

La réduction de l'expression du gène Men1 augmente la prolifération des cellules épithéliales de la thyroïde murine.

PA - 025

Maïlin Yates, Sourour CHAIB, Chang ZHANG, Françoise BORSON-CHAZOT^a, Samia SELMI-RUBY

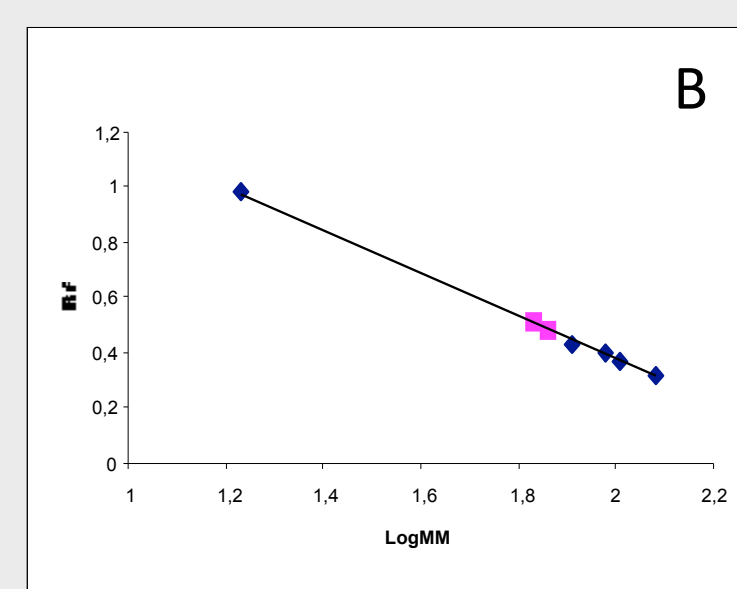
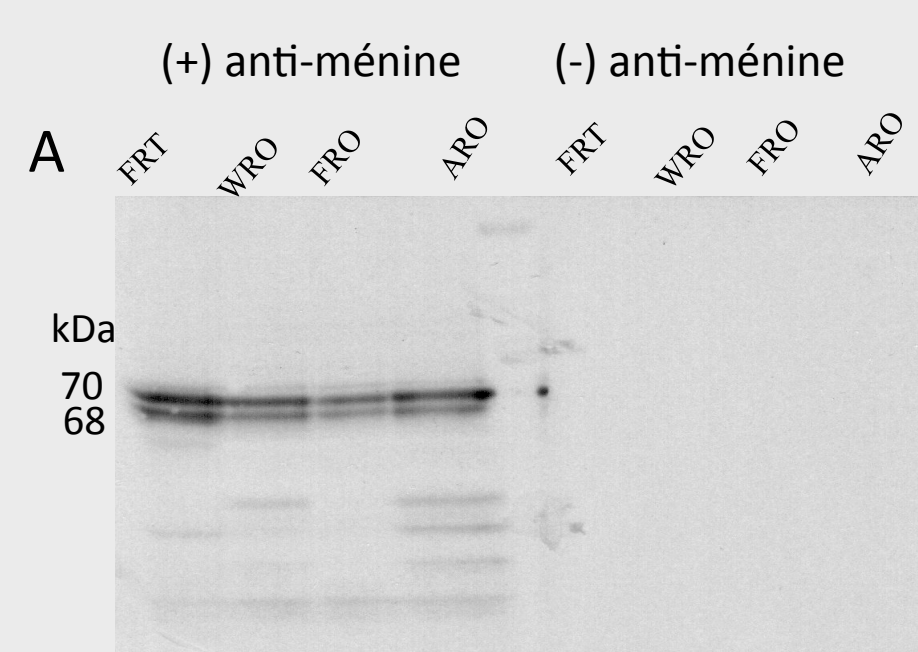
Centre de recherche en cancérologie de LYON (CRCL), INSERM Unité 1052/CNRS 5286, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France
^a Fédération d'endocrinologie, Groupement Hospitalier Est, Bron, Hospices Civils de Lyon, Lyon, FRANCE

Contexte : La glande thyroïde est à ce jour peu reconnue comme un organe cible du syndrome de la Néoplasie Endocrinienne Multiple de type1 (NEM1). Cependant des données de la littérature suggèrent que l'incidence des tumeurs thyroïdiennes pourrait être augmentée¹⁻⁶. L'objectif de notre étude est d'analyser les conséquences fonctionnelles de l'inhibition de l'expression de la ménine sur des lignées de cellules thyroïdiennes de rat, puisque la perte d'expression de la ménine est la situation la plus fréquente observée en pathologie de la NEM1.

Approches expérimentales : La protéine ménine a été analysée par western-blot à l'aide d'un anticorps polyclonal anti-ménine (Menin, A300-105A, Bethyl Laboratoire) (dilution 1:10000) dans les lignées de cellules thyroïdiennes humaines et murines. Le niveau d'expression du gène Men1 a été évalué dans les homogénats, fractions particulières et solubles de trois modèles cellulaires de rat : deux lignées cellulaires différenciées (FRTL5 et PCCL3) et une dédifférenciée (FRT). Dans les cellules différenciées nous avons inhibé l'expression du gène Men1 par une approche d'ARN interférents. L'efficacité de transfection a été réalisée sur des cellules adhérentes en présence de Si-RNA et des quantités croissantes d'agent de transfectant (Dharmafect). A partir des conditions optimales de transfection, nous avons analysé l'impact de l'inactivation de la ménine sur la prolifération et viabilité cellulaire évaluées par comptage cellulaire et MTT.

Résultats 1 : Expression de la ménine dans des lignées de cellules thyroïdiennes

Spécificité de l'anticorps anti-ménine



Immunodétection de la ménine par western-blot:

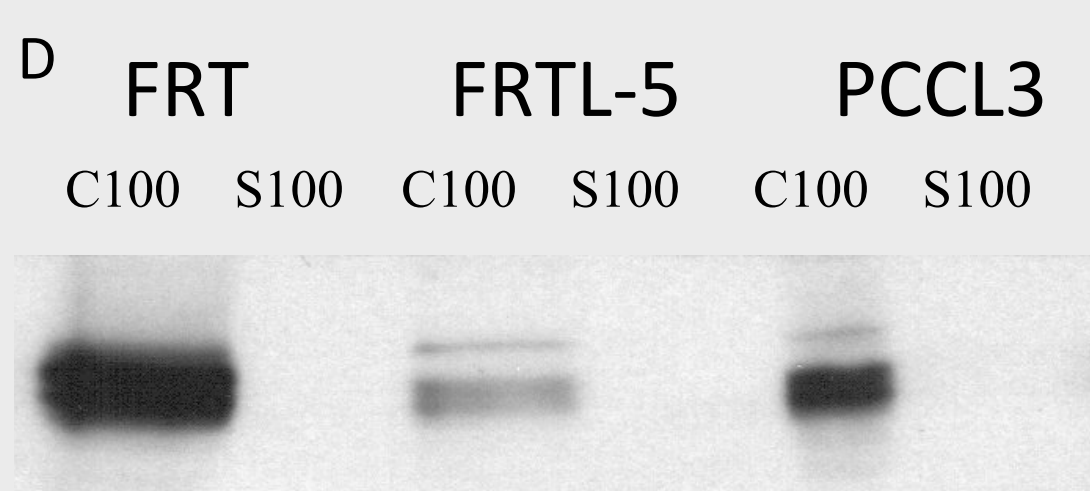
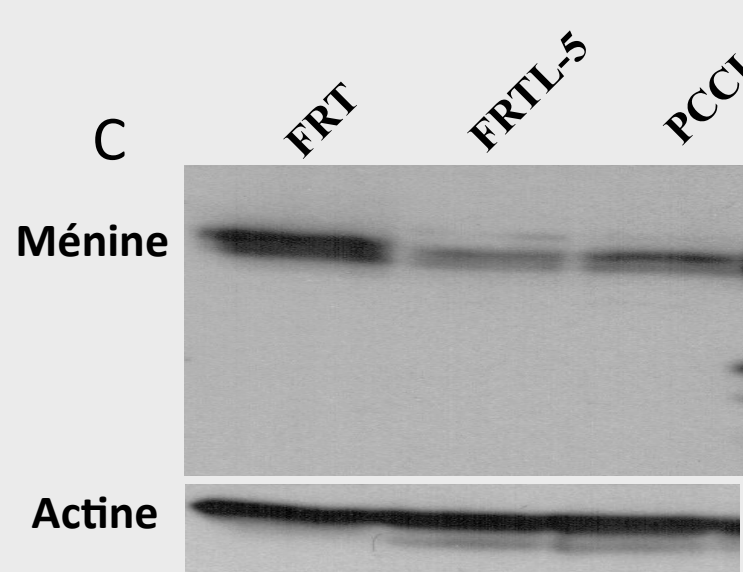
A/ En présence anti-ménine, la ménine migre sous forme d'un doublet dans les différentes lignées de thyrocytes de rat (FRT) et humaines (WRO, FRO et ARO) correspondant aux formes phosphorylée et non phosphorylée.

B/ Représentation linéaire Rf=f (LogMM) ; les Rfs de la bande supérieure et inférieure de la ménine correspondent à une MM de 70 et de 68 kDa, respectivement.

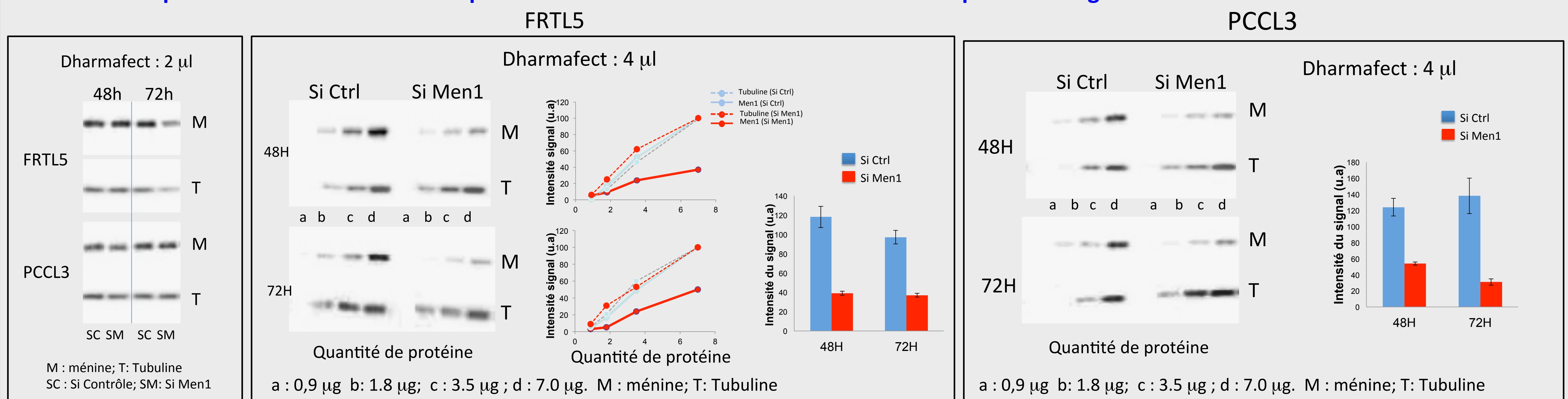
C / L'intensité du signal dans la lignée des cellules dédifférenciées (FRT) est deux fois plus élevée que dans les lignées différenciées (PCCL3 et FRTL5).

D / L'homogénat cellulaire de chacune des lignées d'origine murine, a été centrifugé à 100000 g / 30 min afin de séparer le matériel particulaire (C100) et le matériel soluble (S100). Le signal de 68 kDa n'est présent que dans la fraction particulaire indiquant une localisation nucléo-plasmique.

Le gène Men1 est exprimé dans toutes les lignées de thyrocytes. Son expression est plus importante dans les cellules FRT que dans les cellules différenciées FRTL5 et PCCL3 révélant une éventuelle corrélation entre le contenu en ménine et l'état de différenciation.



Résultats 2 : Optimisation des Conditions expérimentales de transfection : Inhibition de l'expression du gène Men1

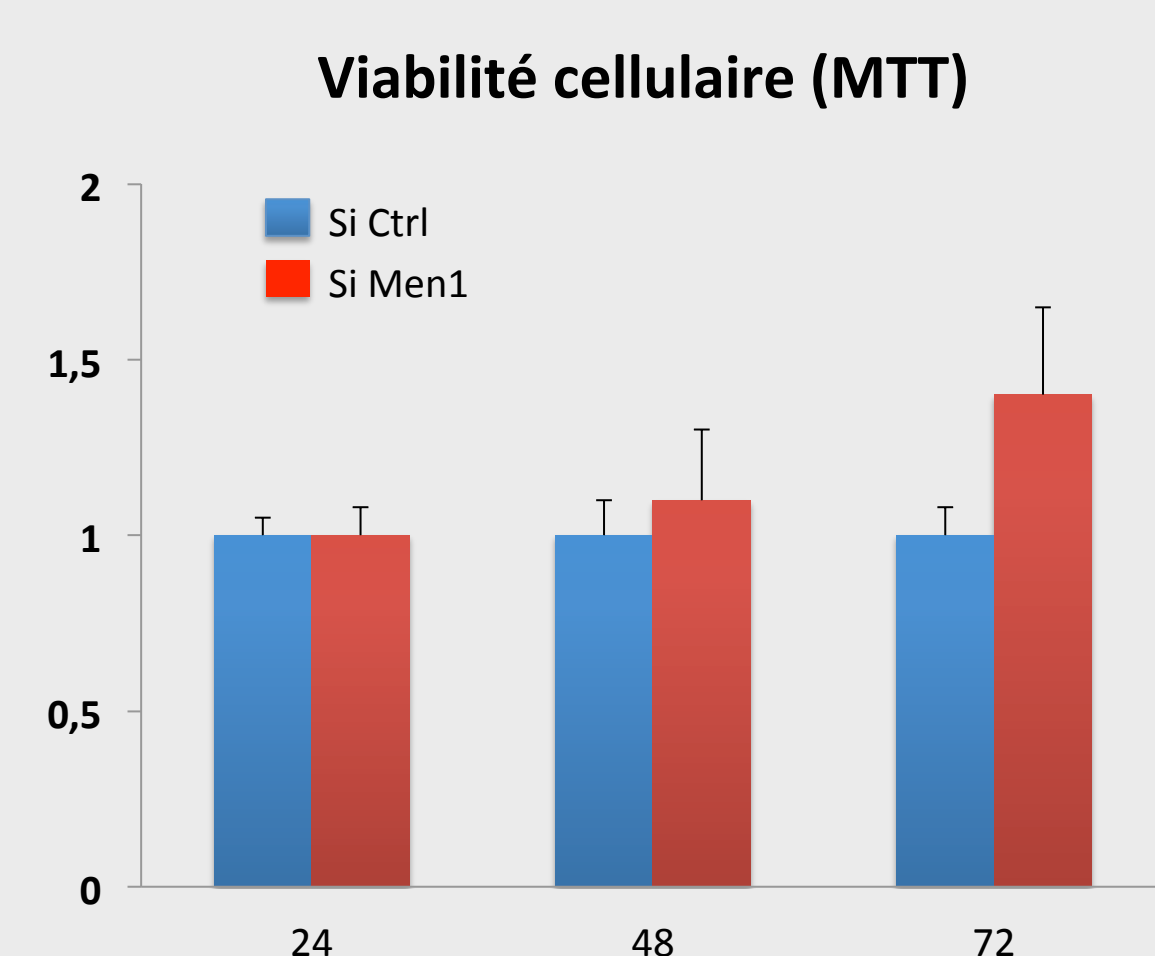
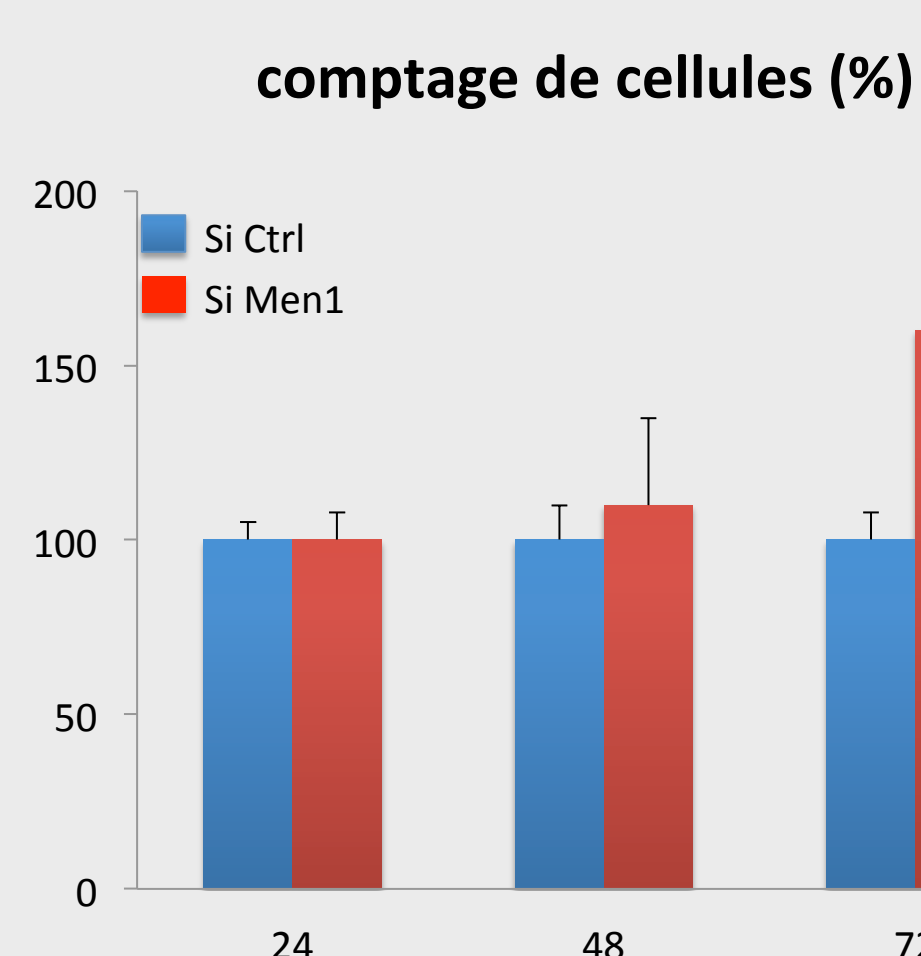


Immunodétection de la ménine par western-blot. 600000 cellules FRTL5 et PCCL3 ensemencées sont transfectées en présence de Si Contrôle (Si Ctrl) ou Si Men1 (Si Men1) et de 2µl ou 4µl de Dharmafect pendant 48h et 72h. L'intensité du signal est proportionnelle à la quantité de protéine déposée. Le niveau d'expression de la ménine n'est pas modifié lorsque le volume de dharmafect est de 2µl, en revanche 4 µl d'agent transfectant donne la meilleure efficacité de transfection.

L'approche d'ARN interférents (Si Men1) permet d'obtenir une forte réduction de l'expression du gène MEN1, plus de 80% dans les lignées FRTL5 et PCCL3.

Resultats 3 : Conséquences de l'inhibition de l'expression de ménine sur la prolifération et la viabilité cellulaire.

Cinétique de prolifération et test de viabilité réalisées sur la lignée cellulaire PCCL3



Résultats similaires pour la lignée FRTL5.

La perte d'expression du gène Men1 conduit à une augmentation significative de la prolifération de 40 à 60% évaluée par le comptage cellulaire et le test MTT.

CONCLUSION

En utilisant une approche "in vitro", nous mettons en évidence pour la première fois que la ménine agit comme un régulateur négatif de la prolifération cellulaire thyroïdienne. Ces résultats confortent les données "in vivo" où l'inactivation de la ménine ciblée dans les thyrocytes entraîne une augmentation de la croissance de la glande thyroïde dans le modèle murin génétiquement modifié.

1-Bertolino et al., *Molecular Endocrinology*, 2003
2-Kitamura, Y., et al, *Genes Chromosomes Cancer*, 2000
3-Loffler et al., *Int J Cancer*, 2007
4-Nord, B. et al., *Genes Chromosomes Cancer*, 1999
5-Ward et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab* 1998

Travail réalisé grâce au soutien de l'INCA et du GTE