

Table des matières

Résumé	4
Abréviations	6
<i>I. Introduction</i>	7
1. Généralités	7
2. Synthèse et sécrétion des hormones thyroïdiennes	8
2.1. L'IODURE	8
2.2. LA THYROGLOBULINE ET LA THYROPEROXYDASE	9
2.3. LE SYSTÈME GÉNÉRATEUR D' H_2O_2	10
2.4. HYPOTHYROÏDIES CONGÉNITALES AVEC DÉFAUT D'ORGANIFICATION DE L'IODURE.....	11
2.5. FONCTIONS DES HORMONES THYROÏDIENNES	12
3. Régulation du métabolisme thyroïdien	12
3.1. LA TSH ET SON RÉCEPTEUR	12
3.2. RÉGULATION DE LA PRODUCTION D' H_2O_2 DANS LA THYROÏDE	13
4. La famille des NADPH oxydases	13
4.1. DE Nox1 À Nox5	13
4.1.1. gp91 ^{phox} /Nox2	14
4.1.2. Nox1	16
4.1.3. Nox3	17
4.1.4. Nox4	18
4.1.5. Nox5	18
4.2. DUOX1 ET DUOX2	19
4.2.1. CLONAGE, STRUCTURE, LOCALISATION	19
4.2.2. RÉGULATION DE L'EXPRESSION DES ARN MESSAGERS ET DES PROTÉINES DUOX DANS LA THYROÏDE ..	20
4.2.3. DÉFAUTS D'ORGANIFICATION DE L'IODURE LIÉS AUX GÈNES <i>DUOX</i>	21
4.2.4. LES PROTÉINES DUOX EXPRIMÉES EN DEHORS DE LA THYROÏDE	22
4.2.4.1. Rôle des protéines Duox dans les voies respiratoires	23
4.2.4.2. Rôle des protéines Duox dans le système digestif	24
4.2.4.3. Duox dans <i>C. elegans</i>	24
4.2.4.4. Rôle de Duox dans la fertilisation	25
4.2.5. DUOX1 ET DUOX2: FACTEURS DE MATURATION RESPECTIFS DE DUOX1 ET DUOX2	25
<i>II. Méthodes expérimentales</i>	28
1. Construction des vecteurs d'expression des siRNAs	28
2. Extraction d'ARN et RT-PCR	28
3. Cultures cellulaires	29
4. Quantification des transcrits des Duox dans les PCCL3 et la thyroïde de rat	29
5. Constructions des plasmides codant pour les protéines Duox	30
6. Transfections cellulaires	31
7. Mesure de la production d' H_2O_2	31
8. Cytométrie de flux (FACS)	32
9. Détection des protéines par Western Blot	33
10. Immunoprécipitations	33
11. Captation d'iode	34

12. Mutagenèse dirigée	34
13. Production de lentivirus	35
14. Phosphorylations des Duox	36
14.1. PAR INCORPORATION DE PHOSPHORE RADIOACTIF <i>IN VIVO</i>	36
14.2. PAR INCORPORATION DE PHOSPHORE RADIOACTIF <i>IN VITRO</i>	36
14.3. PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE	37

III. But du travail	38
---------------------------	----

IV. Résultats	39
---------------------	----

1. Inhibition de l'expression des protéines Duox dans la lignée de thyrocytes de rat PCCL3 par la méthode des siRNAs	39
1.1. CONSTRUCTIONS DES VECTEURS PLASMIDIQUES CODANT POUR LES siRNAs	39
1.1.1. PRINCIPE	39
1.1.2. SÉLECTION DES siRNAs	40
1.2. VALIDATION DES siRNAs PAR CO-EXPRESSION AVEC PROTÉINES LES DUOX EN CELLULES CHO	40
1.3. TRANSFECTION TRANSITOIRE DES siRNAs DANS LA LIGNÉE PCCL3	41
1.3.1. MESURE DE LA PRODUCTION D'H ₂ O ₂ DES PCCL3 TRANSFECTÉES TRANSITOIREMENT	41
1.3.2. ANALYSE DE L'EXPRESSION DES ARN MESSAGERS DE DUOX1 ET DUOX2 PAR RT-PCR DANS LES PCCL3 TRANSFECTÉES TRANSITOIREMENT	41
1.4. TRANSFECTION STABLE DES siRNAs DANS LA LIGNÉE PCCL3	42
1.4.1. PRODUCTION D'H ₂ O ₂ PAR LES PCCL3 EXPRIMANT UN siRNA CONTRE DUOX	42
1.4.2. EXPRESSION DES PROTÉINES DUOX DANS LES CLONES DE PCCL3 EXPRIMANT UN siRNA DIRIGÉ CONTRE DUOX	43
1.4.3. EXPRESSION DES TRANSCRITS DES DUOX DANS LES CLONES DE PCCL3 EXPRIMANT UN siRNA DIRIGÉ CONTRE DUOX	43
1.4.4. ANALYSE DE LA FONCTION THYROÏDIENNE DANS LES PCCL3 EXPRIMANT LE siRNA D1-65	44
1.5. ANALYSE DE L'EXPRESSION RELATIVE DES TRANSCRITS DE DUOX1 ET DUOX2 DANS LA LIGNÉE DE PCCL3 ET DANS DU TISSU DE THYROÏDE DE RAT	45
1.5.1. COMPARAISON DE L'EXPRESSION DE DUOX1 ET DUOX2 DANS DES LIGNÉES DE THYROCYTES DE RAT ET DANS DU TISSU DE THYROÏDE DE RAT PAR RT-PCR	45
1.5.2. COMPARAISON DE L'EXPRESSION DE DUOX1 ET DUOX2 DANS DES LIGNÉES DE THYROCYTES DE RAT ET DANS DU TISSU DE THYROÏDE DE RAT PAR SOUS-CLONAGE	46
1.6. RÉ-EXPRESSION DE DUOX1 PAR L'UTILISATION DE LENTIVIRUS DANS LES CLONES DE PCCL3 INVALIDÉS	47
1.7. PRODUCTION DE LENTIVIRUS EXPRIMANT UN siRNA	48
1.7.1. VALIDATION DES siRNAs PAR CO-TRANSFECTION EN CHO	49
1.7.2. PRODUCTION DE LENTIVIRUS	49
1.7.3. ESTIMATION DU MOI NÉCESSAIRE POUR INFECTER DES THYROCYTES HUMAINS EN CULTURE PRIMAIRE	50
2. Etude de la régulation des protéines Duox en système hétérologue	51
2.1. RECONSTITUTION D'UN SYSTÈME GÉNÉRATEUR D'H ₂ O ₂ EN CELLULES COS-7	51
2.2. UTILISATION DE PROTÉINES DUOX PRÉSENTANT UN ÉPITOPE HA EN NH ₂ -TERMINAL	51
2.3. L'ACTIVITÉ DE LA PROTÉINE DUOX DÉPEND DE SON ACTIVATEUR HOMOLOGUE	52
2.4. RÉGULATION DE LA PRODUCTION D'H ₂ O ₂ EN RÉPONSE À DIFFÉRENTS AGENTS	53
2.5. ACTIVATION DES DUOX PAR LE CALCIUM	53
2.6. RÉGULATION DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DES PROTÉINES DUOX PAR LA VOIE DE L'AMP CYCLIQUE	55
2.6.1. ANALYSE DE LA RÉGULATION DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DES PROTÉINES DUOX PAR UN ANALOGUE DE L'AMPC	55
2.6.2. ANALYSE DE LA RÉGULATION DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DES PROTÉINES DUOX PAR SUR-EXPRESSION DE LA SOUS-UNITÉ CATALYTIQUE α DE LA PKA	55
2.7. RÉGULATION DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DES PROTÉINES DUOX PAR LA VOIE DES PHOSPHATIDYLINOSITOLS ACTIVANT LA PKC	56
2.8. ACTIVITÉ DES PROTÉINES DUOX EXPRIMÉES DANS LA LIGNÉE CELLULAIRE HTORI	56
3. Etude de la phosphorylation des protéines Duox en système hétérologue	58

3.1. RECHERCHE DE SITES POTENTIELLEMENT PHOSPHORYLÉS PAR LA PKA	58
3.1.1. RECHERCHE DE PHOSPHORYLATIONS PAR UTILISATION D'UN ANTICORPS SPÉCIFIQUE	58
3.1.2. RECHERCHE DE PHOSPHORYLATIONS PAR INCORPORATION DE PHOSPHORE RADIOACTIF	59
3.1.3. RECHERCHE DE PEPTIDES PHOSPHORYLES DANS DUOX1 PAR SPECTROMETRIE DE MASSE	59
3.2. ETUDE DES MUTATIONS DANS LES SITES DE DUOX1 THEORIQUEMENT PHOSPHORYLES PAR LA PKA ..	60
3.2.1. ANALYSE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DES SIMPLES MUTANTS DUOX1	60
3.2.2. ANALYSE DE LA PHOSPHORYLATION DES SIMPLES MUTANTS DUOX1	60
3.2.3. ANALYSE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DU DOUBLE MUTANT DUOX1	61
3.2.4. ANALYSE DE LA PHOSPHORYLATION DU DOUBLE MUTANT DUOX1	61
3.3. RECHERCHE DE SITES POTENTIELLEMENT PHOSPHORYLÉS PAR LA PKC	61
3.3.1. RECHERCHE DE PHOSPHORYLATIONS PAR UTILISATION D'UN ANTICORPS SPÉCIFIQUE	61
3.3.2. RECHERCHE DE PHOSPHORYLATIONS PAR INCORPORATION DE PHOSPHORE RADIOACTIF	62
3.3.3. PHOSPHORYLATION <i>IN VITRO</i> DE DUOX2 PAR LA PKC	62
3.4. ETUDE DES MUTATIONS DANS LES SITES DE DUOX2 THEORIQUEMENT PHOSPHORYLES PAR LA PKC ..	63
3.4.1. ANALYSE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DES SIMPLES MUTANTS DUOX2	63
3.4.2. ANALYSE DE LA PHOSPHORYLATION DES SIMPLES MUTANTS DUOX2	64
3.4.2.1. <i>Par utilisation de l'anticorps anti-sérines phosphorylées par la PKC</i>	<i>64</i>
3.4.2.2. <i>Par phosphorylation in vitro</i>	<i>64</i>
4. Etude de la production de peroxyde d'hydrogène de thyrocytes humains en culture	
primaire	65
4.1. REGULATION DE L'EXPRESSION DES PROTEINES DUOX EN REPONSE A LA TSH	65
4.2. REGULATION DE LA PRODUCTION D'H ₂ O ₂ PAR L'IONOMYCINE ET LE PMA	65
4.3. REGULATION DE LA PRODUCTION D'H ₂ O ₂ PAR LE PMA	66
4.4. PHOSPHORYLATION DES PROTEINES DUOX	66
4.4.1. PAR UTILISATION D'UN ANTICORPS	66
4.4.2. PAR INCORPORATION DE PHOSPHORE RADIOACTIF	66
4.5. EXPRESSION DE LA PROTEINE NOXA1	67
V. Discussion	68
1. <i>Le système générateur d'H₂O₂ des PCCL3</i>	<i>69</i>
2. <i>Régulation de l'activité de protéines Duox en cellules Cos-7</i>	<i>72</i>
2.1. REGULATION PAR LE CALCIUM	73
2.2. REGULATION PAR PHOSPHORYLATIONS DEPENDANTES DE LA PKA	74
2.3. REGULATION PAR PHOSPHORYLATIONS DEPENDANTES DE LA PKC	75
2.4. PRODUCTION DE ROS PAR LES PROTEINES DUOX: H ₂ O ₂ OU O ₂ •?	78
3. <i>Régulation de l'activité des protéines Duox dans des cultures primaires de thyroïde</i>	
<i>humaine</i>	<i>79</i>
4. <i>Conclusions</i>	<i>81</i>

Références	84
-------------------------	-----------

Annexes