.	GPCRome dans le cancer de la thyroïde	79
1.2.	Techniques de détection et de quantification à haut débit des ARN messager codant pour des récepteurs couplés aux protéines G	80
1.2.1.	TaqMan low-density array	80
1.2.2.	Puce à ADN ou <i>microarray</i>	81
1.2.3.	La technologie RNA-sequencing (RNA-seq).....	81
1.2.4.	Le système d'analyse nCounter (technologie NanoString)	82
1.3.	Repositionnement moléculaire et cancer	84
1.3.1.	Méthodologies du repositionnement moléculaire	84
	a) Approches expérimentales	84
	b) Approches <i>in silico</i>	85
1.3.2.	Repositionnement moléculaire et cancer de la thyroïde.....	85
1.3.3.	Repositionnement moléculaire et RCPG en cancérologie.....	88
1.4.	Objectifs	90
2.	Article 1	91
3.	Discussion	93
3.1.	Identification des RCPG avec une expression différentielle	93
3.2.	Facteurs pronostiques	98
3.3.	Ciblage thérapeutique spécifique	98

PARTIE II : CRIBLAGE PHARMACOLOGIQUE DES MOLECULES CIBLANT LES RECEPTEURS COUPLES AUX PROTEINES G DANS LE CANCER THYROÏDIEN REFRACTAIRE A L'IODE RADIOACTIF 101

1.	Introduction	103
1.1.	Médecine personnalisée.....	103
1.2.	Modèles cellulaires utilisés	104
1.2.1.	Lignées cellulaires.....	104
1.2.2.	Prélèvement <i>ex vivo</i>	104
1.3.	Etudes de combinaisons de traitements	105
1.3.1.	Méthodologie.....	105

a)	Généralités.....	105
b)	Highest single agent (HSA)	106
c)	Modèle de Bliss.....	106
d)	Modèle de Loewe	106
1.3.2.	Validation d'une méthode de criblage pharmacologique	107
1.4.	Objectifs	110
2.	Article 2	111
3.	Discussion	113
3.1.	Résultats principaux.....	113
3.2.	Détection de l'expression de l'ARNm des RCPG dans les lignées cellulaires	113
3.2.1.	Panel des RCPG utilisés pour le criblage pharmacologique.....	113
3.2.2.	Profil d'expression des ARNm codant pour les RCPG dans les lignées thyroïdiennes	114
3.3.	Criblage pharmacologique	115
3.3.1.	Vilazodone	116
3.3.2.	Vortioxetine	117
3.3.3.	Fingolimod.....	117
3.4.	Du prélèvement ex-vivo à la création d'une lignée cellulaire.....	119
PARTIE III : ATLAS DES RECEPTEURS COUPLES AUX PROTEINES G DANS LES TUMEURS NEUROENDOCRINES		121
1.	Introduction	123
1.1.	Cancer médullaire de la thyroïde	124
1.2.	Tumeurs neuroendocrines hypophysaires	127
1.3.	Phéochromocytome et paragangliome.....	129
1.4.	Corticosurréalome.....	133
1.5.	Objectifs	135
2.	Article 3	137
3.	Discussion	139
3.1.	Résultats principaux.....	139
3.2.	Approche bio-informatique pour le profil transcriptomique des récepteurs couplés aux protéines G.....	139
3.3.	Expression différentielle des récepteurs couplés aux protéines G entre tissu sain et tissu tumoral dans les tumeurs endocrines.....	141
3.3.1.	Cancer médullaire de la thyroïde	141
3.3.2.	Tumeurs neuroendocrines hypophysaires (PitNET)	144
3.3.3.	Phéochromocytome et paragangliome.....	149
3.3.4.	Corticosurréalome.....	153
3.3.5.	Récepteurs communs entre les tumeurs.....	158
3.4.	Repositionnement moléculaire des RCPG dans les tumeurs endocrines	158
3.5.	Facteurs associés aux profils d'expression différentielles des RCPG	160
3.6.	Conclusion	162
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....		163
BIBLIOGRAPHIE		169
TABLE DES MATIERES		205
TABLE DES FIGURES		209
TABLE DES TABLEAUX.....		211
VALORISATION DU TRAVAIL DE THESE		213
1.	Publications	213
2.	Communications orales	213
3.	Autres publications en lien avec la thématique.....	213
4.	Prix	213

Table des figures

Figure 1 : Structure et fonction de la thyroïde.....	18
Figure 2 : Incidence mondiale des principaux cancers dont celui de la thyroïde.	19
Figure 3 : Figure récapitulant l'ensemble des types histologiques de cancer de la thyroïde.	20
Figure 4 : Classification histologique des cancers différenciés de la thyroïde.	21
Figure 5 : Représentation schématique des grandes voies de signalisation impliquées dans la carcinogenèse thyroïdienne.....	23
Figure 6 : Stratégie thérapeutique dans le cancer différencié de la thyroïde métastatique. ITK : Inhibiteur de tyrosine kinase.	34
Figure 7 : Schéma représentant la plupart des thérapies ciblées utilisées dans le cancer de la thyroïde.	35
Figure 8 : Principaux résultats d'efficacité du Sorafenib et du Lenvatinib.	36
Figure 9 : Représentation schématique de la structure commune des récepteurs couplés aux protéines G.	51
Figure 10 : Classification des récepteurs couplés aux protéines G.	52
Figure 11 : Principales mutations des récepteurs couplés aux protéines et des protéines G dans le cancer.	54
Figure 12 : Voies de signalisation cellulaire médiées par les RCPG et associées au cancer.	57
Figure 13 : Les voies de signalisation couplées aux protéines G.....	59
Figure 14 : Différentes fonctions de la β -arrestine.	61
Figure 15 : Les différents modes d'action des médicaments agissant sur les récepteurs couplés aux protéines G.	64
Figure 16 : Agonistes biaisés des récepteurs couplés aux protéines G.	66
Figure 17 : Expression des récepteurs de chimiokines et leurs ligands dans les cellules thyroïdiennes normales et cancéreuses. <i>D'après Coperchini F et al. Endocr Relat Cancer. 2019 Aug;26(8):R465-R478.</i>	78
Figure 18 : Etapes détaillées de l'analyse nCounter de NanoString.....	82
Figure 19 : Plan général de préparation automatisée des microplaques pour un criblage pharmacologique en format 384 puits.....	109
Figure 20 : Exemples de courbes dose-réponse obtenus avec l'approche utilisée.....	109
Figure 21 : Expression des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) dans 51 lignées cellulaires thyroïdiennes.	115
Figure 22 : Expression des récepteurs S1PR1-5 dans les différentes lignées dérivées de cancer thyroïdien. ...	118
Figure 23 : Caractérisation de la lignée cellulaire dérivée de l'ascite métastatique d'un patient présentant un cancer thyroïdien réfractaire à l'iode radioactif.....	119
Figure 24 : Représentation schématique des adénomes hypophysaires.	127
Figure 25 : Localisation anatomique des phéochromocytomes et paragangliomes.....	129
Figure 26 : Représentation schématique de la régulation hormonale hypothalamo-hypophysaire.	144
Figure 27 : Représentation schématique de la régulation hormonale hypothalamo-hypophysaire.	153
Figure 28 : Expression dans la lignée cellulaire TT (dérivée d'un cancer médullaire de la thyroïde) des 14 récepteurs couplés aux protéines G sélectionnés dans l'étude sur échantillons humains.	159
Figure 29 : Association de LGR4 à la survie sans progression.	161

Figure 30 : Volcano plot pour la série GSE32662..... 162

Figure 31 : Schéma décrivant le ciblage théranostique actuel et futur des RCPG dans les cancers de la thyroïde.
..... 166

Table des tableaux

Tableau 1 : Fréquence des anomalies génétiques (mutations et réarrangements chromosomiques) évaluées par les nouvelles technologies de séquençage dans les différents types histologiques de cancers différenciés de la thyroïde.....	24
Tableau 2 : Classification TNM pour les cancers épithéliaux de la thyroïde (8 ^{ème} édition, AJCC 2017).....	28
Tableau 3 : Stades pronostiques de l’AJCC des cancers différenciés de la thyroïde (8 ^{ème} édition, AJCC 2017) et la survie globale associée d’après <i>Tam et al. 2018</i>	29
Tableau 4 : Système de stratification initiale du risque selon l’ATA2015.	30
Tableau 5 : Système de re-stratification du risque après traitement selon les recommandations de l’ATA2015.	31
Tableau 6 : Indication à un traitement systémique chez les patients avec un cancer thyroïdien réfractaire.....	34
Tableau 7 : Etudes cliniques évaluant l’efficacité et la tolérance d’inhibiteurs de tyrosine kinase dans le cancer thyroïdien réfractaire éligible à une thérapie ciblée.....	42
Tableau 8 : Etudes cliniques évaluant l’efficacité et la tolérance des autres inhibiteurs de kinases dans le cancer thyroïdien réfractaire éligible à une thérapie ciblée.....	46
Tableau 9 : Médicaments ciblant les récepteurs couplés aux protéines G utilisés en pratique clinique.	67
Tableau 10 : Médicaments et anticorps anti-récepteurs couplés aux protéines G en cours d’essais cliniques....	69
Tableau 11 : Principaux récepteurs couplés aux protéines G pouvant être ciblés en imagerie fonctionnelle et/ou en radiothérapie métabolique en oncologie.	71
Tableau 12 : Etudes ayant utilisées dans le cancer de la thyroïde la technologie ncouter NanoString pour évaluation de l’expression d’ARNm.	83
Tableau 13 : Liste des agents pharmacothérapeutiques testés dans le cancer de la thyroïde avec leur mécanisme d’action décrit, les effets en pré-cliniques et en cliniques si disponibilité.	87
Tableau 14 : Médicaments ciblant des Récepteurs couplés aux protéines G et utilisés dans une stratégie de repositionnement moléculaire dans le cancer.	89
Tableau 15 : Données des RCPG exprimés de manière différentielle dans notre travail et retrouvés dans la littérature.	97
Tableau 16 : Principales caractéristiques des lignées cellulaires dérivées de cancer thyroïdien humain utilisées dans ce travail.....	104
Tableau 17 : Modèles utilisés pour déterminer une éventuelle synergie pour une combinaison de traitements.	106
Tableau 18 : Nombre de médicaments approuvés ciblant les RCPG identifiés dans deux pharmacologiques parmi les RCPG exprimés de manière différentielle entre le tissu sain et le tissu tumoral.....	108
Tableau 19 : Profil de sensibilité et d’efficacité du Lenvatinib et du Selumetinib dans les 6 lignées utilisées pour le criblage pharmacologique.....	114
Tableau 20 : Syndromes héréditaires associés au cancer médullaire de la thyroïde.....	125
Tableau 21 : Etudes cliniques évaluant l’efficacité et la tolérance d’inhibiteurs de tyrosine kinase approuvés dans le cancer thyroïdien réfractaire éligible à une thérapie ciblée.....	126
Tableau 22 : Altérations génétiques dans les PitNET.....	128

Tableau 23 : Anomalies génétiques associées aux phéochromocytomes et paragangliomes.....	131
Tableau 24 : Etudes évaluant l'efficacité et la tolérance des principaux traitements systémiques dans le phéochromocytome/paragangliome.	132
Tableau 25 : Evaluation de l'efficacité et la tolérance des principaux traitement systémiques dans le corticosurréalome.	134
Tableau 26 : Liste des récepteurs couplés aux protéines G retrouvés dans la littérature dans le cancer médullaire de la thyroïde.	143
Tableau 27 : Liste des récepteurs couplés aux protéines G étudiés dans la littérature dans les tumeurs neuroendocrines hypophysaires.....	148
Tableau 28 : Liste des récepteurs couplés aux protéines G étudiés dans la littérature dans les phéochromocytomes/paragangliomes.	152
Tableau 29 : Liste des récepteurs couplés aux protéines G étudiés dans la littérature dans les corticosurréalomes.	157

Valorisation du travail de thèse

1. Publications

Suteau V, Seegers V, Munier M, Ben Boubaker R, Reyes C, Gentien D, Wery M, Croué A, Illouz F, Hamy A, Rodien P, Briet C. G Protein-coupled Receptors in Radioiodine-refractory Thyroid Cancer in the Era of Precision Medicine. *J Clin Endocrinol Metab.* 2021 Jul 13;106(8):2221-2232.

Suteau V, Munier M, Ben Boubaker R, Wery M, Henrion D, Rodien P, Briet C. Identification of Dysregulated Expression of G Protein Coupled Receptors in Endocrine Tumors by Bioinformatics Analysis: Potential Drug Targets? *Cells.* 2022; 11(4):703. doi.org/10.3390/cells11040703

2. Communications orales

V. Suteau et al. Les récepteurs couplés aux protéines G dans le cancer thyroïdien : de la biologie à la réutilisation de médicaments, Congrès de la Société Française d'Endocrinologie, Nantes 2022.

V Suteau et al. Atlas of G protein-coupled receptors in radioiodine-refractory thyroid cancer: Novel therapeutic targets for drug repositioning? E-European Congress of Endocrinology, 2021.

V. Suteau et al. Première lignée thyroïdienne dérivée d'une ascite métastatique d'un cancer thyroïdien réfractaire à l'iode : un modèle à l'heure des traitements personnalisés. Congrès de la Société Française d'Endocrinologie, Le Havre 2021.

V. Suteau, et al. Les récepteurs couplés aux protéines G comme potentielles cibles dans le cancer thyroïdien réfractaire. Congrès de la Société Française d'Endocrinologie, Marseille 2020.

V. Suteau, et al. Les récepteurs couplés aux protéines G comme potentielles cibles dans le cancer thyroïdien réfractaire. Journée recherche biomédicale Angers-Tours, Tours, 2019.

3. Autres publications en lien avec la thématique

Suteau V et al (2022). RET : un gène aux multiples facettes. Correspondances en Métabolismes Hormones Diabète et Nutrition/ n°1/ février 2022.

Suteau V. et al (2021). Sex bias in differentiated thyroid cancer, *International Journal of Molecular Sciences, Int. J. Mol. Sci.* doi.org/10.3390/ijms222312992

4. Prix

Prix de Recherche en Endocrinologie PFIZER (Congrès Société Française d'Endocrinologie, Marseille, 2020)

Prix de meilleure communication orale (Congrès Société Française d'Endocrinologie, Le Havre, 2021)

Prix de recherche « Young Investigator Award » (European Congress of Endocrinology, 2021)

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné(e) SUTEAU Valentine
déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une
partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet,
constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.
En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées
pour écrire ce rapport ou mémoire.

signé par l'étudiant(e) le lundi 14 novembre 2022

**Cet engagement de non plagiat doit être signé et joint
à tous les rapports, dossiers, mémoires.**

Présidence de l'université
40 rue de rennes – BP 73532
49035 Angers cedex
Tél. 02 41 96 23 23 | Fax 02 41 96 23 00



Titre : Ciblage pharmacologique des récepteurs couplés aux protéines G dans les tumeurs endocrines pour un repositionnement moléculaire- Exemple du cancer thyroïdien réfractaire à l'iode radioactif

Mots clés : Cancer de la thyroïde ; Récepteurs couplés aux protéines G ; Repositionnement moléculaire : Tumeurs endocrines

Introduction : Certaines tumeurs endocrines, dont les cancers de la thyroïde réfractaires à l'iode radioactif, ont des options thérapeutiques limitées. Le repositionnement de médicaments est une stratégie en développement en oncologie. Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) représentent la plus grande famille de récepteurs ciblés par des médicaments approuvés et de nombreuses données relient les RCPG au cancer. Nous avons donc cherché à identifier des médicaments ciblant les RCPG et ayant un effet antitumoral dans les tumeurs endocrines, en premier lieu dans le cancer thyroïdien réfractaire.

Méthodes : Nous avons analysé l'expression différentielle de près de 400 gènes codant pour des RCPG dans les tissus tumoraux en comparaison au tissu sain par analyse transcriptomique (technologie Nanostring) et/ou analyses bio-informatiques de bases de données (*Gene Expression Omnibus* et *The Cancer Genome Atlas*). Nous avons ensuite identifié les RCPG ciblés par des médicaments approuvés à partir de bases de données pharmacologiques (ChEMBL et DrugBank). Le criblage pharmacologique *in vitro* et *ex vivo* a été réalisé en quantifiant la viabilité cellulaire de 17 médicaments approuvés ciblant dix RCPG d'intérêt.

Résultats : Nos analyses transcriptomiques ont montré qu'un certain nombre de RCPG étaient sur ou sous-exprimés dans les tissus tumoraux en comparaison au tissu sain adjacent. Dix récepteurs ont été sélectionnés pour le criblage pharmacologique dans le cancer de la thyroïde, basés sur leur expression différentielle dans les cancers thyroïdiens, leur ciblage pharmacologique potentielle et un niveau d'expression suffisant au sein des lignées cellulaires étudiées (*ADORA1*, *CHRM3*, *CXCR7*, *EDNRB*, *F2R*, *GABBR2*, *HRH1*, *HTR7*, *P2RY6*, *S1PR2*). Celui-ci a montré que trois agents (Vilazodone, Vortioxetine, Fingolimod) avaient une efficacité anti-tumorale supérieure à 60% et une concentration inhibitrice de 50% (IC50) de l'ordre du micromolaire. Selon les sous-types histologiques, ces molécules avaient également un effet inhibiteur sur la migration et l'invasion.

Conclusion : Pour la première fois, nous avons établi le profil d'expression des RCPG dans les principales tumeurs endocrines avec des signatures spécifiques. Ces données pourraient aider à identifier des cibles thérapeutiques potentielles. Nous avons montré la faisabilité d'un criblage pharmacologique de médicaments ciblant les RCPG.

Title : Pharmacological targeting of G protein coupled receptors in endocrine tumors for molecular repurposing - Example of Radioiodine refractory Thyroid Cancer

Keywords : Thyroid cancer, G protein coupled receptors, drug repurposing, endocrine tumors

Introduction: Some endocrine tumors, including radioiodine refractory thyroid cancers, have limited therapeutic options. Drug repurposing is a developing strategy in oncology. G protein-coupled receptors (GPCRs) represent the largest family of receptors targeted by approved drugs and there is lot of evidence linking GPCRs to cancer. We therefore sought to identify GPCR-targeted drugs with antitumor effect in endocrine tumors, primarily in refractory thyroid cancer.

Methods: We analyzed the differential expression of about 400 genes encoding GPCRs in tumor tissues compared to healthy tissue by transcriptomic analysis (Nanostring technology) and/or bioinformatics analyses of databases (*Gene Expression Omnibus* (GEO) and *The Cancer Genome Atlas* (TCGA)). We then identified GPCRs targeted by approved drugs from pharmacological databases (ChEMBL and DrugBank). *In vitro* and *ex vivo* pharmacological screening was performed by quantifying cell viability of 17 approved drugs targeting ten selected GPCRs.

Results: Our transcriptomic analyses showed that a number of GPCRs were up- or downregulated in tumor tissue compared to adjacent healthy tissue. Ten receptors were selected for drug screening in thyroid cancer, based on their differential expression in thyroid cancers, their potential pharmacological targeting and a sufficient level of expression in the studied cell lines (*ADORA1*, *CHRM3*, *CXCR7*, *EDNRB*, *F2R*, *GABBR2*, *HRH1*, *HTR7*, *P2RY6*, *S1PR2*). This showed that three agents (Vilazodone, Vortioxetine, Fingolimod) had an anti-tumor efficacy greater than 60% and a 50% inhibitory concentration (IC50) in the micromolar range. Depending on the histological subtypes, these molecules also had an inhibitory effect on migration and invasion.

Conclusion: For the first time, we profiled the expression of GPCRs in major endocrine tumors with specific signatures. These data could help to identify potential therapeutic targets. We have shown the feasibility of drug screening of GPCR-targeted drugs.