

Table des matières

Introduction.....	8
1. La famille des NADPH oxydases	8
I. Nox2/gp91 ^{phox}	9
II. Nox1.....	11
III. Nox3.....	13
IV. Nox4.....	14
V. Nox5.....	16
2. Les enzymes Duox1 et Duox2	18
I. Caractéristiques biochimiques et structurales.....	18
II. Régulation transcriptionnelle.....	21
III. Régulations post-traductionnelles.....	22
a. Régulation par le calcium.....	22
b. Régulation par les phosphorylations	23
IV. Les facteurs de maturation DuoxA	23
V. Activité des Duox.....	26
3. Physiologie thyroïdienne et rôle des Duox	28
I. La thyroïde	28
II. Les hormones thyroïdiennes.....	29
a. Structure	29
b. Synthèse.....	30
c. Transport et fonctions	31
III. Régulation du métabolisme thyroïdien	32
IV. Mécanismes de défense contre les ROS	34
4. Duox dans les autres tissus	37
5. Pathologies associées à Duox et DuoxA	39
I. L'hypothyroïdie congénitale	39
II. Les cancers thyroïdiens.....	42
III. Les cancers non-thyroïdiens.....	44
IV. Les maladies inflammatoires.....	46
But du travail	48
Stratégie et description du modèle.....	49
Matériel et Méthodes.....	51

1. Culture cellulaire et transfection transitoire	51
2. Constructions plasmidiques et mutagenèse.....	51
3. Obtention de clones cellulaires stables Duox/DuoxA	52
4. Cultures primaires de thyrocytes humains	54
5. Génération d'un anticorps anti-DuoxA (1349).....	54
6. Cytométrie en flux.....	55
7. Mesure de la production de peroxyde d'hydrogène.....	56
8. Mesure de la production d'anions superoxydes.....	56
9. Etude des interactions protéiques – Duolink®	57
10. Mesure des dégâts à l'ADN – Phosphorylation de l'histone H2AX.....	59
11. Mise en évidence du stress oxydatif intracellulaire	60
12. Immunofluorescence.....	60
13. Extraction et dosage des protéines	61
14. Western blot et études de déglycosylation	62
15. Etude de la stabilité des protéines (traitement au cycloheximide).....	63
16. Co-immunoprécipitations	63
17. Analyses statistiques	64
Résultats.....	65
1. Article	65
2. Résultats complémentaires à l'article	101
I. Génération et caractérisation des clones HEK293 Tet-On3G	101
II. Activité des enzymes Duox dans les clones HEK293 Tet-On3G	105
a. Inhibition de Duox1 et Duox2 par des inhibiteurs des Nox/Duox.....	105
b. Mesure de la production d'anions superoxydes par Duox	108
III. Importance du partenaire sur la stabilité et la localisation des protéines Duox et de leurs facteurs de maturation DuoxA	110
IV. Etude de l'interaction membranaire entre Duox et DuoxA	114
V. Dommages à l'ADN causés par l'H ₂ O ₂ produit par les enzymes Duox.....	118
VI. Rôle de la glycosylation des facteurs de maturation sur l'expression et l'activité des enzymes DUOX.....	120
a. Etude de la glycosylation des protéines DuoxA	120
b. Mutation des sites de glycosylation de DuoxA.....	122
c. Impact de l'absence de glycosylation de DuoxA sur les Duox.....	125
Discussion.....	129
1. Utilisation d'un système cellulaire hétérologue pour étudier les mécanismes d'activation des enzymes Duox.....	129

2. Etude de l'activité des enzymes Duox	134
I. L'activité des Duox dépend de leur facteur de maturation	134
II. Le couple Duox2/DuoxA2 est plus actif que le couple Duox1/DuoxA1	136
III. Les inhibiteurs des Nox/Duox.....	137
3. La stabilité des protéines Duox et DuoxA dépend du partenaire coexprimé.....	138
4. Les protéines Duox interagissent avec leur facteur de maturation à la surface des cellules..	140
5. L'H ₂ O ₂ produit par le couple Duox2/DuoxA2 induit des dégâts à l'ADN	142
6. La glycosylation de DuoxA2 est nécessaire pour la maturation et l'activité de Duox2.....	144
I. Etude de la glycosylation des protéines DuoxA	144
II. Mutation des sites de glycosylation des protéines DuoxA	145
Conclusion générale et perspectives	149
Références.....	153