

# **Contribution à l'étude de l'expression des gènes ThOX et DuOXA et du rôle du facteur de transcription Pax8 dans le thyrocyte**

Ing M. DELLA GIUSTINA

Dr D. CHRISTOPHE

Dr C. CHRISTOPHE-HOBERTUS

ISICHt -- Mons

*Cet article présente un aperçu du travail de fin d'étude réalisé au sein de l'IRIBHM à l'Université Libre de Bruxelles. Ce travail, nous a permis de mettre au point une méthode permettant de comparer les abondances relatives de divers ARNm au sein d'un type cellulaire en utilisant les résultats de q-PCR sur ADN génomique pour normaliser les résultats de RT-qPCR correspondants. Nous avons aussi participé à un projet visant à identifier l'ensemble des gènes dont l'expression dépend du facteur de transcription Pax8 dans la cellule thyroïdienne.*

*Mots clés : biologie moléculaire, endocrinologie, ADN, ARN, facteurs de transcription, RT-qPCR, culture cellulaire, clonage.*

*We report here a work that was performed at the Université Libre de Bruxelles within the Institute of Interdisciplinary Research in Human and Molecular Biology. In this work, we set up a method allowing to compare the relative amounts of selected mRNAs within a given cell type using RT-qPCR and qPCR on genomic DNA for normalization. Another part of the work aimed at the identification of the whole set of genes that is transcriptionally controlled by the Pax8 protein in the thyrocyte..*

*Keywords: molecular biology, endocrinology, DNA, RNA, transcription factors, RT-qPCR, cell culture, cloning.*

## **1. Etude bibliographique**

### **1.1 La thyroïde [1,2]**

La thyroïde, une glande endocrine bilobée située à la base du cou, est le siège de la synthèse des hormones thyroïdiennes, T3 et T4, indispensables au développement et au bon fonctionnement de l'organisme. Chez l'homme, elle pèse 25 à 30 grammes. La glande est organisée en follicules et contenue dans une capsule fibreuse. Le follicule thyroïdien, l'unité fonctionnelle, a une structure sphérique creuse, constituée d'une monocouche de cellules épithéliales, les thyrocytes, délimitant la lumière folliculaire, contenant le colloïde au sein duquel la thyroglobuline iodée, le précurseur des hormones thyroïdiennes, est stockée.

Les thyrocytes sont des cellules polarisées. Leur pôle basal est en contact avec les capillaires sanguins et leur pôle apical est orienté vers le colloïde.

D'autres cellules sont localisées à la membrane basale de l'épithélium folliculaire : les cellules parafolliculaires C sécrétant la calcitonine. Cette hormone participe au métabolisme du phosphore et du calcium jouant un rôle important dans la résorption osseuse.

### **1.2. Synthèse des hormones thyroïdiennes [1]**

La synthèse des hormones thyroïdiennes est contrôlée par la thyrotropine (TSH), produite par l'hypophyse, grâce à sa liaison à son récepteur (TSHR). Divers éléments spécifiques de la thyroïde sont nécessaires pour la synthèse des hormones thyroïdiennes : la thyroglobuline (Tg), l'activité enzymatique de la thyroperoxydase (TPO), un système générateur d' $H_2O_2$ . Un apport d'iode, est aussi indispensable à la synthèse des hormones thyroïdiennes, il est fourni par l'alimentation. Son apport en quantité suffisante est nécessaire pour éviter les hypothyroïdies.

Les principales étapes de la production des hormones sont résumées à la figure 1.

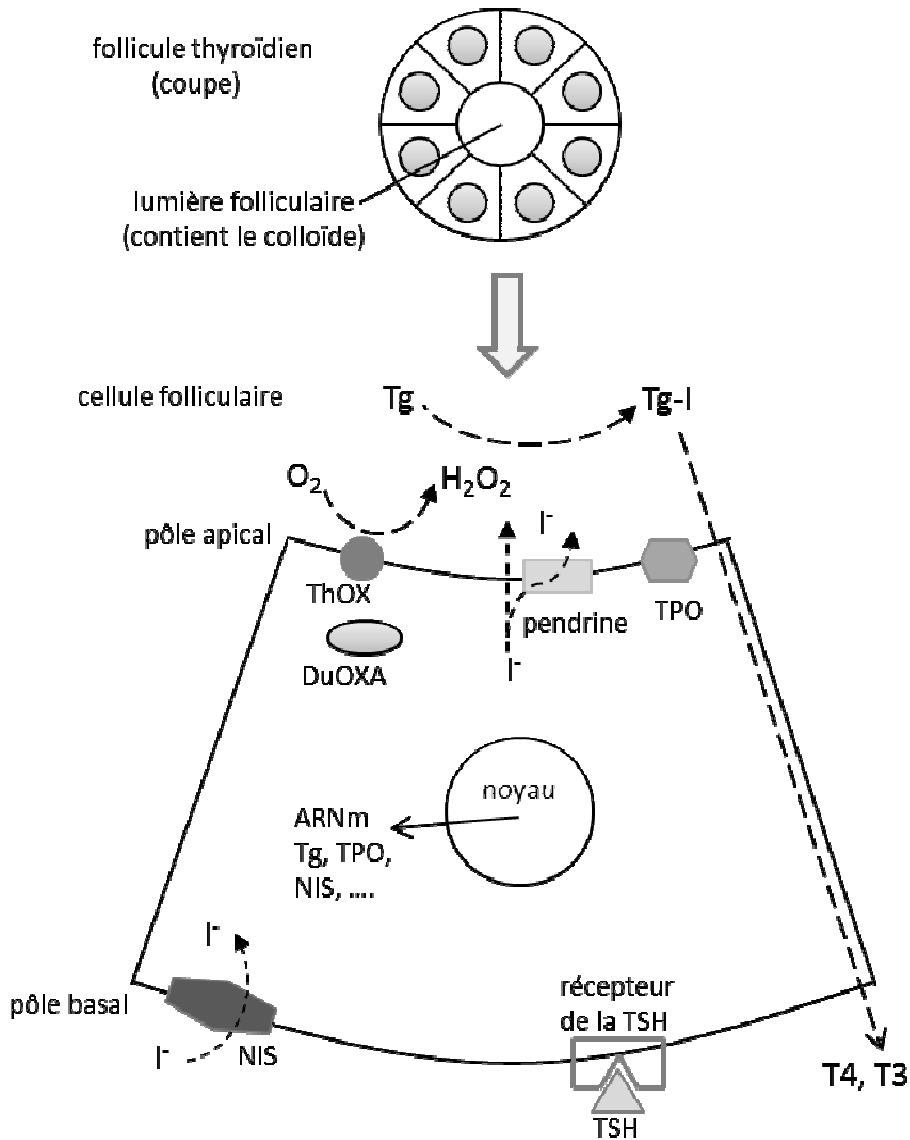


Figure 1 : Représentation schématique des éléments nécessaires à la synthèse des hormones thyroïdiennes au sein du thyrocyte

L'iodure est capté au pôle basolatéral du thyrocyte par le symporteur  $Na^+/I^-$  (NIS) et est transporté vers le cytoplasme du thyrocyte. Ensuite, l'iodure est transporté jusqu'au pôle apical de la cellule où il est exporté dans la lumière folliculaire par un mécanisme encore mal décrit qui semble impliquer la pendrine.

L'iode est oxydé grâce à l'activité enzymatique de la thyroperoxydase, localisée sur la membrane apicale, en présence de peroxyde d'hydrogène. Cet oxydant puissant est produit grâce à l'activité NADPH oxydase des protéines ThOX1 et ThOX2 (thyroid oxidase 1 et 2) en présence de leur facteur de maturation respectif DuOXA1 et DuOXA2 (dual oxidase maturation factor 1 et 2).

La forme oxydée de l'iode se lie à des résidus tyrosyls de la thyroglobuline, sécrétée et stockée dans le colloïde pour donner naissance aux précurseurs des hormones thyroïdiennes: mono-iodo-tyrosine (MIT) et di-iodo-tyrosine (DIT).

Le couplage des MIT et DIT par la TPO résulte en la formation des hormones T3 et T4. La cellule folliculaire, stimulée par la TSH, endocyte la thyroglobuline iodée et la protéolyse dans un lysosome avant de déverser les hormones T3 et T4 dans la circulation sanguine.

### 1.3 Facteur de transcription Pax8 [1]

La protéine Pax8 (Paired box gene 8), est un facteur de transcription impliqué dans le développement de la glande thyroïde et dans le contrôle de la transcription des gènes spécifiques de cet organe : Tg et TPO.

Pax8 est présent dans l'ébauche thyroïdienne dès les 1ers stades du développement. Chez la souris, il apparaît dès le stade embryonnaire et reste exprimé durant toutes les étapes ultérieures du développement thyroïdien.

Pax8 est aussi exprimé dans les reins, le placenta, les ovaires et le cerveau.

La protéine Pax8 est caractérisée par (voir la figure 2):

- un domaine *paired*, composé de 128 acides aminés et situé à l'extrémité amino-terminale de la protéine, constituant le domaine de liaison à l'ADN,
- un homéodomaine tronqué situé à l'extrémité carboxy-terminale du domaine *paired*,
- un domaine de régulation de l'activité transcriptionnelle situé à l'extrémité carboxy-terminale de la protéine.

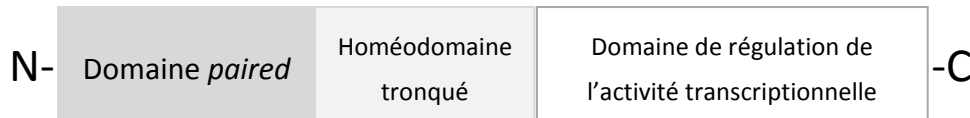


Figure 2 : Représentation schématique de la structure de la protéine Pax8

L'invalidation du gène Pax8 chez la souris entraîne la formation d'une thyroïde dépourvue de follicules et constituée presque uniquement de cellules parafolliculaires C. Les souris meurent par manque d'hormones thyroïdiennes.

Ce facteur de transcription paraît donc capital pour la prolifération et la différenciation des cellules thyroïdiennes.

Un projet visant à identifier l'ensemble des gènes dont l'expression est contrôlée par Pax8 au sein de la cellule thyroïdienne, a été entamé dans le laboratoire d'accueil. Notre participation à ce projet a consisté à réaliser les constructions plasmidiques permettant l'expression d'un antagoniste de Pax8 et à générer des lignées de cellules thyroïdiennes exprimant cet antagoniste de manière inductible.

#### 1.4. Système générateur d' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans la thyroïde : les protéines ThOX1, ThOX2, DuOXA1 et DuOXA2 [2]

L'expression des protéines ThOX1 et ThOX2 et de leur facteur de maturation respectif DuOXA1 et DuOXA2 est nécessaire pour la formation d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> au sein du follicule thyroïdien.

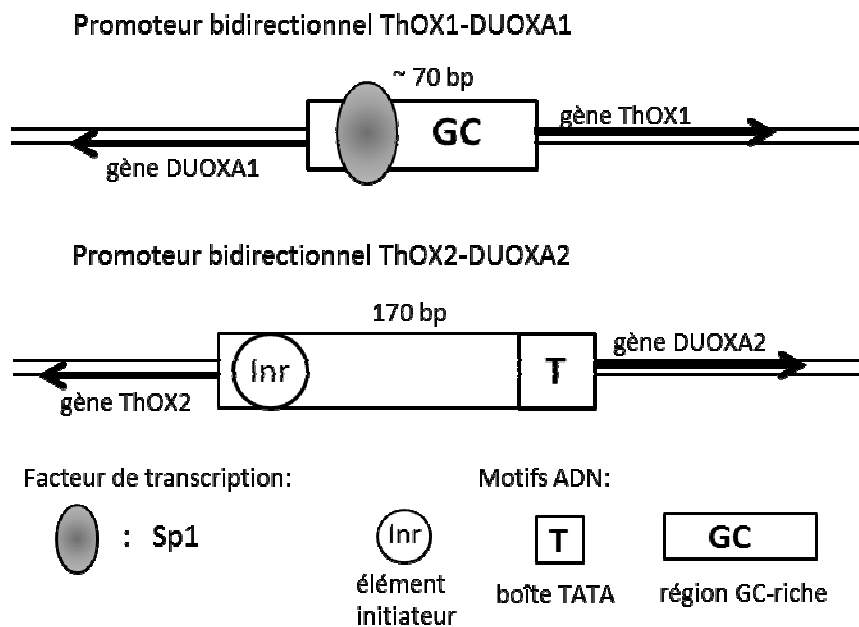
Chaque couple, ThOX1-DuOXA1 d'une part, et ThOX2-DuOXA2 d'autre part, est suffisant pour assurer la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Néanmoins, le rôle de chacune de ces protéines n'est pas complètement élucidé.

Des mutations au niveau des gènes ThOX2 et DuOXA2 ont été mises en évidence chez des patients souffrant d'hypothyroïdie. Ces mutations entraînent la production de protéines tronquées. Jusqu'à présent, aucune mutation responsable d'hypothyroïdie, n'a été trouvée au niveau des gènes ThOX1 et DuOXA1.

Les protéines ThOX et DuOXA présentent une similitude de séquence importante : 75 % de similitudes entre ThOX1 et ThOX2, et 57% entre DuOXA1 et DuOXA2.

En plus de la thyroïde, elles sont exprimées au sein de divers organes comme la peau, la prostate, les voies respiratoires, le système digestif ....

Les gènes ThOX1, ThOX2, DuOXA1 et DuOXA2 sont situés à proximité les uns des autres. Les gènes ThOX et DuOXA sont disposés dans des directions opposées à proximité l'un de l'autre (fig.3): ThOX1 dos à DuOXA1 et ThOX2 dos à DuOXA2.



*Figure 3 : Organisation des promoteurs bidirectionnels des gènes ThOX et DuOXA chez le rat*

L'expression des gènes ThOX1 et DuOXA1 est contrôlée par un promoteur bidirectionnel s'étendant sur environ 70 paires de bases, qui contient une région riche en bases GC et deux sites de liaison pour le facteur de transcription sp1 [3].

L'expression des gènes ThOX2 et DuOXA2 est également contrôlée par un promoteur bidirectionnel d'environ 170 nucléotides qui contient une TATA box (en amont du gène DuOXA2) et un élément initiateur, INR (en amont du gène ThOX2) [3].

A ce jour, seules des mesures semi-quantitatives ont permis d'évaluer l'abondance relative des ARNm ThOX1 (Th1) et ThOX2 (Th2) dans les thyrocytes [4]. Aucune donnée n'est répertoriée pour les ARNm DuOXA1 (DuA1) et DuOXA2 (DuA2).

Afin de pouvoir mesurer les abondances relatives de ces 4 ARNm au sein de lignées de cellules thyroïdiennes de rat, nous avons mis au point une méthode permettant de comparer les abondances relatives de divers ARNm au sein d'un type cellulaire par RT-qPCR, c'est-à-dire en effectuant une pcr quantitative au départ d'ADN complémentaires obtenus par rétro-transcription des ARNm. Les résultats obtenus sont normalisés par rapport à ceux obtenus par q-PCR au départ d'ADN génomique.

## **2. Stratégie et résultats**

### **2.1 Mesure de l'abondance relative des ARNm Th1, Th2, DuA1 et DuA2 par RT-qPCR**

#### ***Principe de la PCR quantitative***

La PCR quantitative permet la détection en temps réel de la quantité d'amplicon formé, après chaque cycle, grâce à une mesure de la fluorescence, suite à l'incorporation de SybrGreen dans l'ADN double brin. Le Ct correspond au cycle à partir duquel la quantité d'ADN produite génère un signal de fluorescence supérieur au bruit de fond.

Donc, au plus le Ct est petit, au plus la quantité d'ADN cible est grande.

En théorie, si l'efficacité de la PCR est de 100%, la quantité d'amplicon formé double à chaque cycle. Donc, une différence de Ct égale à 1, correspond à un facteur 2 au niveau de la quantité d'amplicon.

***Etapes de la procédure suivie :***

- Préparations d'ARN total et d'ADN génomique (ADNg) à partir de 2 lignées de cellules thyroïdiennes de rat indépendantes : PCCI3 et FRTL-5 [5].
- Elimination de l'ADN génomique contaminant la préparation d'ARN par un traitement à la DNaseI
- Préparation d'ADN complémentaire (ADNc) par rétro-transcription (RT) des ARN
- qPCR sur l'ADNc et sur l'ADN génomique
- Analyse des résultats

***Résultats et interprétation***

Les valeurs de Ct obtenues pour les différentes PCR (Th1, Th2, DuA1 et DuA2) ne peuvent pas être comparées les unes aux autres car les différentes PCR n'ont pas nécessairement la même efficacité.

Afin de pouvoir comparer entre elles les valeurs de Ct obtenues pour ces différentes PCR (Th1, Th2, DuA1, DuA2) effectuées sur la préparation d'ADNc, nous avons normalisé les valeurs par rapport à celles obtenues par q-PCR sur l'ADN génomique. En effet, les ADN cibles sont présents en quantité équivalente dans l'ADN génomique. Donc, dans le cas de l'ADN génomique, les différences entre les valeurs de Ct observées entre les différentes PCR reflètent les différences d'efficacité de ces PCR.

Classiquement, un des problèmes potentiels associé à la RT-qPCR est l'amplification de séquences génomiques qui contaminent la préparation d'ADN complémentaire. Il est donc judicieux de placer les amorces dans des exons différents de sorte que les produits attendus de l'amplification d'ADN complémentaire ou d'ADN génomique soient de tailles différentes. Si l'intron est très grand, nous n'observerons pas d'amplification au départ d'ADN génomique. Cette manière de procéder permet d'éviter l'amplification d'un amplicon non spécifique.

Contrairement, à ce qui est habituellement réalisé dans les expériences de RT-qPCR, nous avons positionné les amorces sens et antisens dans le même exon de manière à générer exactement le même amplicon au départ d'ADN complémentaire et d'ADN génomique.



Pour chaque gène, nous avons choisi de positionner les amorces dans le dernier exon pour les raisons suivantes:

- la région est spécifique pour chacun des gènes,
- l'exon est de grande taille et facilite le choix de la position des amorces

Afin de vérifier que dans les échantillons d'ADN complémentaire l'amplification observée ne provient pas d'une contamination par de l'ADN génomique présent dans la préparation, toutes les q-PCR ont été réalisées en parallèle, à partir d'un échantillon d'ARN total non rétrotranscrit (RT-).

***Méthode de calcul de l'abondance relative des ADNc (ARNm)***

Nous décrivons ci-dessous les calculs effectués pour déterminer l'abondance relative des ARNm.

A titre d'exemple, les valeurs reprises dans le tableau 1 correspondent aux résultats obtenus après RT-qPCR sur l'ARNm préparé à partir de cellules PCCl3 pour les ARNm ThOX1 et DuOXA1. Les valeurs de Ct observées dans le cas de PCR effectuées sur l'ADN génomique permettront de normaliser les résultats.

	ThOX1	DUOXA1
Ct ADNg	25,36	24,20
Ct ADNc	28,16	29,14

*Tableau 1 : Ct obtenus au départ de l'ADN génomique et de l'ADN complémentaire de cellules PCCl3*

$$\Delta_{Ct} \text{ ADNc} = Ct \text{ ThOX1} - Ct \text{ DuOXA1} = 28,16 - 29,14 = - 0,98$$

$$\Delta_{Ct} \text{ ADNg} = Ct \text{ ThOX1} - Ct \text{ DuOXA1} = 25,36 - 24,20 = 1,16$$

$$\Delta\Delta_{Ct} = \Delta_{Ct} \text{ ADNc} - \Delta_{Ct} \text{ ADNg} = - 0,98 - 1,16 = - 2,14$$

$$| \text{différence approximative d'expression entre les 2 gènes} | = 2^{\Delta\Delta_{Ct}} = 2^{-2,14} = 0,23$$

Dans l'exemple ci-dessus, nous avons considéré une efficacité de la PCR de 100%. En réalité, toutes les PCR n'ont pas la même efficacité et celle-ci peut être légèrement inférieure à 100%. Dans ce cas, la quantité d'amplicons formés ne double pas à chaque cycle et dans l'expression  $n^{\Delta Ct}$ , n peut être légèrement inférieur à 2. La différence d'expression mesurée est donc approximative.

Afin de déterminer, lequel des deux gènes est plus exprimé que l'autre, nous comparons, pour chaque gène, la différence entre les Ct ADN génomique et ADN complémentaire. Dans notre exemple, nous observons que le Ct DuOXA1 est inférieur au Ct ThOX1 dans le cas de la PCR sur l'ADN génomique (même nombre de copies), par contre il est supérieur dans le cas de la PCR sur l'ADNc, donc il y a moins de copies d'ADNc DuOXA1 que ThOX1.

En posant arbitrairement ThOX1 à 1, il en ressort que l'abondance relative de l'ARN messager de ThOX1 est environ 4,35 fois plus élevée que l'abondance relative de l'ARN messager de DuOXA1.

#### ***Validation des résultats***

Afin de valider nos résultats, nous avons vérifié la linéarité de la relation entre les valeurs de Ct mesurées et la quantité d'ADN engagée dans la PCR. Ceci a été vérifié pour les PCR effectuées sur de l'ADN génomique et sur de l'ADN complémentaire, préparés à partir de cellules PCCI3.

Nous avons engagé d'une part, 5ng, 20ng et 80ng d'ADN génomique, et d'autre part 1,56ng, 6,25ng et 25ng d'ADN complémentaire.

Les résultats présentés ci-dessous (fig.4), provenant chacun de 2 expériences indépendantes, montrent que les valeurs de Ct obtenues sont proportionnelles aux quantités d'ADN cible engagé, dans les deux cas.

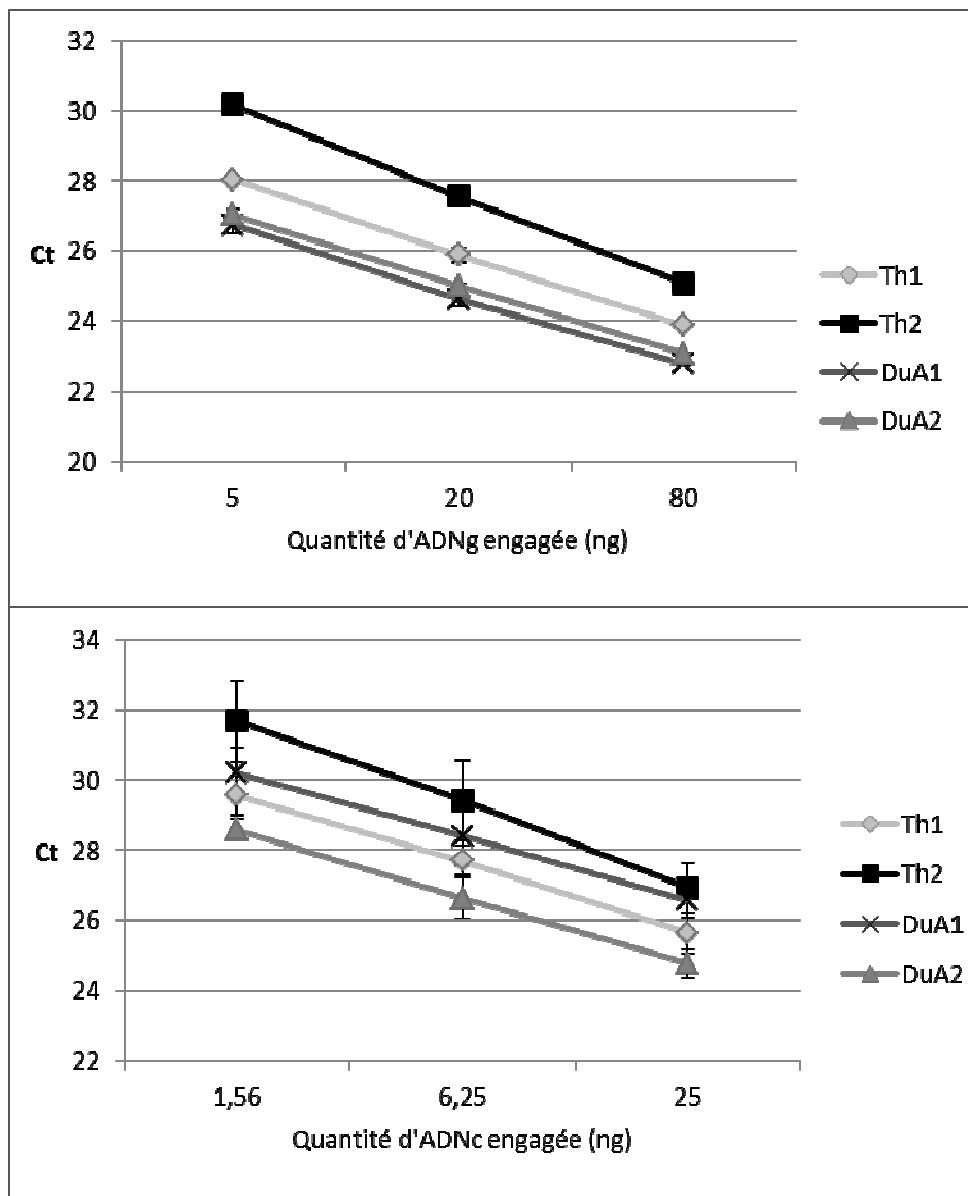


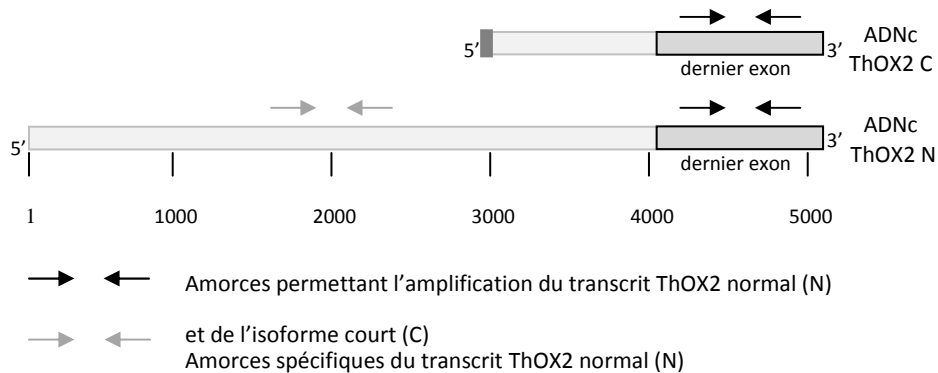
Figure 4. Mesures de Ct en fonction de la quantité d'ADN engagée

### *Analyse des résultats*

Les expériences de RT-qPCR ont été réalisées au départ d'ARN issus de 2 lignées de cellules thyroïdiennes de rat : les PCC13 et les FRTL5.

En ce qui concerne ThOX2, la présence d'un isoforme court dans les cellules PCC13 et FRTL5 a été décrite par Morand et al [6]. Cet ARNm est dépourvu de la partie 5' de l'ARNm ThOX2, son rôle n'est actuellement pas connu.

Au cours de nos expériences de RT-qPCR, nous avons amplifié d'une part, une région commune aux 2 isoformes (située dans le dernier exon), et d'autre part, une région spécifique du transcrite ThOX2 normal (voir figure 5).

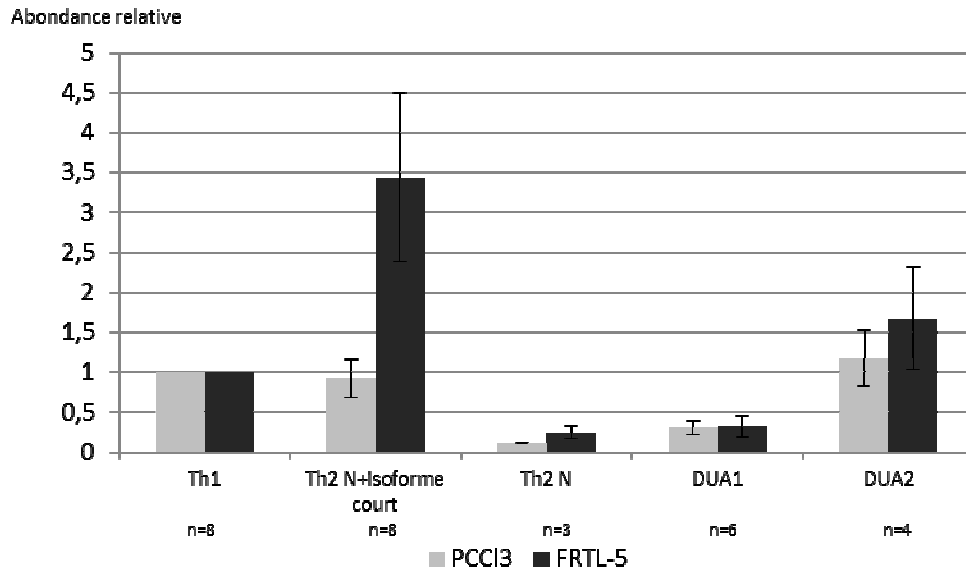


*Figure 5 : Représentation schématique des ADN complémentaires de ThOX2 normal et de l'isoforme court et positions des amorces utilisées*

Les résultats obtenus (fig.6) montrent que l'ARNm DuOXA2 est plus abondant que celui de DuOXA1, dans les 2 types cellulaires.

D'autre part, les résultats obtenus montrent que l'ARNm de ThOX2 (Th2 N) est moins abondant que celui de ThOX1 dans les cellules PCC13 et FRTL5, ce qui confirme les données semi-quantitatives disponibles [4].

Ces résultats confirment aussi la présence d'un isoforme court ThOX2, particulièrement abondant dans les cellules FRTL5 [6].



n : nombre de mesures indépendantes effectuées.

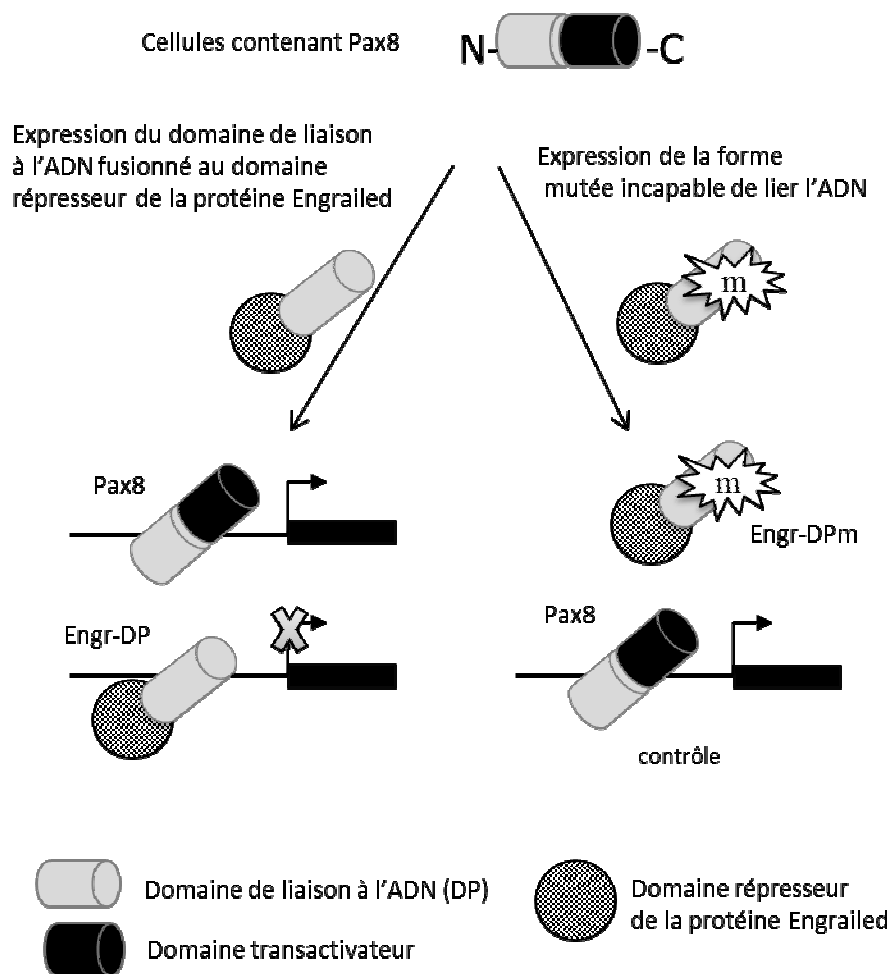
*Figure 6 : Abondance relative des ARNm ThOX1, ThOX2, DuOX1 et DuOX2 au sein des cellules PCCl3 et FRTL5. Les valeurs sont normalisées arbitrairement par rapport à ThOX1.*

## 2.2 Contribution à l'étude visant à identifier l'ensemble des gènes dont l'expression est dépendante du facteur de transcription Pax8 dans la cellule thyroïdienne

Notre but est de générer d'une part, une lignée de cellules thyroïdiennes de rat exprimant de manière inducible, un antagoniste de Pax8 et d'autre part, une lignée "contrôle" exprimant la protéine antagoniste mutée de manière à abolir sa capacité de liaison à l'ADN (fig.7).

La protéine antagoniste « engr-DP » est composée du domaine paired de Pax8, permettant la liaison à l'ADN, et du domaine répresseur de la protéine engrailed de drosophile. Lorsque cette protéine antagoniste est exprimée dans le thyrocyte, elle peut entrer en compétition avec le facteur Pax8

endogène pour la liaison à l'ADN. Lorsque Pax8, qui est un activateur de la transcription, est remplacé par la protéine antagoniste au niveau des séquences promotrices d'un gène, l'expression de ce gène s'en trouve réduite en raison de l'activité de répresseur transcriptionnel de la protéine antagoniste. La protéine antagoniste mutée « engr-DPm », n'étant plus capable de lier l'ADN, n'influencera pas la liaison de Pax8 endogène sur ses séquences cibles.



↳ : représente le point de départ de la transcription

Figure 7 : Stratégie utilisée afin d'identifier l'ensemble des gènes dont l'expression requiert l'activité du facteur de transcription Pax8

### ***Système inductible Tet-Off [7]***

Nous avons choisi d'utiliser le système inductible Tet-Off pour exprimer l'antagoniste de Pax8 (ou la protéine contrôle) de manière contrôlée au sein de la lignée cellulaire PCC13.

Le principe de la méthode est de générer en premier une lignée de cellules qui expriment un transactivateur (tTA) contrôlé par la tétracycline.

Cette protéine trans-activatrice artificielle hybride (tTA) est composée:

- du domaine activateur de la protéine virale VP16 du virus de l'*Herpès simplex*,
- du répresseur de la tétracycline, TetR (Tet Repressor protein), qui bloque la transcription des gènes de résistance à la tétracycline en se liant sur l'opérateur tetO en absence de tétracycline dans *Escherichia coli*.

Une lignée de cellules PCC13 exprimant le tTA était disponible au laboratoire d'accueil.

Cette lignée PCC13-tTA sera ensuite transfectée de manière stable par la construction plasmidique engr-DP-pTRE2hyg ou engr-DPm-pTRE2hyg, permettant l'expression de la protéine d'intérêt "engr-DP" ou « engr-DPm » sous dépendance du TRE (Tetracycline Response Element) (fig.8):

- en absence de doxycycline (un dérivé de la tétracycline), la protéine de fusion trans-activatrice (tTA), synthétisée dans les cellules PCC13-tTA, se fixe sur l'élément de réponse à la tétracycline (TRE), placé en amont du gène d'intérêt, et transactive l'expression du gène d'intérêt lié à cet élément,
- en présence de doxycycline, la protéine de fusion trans-activatrice (tTA), synthétisée dans les cellules PCC13-tTA, est incapable de se lier à l'élément de réponse à la tétracycline (TRE). L'expression du gène d'intérêt est inhibée

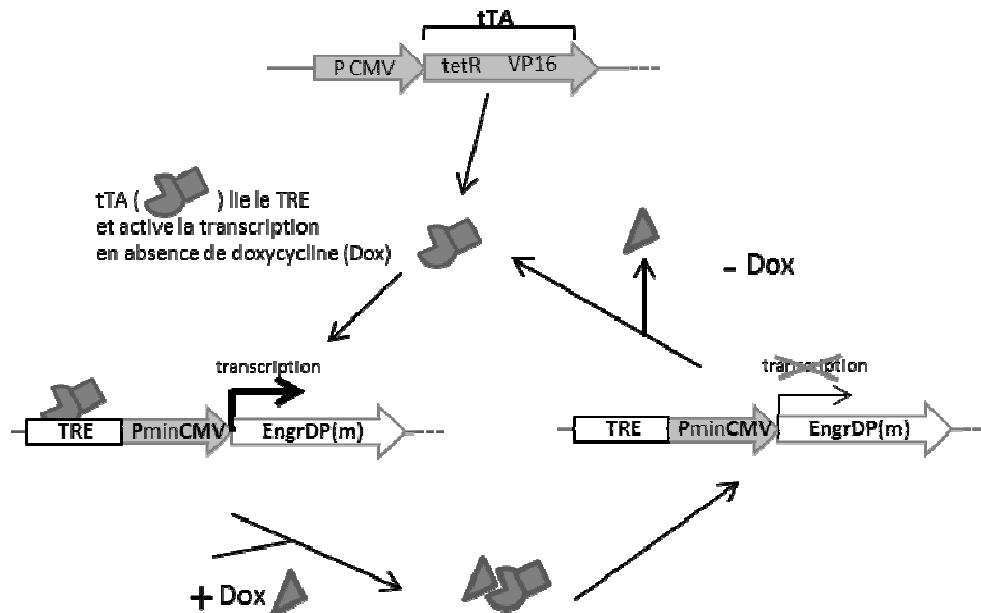


Figure 8 : Principe du système inductible Tet-Off

En absence de doxycycline, la protéine de fusion "engr-DP", capable de lier l'ADN, entrera en compétition avec Pax8 endogène tandis que "engr-DPm", incapable de lier l'ADN, n'aura aucun effet sur l'activation des promoteurs dépendant de Pax8.

### Stratégie générale

#### Clonage :

- Préparation des inserts « engr-DP » et « engr-DPm » par restriction enzymatique à l'aide des enzymes EcoRV et XbaI
- Préparation du vecteur pTRE2hyg par restriction enzymatique à l'aide des enzymes PvuII et NheI
- Ligation de l'insert au vecteur, transformation de bactéries et sélection des bactéries transformées sur milieu solide sélectif
- Identification des clones attendus par isolement de l'ADN plasmidique, restriction enzymatique et analyse du résultat par électrophorèse



- Vérification par séquençage que la totalité de l'insert soit exempt de mutations

*Transfection stable :*

- Transfection stable des constructions plasmidiques engr-DP/DPm-pTRE2hyg dans les cellules PCCI3-tTA en présence de doxycycline
- Sélection des cellules transfectées de manière stable, en présence d'hygromycine
- Isolement des clones cellulaires obtenus

*Stratégie de clonage*

Nous avons généré les constructions plasmidiques « engr-DP-pTRE2hyg » et « engr-DPm-pTRE2hyg » (fig.9).

Les fragments contenant les séquences codant engr-DP et engr-DPm sont excisés de constructions plasmidiques existant au laboratoire d'accueil. La construction existante ne permet pas d'exprimer la protéine antagoniste au moyen d'un système inductible.

Les fragments « engr-DP » et « engr-DPm » sont ensuite insérés dans le vecteur pTRE2Hyg (Clontech) de manière à ce que leur expression soit sous contrôle du TRE après transfection dans des cellules eucaryotes.

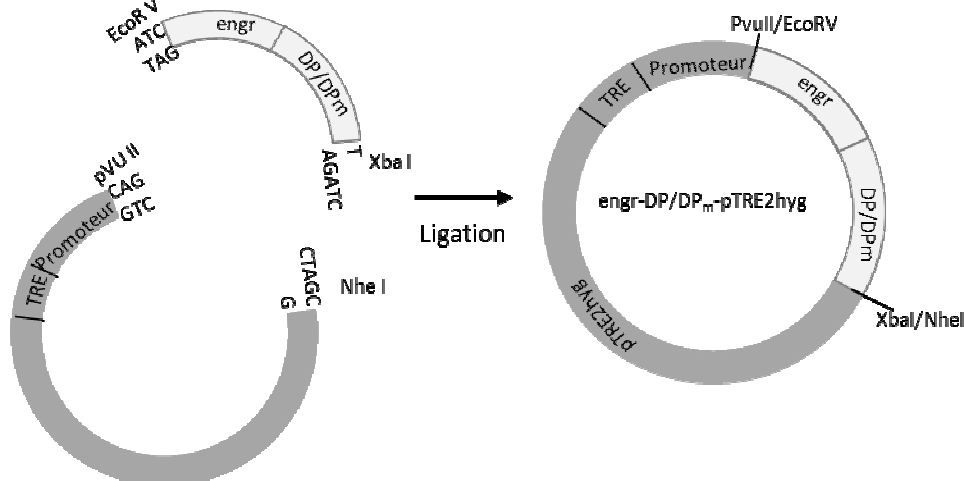


Figure 9 : schéma représentant la stratégie de clonage

***Transfections stables et isolement des clones cellulaires***

Les cellules PCCI3-tTA ont été transfectées à l'aide des ADN plasmidiques préparés, en présence de l'agent transfectant FuGene (Roche Diagnostics).

Les cellules ayant intégré l'ADN plasmidique ont été sélectionnées en présence d'hygromycine et ont été maintenues en culture en présence de doxycycline ( en renouvelant le milieu de culture tous les 2-3 jours de manière à maintenir une concentration en doxycycline adéquate).

Les premières colonies isolées sont apparues environ deux semaines après la transfection stable. Les clones cellulaires ont ensuite été repiqués individuellement sous binoculaire et maintenus en culture.

Nous avons obtenu 15 clones de cellules contenant la construction d'expression « engr-DP » et 15 clones de cellules contenant la construction d'expression « engr-DPm ».

A ce stade, nous ne pouvons pas encore affirmer être en possession des lignées exprimant l'antagoniste recherché.

Afin de vérifier si les lignées cellulaires obtenues expriment correctement les protéines d'intérêt, des expériences de Western Blot devront être effectuées à partir d'extraits protéiques préparés à partir de cellules maintenues en présence ou en absence de doxycycline.

Les lignées cellulaires qui expriment le transgène en absence de doxycycline et non en présence de cet agent seront retenues et utilisées par la suite pour réaliser des expériences de  $\mu$ -array permettant l'identification individuelle des gènes dont l'expression est réduite en présence de la protéine antagoniste de Pax8 « engr-DP ».

### **3. Conclusion et perspectives**

#### **3.1 Mesure de l'abondance relative des ARNm des gènes ThOX et DuOXA**

Au cours de ce travail, nous avons mis au point une méthode permettant de comparer les abondances relatives de divers ARNm au sein d'un type cellulaire en utilisant les résultats de q-PCR sur ADN génomique pour normaliser les résultats de RT-qPCR correspondants. Ceci nous a permis de montrer qu'au sein des 2 lignées de cellules thyroïdiennes PCCI3 et FRTL5, l'ARNm DuOXA1 est moins abondant que celui de DuOXA2 et que l'ARNm de ThOX1 est plus abondant que celui de ThOX2.

Cette méthode de quantification relative de l'abondance des ARNm dans la cellule thyroïdienne devrait nous permettre de comparer les niveaux d'expression de ces gènes au sein de tissus normaux ou pathologiques. Ceci permettra de voir si la mesure de ces niveaux d'expression peut être intéressante sur le plan du diagnostic médical. Toutefois, la seule mesure de l'abondance d'un ARNm ne permet pas de connaître la quantité de protéine correspondante présente dans la cellule ou le tissu.

#### **3.2 Etablissement de lignées cellulaires afin d'identifier l'ensemble des gènes dont l'expression dépend du facteur de transcription Pax8 dans la cellule thyroïdienne**

Nous avons réalisé les constructions d'expression permettant de produire un antagoniste de Pax8 (ou une protéine contrôle) de manière inductible après transfection dans les cellules thyroïdiennes de rat PCCI3. Après transfection, nous avons sélectionné les transfectants stables et isolé les clones cellulaires obtenus.

Les clones cellulaires exprimant le transgène de manière inductible seront identifiés par des expériences de Western blot. L'effet de l'expression de la protéine antagoniste engr-DP sur la morphologie et la prolifération des cellules PCCI3 sera observé. Les ARN totaux des cellules exprimant le compétiteur engr-DP ou la protéine contrôle engr-DPm seront préparés pour réaliser des expériences de  $\mu$ -array et de PCR quantitative afin d'identifier les gènes dont l'expression est contrôlée par Pax8.

#### 4. Sources

- [1] *La Thyroïde, des concepts à la pratique clinique*  
Editeurs : Leclère J, Orgiazzi J, Rousset B, Schlienger JL, Wémeau JL  
2001, 2<sup>e</sup> édition, Editions scientifiques et médicales Elsevier-Paris, France
- [2] DUMONT JE, OPITZ R, CHRISTOPHE D et al, 2011, *Ontogeny, anatomy, metabolism and physiology of the thyroid*  
*Thyroid Disease Manager, Chapter 11: Control of thyroid specific gene expression*  
<http://www.thyroidmanager.org>
- [3] CHRISTOPHE-HOBERTUS C and CHRISTOPHE D, *Delimitation and functional characterization of the bidirectional ThOX-DuOXA promoter regions in thyrocytes*,  
*Mol. Cell. Endocrinol.* (2010), 317, 161-167.
- [4] RIGUTTO S, HOSTE C, DUMONT JE et al, *DuOX1 is the main source of hydrogen peroxyde in the rat cell line PCC13*  
*Exp Cell Res.* (2007), 1,313(18), 3892-3901
- [5] FUSCO A, BERLINGIERI MT, DI FIORE PP et al, *One- and two-step transformations of rat thyroid epithelial cells by retroviral oncogenes*  
*Mol. Cell. Biol.* (1987), 7, 3365-3370
- [6] MORAND S, DOS SANTOS OF, OHAYON R et al, *Identification of a truncated dual oxidase 2 (DUOX2) messenger ribonucleic acid (mRNA) in two rat thyroid cell lines. Insulin and forskolin regulation of DUOX2 mRNA levels in FRTL-5 cells and porcine thyrocytes*  
*Endocrinology.* (2003), 144(2),567-74
- [7] CLONTECH Laboratories, 2005,  
*Tet-Off<sup>®</sup> and Tet-On<sup>®</sup> Gene Expression Systems User Manual*  
<http://www.clontech.com/>