



HAL
open science

Étude omique de la régulation de la thyroïde par l'iode et du rôle de SLC5A8 dans la thyroïde

Maha Hichri

► **To cite this version:**

Maha Hichri. Étude omique de la régulation de la thyroïde par l'iode et du rôle de SLC5A8 dans la thyroïde. Médecine humaine et pathologie. COMUE Université Côte d'Azur (2015 - 2019), 2018. Français. NNT : 2018AZUR4061 . tel-02101065

HAL Id: tel-02101065

<https://theses.hal.science/tel-02101065v1>

Submitted on 16 Apr 2019

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.

THÈSE DE DOCTORAT

Étude omique de la régulation de la thyroïde par l'iode et du rôle de SLC5A8 dans la thyroïde

Maha HICHRI

TIRO-MATOs UMR E4320

**Présentée en vue de l'obtention
du grade de docteur en** Sciences de la vie
et de la Santé
Mention : Interactions moléculaires et
cellulaires
d'Université Côte d'Azur

Devant le jury, composé de :
Anne-Sophie Gay, IR, CNRS
Luc Camoin, IR (HDR), Inserm
Laurent Counillon, PR, UNS
Sylvie Chevillard, DR, CEA

Dirigée par : Thierry Pourcher
Co-encadrée par : Sabine Lindenthal
Soutenue le : 23 Novembre 2018

Université Côte d'azur
École Doctorale des Sciences de la Vie et de La Santé (ED85)

Thèse de doctorat
Présentée par Maha Hichri

Étude omique de la régulation de la thyroïde par l'iode et du rôle de SLC5A8 dans la thyroïde

Devant le jury composé de :

Président de jury	Pr. Laurent Counillon, Professeur 1, UNS LP2M - CNRS-UNS UMR 7370 Université de Nice-Sophia Antipolis
Rapporteurs	Dr. Luc Camoin, Ingénieur de recherche, INSERM Institut de cancérologie et d'immunologie de Marseille INSERM U1068 -CNRS UMR7258 -Aix-Marseille Université Dr. Sylvie Chevillard, Directeur de recherche, CEA LCE_ Laboratoire de Cancérologie expérimentale CEA/DVS/IRCM/SRETT - CEA Fontenay-aux-Roses
Examineur	Dr. Anne-Sophie Gay, Ingénieur de recherche, CNRS Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (IPMC) UMR7275 CNRS et Université de Nice Sophia Antipolis
Directeur de thèse	Dr, Thierry Pourcher, Directeur de recherche, CEA TIRO-MATOs, UMR E4320

Étude omique de la régulation de la thyroïde par l'iode et du rôle de SLC5A8 dans la thyroïde

Résumé

L'iode est un composant essentiel aux hormones thyroïdiennes. Les cellules thyroïdiennes captent l'iode circulant et le concentrent vers le colloïde. Il est alors incorporé à la thyroglobuline, protéine précurseur des hormones, par un mécanisme d'organification. La capacité de captation de l'iode par la thyroïde est finement régulée notamment par la « Thyroid Stimulating Hormone » (TSH) mais aussi l'iode circulant. En effet, en cas d'une élévation de l'iode circulant, la thyroïde déclenche un mécanisme de régulation appelée l'effet Wolff-Chaikoff. Ce phénomène se traduit par une limitation transitoire de production des hormones thyroïdiennes qui s'accompagne notamment d'une diminution de l'expression du NIS (Natrium Iodide Symporter), la protéine responsable du transport actif de l'iode dans la thyroïde. Dans cette étude, des approches omiques globales ont été mises à profit pour étudier cette régulation dans le contexte de l'administration d'un produit iodé et de souris invalidées pour un gène codant pour un transporteur de monocarboxylate exprimé dans la thyroïde.

Dans la première partie de ce travail, l'effet des agents de contraste iodés (ICA), couramment utilisés en imagerie médicale, a été étudié. L'administration de ces agents entraîne une réduction de la captation de l'iode souvent expliquée par un effet Wolff-Chaikoff associé à un potentiel relargage d'iode. Par une approche de protéomique quantitative global, le protéome de thyroïde de souris, après administration d'ICA, a été comparé au protéome après administration d'iode.

Après un traitement des données et une analyse bioinformatique, nos résultats mettent en évidence l'existence de peu de mécanismes en commun induits par l'iode et les ICA mais cependant de plus importantes variations d'expression de protéines sont déclenchées uniquement par les ICA.

Dans la deuxième partie, le rôle de SLC5A8 dans la fonction thyroïdienne et les mécanismes sous-jacents à l'effet Wolff-Chaikoff ont été étudiés chez des souris invalidées pour le gène *Slc5a8* (Solute carrier family 5 number 8) et des souris non mutées. SLC5A8 est une protéine membranaire identifiée au laboratoire et exprimée dans la membrane apicale du thyrocyte. Cette protéine catalyse un transport de monocarboxylate dans différents organes mais son rôle dans la thyroïde demeure non élucidé.

L'invalidation n'entraîne pas d'effet majeur sur la fonction thyroïdienne. En mettant à profit une approche multiomique comparative, combinant la transcriptomique, la protéomique et la métabolomique, les effets de cette invalidation combinée ou non à une administration d'iode ont été explorés. Le traitement des data révèle de nombreuses voies activées dans les différentes conditions avec des effets inverses à ceux de l'invalidation par l'administration d'iode. L'ensemble des résultats indiquent que la perte de fonction de SLC5A8 affecte l'organification de la thyroglobuline et le contrôle du stress oxydatif.

Mots Clefs : Thyroïde, Wolff-Chaikoff, agent de contraste, SLC5A8, protéomique quantitative

Multomics study of thyroid regulation by iodide and the role of SLC5A8 in the thyroid

Abstract

Iodine is an essential component of thyroid hormones. Thyroid cells trap the circulating iodide and accumulate it in the colloid. Iodide is subsequently organified and incorporated into the thyroglobulin, the hormone precursor protein. The iodide uptake capacity of the thyroid is finely regulated, not only by the Thyroid Stimulating Hormone (TSH), but also by the levels of circulating iodide. Indeed, an increase in the blood iodide concentration evokes a regulating mechanism called the Wolff-Chaikoff effect. This phenomenon includes a transient inhibition of thyroid hormone release and a decrease in the expression of NIS (Natrium Iodide Symporter), the protein that mediates the active transport of iodide in the thyroid. Here, global “omics” approaches were used to study this regulation after administration of iodide or iodinated contrast agents in wild-type mice and mice that were deficient for the monocarboxylate transporter (SLC5A8).

In the first part of this study, we analyzed the effect of iodinated contrast media (ICM; commonly used in medical imaging). The administration of these agents leads to a reduction in the uptake of iodide, which is often explained by the Wolff-Chaikoff effect associated with a putative iodine release from the compound. Using a quantitative proteomic approach, the mouse thyroid proteome, was assessed before and after the administration of ICM or iodide.

In the second part, the role of SLC5A8 in thyroid function and the molecular mechanisms underlying the Wolff-Chaikoff effect were studied in both SLC5A8-deficient and wild type mice. SLC5A8 is a membrane protein that is expressed in the apical membrane of thyrocytes. This protein mediates monocarboxylate transport in different organs but its role in the thyroid remains unsolved. SLC5A8-deficient mice have no apparent thyroid dysfunction, but some preliminary results have shown that SLC5A8-deficient mice have impaired iodide-mediated regulation of the thyroid. Using a multiomic approach that combines transcriptomics, proteomics and metabolomics, the effect of the lack of SLC5A8 was studied in terms of thyroid function and thyroid regulation by iodide. Data processing revealed several activated pathways. Our results indicate that SLC5A8 function is important for organification of thyroglobulin, and control of oxidative stress.

Keywords: Thyroid, Wolff-Chaikoff, Iodinated Contrast Media, SLC5A8, quantitative proteomics

Table des matières

Liste des figures	3
Liste des tableaux	5
Liste des annexes	6
Liste des abréviations	7
Partie 1 : Rapport Bibliographique	9
Chapitre 1 : La fonction thyroïdienne	10
I. L'importance de l'iode dans la thyroïde	10
II. La thyroïde	12
II.1. Organogénèse de la glande thyroïde	13
III. La synthèse des hormones thyroïdiennes	13
III.1. Mécanismes de transport de l'iode	14
III.2. Mécanismes de l'organification	15
IV. La régulation de la fonction thyroïdienne par la thyrotropine (TSH)	18
V. La régulation de la fonction thyroïdienne par l'iode	21
Chapitre 2 : L'effet Wolff Chaikoff et ses applications	25
I. L'effet Wolff-Chaikoff et son application en radioprotection	25
II. Les agents de contraste	30
Chapitre 3 : La protéine SLC5A8	34
I. Présentation du SLC5A8	35
I.1. Identification de SLC5A8 (SMCT1, hAIT)	35
I.2. SLC5A8 et son rôle anti tumoral	37
I.3. SLC5A8: un transporteur de monocarboxylates	38
Chapitre 4 : Le criblage des mécanismes moléculaires par les méthodes omiques	42
I. Approche protéomique	44
I.1. Présentation générale	44
I.2. Les différentes approches en protéomique	57
I.3. La protéomique comparative	59
I.4. La protéomique quantitative	60
II. Approche transcriptomique	66
II.1. Définition de la transcription	66
II.2. La transcriptomique	68
II.3. Approche RNA seq par Illumina	69
III. Approche métabolomique	73
III.1. La préparation de l'échantillon	77
III.2. Le traitement des données	77
III.3. La normalisation	78

III.4. Les analyses statistiques _____	79
IV. Intérêt des études multi-omiques _____	81
Partie 2 : Résultats et Discussions _____	83
I. Contexte _____	84
II. Objectif de la thèse _____	84
III. Présentation des résultats _____	85
Article I : Etude comparative des variations du protéome induites par un agent de contraste et de l'iode. _____	86
Contexte _____	86
Résultats _____	86
Conclusion _____	87
Article II : Etude du rôle de SLC5A8 dans la thyroïde dans le cas d'un Wolff Chaikoff par une approche multi-omiques _____	122
Contexte _____	122
Résultats _____	122
Conclusion _____	123
Partie 3 : Discussions & Perspectives _____	186
Annexes _____	192
Résumé _____	193
Contexte _____	193
Résultats _____	193
Conclusion _____	193
Partie 4 : Références bibliographiques _____	194

Liste des figures

Figure 1 La glande thyroïdienne A. Vue de devant (à gauche) et de derrière (à droite). B. (à gauche) Coupe latérale de la trachée qui permet d'observer la thyroïde par rapport à la trachée. B. (à droite) Coupe histologique d'une thyroïde de rat permettant d'observer l'anatomie de la glande thyroïdienne : (F) Follicules thyroïdiens, (C) Colloïde et (S) Tissue conjonctif (septa) (Young, O'Dowd and Woodford, 2006). _____ 12

Figure 2 Structure des hormones thyroïdiennes : (A) L-triiodothyronine (T3) et (B) L-Thyroxine (T4). _____ 14

Figure 3 Biosynthèse des hormones thyroïdiennes : la thyroglobuline entre dans le lumen par exocytose. Le Symporteur Na^+/T transporte les ions iodures du sang vers le cytoplasme du thyrocyte. Les ions iodures passent vers le colloïde par un transporteur apical (PDS, CLC5 ou autres). Les ions iodures sont oxydés par la TPO et se fixent de façon covalente sur les résidus tyrosine de la thyroglobuline. Deux résidus d'iodotyrosine sont ensuite couplés grâce à la TPO pour former les précurseurs hormonaux sur la thyroglobuline. La thyroglobuline iodée est ensuite internalisée dans le thyrocyte par endocytose. Les hormones thyroïdiennes sont ensuite obtenues par protéolyse de la thyroglobuline et libérées dans le sang (Darrouzet et al., 2014). _____ 16

Figure 4. Mécanisme de la régulation de la thyroïde par la TSH.(adaptée de (Brent, 2012)) _____ 18

Figure 5. La liaison de la TSH au TSHr déclenche l'activation de l'Adényl cyclase dépendant de Gs conduisant ainsi à une stimulation de la production d'AMPc. En conséquence, la PKA est activée et phosphoryle plusieurs protéines impliquées dans l'entrée de l'iode dans les thyrocytes comme le NIS et dans la libération des hormones thyroïdiennes (Adjadj, Schlumberger and de Vathaire, 2009). _____ 19

Figure 6. L'effet de Wolff Chaikoff. À la suite d'une forte dose d'iode, une inhibition est observée au niveau de l'expression du NIS ce qui entraîne une réduction dans le transport de l'iode. Une baisse de la synthèse des hormones thyroïdiennes est observée dû à l'excès d'iode. Un niveau normal de production des hormones thyroïdiennes sera rétabli lors de la phase d'échappement (Leung and Braverman, 2014). _____ 22

Figure 7 Biosynthèse des deux iodolipides proposés en tant que médiateurs dans la régulation par l'iode dans les thyrocytes ; R1, R2 : groupement Acyl. _____ 24

Figure 8 l'effet protecteur de l'iode administré sous forme de pastille de KI (100 mg). L'abscisse représente le temps (en heures) avant ou après l'exposition à l'iode radioactif (administré à temps égal zéro) (Becker, 1983). _____ 28

Figure 9. Alignement des acides aminés des séquences des deux protéines humaines hNIS et hSLC5A8 : les acides aminés en commun sont notés (-), les treize domaines transmembranaires sont surlignés, les sites de glycosylation, sont notés (GLY), les sites potentiels de phosphorylation par la kinase cAMP dépendante (PKA), la kinase C (PKC) et la tyrosine kinase (Pkyr) sont aussi indiqués.(Rodriguez et al., 2002) _____ 36

Figure 10. Coupe histologique d'une thyroïde humaine mettant en évidence la protéine SLC5A8 par un marquage immunohistochimique (agrandissement*250) (Rodriguez et al., 2002) _____ 37

Figure 11. Suivi du Lactate urinaire et salivaire dans les modèles KO et WT de SLC5A8-/- (n=23/groupes). (A) Concentration du lactate urinaire (n=23/groupes). (B) Concentration du lactate salivaire (n=13/groupe) 2 min après injection pilocarpine (Henning, Frank et al., 2008). _____ 40

Figure 12 schéma représentant les différentes « -omiques » et illustrant les possibles relations entre elles (Goodacre, 2004) _____ 43

Figure 13 Les différentes étapes de préparation d'un échantillon pour une analyse en protéomique (1) l'échantillon est digéré par une enzyme comme la trypsine, ces peptides peuvent être déplétés ou enrichis avant d'être séparés. (2) Les peptides sont analysés en spectrométrie de masse MS/MS (3) L'identification des peptides par corrélation de spectres théoriques et observés (Nesvizhskii, 2010). 45

Figure 14 Workflow de la préparation de l'échantillon en vue d'une analyse protéomique à partir de cellules ou de tissus, il est possible aussi d'enrichir ou de fractionner l'extrait protéique avant la digestion enzymatique _____ 46

Figure 15 Chromatogramme d'un composé analysé représentant les pics relatifs à l'analyte et la largeur de mi-hauteur (w_{1/2}) et en abscisse le temps de rétention (tr). _____ 47

Figure 16 Illustration de la différence de configuration des éléments composant un spectromètre de masse MS (conventionnelle) et MS/MS (en tandem). _____ 50

Figure 17 Schéma de fragmentation séquentielle des peptides obtenue par CID à basse et haute énergie. R correspond à la chaîne latérale de l'acide aminé (Palzs and Suhail, 2005) _____ 51

Figure 18 Spectres de masse obtenus après fragmentation en HCD par Orbitrap QExactive Plus, les ions rapporteurs sont clairement observés. _____ 53

Figure 19 Schéma d'un spectromètre de masse de type Orbitrap Q Exactive Hybrid Quadrupole (Michalski et al., 2011) _____ 54

Figure 20 Workflow standard de la recherche de séquence dans la base de données (Verheggen et al., 2016). _____ 56

Figure 21 Méthodes classiques MS/MS par collision (CID, HCD) versus méthode de fragmentation à base d'électron pour la fragmentation des ions protéines et peptides dans la spectrométrie de masse en tandem. _____ 59

Figure 22 Différentes méthodes de quantification avec ou sans marquage isotopique. Les marquages sont introduits à différents niveaux en fonction de la méthode choisie (Bantscheff et al., 2007). _____ 61

Figure 23 Extraction des données quantitatives à partir d'un spectre de masse. (A gauche) Visualisation de chaque peptide marqué en rouge et non marqué en noir. A droite : courbe de l'élué chromatographique, le signal peptidique est suivi par la courbe dont l'aire correspond au courant mesuré (XIC), une mesure proportionnelle à l'abondance du peptide (Ong and Mann, 2005). _____ 62

Figure 24 Schéma explicatif représentant la structure chimique des réactifs TMT. (A) les différentes régions composant la structure du TMT et les sites de fragmentation MS/MS par HCD et ETD (B) Les réactifs des TMT10plex et du TMT 11-131C et les positions des isotopes (indiqué par une astérisque) (Scientific, 2014) _____ 64

Figure 25 Schéma récapitulatif de la construction des marquages isobariques _____ 64

Figure 26 La procédure d'utilisation du kit TMT10plex en utilisant le kit 10plex Label Reagents.(Scientific, 2014) _____ 65

Figure 27 Schéma récapitulatif du passage de l'information génétique portée par l'ADN, sous forme de transcrits ARNm du noyau vers le cytoplasme de la cellule où se trouve les outils nécessaires pour la traduction (Jaspard.E, 2013) _____ 67

Figure 28 Epissage du pré-ARN messenger : Les introns sont éliminés pour construire la séquence d'ARN mature. Plusieurs exons peuvent être sélectionnés pour former l'ARNm, ce qui résultent en plusieurs variants de séquence d'ARNm. (Synnergren and Sartipy, 2011). _____ 67

Figure 29 Principe de la technique de séquençage Illumina (a) fragmentation de l'ADN et ligation des adaptateurs (b) Fixation des fragments simple brins sur la lame de verre (c) amplification en pont (d)obtention des brins doubles en pont sur la lame (e) dénaturation afin de garder uniquement le simples brins fixées (f) répétitions des étapes c, d et e (g) début de séquençage par additions de nucléotides fluorescents lors de la polymérisation des brins amplifiées fixées ; (h) lecture du signal fluorescent à chaque cycle et concaténation de la séquence ;(i)alignement des séquences sur une séquence de référence afin de détecter les variations de polymorphisme ou de quantifier l'expression (Illumina, 2010)._____ 71

Figure 30 Vue globale du métabolome englobant les différentes classes de métabolites (Junot et al., 2014) _____ 74

Figure 31. Représentation des différentes sensibilités de détection en fonction de la technique d'analyse suivie. La RMN a une application rapide mais très peu sensible par rapport aux autres techniques favorisant, ainsi, la détection des métabolites les plus concentrés (la partie apparente de l'Iceberg). La GC/MS et la HPLC/MS sont plus sensibles (Sumner, Mendes and Dixon, 2003). _____ 75

Figure 32 Processus ou workflow d'une analyse métabolomique par spectrométrie de masse haute résolution (Roux et al., 2011) _____ 76

Liste des tableaux

Tableau 1 Liste des différents agents de contraste, avec leur concentration en iode et leur osmolarité(Sun Y. Lee et al., 2015). _____ 31

Tableau 1. Top 9 list of the most induced and most inhibited proteins in NaI vs CTRL _____ 113

Liste des annexes

Article:

Single-photon emission computed tomography for preclinical assessment of thyroid radioiodide uptake following various combinations of preparative measures

Liste des abréviations

ADNc: Acide DésoxyRibonucléique complémentaire

ARN: Acide Ribonucléique

ARNm: Acide Ribonucléique messenger

ARNr: ARN ribosomaux

CID: Collision Induced Dissociation

CLHP: chromatographie liquide à haute performance

DIT: Di-iodotyrosine

ECD : Electron capture dissociation

EST: Expressed Sequence Tag

ETD: Electron Transfer Dissociation

eV: Electron volt

FDR: False Discovery Rate

FTMS: Fourier Transform Mass Spectrometry

GC-MS: Gas chromatography-mass spectrometry

HCD: High Collision Dissociation

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

I: Ion iodure

ICA: Agent De Contraste Iodé

ICAT: Isotope Coding Affinity Tag

IRMPD : Infra Red Multi Photon Dissociation

iTRAQ : Isobaric tag for relative and absolute quantitation

KI: iodure de potassium

KO: Knock-out

LMCO: Low Mass Cut-Off

LTQ Orbitrap : Linear Trap Quadropole

MALDI : Matrix Assited Laser Desorption ionisation

MIT: Mono-iodotyrosine

MRM: Multiple Reaction Monitoring

MS: Mass spectrometry

NGS: Next Generation Sequencing

NIS: Natrium Iodide Symporter
PSM: Peptide-to-Spectrum Match
PTM : modifications post traductionnelles
QQQ : Triple quadripôle
QC : échantillons de contrôle qualité
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
ROS: Reactive Oxygen Species
RPLC: Reversed phase liquid chromatography
SILAC: Stable Isotope Labeling By Amino Acids In Cell Culture
SIM: Selected Ion Monitoring
SLC5A8: Solute Carrier Family 5 Member 8
SORI: Sustained Off Resonance Irradiation
SPECT: Single Photon Emission Computed Tomography
SPME: Solid Phase Microextraction
SRM: Selected Reaction Monitoring
T3: Triiodothyronine
T4: Thyroxine
TG: Thyroglobuline
TMT: Tandem Mass Tag
TOF : Time Of Flight
TPO: Thyroid peroxidase
TRH: Thyroid Releasing Hormone
TSH: Thyroid Stimulating Hormone
TSHr: Thyroid Stimulating Hormone receptor
UHPLC: Ultra High Performance Liquid Chromatography
UPLC: Ultra Performance Liquid Chromatography
UTP: Uridine triphosphate
UV: Ultra Violet
WT: Wild Type

Partie 1 : Rapport Bibliographique

Chapitre 1 : La fonction thyroïdienne

I. L'importance de l'iode dans la thyroïde

L'iode est un oligo-élément essentiel dans l'organisme, les besoins journaliers d'un adulte sont estimés à 150µg (AFSSA, 2009). Il est l'un des éléments constituant des hormones thyroïdiennes. Un apport d'iode adéquat, dès le jeune âge est notamment nécessaire pour prévenir l'apparition des pathologies sévères telles que le crétinisme associées à des carences iodées (Bleichrodt and Born Ph, 1994). Une carence chronique en iode chez l'adulte se caractérise par un goitre et une réduction de la production des hormones thyroïdiennes (Verheesen and Schweitzer, 2008).

Géographiquement, c'est dans les zones montagneuses ou éloignées de la mer qu'une forte prévalence de goitre et de crétinisme a été observée en cas de carence. Dès 1922, la Suisse a supplémenté ses habitants et son bétail en iode afin de prévenir cette carence (Delange *et al.*, 2002). Cela fût la première mesure prise à grande échelle contre ce type de carence.

Aujourd'hui, selon l'estimation de l'organisation mondiale de la santé (OMS), plus de 35% de la population souffre encore d'un apport insuffisant en iode (Organisation mondiale de la Santé, 2014). Ce déficit nutritionnel constitue un problème mondial de santé publique. En effet, 1,92 milliards de personnes au total dont environ 246 millions d'enfants de 6 à 12 ans sont carencés en iode.

Les besoins en iode sont variables selon l'âge, le sexe et les situations physiologiques. Les enfants de 7 à 24 mois ainsi que les femmes en âge de procréer constituent la population la plus exposée aux effets d'une carence en iode. Cette déficience est peut être étroitement liée à des échecs de procréation et elle est aussi associée à la mortalité prénatale (Morreale De Escobar, Jesus Obregon and Escobar Del Rey, 2000; Dunn and Delange, 2001).

Ainsi, afin d'augmenter l'apport journalier en iode, dès 1952, des lignes directrices ont été émises et des mesures concernant un enrichissement universel en iode du sel de table et de cuisson ont été préconisées par les autorités internationales et sanitaires. Ces recommandations sont régulièrement revisitées (OMS, UNICEF) (WHO, 2014). Durant la grossesse et l'allaitement, des doses d'iodes supplémentaires sont prescrites car les besoins des femmes augmentent de 150 à 250 µg/jour, en raison de modifications du métabolisme (Smyth *et al.*, 1997; Berghout and Wiersinga, 1998; Doggui and El Atia, 2015). Pendant la grossesse, la production des hormones thyroïdiennes maternelles augmente et le transfert de thyroxine et

d'iode de la mère au fœtus est essentiel pour assurer chez celui-ci une production fœtale d'hormones thyroïdiennes (Glinoeer, 1997).

L'iode est essentiel à la synthèse des hormones thyroïdiennes, mais son excès peut entraîner un dysfonctionnement thyroïdien.

En Europe, une prise dépassant 600 µg par jour et 1100 µg par jour aux Etats-Unis, est considérée comme tolérable chez les adultes (Zimmermann and Boelaert, 2015). Ces valeurs limites sont arbitraires car certaines populations tolèrent une plus forte dose pouvant atteindre 5000 mg/ jour pour les consommateurs de produits issus de la mer (Preedy, Burrow and Watson, 2009). La thyroïde est capable de s'adapter à l'excès chronique de l'iode (30mg à 2g par jour) sans entraîner des symptômes cliniques de dysfonctionnement thyroïdien ou de goitre. Une augmentation du volume thyroïdien est, néanmoins, observée en échographie accompagnée d'une légère baisse persistante d'hormones thyroïdiennes (20%) (Vagenakis *et al.*, 1974; Jubiz, Carlile and Lagerquist, 1977; Phillippou *et al.*, 1992).

Une surcharge en iode peut être d'origine alimentaire : des études épidémiologiques menées en Chine, Danemark, et Turquie suggèrent que la supplémentation en sel iodé augmente la prévalence des maladies thyroïdiennes (Bülow Pedersen *et al.*, 2006) et /ou auto-immunes (Bastemir *et al.*, 2006; Teng *et al.*, 2006, 2009). Elle peut, aussi, être liée à une exposition professionnelle comme chez les travailleurs des lignes de fabrication en industrie pharmaceutique, chimique ou électronique (Guével *et al.*, 2004). Des doses élevées en iode sont, également, utilisées dans certains cas spécifiques comme lors de l'utilisation des agents de contraste ou en contre-mesure lors d'un accident nucléaire.

L'excès de l'iode peut déclencher une hyperthyroïdie comme après un traitement à l'iode de la maladie de Basedow-Graves (Roti *et al.*, 1993) mais de tels excès peuvent aussi entraîner le développement d'hypothyroïdie dans le cas de thyroïdite auto-immune de Hashimoto (Braverman, Woeber and Ingbar, 1969; Roti *et al.*, 1991). Des doses minimales de 750 µg par jour provoqueraient une hypothyroïdie chez 20% de ces patients (Chow *et al.*, 1991; Reinhardt *et al.*, 1998).

Aujourd'hui, l'iodation du sel contribue certes, à améliorer le statut en iode de la population, mais doit également être cohérente avec les recommandations nutritionnelles visant à diminuer les apports en sel ajoutés par le consommateur via la salière domestique ou en provenance des produits agroalimentaires (AFSSA, 2009; WHO, 2014).

II. La thyroïde

La thyroïde est une glande endocrine qui est située dans le cou et est antérolatérale par rapport à la trachée et au larynx (Figure 1). Elle est la plus grande et la plus vascularisée des glandes du système endocrinien. Elle est constituée de deux lobes séparés par un isthme et produit les hormones thyroïdiennes 3,5,3'-Tri-iodo-L-thyronine (T_3) et 3,5,3',5'-Tetra-iodo-thyronine ou thyroxine (T_4) qui régulent le métabolisme systémique. La thyroïde est la seule glande capable de stocker sa production hormonale sous forme de précurseurs (Portulano, Paroder-Belenitsky and Carrasco, 2014).



Figure 1 La glande thyroïdienne A. Vue de devant (à gauche) et de derrière (à droite). B. (à gauche) Coupe latérale de la trachée qui permet d'observer la thyroïde par rapport à la trachée. B. (à droite) Coupe histologique d'une thyroïde de rat permettant d'observer l'anatomie de la glande thyroïdienne : (F) Follicules thyroïdiens, (C) Colloïde et (S) Tissue conjonctif (septa) (Young, O'Dowd and Woodford, 2006).

Histologiquement, la glande thyroïdienne est constituée d'un réseau de follicules entouré par une membrane basale. Chaque follicule est sphéroïdal et formé d'un colloïde entouré par une

monocouche de cellules folliculaires épithéliales (les thyrocytes). Le colloïde a un rôle important dans l'hormonogénèse, puisque, la thyroglobuline (Tg), précurseur et forme de stockage des hormones thyroïdiennes, est stockée dans le colloïde à haute concentration (100 à 750 mg / ml) où elle est iodée (Saber-Lichtenberg *et al.*, 2000).

Les thyrocytes sont des cellules polarisées : elles ont un côté apical orienté vers le colloïde et leurs membranes basolatérales sont orientées vers la circulation sanguine permettant le transport des ions iodures (I⁻) du sang vers l'intérieur du thyrocyte.

D'autres cellules parafolliculaires appelées cellules C sont présentes dans la thyroïde. Elles sont moins abondantes et plus grandes que les cellules folliculaires et sont localisées dans l'espace situé entre les follicules (Figure 1.b). Ces cellules sont responsables de la production de la calcitonine qui intervient dans le métabolisme du calcium.

II.1. Organogénèse de la glande thyroïde

Chez les mammifères, la thyroïde est le premier tissu glandulaire à se développer. Cependant, chez l'humain, c'est uniquement à partir de la 12^{ème} semaine de grossesse que la thyroïde catalyse ses premières productions d'hormones thyroïdiennes (Park and Chatterjee, 2005). Avant cela, les hormones sont uniquement produites par la mère et véhiculées au travers du placenta, de la mère au fœtus.

Les cellules folliculaires se développent à partir de l'endoderme embryonnaire. A partir du 17^{ème} jour, un épaississement au niveau du pharynx primitif entre le premier et le deuxième arc brachial (Braverman and Cooper, 2012) devient apparent. Il prolifère ventralement et bilatéralement pour former la structure bilobée caractéristique de la glande thyroïdienne. Chez l'homme, c'est à partir de la 7^{ème} semaine de grossesse que la thyroïde est entièrement formée et qu'elle se positionne devant la trachée.

La glande thyroïdienne est considérée comme étant complètement différenciée lorsque les thyrocytes sont entièrement polarisés, organisés en follicules et que l'hormonogénèse fœtale est initiée.

III. La synthèse des hormones thyroïdiennes

Les hormones thyroïdiennes sont la Triiodothyronine (T3) et la thyroxine (T4) sont des noyaux phénoliques reliés par des liaisons éthers et iodées au niveau de 3 positions (3,5,3 -Tri-iodo-L-

thyronine, pour T3) ou au niveau de 4 positions (3,5,3',5'-Tetra-iodo-thyronine, pour T4) (Figure2).

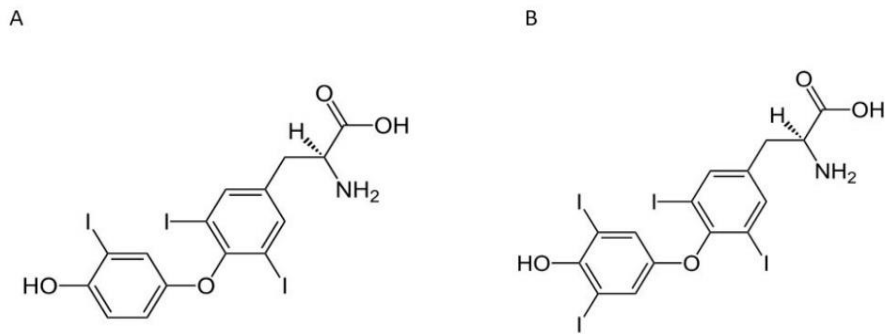


Figure 2 Structure des hormones thyroïdiennes : (A) L-triiodothyronine (T3) et (B) L-Thyroxine (T4).

III.1. Mécanismes de transport de l'iode

Les mécanismes du transport d'iode dans les follicules thyroïdiens ont été étudiés depuis des dizaines d'années et plusieurs hypothèses avaient été émises.

En 1983, l'équipe de Chambard a cultivé des cellules épithéliales issues de thyroïde porcine sur des filtres qui permettent aux cellules de se polariser et de former des épithéliaux. Ce type de culture permet un accès aux deux compartiments, apical et basolatéral, indépendamment l'un de l'autre. Ces travaux ont montré que l'iodure (I⁻), présent côté basolatéral du milieu de culture, était concentré dans les cellules tandis qu'aucun transport actif n'a été observé lorsque l'iodure était rajouté dans le compartiment apical (Chambard *et al.*, 1983).

Cette étude avait mis en évidence la présence d'un mécanisme de transport d'I⁻ localisé au niveau de la membrane basolatérale des thyrocytes (Chambard *et al.*, 1983).

En 1996, le NIS (symporteur Sodium Iodure, Natrium Iodide Symporter), la protéine responsable du passage de l'iodure dans le thyrocyte a été identifiée pour la première fois (Dai, Levy and Carrasco, 1996). Dai et ses collaborateurs ont cloné l'ADNc du NIS à partir d'une lignée cellulaire de thyroïde de rat (FRTL5) et d'expression dans des oocytes de *Xenopus laevis*. Ce clonage a ensuite permis l'identification de la séquence humaine (Smanik *et al.*, 1996) et plus tard de celui de la souris dans notre laboratoire (Perron *et al.*, 2001).

Le clonage de l'ADNc du NIS a permis une meilleure compréhension du transport de l'iode.

NIS appartient à la famille 5 des « Solute Carrier » et est désigné sous le nom de SLC5A5 selon le « Gene Nomenclature Committee ». Chez le rat, la protéine est constituée de 618 acides aminés (Dai, Levy and Carrasco, 1996) et de 643 acides aminés chez l'humain (Smanik *et al.*, 1996, 1997). C'est une protéine majoritairement hydrophobique avec 13 segments transmembranaires (TMSs), une extrémité amino terminale extracellulaire, et une extrémité carboxy terminale intracellulaire (Levy *et al.*, 1997; Levy, De la Vieja and Carrasco, 1998; Darrouzet *et al.*, 2014).

NIS catalyse un transport actif d'iodure en couplant à son passage 2 ions sodium. Ce transport actif d'iodure au niveau du NIS repose donc sur le gradient électrochimique de sodium maintenu par la pompe Na^+/K^+ ATPase. NIS est situé dans la membrane basolatérale des thyrocytes et permet ainsi de concentrer 30 à 60 fois l'iodure dans le thyrocyte par rapport à la concentration circulante contenue dans le compartiment sanguin (Weiss, Philp and Grollman, 1984; Kaminsky *et al.*, 1994). Il assure, ainsi, le transport actif de l'iode du sang vers l'intérieur du follicule.

Les ions iodures diffusent, ensuite, librement dans le thyrocyte. Les effecteurs impliqués dans le passage de l'iodure au travers de la membrane apicale jusqu'au colloïde restent spéculatifs et ont fait l'objet de différentes études :

- L'équipe de Peter Kopp a démontré que la pendrine (PDS/SLC26A4) pourrait être responsable de ce passage (Bizhanova and Kopp, 2010). Des mutations du gène *Slc26a4* entraînent un déficit d'organification d'I⁻ qui pourrait être expliqué par un efflux moins important d'iodure vers le colloïde (Kopp, 2000).
- Le canal chlore CFTR (Cystic Fibrosis trans-membrane conductance Regulator) : Cette protéine est exprimée au niveau de la thyroïde (Li, Ganta and Fong, 2010) et des études menées chez des patients atteints de fibrose kystique ont montré que ces sujets ont plus de probabilité d'avoir un hypothyroïdisme infra cliniques (De Luca *et al.*, 1982).

III.2. Mécanismes de l'organification

Lorsque l'iodure passe dans la lumière folliculaire, il est d'abord oxydé en IOH ou I⁺ puis incorporé via une liaison covalente dans les résidus tyrosine de la thyroglobuline. Les résidus tyrosine iodés sont aussi couplés pour former des hormones thyroïdiennes (Figure 3).

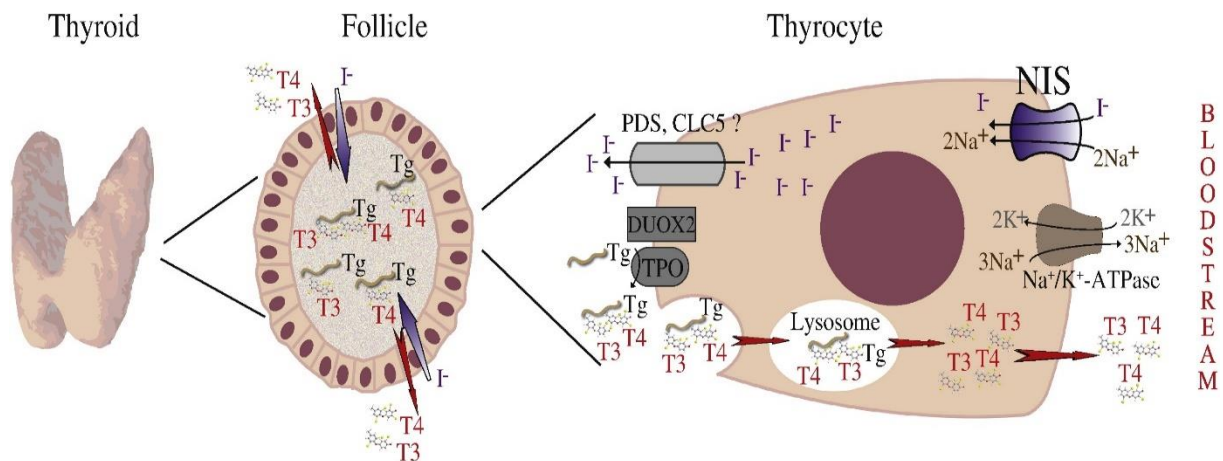


Figure 3 Biosynthèse des hormones thyroïdiennes : la thyroglobuline entre dans le lumen par exocytose. Le Symporteur Na^+/I^- transporte les ions iodures du sang vers le cytoplasme du thyrocyte. Les ions iodures passent vers le colloïde par un transporteur apical (PDS, CLC5 ou autres). Les ions iodures sont oxydés par la TPO et se fixent de façon covalente sur les résidus tyrosine de la thyroglobuline. Deux résidus d'iodotyrosine sont ensuite couplés grâce à la TPO pour former les précurseurs hormonaux sur la thyroglobuline. La thyroglobuline iodée est ensuite internalisée dans le thyrocyte par endocytose. Les hormones thyroïdiennes sont ensuite obtenues par protéolyse de la thyroglobuline et libérées dans le sang (Darrouzet et al., 2014).

L'oxydation de I^- par la « thyroïde peroxydase » (TPO), protéine de la membrane apicale avec un domaine catalytique contenant un hème, nécessite la présence de H_2O_2 qui est lui-même généré par la NADPH double oxydase 2 (Duox2), une protéine membranaire appartenant à la famille des NADP(H) (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate -Dépendent Flavin Adénine Dinucléotide Oxydase). Le nom dual oxydase provient de la présence d'un domaine faisant face à la lumière du follicule, présentant une similarité de 45% au niveau des acides aminés avec la TPO et ayant une activité peroxydase putative (Ris-Stalpers C., 2006; Bedard, Lardy and Krause, 2007).

L'activité de Duox2 est augmentée par une élévation de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire. Des mutations au niveau des gènes codant pour les protéines DUOX2 et DUOXA2, (le facteur de maturation et la protéine chaperonne de DUOX2), ont été identifiées parmi les causes d'hypothyroïdie congénitale (CH) (Moreno et al., 2002; Zamproni et al., 2008). Etant donné l'importance de H_2O_2 dans la synthèse hormonale, DUOX1, qui est une protéine dont la fonction est identique à celle de DUOX2, peut aussi être régulée positivement afin de compenser la défaillance de DUOX2.

Dans la lumière du follicule thyroïdien, après l'oxydation d' I^- , la TPO catalyse l'iodation de résidus tyrosine de la thyroglobuline : c'est l'étape de l'organification. Un iode est par la suite

lié par liaison covalente aux résidus tyrosine de la thyroglobuline pour ainsi former la Mono-iodotyrosine (MIT) et/ou deux iodes sont liés pour former la di-iodotyrosine (DIT). Ces intermédiaires d'hormones thyroïdiennes iodés liés à la thyroglobuline, sont ensuite couplés, de nouveau grâce à la TPO via une liaison éther pour former T3 (un résidu di-iodés et un résidu mono-iodés) et T4 (deux résidus di-iodés) (Gavaret, Cahnmann and Nunez, 1981; Dedieu *et al.*, 2010).

La thyroglobuline est un homodimère de 660 kDa hautement glycosylé et possédant 123 résidus tyrosine. Seul un tiers de ces résidus sont potentiellement iodés chez la souris en comparant à 15 chez l'homme : en moyenne 5 MIT, 5 DIT, 2,5 T4 et 0,7 T3 par chaîne. Cette répartition des iodations est effectuée sur des positions hormonogéniques (Dedieu *et al.*, 2010; Braverman and Cooper, 2012).

La thyroglobuline iodée établit aussi des liaisons disulfide, dityrosine, et glutamyl-lysine et avec des micro globules de protéines insolubles (Saber-Lichtenberg *et al.*, 2000) et est stockée sous forme colloïdale dans la lumière du follicule.

La thyroglobuline est internalisée par endocytose ou micropinocytose dans les conditions basales. Lorsque les taux sériques de TSH augmentent, toutes les étapes de la biosynthèse et du relargage des hormones thyroïdiennes sont stimulées, y compris l'internalisation de la thyroglobuline par endocytose ou micropinocytose. La Thyroglobuline internalisée subit un clivage protéolytique dans les lysosomes, T3 (20%) et T4 (80%) sont ensuite libérées dans la circulation sanguine (Braverman and Cooper, 2012) avec la contribution d'un transporteur de monocarboxylates MCT8 (SLC16A2).

La MIT et la DIT produites par la protéolyse de la thyroglobuline, sont métabolisées, dans la thyroïde, en iodure et en tyrosine par une iodotyrosine déhalogénase (Dehal1) dépendante du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate et utilisant la flavine mononucléotide (FMN) comme cofacteur (Stanbury JB, 1957; Rosenberg and Goswami, 1979; Moreno *et al.*, 2002).

L'iodure est libéré du MIT ou du DIT et peut alors être réintroduit dans le processus d'organification. L'activité Dehal1 est critique pour la synthèse de quantités adéquates d'hormones thyroïdiennes car elle assure ce recyclage de l'iodure intra thyroïdien à partir des formes intermédiaires des hormones thyroïdiennes.

La quantité d'iodure recyclé est 3 à 5 fois plus importante que celle provenant de l'alimentation au niveau de l'iode utilisé dans la synthèse des hormones thyroïdiennes (Degroot, 1966). Les

mutations de Dehal1 engendrent un hypothyroïdisme congénital, un goitre, une augmentation des taux sériques de MIT et DIT, et une perte urinaire sévère de I⁻. Mais, les effets peuvent être minimisés avec succès en administrant de grandes quantités de I⁻. En fonction de l'âge du patient lors du diagnostic et du début de traitement, ces mutations peuvent entraîner un retard dans le développement mental (John *et al.*, 1955; Moreno *et al.*, 2008). Les défauts d'activité Dehal1 souligne l'importance du processus de recyclage de l'iode dans la synthèse thyroïdienne.

IV. La régulation de la fonction thyroïdienne par la thyrotropine (TSH)

La synthèse des hormones thyroïdiennes dépend de l'apport de l'iode et est régulée par la thyrotropine (Thyroid Stimulating Hormone : TSH), une glycoprotéine de 30 kDa synthétisée par les cellules basophiles de l'adénohypophyse et qui est considérée comme le régulateur hormonal majeur de la fonction thyroïdienne. La TSH est constituée de 2 sous-unités : la sous-unité α qui est identique à celle des hormones sécrétées par la glande pituitaire antérieure (l'hormone lutéinisante et l'hormone folliculo-stimulante (LH et FSH)) et la sous-unité β qui lui confère sa spécificité fonctionnelle.

La libération de la TSH répond à une stimulation par l'hormone thyroïdienne (Thyroid Releasing Hormone, TRH). La TRH est une hormone tri peptidique de 362 Da présentant une séquence pyro-Glu-His-Pro-NH₂ et produite par l'hypothalamus.

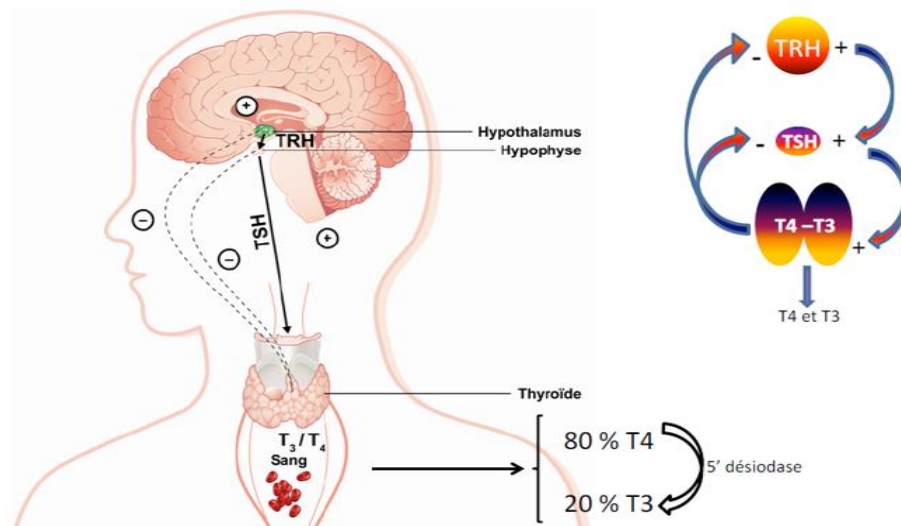


Figure 4. Mécanisme de la régulation de la thyroïde par la TSH. (adaptée de (Brent, 2012))

Les hormones thyroïdiennes agissent aussi par un rétrocontrôle négatif afin de réguler négativement l'expression des hormones stimulatrices. L'augmentation de la concentration des hormones thyroïdiennes circulantes, T₄ et T₃, inhibe la fonction thyroïdienne par diminution de la TSH (Figure 4). Dans notre équipe, il a été récemment démontré que la T₃ peut également directement inhiber la fonction thyroïdienne indépendamment de la TSH (Zwarthoed *et al.*, 2016).

La TSH se fixe à son récepteur, Thyroid Stimulating Hormone receptor (TSHr), appartenant à la famille des récepteurs transmembranaires G, qui est exprimé au niveau basolatéral de la membrane du thyrocyte. Ce couplage hormone/récepteur conduit principalement à un couplage de G_s et par conséquent à une activation de l'adénylate cyclase.(Figure 5) (Halmi *et al.*, 1959; Wilson *et al.*, 1968; Weiss, Philp and Grollman, 1984).

L'augmentation de l'AMP cyclique entraîne la phosphorylation de la protéine kinase A et l'activation d'autres cibles, dans le cytosol et le noyau, telles que la forskoline et la toxine cholique (Weiss, Philp and Grollman, 1984; Kogai *et al.*, 1997). L'activation de la voie d'adénylate cyclase stimule la transcription du NIS (Kogai *et al.*, 1997).

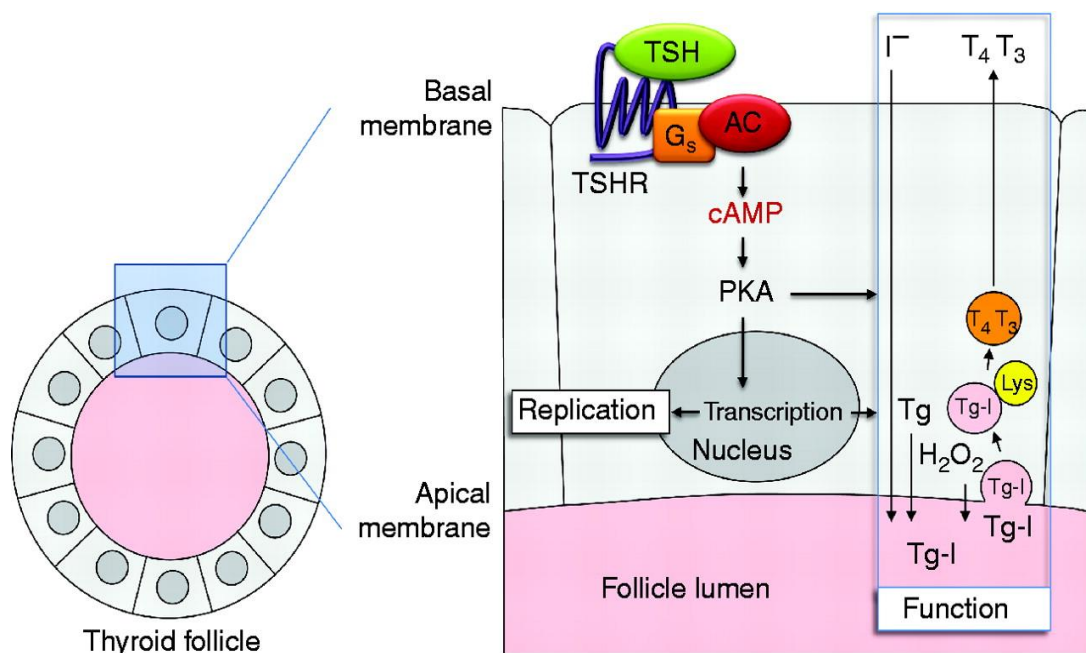


Figure 5. La liaison de la TSH au TSHr déclenche l'activation de l'Adényl cyclase dépendant de G_s conduisant ainsi à une stimulation de la production d'AMPc. En conséquence, la PKA est activée et phosphoryle plusieurs protéines impliquées dans l'entrée de l'iode dans les thyrocytes comme le NIS et dans la libération des hormones thyroïdiennes (Adjadj, Schlumberger and de Vathaire, 2009).

La régulation du NIS par la TSH est à la fois transcriptionnelle et post traductionnelle (Kaminsky *et al.*, 1994; Kogai *et al.*, 1997; Ajjan *et al.*, 1998). Les travaux de Kogai sur la lignée FRTL5 (lignée thyroïdienne de cellules de rat) ont montré que la TSH stimule l'expression du NIS au niveau protéique et ARN messager. Mais la stimulation de la captation d'iodure n'était observée que dans les thyrocytes déjà organisés en follicule, et non pas dans les monocouches de cultures primaires de thyrocytes traitées par la TSH. Cette observation met en évidence l'importance de la polarisation cellulaire et de l'organisation spatiale pour l'activité fonctionnelle du NIS (Kogai *et al.*, 2000). D'autres travaux ont montré que la TSH ne stimule pas, uniquement, l'expression du NIS mais aussi son adressage à la membrane dans la thyroïde (Kogai, Taki and Brent, 2006).

Lorsque le taux de TSH est plus élevé, d'autres voies peuvent être stimulées : Gq/11 et la phospholipase C-dépendante inositol phosphate (la cascade PIP2) qui active la synthèse de H₂O₂ et l'organification de l'iode (Corvilain *et al.*, 2000).

La régulation du TSHr a aussi un effet sur la régulation de la TSH. Plus particulièrement, dans des lignées dérivées de tumeurs thyroïdiennes (FTC-133 et BCPAP), d'autres mécanismes ont été mis en évidence au niveau de l'ARNm, après inhibition des voies de signalisation ras-BRAF-MAPK et PI3K-AKT-mTOR (D'Agostino *et al.*, 2014). Les inhibiteurs d'ERK et d'AKT induisent des niveaux d'expression différents de l'ARNm du NIS et du TSHr :

- L'inhibition d'AKT entraîne une augmentation du NIS et une diminution du TSHr. Cet effet est observé seulement dans la lignée FTC-133.
- L'inhibition d'ERK entraîne une augmentation de l'ARNm du NIS et du TSHr. Cet effet est observé seulement dans la lignée du BCPAP.

Une étude menée en 2016 sur des cultures primaires issues de cellules de thyroïde humaine a exploré le rôle du récepteur IGF-1R dans la régulation du TSHr (Morgan *et al.*, 2016). Cette étude a permis de mettre en évidence un « crosstalk » entre TSHr et IGF-1R, sans activation agoniste de l'IGF-1R, qui intervient dans la régulation du NIS par un mécanisme impliquant ERK1/2 et/ou AKT (Morgan *et al.*, 2016). Cette activation serait dépendante du couplage des protéines G (Krieger *et al.*, 2017).

V. La régulation de la fonction thyroïdienne par l'iode

L'administration de doses modérément élevées en iode chez les rats, souris ou humains, entraîne immédiatement un effet sur la fonction thyroïdienne indépendamment du niveau des hormones thyroïdiennes. Cette régulation permet à la thyroïde de s'ajuster à l'apport de l'iode. Cette régulation par la concentration d'iode circulant est constituée d'une réponse aiguë suivie d'une phase d'échappement si l'apport d'iode reste élevé. Elle est appelée :effet Wolff-Chaikoff (Wolff and Chaikoff, 1948; Halmi *et al.*, 1959).

La thyroïde a la capacité de s'adapter aux surcharges iodées, en réduisant la captation et l'organification de l'iode. Cet effet Wolff-Chaikoff s'observe très nettement entre 6 et 24 heures après exposition mais certaines régulations se mettent en place très rapidement (1h).

Quant à la réponse aiguë, une inhibition de la génération de H_2O_2 , de l'oxydation de l'iode et de sa liaison aux protéines, est rapidement induite. Cette inhibition entraîne une baisse transitoire de la synthèse des hormones thyroïdiennes (Wolff and Chaikoff, 1948) et est levée au bout de 24 heures même si un apport important d'iode est maintenu. Cela permet un retour à une synthèse normale des hormones thyroïdiennes. La capacité de captation d'iode est aussi réduite pendant la réponse aiguë mais elle reste basse durant la phase d'échappement.

L'effet d'inhibition par l'iode a été décrit en premier en 1948 *in vivo* par Wolff et Chaikoff lors d'une étude faite chez les rats. Les modèles ont été injectés avec des doses croissantes d'iode en intrapéritonéale et deux paramètres ont été suivis : le niveau d'organification ainsi que la distribution de l'iode dans le plasma. Les mesures effectuées ont montré un effet d'inhibition aiguë de l'organification de l'iode (moins de 24 heures) et à la suite d'une administration d'une dose seuil ($>10\mu M$) (Wolff and Chaikoff, 1948). Cette diminution de l'organification et de la captation n'entraîne pas d'hypothyroïdie, 48 heures après l'injection de l'iode, la sécrétion des hormones thyroïdiennes a repris normalement chez les rats (Wolff and Chaikoff, 1948).

L'effet Wolff-Chaikoff au niveau de la captation résulte de l'inhibition (Sternthal *et al.*, 1980; Spitzweg *et al.*, 1999) de l'expression du NIS à la fois au niveau transcriptionnel et protéique (Uyttersprot *et al.*, 1997; Leoni *et al.*, 2011). Il a été démontré qu'un excès d'iode induit une diminution de l'expression de l'ARN messager du NIS, sa stabilité et sa traduction (Eng *et al.*, 1999). Cet effet a été observé *in vitro* dans la lignée PCCL3, une lignée issue de thyroïde de rat, et *in vivo* chez des rats (Serrano-Nascimento, Calil-Silveira and Nunes, 2010; Serrano-

Nascimento *et al.*, 2012). En 1999, les travaux d'Eng suggèrent que l'importante décroissance de l'expression du NIS après 24 heures d'exposition aiguë à l'iode serait à l'origine du phénomène d'échappement observé. En effet, la diminution dans le transport actif de l'iode serait responsable de la reprise d'une synthèse normale des hormones thyroïdiennes chez les rats.(Eng *et al.*, 1999; Pramyothin *et al.*, 2011).

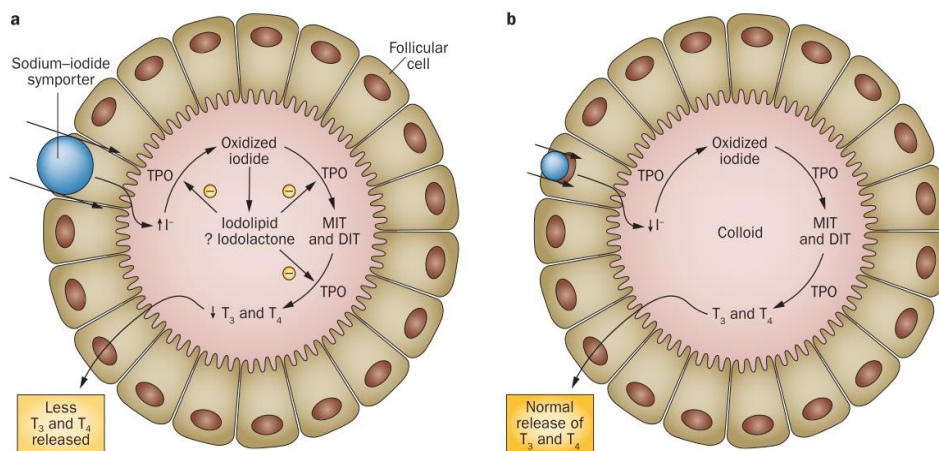


Figure 6. L'effet de Wolff Chaikoff. À la suite d'une forte dose d'iode, une inhibition est observée au niveau de l'expression du NIS ce qui entraîne une réduction dans le transport de l'iode. Une baisse de la synthèse des hormones thyroïdiennes est observée dû à l'excès d'iode. Un niveau normal de production des hormones thyroïdiennes sera rétabli lors de la phase d'échappement (Leung and Braverman, 2014).

Le mécanisme régissant l'effet Wolff-Chaikoff n'est pas élucidé. Néanmoins, il est décrit qu'un excès d'I⁻ entraîne une augmentation de production de dérivés réactifs d'oxygène, (Reactive Oxygen Species : ROS), dans les thyrocytes chez plusieurs espèces (Many *et al.*, 1992; Golstein and Dumont, 1996; Corvilain *et al.*, 2000; Poncin *et al.*, 2008) et qu'il entraîne une augmentation de la production de H₂O₂, chez les FRTL5 (lignée de cellules thyroïdiennes issues du rat), jusqu'à 5 heures après exposition (Alejandro A. Arriagada *et al.*, 2015). Il a aussi été démontré que la superoxyde dismutase (SOD) a un effet protecteur à la suite du stress oxydatif engendré par les concentrations élevées en iode. (Yao *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2015).

Bien que le niveau de base de la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) soit important pour maintenir le niveau de la biosynthèse des hormones thyroïdiennes (Poncin *et*

al., 2008; Poncin, Colin and Gérard, 2009), plusieurs auteurs ont suggéré que cette forte production de ROS serait responsable de l'action antiproliférative et cytotoxique de l'iode sur les thyrocytes (Many *et al.*, 1992; Deneff, Many and Van Den Hove, 1996).

De plus, une forte production de ROS a déjà été démontrée comme étant associée à l'activation de la voie de signalisation AKT/PI3K dans différentes lignées (Dong Yun *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2006). Comme l'apport aigu de l'iode et la stimulation de la voie de signalisation PI3K/AKT déclenchent des effets inhibiteurs similaires sur l'expression du NIS dans les thyrocytes, une équipe a étudié l'implication de PI3K/AKT dans la régulation par l'iode (Serrano-Nascimento *et al.*, 2014). Selon Serrano-Nascimento *et al.*, l'inhibition du NIS par l'iode impliquerait la voie phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B ou PI3K/AKT (Serrano-Nascimento *et al.*, 2014). Ce lien a été déduit par la forte phosphorylation d'AKT en présence d'iode. En revanche cette phosphorylation est modifiée en présence d'inhibiteurs de PI3K comme la wortmannine ou le 2-4-Morpholinyl-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (Serrano-Nascimento *et al.*, 2014). L'activation du mécanisme NRF2-Keap1 antioxydatif a aussi été proposée dans la protection de la thyroïde dans le cas d'un excès de l'iode (T. Wang *et al.* 2017).

L'hypothèse d'un composé iodé produit dans la glande thyroïdienne a été mise en avant pour la compréhension des mécanismes moléculaires liés à cet effet. Plusieurs composés ont été proposés et des investigations cherchant à savoir s'ils reproduisaient l'effet de l'iode ont été menées :

- L'iode lui-même qui pourrait induire l'inhibition de la TPO et donc inhiber l'iodation. Cependant cela n'explique pas la production du H₂O₂ (Nunez and Pommier, 1982).
- Les peptides iodés (Lissitzky, Benevent and Roques, 1961), cependant, aucun n'a été identifié et montré comme impliqué.
- Les hormones thyroïdiennes qui seraient synthétisées puis libérées en excès à l'intérieur de la cellule (Juvenal *et al.*, 1980).
- Les lipides iodés : iodolactones et iodoaldehydes. La présence des iodolactones dans la thyroïde a longtemps été controversée tandis que les iodoaldehydes représentent les iodolipides les plus abondants dans la thyroïde (Pereira *et al.*, 1990). L'ajout de l'aldéhyde 2 hexadecanal (2-IHDA) sur des coupes de thyroïdes a pour conséquence une inhibition de l'adenylyl cyclase (Panneels *et al.*, 1994) et l'inhibition de la production de H₂O₂ (Ohayon *et al.*, 1994; Panneels *et al.*, 1994). Une forte concentration d'iodolactone inhibe la prolifération des cellules thyroïdiennes porcines induites par

l'EGF (Dugrillon and Gartner, 1995). Ces iodolipides ont également été suggérés comme ayant un effet sur l'activité de la TPO (Pramyothin *et al.*, 2011) (Figure7). Concernant, la baisse de la synthèse thyroïdienne, la diminution de l'activité de la déiodinase résultant de la baisse d'iode pourrait y contribuer. Mais aussi la diminution de l'hydrolyse de la thyroglobuline et par conséquent la baisse de la synthèse thyroïdienne a été suggéré en tant que mécanisme impliqué dans cette autorégulation (Lamas and Ingbar, 1978; Becks, Eggo and Burrow, 1987).

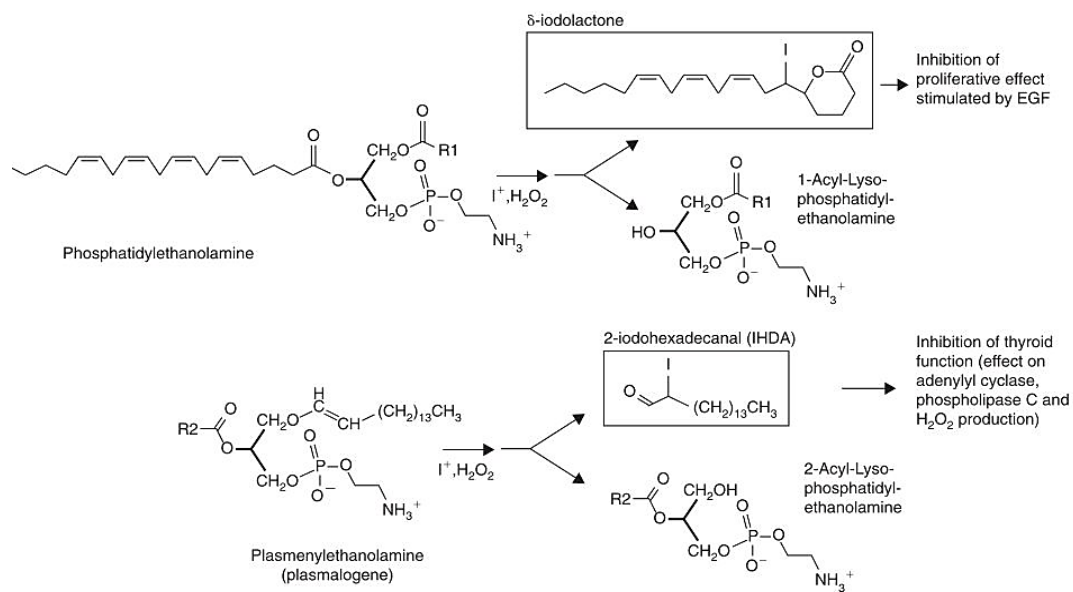


Figure 7 Biosynthèse des deux iodolipides proposés en tant que médiateurs dans la régulation par l'iode dans les thyrocytes ; R1, R2 : groupement Acyl.

Chapitre 2 : L'effet Wolff Chaikoff et ses applications

L'effet de Wolff-Chaikoff correspond à la combinaison de l'inhibition momentanée de la fonction thyroïdienne déclenchée par un fort apport aigu d'iode et de l'échappement traduit par une reprise de la synthèse hormonale. Ce processus physiologique permet la régulation de la thyroïde face à un apport variable d'iode.

Ce mécanisme de régulation physiologique est mis à profit en radioprotection. La prise d'iodure de potassium (KI) concerne potentiellement, les personnes habitant à proximité d'une centrale nucléaire. En effet, ces personnes peuvent être invitées à prendre des pastilles de KI pour empêcher l'absorption de l'iode radioactif dans la thyroïde en cas de relargage accidentel. Cette mesure a été appliquée en Pologne après l'accident de la centrale nucléaire de Tchernobyl au cours duquel le KI a été distribué à plus de 18 millions de personnes (Nauman and Wolff, 1993).

L'exposition à un excès d'iodure peut provenir aussi de molécules riches en iode comme l'amiodarone, qui est lentement métabolisé lui entraînant une libération d'ions iodures jusqu'à plusieurs mois après arrêt du traitement (Bogazzi *et al.*, 2001; van Erven and Schalijs, 2010), ou des agents de contraste utilisés en imagerie qui sont susceptibles de provoquer des effets similaires.

I. L'effet Wolff-Chaikoff et son application en radioprotection

Comme le rappelle l'incident de la centrale nucléaire de Tchernobyl survenu en 1986, un accident impliquant un réacteur, entraîne la libération des radionucléides dans l'environnement. Pendant les dix jours qui ont suivi cet accident, des quantités importantes d'éléments radioactifs ont contaminés l'atmosphère.

La radioactivité contamine l'environnement dans lequel elle est rejetée et atteint rapidement la chaîne alimentaire par inhalation, ingestion ou encore par blessures. La voie respiratoire est la première voie par laquelle elle pénètre, étant donné la volatilité de certains éléments radioactifs. Elle est aussi absorbée par la flore ce qui accélère son intégration dans la chaîne alimentaire. A

titre d'exemple, l'iode radioactif est détecté dans le lait au bout de 24 heures après l'ingestion d'herbes contaminées par les vaches.

Les radiations émises par les radionucléides sont dangereuses et peuvent avoir des effets sur le matériel génétique cellulaire (Yoshida *et al.*, 2014). Ces effets sont soit directs dû au rayonnement ionisant lui-même ou indirects : induites par les radicaux libres (ROS) produits par la radiolyse de l'eau. En effet, les ROS sont responsables à 60% des altérations de l'ADN produits lors d'une irradiation (Ward, 1988, 1994) . En revanche, les effets directs sont à hauteur de 30 à 40%.

Les rayonnements endommagent aussi les tissus et/ou les organes en fonction de la dose reçue ou absorbée. Cette dose est exprimée en unité appelé le Gray (Gy) alors que le Sievert (Sv) est l'unité de dose efficace qui considère à la fois le type de rayonnement et la sensibilité des tissus et des organes.

Une étude présentant une cohorte de 86 000 survivants à des bombardements de Nagasaki et Hiroshima a permis d'observer une relation dose-réponse significative sur l'ensemble des cancers solides et pour certains sites spécifiques de cancer : l'œsophage, le côlon, l'estomac, le foie, la vésicule biliaire, le poumon, le sein, l'ovaire, la vessie et la thyroïde (Ozasa *et al.*, 2012; Grant *et al.*, 2017). Cette étude met, aussi, en évidence l'importance du facteur de l'âge atteint au moment de l'exposition dans la relation dose-réponse. En effet, plus la personne exposée est jeune, plus le risque de développer des cancers solides est élevé (Ozasa *et al.*, 2012; Hsu *et al.*, 2013).

Lors de l'incident de Tchernobyl, les deux familles de radionucléides majoritaires dans les rejets radioactifs étaient les iodes (Iode¹³¹, Iode¹³²/Tellure¹³², Iode¹³³) et les césiums (césium ¹³⁷ et césium ¹³⁴). Etant donné que la thyroïde est un organe à la fois radiosensible et capable de concentrer et de fixer l'iode radioactif, elle est très sensible à l'effet carcinogène entraîné par l'exposition à l'iode radioactif. Le ratio de la relation entre l'exposition aux rayonnements et le risque de développer un cancer de la thyroïde est de 5,5 par Gray (Cardis *et al.*, 2005). Ce risque est dépendant de l'âge. Les études menées en 1990 à la suite des rejets radioactifs, ont mis en évidence l'augmentation d'un facteur 10, du développement des cancers thyroïdiens 4 ans après exposition, chez les enfants et les adolescents de moins de 15 ans (Kazakov, Demidchik and Astakhova, 1992; Heidenreich *et al.*, 1999; United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation, 2011). La plupart des cancers développés étaient des cancers thyroïdiens de type papillaire.

La plus faible dose observée, à partir de laquelle nous pouvons observer une augmentation significative du risque, a été évalué à 0,05 Gy - 0,1 Gy, dans les études épidémiologiques (Ron *et al.*, 1995). Le risque augmente 5 ans après exposition, est au maximum 15 ans après et décroît après 30 ans mais reste présent même au-delà de 40 ans (Ron *et al.*, 1995).

Une exposition à l'iode radioactif peut aussi entraîner l'apparition de perturbations dans la fonction thyroïdienne et engendrer des cas d'hypothyroïdie (Sinnott, Ron and Schneider, 2010). Le risque de maladie de Grave a significativement augmenté chez les survivants de Nagasaki et Hiroshima comme le reporte l'étude qui a concerné 4091 sujets (Hancock, Cox and McDougall, 1991). D'autres études indiquent qu'une exposition à des faibles doses de rayonnement entraînerait une augmentation de synthèse d'anticorps anti-thyroïde, fort indicateur de développement de maladies auto-immunes (Eheman, Garbe and Tuttle, 2003). Ces études préconisent d'évaluer ce risque au moyen d'une dosimétrie ciblée de l'iode fixée au niveau thyroïdien afin d'estimer le réel impact du déclenchement de maladies auto-immunes après une exposition chronique à des faibles doses d'iode radioactif (Eheman, Garbe and Tuttle, 2003).

Face à de telles conséquences, des mesures de protection spécifiques ont été mises en place, les directives sont avant tout : éviter toute exposition en cas de contamination atmosphérique par des protections, des restrictions alimentaires notamment l'interdiction de consommation de tout aliment produit dans la zone et une évacuation si nécessaire. Outre ces recommandations, la thyroïde, grâce à l'effet de Wolff Chaikoff, s'autoprotège par un fort apport d'iode stable. Cette faculté est exploitée à travers le blocage de l'accumulation de l'iode radioactif ou la diminution de sa fixation dans la thyroïde par l'ingestion de grandes quantités d'iode stable.

En effet, une pastille d'iodure de potassium, contenant 100 mg d'iode non radioactif est administrée par voie orale (Becker *et al.*, 1984; Becker, 1987). L'iodure est rapidement absorbé au bout de 30 à 60 min par l'appareil digestif.

Chez les adultes normaux ne présentant aucun problème de régulation thyroïdienne, l'ingestion KI des heures avant l'exposition à la radioactivité entraîne une saturation de 95% de la capacité d'absorption de la thyroïde (Figure 8). L'administration de KI inhibe à hauteur de 90% la fonction thyroïdienne au moment de l'exposition et de 50% s'il est ingéré 6 heures après l'accident. Dans le cas d'une exposition chronique, un renouvellement quotidien de prise, à 15 mg, permet de maintenir cette saturation à 90% (Verger *et al.*, 2001).

Afin d'avoir une protection efficace, il faudrait administrer le KI dans un intervalle de temps court avant le passage du nuage radioactif ou après exposition. Dans un tel cas, la thyroïde sera initialement protégée par un mécanisme de saturation qui sera suivi par l'inhibition liée à la première étape du Wolff-Chaikoff. Cette inhibition est aux alentours de 70% lorsque le KI est administré 24 heures après exposition tandis qu'elle est de 90 % lorsque le KI est administré 12 heures seulement avant l'exposition (Zanzonico and Becker, 2000).

En France, les pastilles de KI sont distribuées aux populations se trouvant dans un périmètre de 10 Km autour des réacteurs nucléaires. Dans le cas d'une contamination atmosphérique, les autorités sont celles qui sont responsables de la dose à administrer. En effet, les pastilles contiennent 65 mg de KI (équivalent à 50 mg d'iodure). Ces pastilles sont divisibles en quatre. Les doses officiellement recommandées sont comme suit : 100 mg pour les adultes incluant les femmes enceintes, 50 mg pour les enfants en dessous de 13 ans, 25 mg pour ceux qui ont moins de 3 ans et 12,5 mg pour les nouveau-nés ce qui correspond à un quart de la pastille (Iglesias *et al.*, 2017).

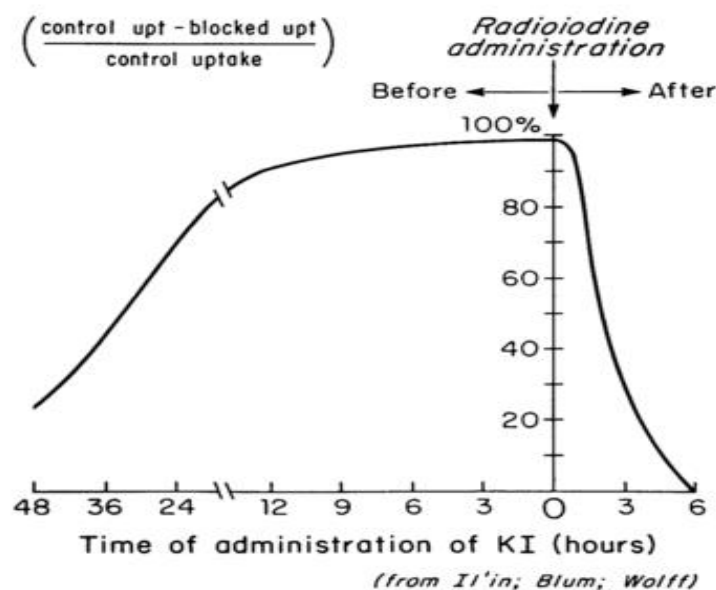


Figure 8 l'effet protecteur de l'iode administré sous forme de pastille de KI (100 mg). L'abscisse représente le temps (en heures) avant ou après l'exposition à l'iode radioactif (administré à temps égal zéro) (Becker, 1983).

Administrer l'iode, à de fortes concentrations, ou encore l'administrer à une population par prévention pourrait aussi avoir des effets secondaires. Certains de ces effets secondaires ont été étudiés dans le cadre de la prophylaxie à l'iode mise en place en Pologne à la suite de l'incident

de Tchernobyl. En effet, 24 heures après la détection des premières retombées radioactives (ce qui correspond à 4 jours après l'accident), des doses de KI ont été administrées à 95% de la population infantile et à 23% de la population adulte (Nauman and Wolff, 1993). Cette étude à taille réelle, a permis de mettre en évidence uniquement quelques effets secondaires s'illustrant principalement par des troubles gastro intestinaux bénins et des éruptions cutanées qui ont été observées autant chez les adultes que chez les enfants. Ces troubles sont des troubles mineurs ne nécessitant pas d'intervention médicale, par ailleurs, il n'a jamais été prouvé qu'il existe un réel lien entre la prise des pastilles de KI et ces effets.

D'autres effets, ont pu être constatés chez certaines personnes consommant quotidiennement une dose de 15 mg et qui développent un goitre au même titre que dans des populations qui ont un régime très fort en iode (Laurberg *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 2000). D'autres médicaments, très fortement iodés comme l'amiodarone, peuvent entraîner chez les patients qui en prennent, des effets secondaires sur la thyroïde (Zhao *et al.*, 2000; Bogazzi *et al.*, 2001). Toutefois, il a été démontré que les effets secondaires de l'amiodarone sur la fonction thyroïdienne ne sont pas directement liée à la surcharge associée à l'iode (Pitsiavas, Smerdely and Boyages, 1999).

L'administration de pastilles de KI avant l'exposition est très efficace. Cependant, ceci n'est pas possible en cas d'accident pour les personnes à proximité immédiate d'une centrale. Elles doivent alors pouvoir se confiner durant une période suffisante pour laisser la pastille de KI agir. Pour ce qui concerne les populations plus éloignées, elles peuvent être prévenues suffisamment en avance par rapport à l'exposition au nuage radioactif. Si l'iodure de potassium est pris après la contamination, il pourrait au contraire entraîner une augmentation de la dose de rayonnement de la thyroïde. En réalité, une augmentation de la concentration d'iodure plasmatique inhibera bien l'absorption d'iodure radioactif supplémentaire mais inhibera simultanément la sécrétion d'hormones avec une rétention prolongée des précurseurs hormonaux ayant déjà incorporés des radio-isotopes de l'iode.

En cas d'exposition prolongée, l'utilisation de pastilles de KI pourrait être efficace à condition de suivre des protocoles d'administration appropriés (Verger *et al.*, 2001). Avec le projet PRIODAC, nous recherchons à optimiser cette protection par prise répétée de KI afin d'assurer une protection maximale de la thyroïde en cas d'exposition continue à de l'iode radioactif. Nous étudions également les effets adverses associés à cette prise répétée de KI et en particulier sur les populations à risques.

D'autres stratégies utilisant des bloqueurs de la thyroïde ont été étudiées comme le perchlorate qui est un compétiteur de l'iode dans l'absorption assurée par le NIS. L'affinité du transporteur pour le perchlorate est plus élevée que pour l'iodure. Il fut ainsi utilisé comme un inhibiteur de la synthèse des hormones thyroïdiennes. Cependant, sa toxicité potentielle, sa courte durée d'action (Godley and Stanbury, 1954) et son mécanisme d'action ont, rapidement, écarté cette alternative dans le traitement de l'hyperthyroïdie et plus tard dans la radioprotection (Wolff, 1998). En effet, l'administration de plusieurs doses quotidiennes était nécessaire car le perchlorate n'a qu'un effet inhibiteur de courte durée et il provoque occasionnellement des nausées, des vomissements, de la fièvre et un dysfonctionnement rénal. Des patients ont également développé une anémie aplasique ou une agranulocytose et pour certains individus, la consommation de perchlorate a même été létale (Krevans, Asper and Rienhoff, 1962).

II. Les agents de contraste

Les agents iodés de contraste radiologique représentent une source de plus en plus fréquente d'excès d'iode (Sun Y. Lee *et al.*, 2015). D'ailleurs, avec l'augmentation de l'utilisation de la tomodensitométrie en imagerie médicale, l'utilisation des agents iodés s'est amplifiée.

Tout d'abord, un agent de contraste est un produit qui permet de mieux visualiser un organe ou une forme pathologique (tumeur) en augmentant visuellement son contraste afin de pouvoir mieux l'observer et le distinguer des autres structures qui l'entourent. Ils sont couramment administrés aux patients par voie intraveineuse.

Ces agents de contraste iodés (ICA) entraînent une diminution considérable de la captation de l'iode et du Pertechnetate dans la thyroïde (Grayson, 1960; Luster *et al.*, 2008). Ce phénomène a également été observé chez les rats (Yu and Shaw, 2003), les chats (Lee, Pease and Berry, 2010) et les souris (Vassaux *et al.*, 2018). Chez l'homme, l'administration intraveineuse d'ICA entraîne une altération de l'absorption thyroïdienne pendant huit semaines.

Tableau 1 Liste des différents agents de contraste, avec leur concentration en iode et leur osmolarité (Sun Y. Lee *et al.*, 2015).

Name (Trade Name)	Iodine Content, mg I/mL	Osmolarity
Ionic contrast media		
Diatrizoate (Hypaque 50)	300	High
Ioxaglate (Isopaque 370)	370	Low
Iothalamate (Conray)	320	Low
Nonionic contrast media		
Iopamidol (Isovue 370)	370	Low
Iohexol (Omnipaque 350)	350	Low
Ioxilan (Oxilan 350)	370	Low
Iodixanol (Visipaque 320)	320	Low
Ioversol (Optiray 350)	350	Low

Les agents de contraste à faible osmolarité (600-1000 mOsm / kg) et iso-osmolaire (280-290 mOsm / kg) ont un ratio plus important d'atomes d'iode par rapport au nombre de particules de contraste comparé aux agents à osmolarité élevée et sont ainsi plus fortement concentré en iode (1500-2000 mOsm / kg) (Katzberg and Haller, 2006; Solomon, Biguori and Bettmann, 2006). Toutefois, que le produit ait une forte ou faible osmolarité, il a toujours une teneur en iode plus forte que la dose recommandée.

Lors d'un examen médical au scanner, les patients reçoivent, en général, une dose qui varie de 50 à 100 ml d'ICA. Ces doses typiques pour les tomographies représentent 2500 à 5000 µg d'iode libre biodisponible et 15 à 37 g d'iode total (Thomsen *et al.*, 2004). En outre, l'iode lié de manière covalente peut être libéré en iodure libre, en particulier lorsque le temps de circulation dans le corps augmente dans le cas d'une altération de la fonction rénale (van der Molen, Thomsen and Morcos, 2004; Moisey *et al.*, 2007).

Après l'administration d'ICA, la quantité d'iode urinaire reste élevée pendant 4 à 8 semaines chez les patients normaux ayant une thyroïde ne présentant aucune anomalie ou dysfonctionnement (patients euthyroïdiques) (Sun Y Lee *et al.*, 2015). Une étude a été réalisée sur des adultes euthyroïdiques en bonne santé ayant une fonction thyroïdienne et rénale intacte. Elle a montré que les concentrations moyennes d'iode urinaire ont augmenté de 300% ,entre les valeurs initiales et maximales, et sont revenues à leur valeur initiale, uniquement, 43 jours après l'administration de l'ICA (Nimmons *et al.*, 2013). Dans une étude portant sur des patients athyréotiques (privés de thyroïde) au Brésil, les taux d'iode urinaire ne se sont normalisés qu'un mois après avoir subi un scanner iodé (Padovani *et al.*, 2012).

Dans une autre étude chez des patients sans dysfonctionnement thyroïdien sous-jacent et sans goitre palpable, l'iode de tomographie a entraîné une augmentation des concentrations sériques de TSH jusqu'à 6,4 mUI / L chez 18% des patients dans les 3-5 jours (valeur normale 4.4 mUI / L). Les concentrations de T4 et de T3 libres sont invariables, bien que dans l'étude, aucune évaluation n'a été réalisée pour estimer les variations légères dans les taux d'hormones thyroïdiennes (Gartner and Weissel, 2004).

Cependant, une étude clinique a constaté que l'exposition à l'ICA chez 39 patients autrefois euthyroïdiens était associée à une augmentation significative des taux sériques de T3 et T4, et à une absence de TSH (Breuel *et al.*, 1979). En effet, un dysfonctionnement thyroïdien peut survenir après une administration d'ICA, même chez des individus sans dysfonctionnement thyroïdien antérieur et avec des glandes thyroïdiennes normales.

Dans ce cadre, des études se sont intéressées au développement d'une hyperthyroïdie après des examens utilisant des ICA (Wu *et al.*, 1978; Jaffiol *et al.*, 1982; Nygaard *et al.*, 1998). D'autres ont démontrés que des développements d'hyperthyroïdie peuvent survenir jusqu'à plusieurs semaines après l'exposition à l'ICA (Padovani *et al.*, 2012; Nimmons *et al.*, 2013) : les concentrations sériques de TSH sont supprimées et les concentrations de T4 libre et / ou de T3 totales sont élevées. Conn et al (CONN *et al.*, 1996) ont rapporté une tendance à l'hyperthyroïdie après radiographie de contraste non ionique dans une cohorte de 73 patients (âge moyen : 65,7 ans), un résultat similaire à celui rapporté par Nygaard et al (Nygaard *et al.*, 1998), dont certains patients ont déjà des symptômes de maladie thyroïdienne, une seule patiente, dans cette étude, âgée de 53 ans a développé le symptôme d'une tempête thyroïdienne ayant entraîné un arrêt cardiopulmonaire immédiatement après une étude radiologique iodée. Dans une étude d'une cohorte de 101 patients ayant subi une angiographie coronarienne, 6% ont développé, également, une hyperthyroïdie subclinique à 8 semaines après l'exposition à l'iode (Ozkan *et al.*, 2013).

Après un traitement avec un ICA, il est, notamment, possible de développer une hypothyroïdie. Une étude récente a démontré une association entre l'exposition à l'ICA et le développement de l'hypothyroïdie (Rhee *et al.*, 2012). Certains patients atteints d'hypothyroïdie transitoire induite par l'iode développent plus tard une hypothyroïdie permanente (Braverman, Woeber and Ingbar, 1969). L'incapacité à échapper à l'effet aigu de Wolff-Chaikoff pourrait être liée à une auto-immunité thyroïdienne ou à des anomalies structurelles sous-jacentes de la glande thyroïdienne (Sun Y Lee *et al.*, 2015).

Historiquement, cette réduction de captation d'iodure par les tissus thyroïdiens en réponse à l'ICA a été attribuée aux fortes quantités d'iodure libre associées (Laurie, Lyon and Lasser, 1992) et / ou libérées par l'ICA. Conformément à cette hypothèse, la teneur en iode urinaire est élevée pendant quatre à six semaines avant de revenir à des niveaux normaux. En effet, la teneur en iodure urinaire est utilisée comme marqueur de suivi (Haugen *et al.*, 2016).

Toutefois, l'implication de l'iodure libre ou l'existence d'autres mécanismes dans la réduction de l'absorption d'iodure par la thyroïde en réponse à l'ICA n'ont jamais été formellement démontrées. Récemment, dans notre laboratoire nous avons montré, en utilisant l'imagerie SPECT chez la souris, que l'ICA réduit l'absorption d'iodure par la thyroïde à un degré plus élevé et plus durable et que l'iodure libre administré avec l'ICA n'explique pas l'inhibition observée (Vassaux *et al.*, 2018).

La thyroïde s'autorégule dans le cas d'une augmentation de l'apport d'iode en déclenchant un mécanisme de protection « le Wolff-Chaikoff ». Ce mécanisme bien que très peu élucidé est notamment mis à profit dans la radioprotection vis-à-vis d'une exposition à l'iode radioactif. Une meilleure compréhension du mécanisme moléculaire sous-tendant l'effet de Wolff-Chaikoff, pourrait conduire à l'élaboration de nouvelles stratégies de radioprotection.

Chapitre 3 : La protéine SLC5A8

Le transport de l'iode par les thyrocytes est un processus en deux étapes impliquant des protéines situées dans la membrane basale et dans la membrane apicale de la cellule. Il est maintenant bien établi que le symporteur sodium/iode (NIS), localisé dans la membrane basolatérale, permet l'accumulation des iodures dans les thyrocytes. Cependant, le ou les effecteurs impliqués dans le passage de l'iode vers la lumière du follicule sont toujours spéculatifs. L'équipe d'Everett a proposé la protéine « Pendrine » à la suite de leurs observations en 1997 chez les patients souffrant du syndrome Pendred (Everett et al. 1997). Ils ont démontré que les mutations du gène *Scl26a4*, qui code pour cette protéine, est associé au syndrome de Pendred et que cette protéine serait responsable du transport apical de l'iode (Royaux *et al.*, 2000).

Au cours de la dernière décennie, plusieurs éléments ont démontré que cette hypothèse est discutable remettant à l'ordre du jour la possibilité de reconsidérer d'autres protéines membranaires comme élément intervenant dans ce passage de l'iode (Carvalho and Dupuy, 2017).

Notre équipe s'est intéressée à cet aspect du transport de l'iode et nos travaux publiés en 2002 ont permis de mettre en évidence un autre transporteur membranaire (SLC5A8) exprimé au niveau de la membrane apicale du thyrocyte qui a été postulé comme étant potentiellement impliqué dans le passage d'iode (Rodriguez *et al.*, 2002). Plusieurs études ont démontré par la suite que c'était un transporteur de monocarboxylates dans différents organes (Gopal, Y. J. Fei, *et al.*, 2004; Miyauchi, Gopal, Y.-J. Fei, *et al.*, 2004; Takebe *et al.*, 2005; Pamela M Martin *et al.*, 2007).

Si un rôle physiologique associé à sa capacité de transport actif de monocarboxylates a été proposé dans le rein et le colon, son rôle dans la thyroïde demeure inconnu. Néanmoins, des observations suggèrent son implication dans le métabolisme de l'iode.

Dans ce chapitre, sont présentés les différents rôles physiologiques attribués à cette protéine.

I. Présentation du SLC5A8

SLC5A8 (Solute carrier family 5 member 8), est une protéine appartenant à la famille des SLC5 constituée de 610 acides aminés chez l'humain et de 611 acides aminés chez la souris. SLC5A8 appartient à la même famille que le NIS nommé aussi SLC5A5.

SLC5A8 est une protéine membranaire initialement identifiée comme potentiellement impliquée dans le transfert passif d'iode au travers de la membrane apicale des thyrocytes et nommée hAIT (putative human Apical Iodide Transporter) (Rodriguez, Perron, Lacroix, Caillou, Leblanc, M. Schlumberger, *et al.*, 2002). Mais, depuis la mise en évidence de sa capacité de transport des monocarboxylates, SLC5A8 est nommée SMCT1 pour Sodium-coupled monocarboxylate transporter 1, ou Electrogenic sodium monocarboxylate cotransporter. Ces noms font tous référence à la même protéine issue de la traduction du gène *Scl5a8*.

I.1. Identification de SLC5A8 (SMCT1, hAIT)

L'identification de SLC5A8, a été effectuée lors de travaux publiés en 2002, par notre équipe dans le cadre d'une collaboration avec l'institut Gustave Roussy, et visant initialement à identifier de nouveaux transporteurs d'iodure dans la thyroïde. L'équipe a utilisé une stratégie de clonage par PCR basée sur les homologies de séquences avec le NIS. A partir d'une banque d'ADNc de rein humain, le transcrit du gène *Scl5a8* a été identifié, et le gène a été localisé plus tard sur le chromosome 12q23. Le transcrit code pour une protéine de 610 acides aminés présentant 46% d'homologie et 70% de similitude avec le NIS humain (Rodriguez *et al.*, 2002) (Figure 10).

En utilisant des anticorps spécifiquement dirigés contre SLC5A8, la protéine a été localisée dans le pôle apical des thyrocytes humain (Figure11).


```

hAIT MDTPRGIG FVVDYVVFAGMLVISAAIGIYYAFA SGG
hNIS MEAVETGERP--GA---G---L--LV-TG--LWVGL-R--

hAIT QQTSKDFLMGRRR PKC PKA TAVPVALSITASEMSAVTVLGTPKCPSEV
hNIS --RSAE--FT---LA-L--G---S-----Q---V---A

hAIT YRFGAIFSIPKCFAFTYFFVVVISAEVFLPVPKCFYKLGITSTYPKCEY
hNIS --Y-LK-LWMCLGQLLNS-LT-LL-M---R--L-----

hAIT LELRFNKCVRLCGT VLFIVQPKCTILYTGIVIVYAPALALPKCNOVT
hNIS --M--SRA-----LQY--A-M-----I-----

hAIT GFPKCDLNGAVVATGVVCTFYCTPKCLGGLKAVIWTPKCDVFOVGIMVA
hNIS -L-I-ASLLS--II---TAV--M---V-----VV-LS

hAIT GFASVILQAVVMQGGISTILNDAYDGGRLNFWNFPNPLO
hNIS --WV-LARG-MLV--PRQV-TL-QNHS-I-LMD---D-RS

hAIT RHTFWPKCLIIGGTFTWTSIYPKCGVNQSQVQRYISCKSRFQAKL
hNIS -Y---FVV---LV-L-M---A---VA-RTEK---

hAIT SLYINLVGLWAILTCSVFCGLALYSRYHDCDPWTAKKVSA
hNIS A-L--Q---FL-VSSAAC--IVMVFV-T---LLGRI--

hAIT PDQLMPYLVLVDILQDYPGLFGLFVACAYSGLTSTVSSIN
hNIS ---Y--L---FE-L--V---L-----A-T---

hAIT ALAAVTVPKCEDLIKPYFRSLERSLSWISQPKCMSVYVYGALCIG
hNIS -M-----RL---APRK-VI--K-L-LI--SA-LT

hAIT MAALASLMG AILQAAPKCLSVFGMVGGLMGLFALGILVPKCPF
hNIS V---S--L-GGV--GSFT-M-VIS---L-A-I--MFL-AC

hAIT NSIGALVGLMAGFAISLWVGIGAQIYPLPERTLPPKCHLDI
hNIS -TP-V-A-G-L-L--AL--TL--SEQTMRV-PSSA

hAIT QGCNSGLY TYNGLYETNLITTEMPFTTSVPKCFQIYN VQRTPLM
hNIS AR-VALSV-ASG-LDPALL-AND-SRAPSSGMDAS-PA-A

hAIT DNPKCWYLSYLYFSTVGTLVTLVGLVSLPKCSTGGRKQ NLDP
hNIS -SF-AI-----YGAL---T-V-C-A-I-CL--PT-RSTLA-

hAIT RYILTPKtyrKEDFLSNFDIFKPKCKKHVLPKCSYKSHPKCPVE DGG
hNIS G -LWW-LARQTASVAP-EEVAILDDNL-KGPEELPT-N

hAIT TDNPAFN HIELN SDQSGKSPKC
hNIS KKP-G-LPTNEDRLFPKCFLGQK--EGAGSWTPCVGH-GGRDQ

hAIT NGTRL
hNIS QE-N-

```

Figure 9. Alignement des acides aminés des séquences des deux protéines humaines hNIS et hSLC5A8 : les acides aminés en commun sont notés (-), les treize domaines transmembranaires sont surlignés, les sites de glycosylation, sont notés (GLY), les sites potentiels de phosphorylation par la kinase cAMP dépendante (PKA), la kinase C (PKC) et la tyrosine kinase (Pkyr) sont aussi indiqués. (Rodriguez et al., 2002)

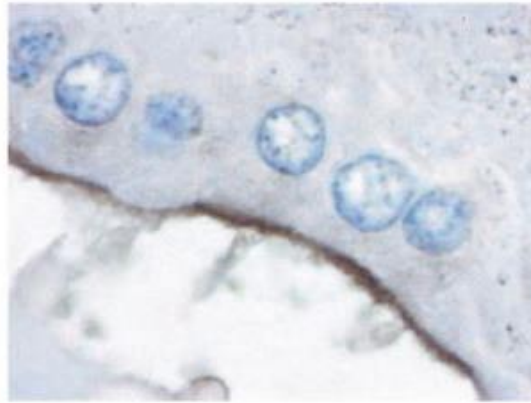


Figure 10. Coupe histologique d'une thyroïde humaine mettant en évidence la protéine hSLC5A8 par un marquage immunohistochimique (agrandissement*250) (Rodriguez et al., 2002)

I.2. SLC5A8 et son rôle anti tumoral

La protéine SLC5A8 a été proposée peu de temps après son identification comme possédant un rôle suppresseur de tumeur (Li et al. 2003). En effet, dans le contexte du cancer du côlon, Li et ses collaborateurs ont montré que l'expression de SLC5A8 est réprimée dans une majorité des tumeurs par méthylation de son gène codant et que l'expression de SLC5A8 dans des cellules en culture est associée à un effet antiprolifératif. Les auteurs ont proposé que la perte d'expression induise la prolifération tumorale des cellules coliques.

Les modifications épigénétiques sont communes dans les cellules tumorales et contribueraient à l'initiation et à la progression du cancer (Sharma, Kelly and Jones, 2010; Hatziaepostolou and Iliopoulos, 2011). Des modifications épigénétiques (méthylation de l'ADN, acétylation et méthylation des histones, remodelage de la chromatine et dérégulation des miARN) s'ajoutent à des altérations génétiques pour perturber la fonction des gènes.

L'expression de SLC5A8 est supprimée dans une majorité de tumeurs du côlon, tant au niveau transcriptionnel que protéique. Cet effet est associé à la méthylation de l'exon 1 de *Slc5a8* (Li et al., 2003; Dong et al., 2005; Paroder et al., 2006; Thangaraju et al., 2006; Brim et al., 2011). En effet, dans le cas d'une muqueuse normale du côlon, l'exon 1 de *Slc5a8* est non méthylée. En revanche, il est fréquemment méthylée dans les cancers primaires et les adénomes du côlon ainsi que dans les foyers de cryptes aberrantes (la première anomalie morphologique détectable de l'épithélium colique), suggérant que l'hyperméthylation du promoteur de *Slc5a8* est un des premiers signes du développement tumorale dans le côlon (Li et al., 2003).

La méthylation du promoteur de *Slc5a8* et l'inactivation génique (silencing) ont également été démontrées dans divers néoplasmes non coliques, y compris le cancer de la thyroïde (Lacroix *et al.*, 2004; Porra *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2006; Schagdarsurengin *et al.*, 2006), le cancer du sein (Thangaraju *et al.*, 2006), le cancer gastrique (Ueno *et al.*, 2004), le cancer du cerveau (Hong *et al.*, 2005), le cancer de la prostate (Park *et al.*, 2007), le cancer du pancréas (Park *et al.*, 2008), le carcinome épidermoïde de la tête et du cou (Bennett *et al.*, 2008) et la leucémie myéloïde aiguë (Whitman *et al.*, 2008).

In vitro, dans des lignées de cellules cancéreuses non issues du colon, la protéine SLC5A8 n'est pas exprimée. En revanche, après traitement par des agents de déméthylation, son expression peut être restaurée (Li *et al.*, 2003).

La fonction de suppresseur de tumeur de SLC5A8 a souvent été l'objet d'études qui ont recherché principalement à comprendre son rôle dans le côlon.

Plusieurs d'entre elles, proposèrent que cet effet serait médié par une augmentation du butyrate intracellulaire (Ganapathy *et al.*, 2005, 2008) induisant une apoptose via une inhibition des histones désacétylases. Le butyrate est très abondant dans la lumière du colon (5-15mM). Il résulte de la fermentation bactérienne de la matière organique non digérée. Il a aussi des propriétés anticancérigènes, inhibe la prolifération et induit la différenciation et l'apoptose des cellules cancéreuses *in vitro*, y compris les cellules cancéreuses colorectales (Kruh, 1982; Tsao *et al.*, 1983; Augeron and Laboisse, 1984; Hague *et al.*, 1993). Des études épidémiologiques ont depuis longtemps démontré l'effet protecteur des fibres alimentaires contre le cancer du côlon (Kim, 2000), et la génération de butyrate par la fermentation bactérienne est à l'origine de cet effet.

Par contre, les études *in vivo* menées par l'équipe de Frank en 2008 sur une lignée de souris invalidée pour gène codant SLC5A8 (*slc5a8*^{-/-}) ont montré que l'incidence du cancer intestinal n'est pas augmenté chez ces animaux même après exposition à des substances cancérigènes (Henning. Frank *et al.*, 2008) remettant, ainsi, en question le caractère anti tumoral de SLC5A8, médié par le butyrate.

D'ailleurs, le transport de butyrate dans les tissus du colon chez les souris Knock-out SLC5A8 n'a pas été altéré, laissant supposer que d'autres voies d'absorption du butyrate seraient impliquées ou d'autres transporteurs seraient concernés.

I.3. SLC5A8 : transporteur de monocarboxylates

SLC5A8 appartient à la famille SLC5 des transporteurs couplés au sodium qui comprend au moins 11 membres avec une distribution tissulaire et une spécificité de substrat variées. Plus spécifiquement, SLC5A8, est un transporteur de monocarboxylates couplé au sodium (également connu sous le nom SMCT1) principalement présent dans l'intestin grêle, le côlon, la thyroïde, les glandes rénales et salivaires mais aussi dans la rétine et le cerveau (Rodriguez, 2002; Gopal, Y.-J. Fei, *et al.*, 2004; Takebe *et al.*, 2005; Iwanaga *et al.*, 2006; Gopal *et al.*, 2007; Pamela M Martin *et al.*, 2007; Henning Frank *et al.*, 2008; Yanase *et al.*, 2008).

La spécificité de substrat de SLC5A8 est similaire à celle des transporteurs de monocarboxylates (MCTs) (Halestrap and Price, 1999). Cependant, il n'y a pas de similarité de séquence entre les membres de la famille MCT et SLC5A8 et ils diffèrent aussi dans leurs mécanismes de transport.

Contrairement à SLC5A8, qui fonctionne comme un transporteur électrogène couplé au Na⁺, les MCT fonctionnent comme des transporteurs électroneutres couplés à des H⁺ (co-transporteur d'1 monocarboxylate⁻ pour 1 Na⁺).

La fonction de transport a été montrée dans le système d'expression de l'oocyte de *Xenopus laevis*. En effet, l'expression de SLC5A8 dans les oocytes a conduit à une absorption dépendante du Na⁺ de divers monocarboxylates tels que l'acétate, le propionate et le butyrate ainsi que le lactate (Miyachi, Gopal, Y. J. Fei, *et al.*, 2004).

Les affinités du transporteur pour ses différents substrats sont :

- butyrate ($81 \pm 17 \mu\text{M}$) > propionate ($127 \pm 14 \mu\text{M}$) > L-lactate ($235 \pm 24 \mu\text{M}$) > D-lactate ($742 \pm 330 \mu\text{M}$) > acétate ($2,46 \pm 0,89 \text{ mM}$).

Les monocarboxylates avec cinq à huit atomes de carbone sont également transportés par SLC5A8 mais moins efficacement en comparaison avec les monocarboxylates volatils.

Le rapport Sodium-substrat différerait selon le substrat : alors que ce rapport est de 3 pour le propionate, la valeur est de 2 pour le lactate. Ainsi, la stœchiométrie du substrat /Na⁺ semble varier en fonction du substrat transporté (4:1 pour le propionate et 2:1 pour le lactate) (Miyachi, Gopal, Y.-J. Fei, *et al.*, 2004).

La nature du substrat principal co-transporté par SLC5A8 varie probablement d'un tissu à l'autre. Dans le côlon, par exemple, la fermentation bactérienne, des glucides non absorbés et des fibres alimentaires, génère des niveaux élevés de monocarboxylates, principalement l'acétate, le propionate et le butyrate, tous déjà démontrés comme étant des substrats de SLC5A8 dans les modèles cellulaires.

Dans le modèle murin invalidé pour le gène codant pour SLC5A8, le transport du butyrate et du propionate dans le côlon n'est pas modifié (Henning. Frank *et al.*, 2008), ce qui remet en question un rôle prépondérant de SLC5A8 dans l'absorption de monocarboxylates *in vivo*. Toutefois, le knockout SLC5A8 atténue significativement le transport du lactate par les tissus du côlon, suggérant un rôle de SLC5A8 dans l'absorption du lactate intestinal, notamment dans des conditions pathologiques de prolifération bactérienne conduisant à l'acidose D-lactique (Henning. Frank *et al.*, 2008) (Figure 12).

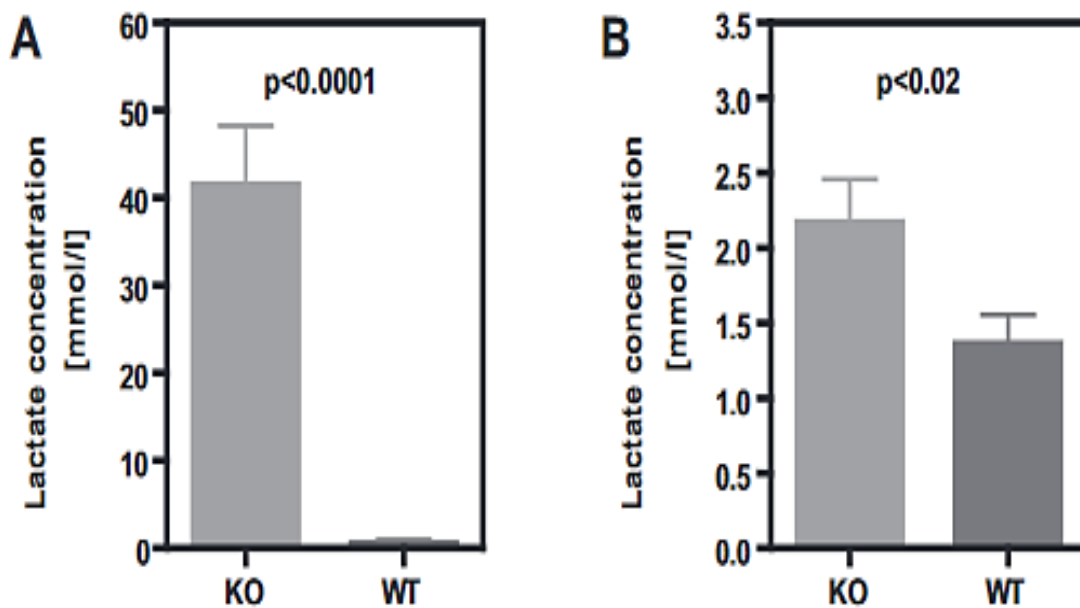


Figure 11. Suivi du Lactate urinaire et salivaire dans les modèles KO et WT de SLC5A8^{-/-} (n=23/groupes). (A) Concentration du lactate urinaire (n=23/groupes). (B) Concentration du lactate salivaire (n=13/groupe) 2 min après injection pilocarpine (Henning. Frank *et al.*, 2008).

Le lactate serait le substrat principal de SLC5A8 dans les glandes rénales et salivaires (Gopal, Y.-J. Fei, *et al.*, 2004; Henning Frank *et al.*, 2008). En effet, les souris invalidées pour le gène codant SLC5A8 manifestent des concentrations plus élevées de lactate urinaire et salivaire par rapport aux animaux non mutants (WT), suggérant que SLC5A8 contribue à la réabsorption du lactate dans les deux organes (Henning Frank *et al.*, 2008).

SLC5A8 interviendrait également dans la réabsorption rénale du nicotinate (vitamine B3), vitamine essentielle au fonctionnement normal de toutes les cellules (Gopal, Y.-J. Fei, *et al.*, 2004) et du pyroglutamate, un sous-produit du métabolisme du glutathion (Miyachi *et al.*, 2010).

Le SLC5A8 neuronal contribuerait aussi à l'absorption des corps lactate et corps cétoniques, utilisés comme source d'énergie dans le cerveau dans les conditions physiologiques et pathologiques. Normalement, le lactate est un carburant métabolique important pour les neurones. Il provient de la circulation sanguine ou il est généré par les astrocytes à partir du glucose. En revanche, les corps cétoniques sont des substrats métaboliques pour les neurones dans des conditions de disponibilité transitoire limitée du glucose telles que la diète et le diabète non contrôlé.

Un rôle similaire de SLC5A8 dans le transport du lactate et des corps cétoniques a été proposé dans le métabolisme de la rétine, (Pamela M. Martin *et al.*, 2007).

SLC5A8 a été identifié par homologie avec le transporteur d'iode (NIS). Il a été montré comme étant exprimé dans la membrane apicale des cellules folliculaires thyroïdiennes et a été proposé comme potentiellement intervenant au transport d'iodure dans la lumière thyroïdienne (Rodriguez *et al.*, 2002).

D'autres études ont toutefois montré que SLC5A8 ne transporte pas d'iodure et que les souris invalidées pour le gène codant pour SLC5A8 possèdent une fonction thyroïdienne normale. La fonction de SLC5A8 dans la thyroïde demeure donc inconnue.

Chapitre 4 : Le criblage des mécanismes moléculaires par les méthodes omiques

Les deux dernières décennies ont été témoins d'une explosion des données issues du développement et de la maturation progressive des technologies « omiques » et de la bio-informatique. Aujourd'hui, le séquençage du génome entier est devenu un outil de recherche de routine, et les technologies de protéomique de pointe ont rattrapé la génomique au cours des dernières années en termes de couverture. La protéomique, a rendu possible la lecture de l'évolution globale du protéome d'une cellule en réponse à un stimulus ou lors d'un phénomène de régulation physiologique.

La présence d'une molécule organique dans une cellule, un tissu ou un organisme vivant, conduit souvent à des modifications des niveaux d'expression d'un certain nombre de gènes et/ou de protéines. La capacité de détecter ces différences significatives entre deux états cellulaires est une approche universelle qui vise à démêler les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans un processus physiologique. Le but ultime est de découvrir de nouveaux marqueurs, de diagnostiquer et indirectement de suivre de nouvelles voies thérapeutiques.

Les profilages transcriptionnels et protéomiques consistent donc à comparer les profils d'expression obtenus en présence et absence du composé (au moyen de puces à ADN, de gels d'électrophorèse 2D ou de techniques protéomiques quantitatives) afin d'identifier la voie ciblée par la molécule d'intérêt. L'avantage de ces méthodes est de donner une vue d'ensemble des modifications induites par la molécule ou le stimulus (rayons ionisants, chaleur, etc).

Par ailleurs, ces avancées technologiques et ces nouvelles plateformes développées concernent aussi l'analyse des métabolites. En effet, l'analyse métabolomique permet d'avoir une capture instantanée sur les métabolites résultants et produits à la suite des mécanismes engagés en réponse aux molécules exogènes ou en réponse aux stimuli. Cette approche rapide d'application nécessitant moins de temps de préparation de l'échantillon est largement appliquée dans le domaine médical et dans la recherche de marqueurs exprimés en oncologie.

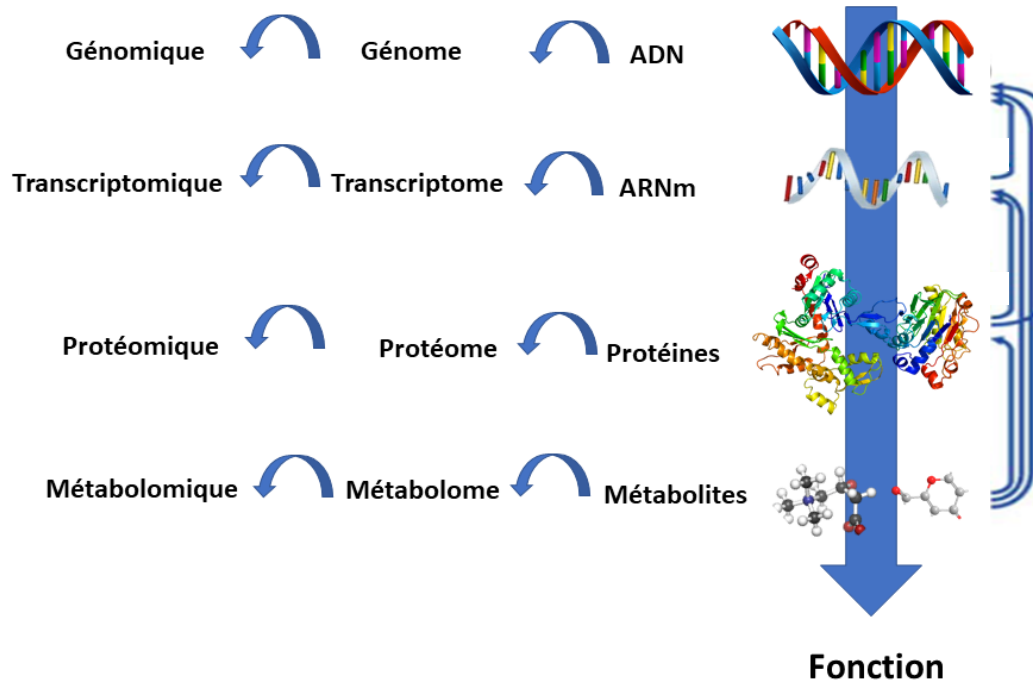


Figure 12 schéma représentant les différentes « -omiques » et illustrant les possibles relations entre elles (Goodacre, 2004)

Afin d'étudier les protéines impliquées dans une réponse physiologique, la protéomique est aujourd'hui l'outil incontournable pour l'étude de cette réponse. Au cours de ma thèse, nous avons eu recours à différentes méthodes omiques dans une approche comparative pour répondre à plusieurs questions sur l'effet du Wolff-Chaikoff, *in vivo*. Ainsi, nous avons optimisé la méthode d'extraction des protéines de la thyroïde de souris, séparé les protéines et marqués les peptides (par Tandem Mass Tags) après digestion afin d'étudier les variations globales du protéome. Ces méthodes ont été utilisées sur des thyroïdes de souris et se sont avérées complémentaires dans la compréhension du mécanisme physiologique.

La protéomique a été la principale technique utilisée au cours de ce travail et a été renforcée par la transcriptomique et la métabolomique lors de l'étude du rôle de SLC5A8 chez les souris KO. Dans ce chapitre, nous présentons, en premier, la principale technique utilisée lors du projet et nous aborderons ensuite la métabolomique ainsi que la transcriptomique.

I. Approche protéomique

I.1. Présentation générale

Les protéines jouent un rôle majeur dans les organismes vivants. Le terme « protéome » a été utilisé par la première fois par Wilkins en 1996 (Wilkins *et al.*, 1996) faisant ainsi référence à l'ensemble des protéines y compris leurs modifications générées par des conditions physiologiques ou pathologiques données, dans un tissu ou un organisme.

L'analyse d'un protéome, la protéomique (Anderson and Anderson, 1998; Tyers and Mann, 2003), peut être appliquée à l'étude de protéines présentes dans divers types de matériels biologiques, notamment pour identifier leurs fonctions et structures, par exemple l'identification de sites d'interaction ou des modifications post-traductionnels (PTM).

Alors que les analyses sont essentiellement réalisées avec des cellules et / ou des tissus, le profilage des fluides corporels a déjà été anticipé il y a quelques années (Apweiler *et al.*, 2009) et a contribué à l'identification de plusieurs biomarqueurs. Les protéines présentent une large gamme dynamique dont l'abondance est variable entre faible et élevée comme dans certains fluides tel que le plasma (de 109 à 10¹⁰ protéines identifiées) (Rabilloud, 2002).

La protéomique peut avoir deux types d'approches : globale en shotgun ou ciblée. Elle peut être qualitative mais aussi quantitative au moyen de marquage ou sans marquage (Label free).

Une approche protéomique est un processus analytique à plusieurs étapes. La première étape est dédiée à la préparation des cellules ou des échantillons (conditions de croissance cellulaire, collecte des cellules ou organes, stockage des cellules/organes, rupture des cellules). La deuxième étape correspond à la préparation des protéines de l'échantillon (extraction, concentration, purification pour éliminer les contaminants tels que les lipides ou les acides nucléiques et le stockage des protéines) tandis que la troisième est liée aux méthodes de séparation et d'analyse en spectrométrie de masse (Figure 13).

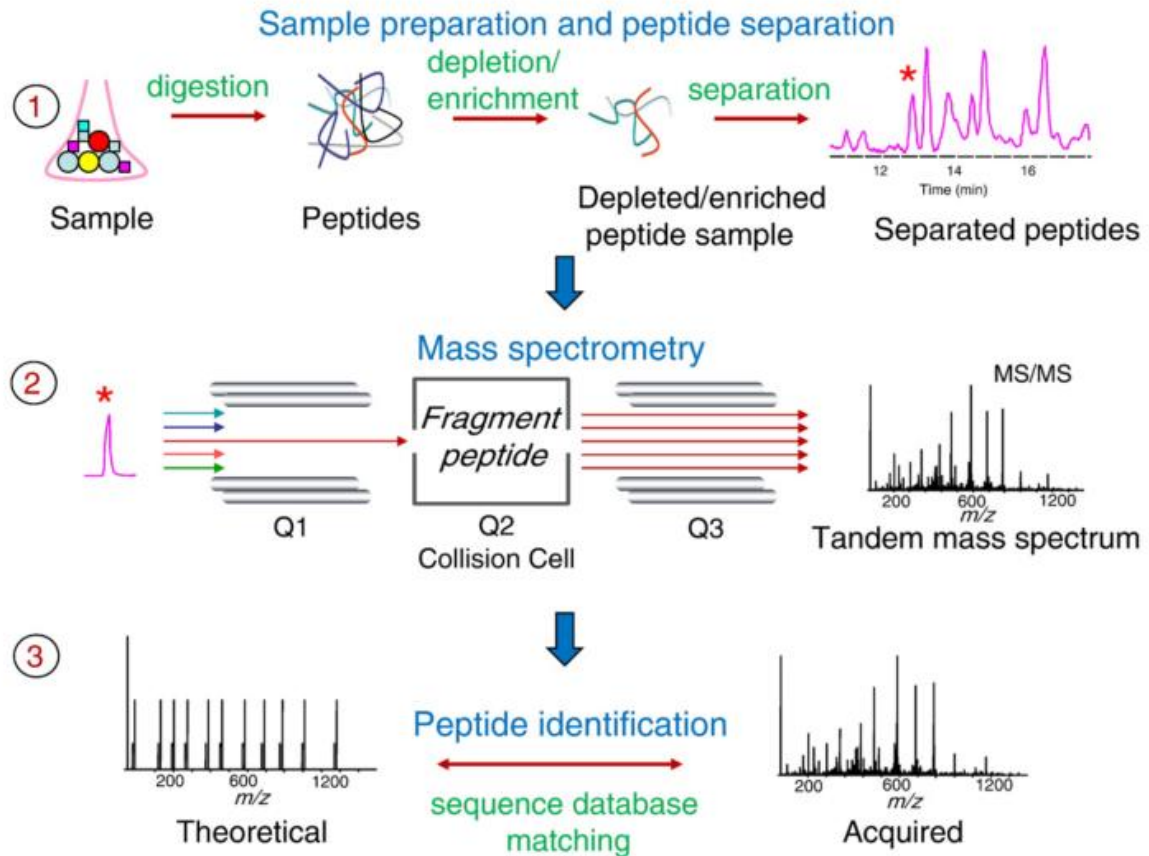


Figure 13 Les différentes étapes de préparation d'un échantillon pour une analyse en protéomique (1) l'échantillon est digéré par une enzyme comme la trypsine, ces peptides peuvent être déplétés ou enrichis avant d'être séparés. (2) Les peptides sont analysés en spectrométrie de masse MS/MS (3) L'identification des peptides par corrélation de spectres théoriques et observés (Nesvizhskii, 2010).

1.1.a. L'extraction des protéines

La préparation des échantillons est une étape importante pour obtenir un résultat fiable et reproductible. L'extraction permet la solubilisation de toutes les protéines d'un échantillon, sans aucune modification chimique, en éliminant tous les composés interférents (acides nucléiques, polysaccharides, polyphénols, lipides, etc.) et tout en étant compatible avec la méthode analytique qui sera utilisée par la suite. Il n'existe pas de protocole universel pour la préparation des échantillons, bien que plusieurs protocoles aient été adaptés en fonction de l'échantillon biologique et des objectifs de l'étude (Rabilloud and Lelong, 2011). Ainsi, il est important de connaître la composition de l'organe ou des cellules mais aussi la nature et la localisation des protéines recherchées pour définir le protocole d'extraction à adopter.

1.1.b. La séparation des protéines

L'étape de séparation est utilisée pour réduire la complexité de l'échantillon avant l'analyse de masse. Elle peut être réalisée directement sur des protéines ou sur l'ensemble des peptides issus de la digestion enzymatique des protéines correspondantes. La séparation des protéines ou des peptides peut être réalisée de deux manières :

- In-gel : « en gel », basée sur l'électrophorèse
- Gel free : « sans gel », basée essentiellement sur la chromatographie.

La stratégie suivie dans ce travail de thèse est la méthode « In gel » par électrophorèses suivi d'une digestion enzymatique des protéines par la trypsine. Celle-ci permet de produire des coupures au niveau des liaisons peptidiques dans la partie C-terminale des résidus basiques : lysine ou arginine. Cette digestion enzymatique permet de créer des espèces multichargés 2+ et 3+ (Olsen, Ong and Mann, 2004). Les peptides obtenus ont une masse de 10 à 15 acides aminés à la capacité d'acquisition des spectres MS.

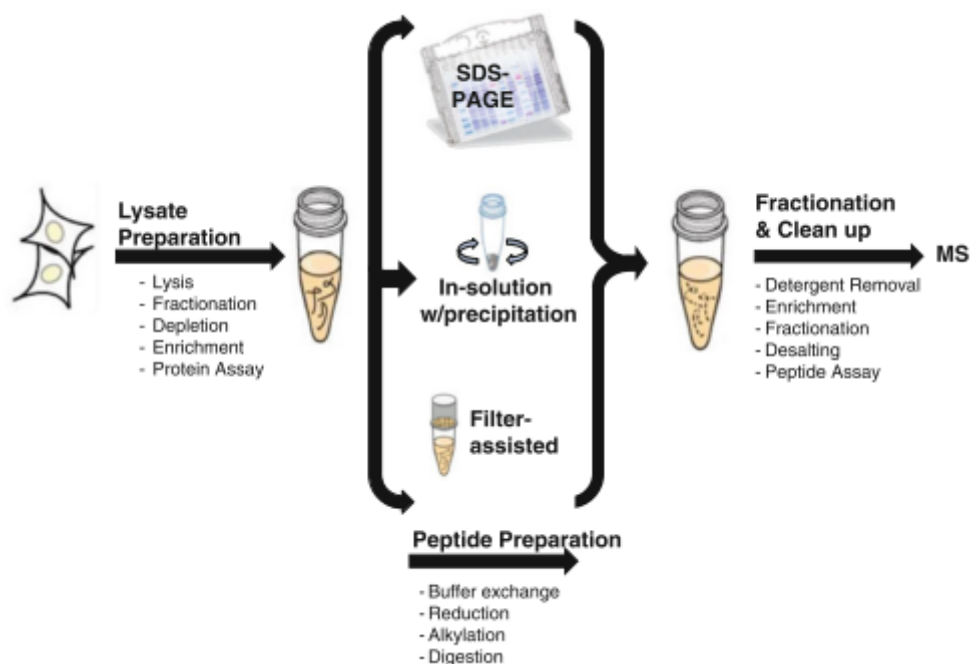


Figure 14 Workflow de la préparation de l'échantillon en vue d'une analyse protéomique à partir de cellules ou de tissus, il est possible aussi d'enrichir ou de fractionner l'extrait protéique avant la digestion enzymatique

I.1.c. La séparation par HPLC

La chromatographie est une technique permettant la séparation des analytes en fonction de leurs propriétés physico-chimique. Elle est basée sur la différence de miscibilité d'un composé entre deux phases non miscibles. Cette technique est basée sur les différences d'affinités entre la substance à analyser, la phase stationnaire (la colonne) et la phase mobile (l'éluant).

La détection d'un analyte est représentée par un chromatogramme représentant un ensemble de pics gaussiens. Dans des conditions d'analyse particulière, une molécule est caractérisée par son temps de rétention (t_r) et la largeur du pic à mi-hauteur ($w_{1/2}$) (Figure 15).

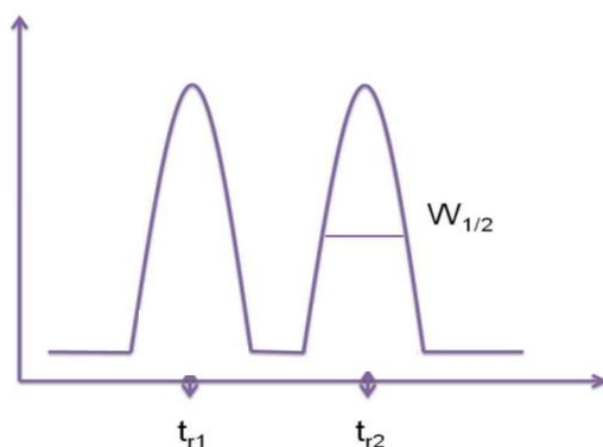


Figure 15 Chromatogramme d'un composé analysé représentant les pics relatifs à l'analyte et la largeur de mi-hauteur ($w_{1/2}$) et en abscisse le temps de rétention (t_r).

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est, actuellement, l'un des outils d'analyse les plus puissants qui a révolutionné le domaine de la protéomique. Anciennement connue sous le nom de chromatographie liquide à haute pression, cette technique a été introduite au début des années 1960 pour améliorer l'efficacité des séparations par chromatographie liquide en utilisant de petites particules en phase stationnaire fixées sur des colonnes.

Aujourd'hui, il existe différents types de colonnes dans différents matériaux qui sont combinées à plusieurs modes d'HPLC permettant ainsi d'identifier et de quantifier des peptides et des protéines avec une sensibilité et une résolution élevée à partir de quantités limitées d'échantillon ou d'échantillon complexe.

La chromatographie de partage à polarité de phases inversées (RPLC) est la plus souvent employée. Elle s'adapte parfaitement en couplage avec la spectrométrie de masse et s'adapte aussi à des pourcentages importants de solvants organiques, paramètre favorable à la bonne ionisation des composés dans une source électrospray.

Le choix du couplage à utiliser est dépendant de la masse des composés à étudier. En effet, la LC-MS/MS couplée à l'électrospray permet l'ionisation des molécules polaires et ayant une masse variant de 10^1 à 10^6 .

Ce couplage permet de réaliser des analyses LC-MS/MS permettant de s'affranchir d'un fractionnement extensif des protéines en amont de l'analyse en spectrométrie de masse et de réaliser ainsi l'étude d'un protéome complexe en une seule analyse.

L'introduction de la Chromatographie Liquide Ultra Haute Performance (UHPLC) a encore amélioré le niveau de performance de la séparation avec des augmentations significatives de la résolution, de la vitesse et de la sensibilité. En effet, en augmentant le débit, la résolution a été améliorée et le temps d'analyse a diminué (de Villiers *et al.*, 2006). Les matrices biologiques complexes contiennent plusieurs composés ayant des propriétés physico-chimiques similaires. Ces composés peuvent être élués au même temps entraînant des compétitions d'ionisation dans la source du spectromètre de masse. L'utilisation de l'UPLC minimiserait le phénomène de suppression d'ionisation à la source et améliore ainsi la séparation des pics chromatographiques (Chambers *et al.*, 2007).

Une autre technique d'analyse prometteuse existe : c'est la nano chromatographie, qui est plus récente et qui a recours à des colonnes capillaires de 50 à 100 μm . Couplée à des spectromètres de masse à ultra-haute résolution, cette technique séparative est devenue incontournable pour les analyses protéomiques et permet un gain théorique en sensibilité (un facteur de plusieurs centaines en comparaison avec des colonnes classiques de 2,1 mm) pour quelques microlitres d'échantillon injectés.

Cependant, cette technique n'est pas compatible avec des échantillons denses et complexes représentant un protéome global d'un organe, mais elle est plutôt adaptée aux échantillons issus d'un fractionnement préalable soit par compartiment cellulaire ou notamment par immunoprécipitation. Ainsi, au cours de ce projet de thèse, nous avons utilisé une chromatographie capillaire en injectant 5 μl par échantillon. La chromatographie capillaire nous a permis d'augmenter la robustesse et d'avoir une meilleure qualité des spectres.

i. La phase stationnaire

En chromatographie de partage à polarité de phases inversées (RPLC), les phases stationnaires les plus employées sont constituées de billes de silice greffées par des chaînes alkyle (le plus souvent C18, mais aussi C8 ou parfois plus courtes). Les propriétés de rétention dépendent du taux de greffage de chaînes carbonées sur la silice, du type de griffons ou en modifiant le greffage de la silice (diphényl, phénylhexyle). Les particules de phase stationnaire ont des

diamètres compris entre 1 et 5 μm , la taille des pores variant entre 80 et 300 Å. Les composées seront éluées par polarité décroissante sur ces phases stationnaires.

ii. La phase mobile

Les phases mobiles utilisées sont constituées de deux phases : une phase aqueuse et une phase organique d'éluion (acétonitrile ou méthanol). Il existe deux modes de pompage des phases mobiles : un mode isocratique et un mode gradient (Wiczling *et al.*, 2008). Lorsque la composition de la phase mobile évolue au cours du temps, on parle d'un mode « gradient ». Au contraire, dans le mode « isocratique », la phase mobile est invariable. Pour notre étude nécessitant la séparation d'un mélange complexe, les analyses ont été effectuées en augmentant au cours du temps le pourcentage de solvant organique dans la phase mobile.

Les phases mobiles sont, habituellement, acidifiées pour augmenter la résolution des pics chromatographiques observés, en ajoutant des acides organiques volatils tels que l'acide trifluoroacétique (TFA), l'acide acétique ou l'acide formique. Ces acides interagissent avec les analytes et augmentent leurs hydrophobies en formant des paires d'ions. Il est important de prohiber l'utilisation de sels lors de la préparation de l'échantillon, ces derniers pouvant former des adduits avec les analytes et polluer la source électrospray.

I.1.d. L'analyse en spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse doit son succès à John Fenn et Koichi Tanaka, prix Nobel de chimie en 2002, qui ont mis au point les nouvelles techniques d'ionisation douce : l'ionisation Electrospray (ESI) (Fenn *et al.*, 1989) et le Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) (Karas and Hillenkamp, 1988), largement exploitée aujourd'hui en biologie. Ces deux techniques permettent le transfert des molécules intactes en phase gazeuse.

Un spectromètre de masse comprend les éléments suivants : un système d'introduction de la substance à analyser, une source (sous vide ou à pression atmosphérique, par ionisation ou par désorption) pour transformer les analytes de la forme ionique à l'état gazeux, un ou plusieurs analyseurs pour séparer les divers ions produits en fonction de leur rapport masse/charge (m/z), un détecteur pour transformer les ions en un signal électrique et enfin, un système de pilotage de l'instrument et de traitement des données acquises fournissant le spectre de masse.

Le spectre de masse obtenu est représenté sous forme d'un diagramme bidimensionnel : le rapport masse/charge est porté en abscisse et l'abondance des ions est portée en ordonnée.

Lors d'une analyse du protéome d'un échantillon donné, on combine, à la fois, la séparation des protéines et la spectrométrie de masse qui se décline en trois types : la spectrométrie de masse simple (MS), la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) ou à fragmentation successives (MS_n) (Figure 16).

Le premier mode de spectrométrie, la MS, simple permet une acquisition en mode balayage (scan) ou en mode de détection d'ions sélectionnés (*selected ion monitoring*, SIM). Le balayage scan consiste en une acquisition des spectres de masse qui seront acquis sur une plage de rapport m/z. Alors que le mode SIM est plus spécifique et détecte uniquement les ions sélectionnés à un m/z caractéristique des substances à analyser.

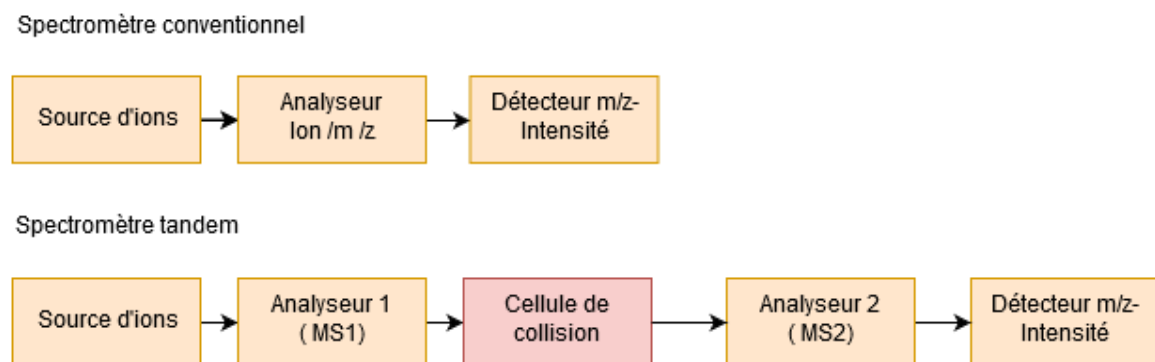


Figure 16 Illustration de la différence de configuration des éléments composant un spectromètre de masse MS (conventionnelle) et MS/MS (en tandem).

Le deuxième mode MS/MS et le troisième MS_n se distinguent du premier mode d'acquisition par la nécessité de l'activation des ions (augmentation de leur énergie interne). Celle-ci peut être assurée par différents moyens : la collision par gaz (CID, *collision induced dissociation*), la technique SORI (*sustained off resonance Irradiation*), les techniques ECD (*Electron capture dissociation*) et ETD (*electron transfer dissociation*) et la technique IRMPD (*infra red multi photon dissociation*).

La première étape consiste, donc, à isoler les ions d'un même rapport m/z (ion parent ou précurseur) et de les fragmenter. La deuxième étape est l'analyse des ions produits (ions fils). Cette analyse peut être réalisée : soit en mode balayage, soit en ne sélectionnant qu'un seul ion fragment (SRM, *selected reaction monitoring*). Le mode d'acquisition MS_n se caractérise par une fragmentation de l'ion fils n fois.

Par la diminution du bruit de fond, le mode d'analyse SRM augmente la sensibilité et la spécificité (Kuhn *et al.*, 2004; Anderson and Hunter, 2006). En effet, il est peu courant que

deux molécules aient la même valeur de masse à la fois pour les ions précurseurs comme pour les ions fils. Le mode SRM est ainsi adapté à la quantification d'une molécule particulière déjà caractérisé et à sa quantification tel que les molécules d'intérêt ou les métabolites (Zweigenbaum and Henion, 2000; Zhang, Bartels and Stott, 2004; Wang, Whiteaker and Paulovich, 2009).

i. Les méthodes de fragmentation

Afin de comprendre la structure et la composition d'un peptide, une dissociation est appliquée. Celle-ci fragmente les peptides, pour qu'elles puissent être analysées par le spectromètre de masse par la suite, selon les règles de fragmentation. Une nomenclature a été établie avec des ions C-terminaux (x, y, z) et N-terminaux (a, b, c) (**figure 17**). En conséquence, l'ion parent, déterminé en analyse spectrale MS et sélectionné en MS/MS, se transforme par fragmentation en un ensemble de pics fragments dont les ions y et b sont en général majoritaires dans les modes de fragmentations classiques. Ces pics représentent "l'empreinte" de la molécule, permettant l'identification de la séquence peptidique. De plus, cette fragmentation permet de confirmer des caractéristiques telles que les groupes moléculaires et les marquages, les modifications et les produits de dégradation. La fragmentation dépend de plusieurs paramètres incluant la composition et la nature de l'acide aminé, la taille du peptide, le mode d'excitation, l'instrument utilisé et l'état de charge de l'ion (Palzs and Suhal, 2005).

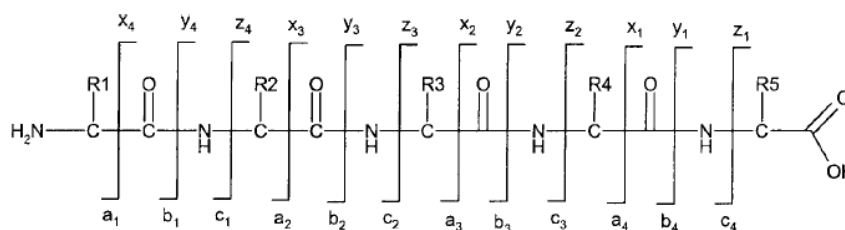


Figure 17 Schéma de fragmentation séquentielle des peptides obtenue par CID à basse et haute énergie. R correspond à la chaîne latérale de l'acide aminé (Palzs and Suhal, 2005)

Plusieurs techniques ont été développées au fil des années, la plupart dépendent d'un analyseur de masse particulier et certaines sont couplées à un mode d'ionisation spécifique. Il est courant de multiplier les dissociations afin de confirmer l'identité d'un composé.

La dissociation induite par la collision (Collision induced dissociation), CID, se déroule en deux étapes. La première est la collision entre l'ion et le gaz cible (hélium, azote, argon). Cette étape induira l'excitation de l'ion résultant de la conversion d'une partie de l'énergie cinétique due à la collision de l'ion en énergie interne. La deuxième consiste en une décomposition unimoléculaire de l'ion activé par une rupture des liaisons. Ces fragments sont par la suite accélérés vers l'analyseur de masse. Lorsqu'ils sortent de la cellule de collision, ils seront analysés par le détecteur.

La CID en basse énergie est utilisée, par exemple dans les spectromètres de masse à triple quadripôle (QQQ), trappe ionique ou hybride en fournissant une énergie variant de 10 à 100 eV.

La collision à haute énergie, High Collision Dissociation (HCD), permet d'augmenter l'énergie cinétique de l'ion de l'ordre de kiloélectronvolt (keV). Ce mode a été initialement décrit sur un appareil LTQ Orbitrap par Olsen en 2007 (Olsen *et al.*, 2007). Seuls les appareils hybrides ou électromagnétiques permettent de travailler à de hauts potentiels d'accélération.

L'excitation de l'ion est principalement électronique. Cette énergie acquise est par la suite redistribuée en énergie vibrationnelle qui entraînera la rupture des liaisons.

Comparé à un mode de fragmentation CID qui se déroule dans un piège linéaire, l'HCD se déroule dans un multipôle (Figure 19). L'HCD permet une diminution de la gamme de masse observée en MS/MS et permet donc l'observation des fragments de basse masse « low mass cut-off » (LMCO) qui est une des principales limites du CID. Cette caractéristique permet d'observer les ions rapporteurs utilisés en quantification par marquage (Figure 18). Ce mode de fragmentation est le plus adapté aux travaux menés lors de cette thèse.

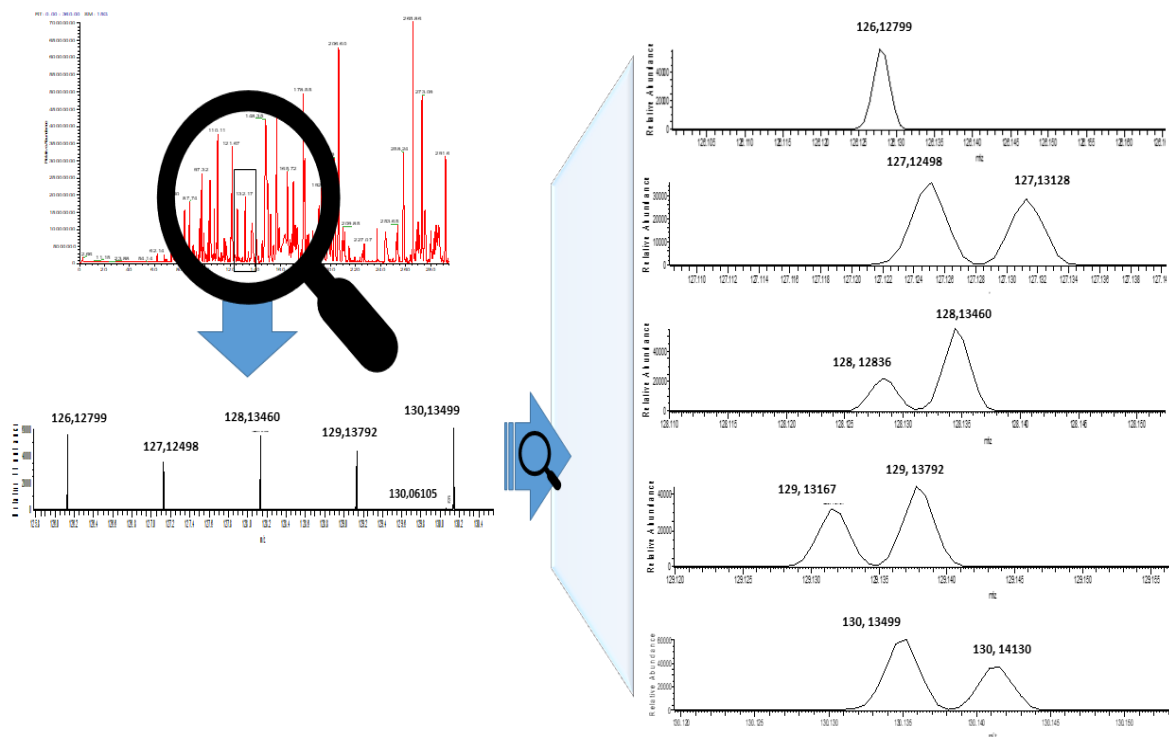


Figure 18 Spectres de masse obtenus après fragmentation en HCD par Orbitrap QExactive Plus, les ions rapporteurs sont clairement observés.

Lors de ce projet nous avons utilisé, un spectromètre de masse de la série orbitrap, qui permet d’avoir une grande précision sur les m/z et une meilleure résolution que le TOF.

L’orbitrap est un piège à ions utilisant un champ électrostatique et non pas un champ magnétique, dans lequel les ions se mettent en orbite autour de l’électrode centrale avec une fréquence en fonction de leur masse sur charge (m/z) (Scigelova and Makarov, 2006).

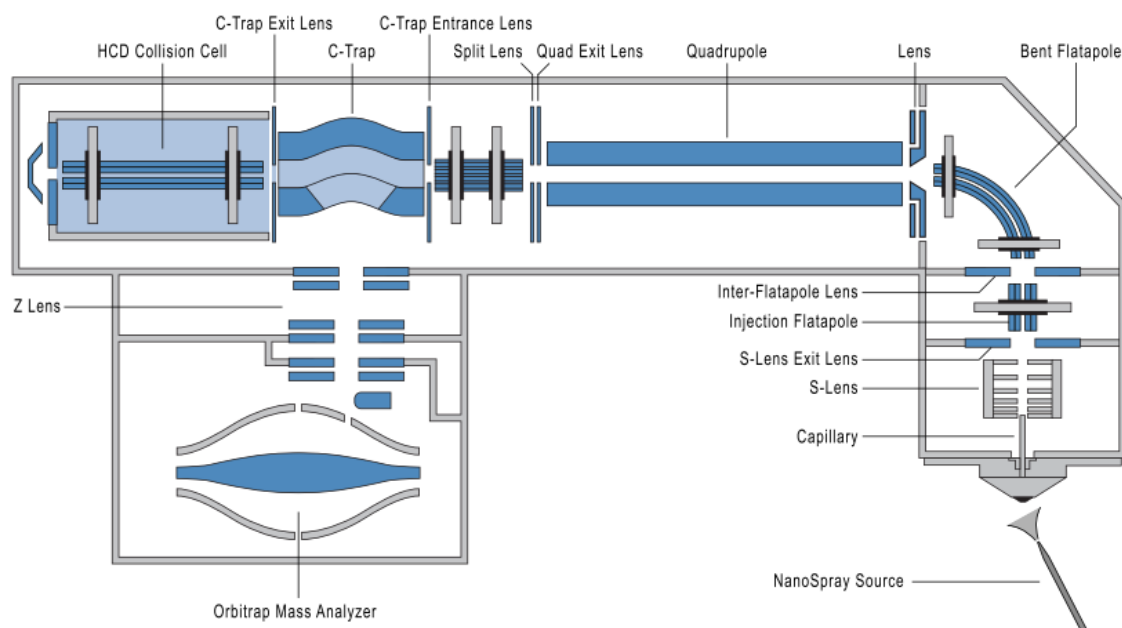


Figure 19 Schéma d'un spectromètre de masse de type Orbitrap Q Exactive Hybrid Quadrupole (Michalski *et al.*, 2011)

Le Q Exactive Plus (Figure 19), utilisé lors de cette thèse, permet une bonne couverture du protéome global et augmente la reproductibilité. Il est aussi très adapté à la quantification des ions de faible abondance dans des protéomes complexes (Makarov *et al.*, 2000).

Dans l'orbitrap, les ions doivent être injectés rapidement. En effet, ils sont accélérés pour avoir une grande énergie cinétique et accéder au piège électrostatique en suivant un acheminement tangentiel par rapport à l'axe de l'orbitrap. L'orbitrap Q Exactive Plus fournit des courants ioniques élevés grâce à la lentille S et une rapide fragmentation des peptides.

Les ions produits par la source d'ions en continu sont transférés dans le C-trap. Ces ions commencent à perdre de l'énergie cinétique (potentiel appliqué environ 12V-15V) par la collision avec le gaz. Les ions sont pulsés vers l'orbitrap à travers un intermédiaire, qui est un piège de forme C (C-trap) et qui a pour effet d'accélérer et compacter le nuage d'ions. Ensuite, les ions entrent dans l'orbitrap où le voltage de l'électrode centrale a été appliqué auparavant (50-90 μ sec). Lorsque les tensions sont stabilisées à 3,5kV, la détection de l'image issus des paquets d'ions est effectuée. Ces signaux sont amplifiés et transformés en spectre de fréquence via la transformée de Fourier (Michalski *et al.*, 2011).

I.1.e. L'identification des peptides

Les données brutes (raw data) générées par les spectromètres de masse modernes utilisés dans la protéomique à haut débit ne fournissent pas d'informations directement interprétables du protéome de l'échantillon analysé. Afin de déduire la composition protéique d'un échantillon, il faut, alors, avoir recours à des logiciels d'identification qui permettent d'identifier les peptides à partir de spectres de masse en tandem (Mueller *et al.*, 2008; Vaudel, Sickmann and Martens, 2010).

Les bases de recherche comparent les spectres expérimentaux à des séquences protéiques théoriques obtenues à partir d'une base de données de séquences de protéines. En effectuant un traitement *in silico* des séquences théoriques, la digestion et la fragmentation de l'expérience réelle sont imitées par le logiciel. Par conséquent, les spectres théoriques sont générés et peuvent ensuite être comparés aux spectres obtenus expérimentalement (Figure 20).

La correspondance entre un spectre expérimental et un spectre théorique est appelée une correspondance peptide-à-spectre (PSM/ **Peptide-to-Spectrum Match**). Le résultat de base d'un moteur de recherche est composé d'une liste de plusieurs PSM candidats pour chaque spectre, avec des scores associés (généralement indiqués en e-value) qualifiant la qualité de la correspondance.

SEQUEST (Eng, McCormack and Yates, 1994) a été le premier algorithme largement utilisé à mettre en œuvre cette technique et a été rapidement adopté dans les pratiques de laboratoire courantes.

L'un des principaux défis de l'identification des peptides de données de protéomique en shotgun est l'identification de faux positifs. Leur présence est contrôlée a posteriori grâce à la FDR (False Discovery Rate) (Nesvizhskii, 2010).

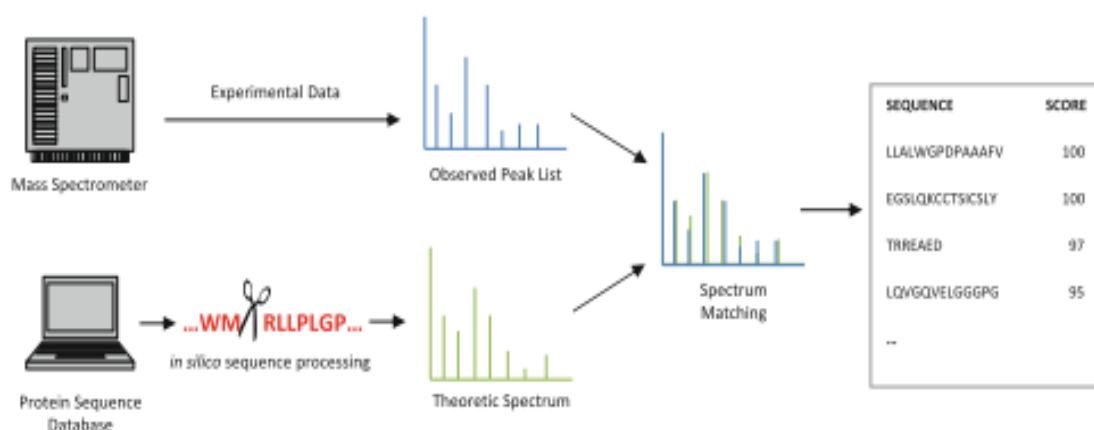


Figure 20 Workflow standard de la recherche de séquence dans la base de données (Verheggen *et al.*, 2016).

1.1.f. Les analyses bio-informatiques

Les outils bio-informatiques comprennent une sélection variée d'approches pour le traitement, l'analyse et la gestion de données protéomiques basées sur la spectrométrie de masse.

L'architecture sous-jacente varie d'applications commerciales à des bibliothèques de logiciels libres et open source. Les solutions algorithmiques permettent de rechercher des spectres MS en tandem par rapport à une base de données de protéines, ainsi que des méthodes de post-traitement statistiques pour l'évaluation des résultats d'identification et de quantification.

Le développement de moteurs de recherche en tandem MS a été un sujet de recherche en bio-informatique protéomique depuis l'émergence du domaine au début des années 1990. Ces développements incluent Sequest (Eng, McCormack and Yates, 1994), Mascot (Perkins *et al.*, 1999), OMSSA (Geer *et al.*, 2004) ou Andromeda (Cox *et al.*, 2011) parmi beaucoup d'autres. Dans une deuxième étape de l'identification informatique, les résultats bruts de la recherche sont soumis à des outils de post-traitement, tels que PeptideProphet (Andrew Keller *et al.*, 2002) ou Percolator (Käll *et al.*, 2007).

Les outils de calcul qui fournissent le workflow d'analyse des données protéomiques sont disponibles auprès des fournisseurs d'instruments ou des entreprises de bio-informatique. Ils sont aussi souvent disponibles en tant qu'applications open source et freeware fréquemment développées en tant que projets de recherche bio-informatique.

I.2. Les différentes approches en protéomique

Une analyse protéomique peut se décliner sous forme de deux approches : une approche globale et une approche ciblée. Une analyse commence avec la préparation de l'échantillon dans lequel les protéines sont digérées enzymatiquement en peptides (analyse ascendante) (McDonald and Yates, 2002; Chait, 2006) ou analysées sans digestion (analyse descendante) (McLafferty *et al.*, 1999; Reid and McLuckey, 2002; Breuker *et al.*, 2008).

I.2.a. L'approche Bottom up : approche ascendante

L'approche ascendante est la méthode la plus populaire pour traiter des échantillons de grande complexité pour des analyses à grande échelle. Le terme protéomique de shotgun (Link *et al.*, 1999; Dirk A. Wolters, Michael P. Washburn and John R. Yates, 2001; Yates, 2004) est la méthode équivalente au séquençage génomique.

La protéomique ascendante est une approche dans laquelle les protéines sont digérées par protéolyse en peptides avant l'analyse de masse (Figure 21.b). Les masses peptidiques et les séquences qui en découlent sont utilisées pour identifier les protéines correspondantes (Figure 21.b). La plupart des applications ascendantes nécessitent une acquisition de données en tandem dans laquelle les peptides sont soumis à une dissociation activée par collision (CID) (dissociation induite par collision).

La méthode la plus utilisée pour l'identification de données MS en tandem ascendante est la recherche dans la base de données (Eng, McCormack and Yates, 1994; Perkins *et al.*, 1999) dans laquelle les données de tous les spectres de masse expérimentaux sont comparés aux spectres de fragmentation in situ des peptides étudiés.

Depuis la publication originale de SEQUEST en 1994, de nombreuses méthodes ont été développées pour résoudre certains des problèmes de calcul associés à la protéomique ascendante. Certaines de ces méthodes comprennent l'utilisation de schémas de notation probabilistes (Perkins *et al.*, 1999; Tabb, McDonald and Yates, 2002), l'incorporation de critères de recherche supplémentaires (Moore, Young and Lee, 2000; Keller *et al.*, 2005), et le stockage de spectres préalablement identifiés pour amorcer la recherche dans la base de données (Frewen and MacCoss, 2007).

Les avantages de l'approche ascendante sont notamment une meilleure séparation des peptides par rapport aux protéines et une sensibilité plus élevée que la méthode descendante.

Cependant, une couverture limitée de la séquence protéique et la perte des peptides ayant été modifiés au niveau post traductionnel (PTM) sont les principaux inconvénients de l'approche ascendante.

1.2.b. L'approche Top-Down : approche descendante

Les méthodes descendantes utilisent des masses de protéines entières et la masse de leurs fragments pour l'identification des protéines (Figure 21.a). Les techniques de fragmentation les plus utilisées sont la dissociation par capture électronique (ECD) (Roman A. Zubarev, Neil L. Kelleher, and McLafferty 1998) et la dissociation par transfert électronique (ETD : Electron transfert Dissociation) (Syka *et al.*, 2004; Coon *et al.*, 2005), ces deux techniques permettent un séquençage et une couverture complète de la protéine.

Les données générées sont analysées par la méthode de séquence exprimée marquée (Expressed Sequence Tag/ EST) (Mortz *et al.*, 1996; Cargile, McLuckey and Stephenson, 2001) ou la méthode de novo (Horn, Zubarev and McLafferty, 2000).

L'approche descendante permet une plus grande couverture de la séquence des protéines cibles (Neil L. Kelleher *et al.*, 1999) et une meilleure caractérisation des modifications post-traductionnelles (Vlad Zabrouskov *et al.*, 2005; Siuti and Kelleher, 2007).

Cette approche descendante est meilleure dans le cas d'une quantification d'une protéine particulière (Yi Du *et al.*, 2005; Pesavento, Mizzen and Kelleher, 2006; Waanders, Hanke and Mann, 2007). Cependant, la séparation front-end des protéines est plus compliquée que la séparation des mélanges peptidiques, ce qui implique la nécessité d'instruments de masse d'une plus grande précision, pour des mélanges protéiques complexes, tels que la FTMS (McLafferty *et al.*, 2001) et le LTQ-Orbitrap (Macek *et al.*, 2006; Waanders, Hanke and Mann, 2007).

Compte tenu de ces limitations techniques, nous avons eu recours à l'approche ascendante plus couramment utilisée dans les études de complexes protéiques, cela nous a permis d'avoir une quantification globale et une meilleure couverture du protéome.

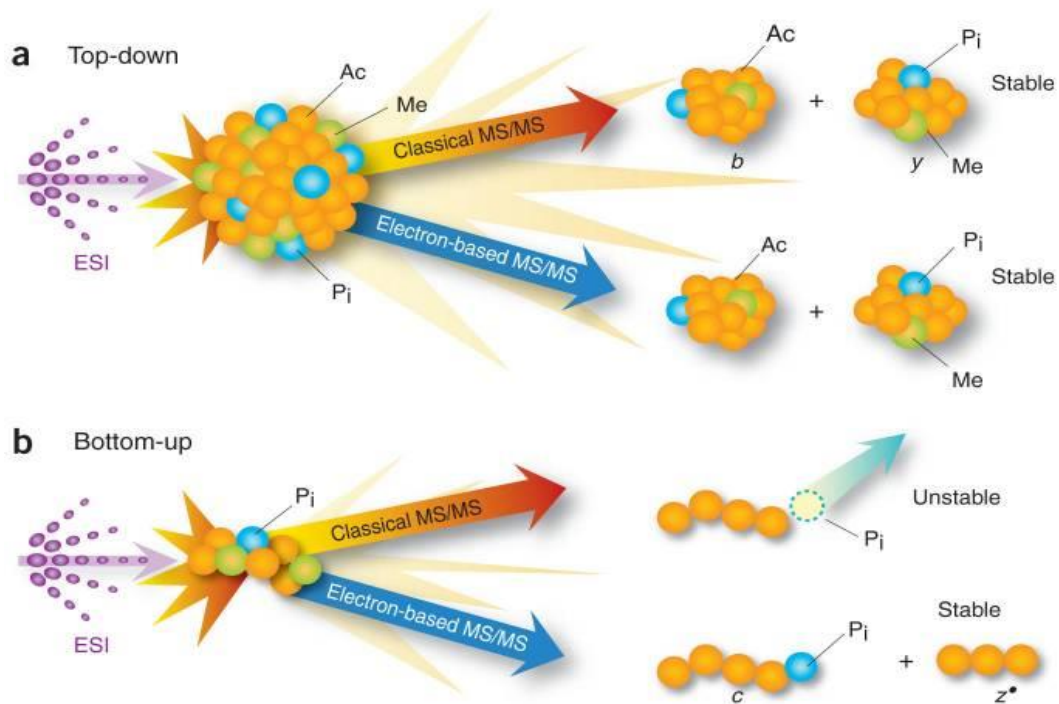


Figure 21 Méthodes classiques MS/MS par collision (CID, HCD) versus méthode de fragmentation à base d'électron pour la fragmentation des ions protéines et peptides dans la spectrométrie de masse en tandem.

(a) Top-Down : La plupart des PTM sont stables pendant la fragmentation descendante des protéines par des méthodes MS / MS classiques ou à base d'électron, qui créent typiquement des ions de type b et y ou c et z, respectivement.

(b) Bottom-up : Au cours de la fragmentation classique de petits peptides générés lors de l'analyse ascendante, certains PTM tels que la phosphorylation, ne sont pas toujours stables

Ac, groupe acétyle ; Me, groupe méthyle ; Pi, groupe phosphate (Siuti and Kelleher, 2007).

I.3. La protéomique comparative

La protéomique est devenue un outil clé pour l'étude des systèmes biologiques. La comparaison entre deux états physiologiques différents permet de démêler les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans un processus biologique. La protéomique peut confirmer la présence de protéines et fournir une mesure directe de la quantité présente dans une cellule.

Les stratégies de protéomiques globales et ciblées peuvent être appliquées. Les stratégies protéomiques ciblées limitent le nombre des analytes suivis, puis optimisent les méthodes pour obtenir la sensibilité et le débit les plus élevés pour une grande quantité d'échantillons. L'avantage des stratégies protéomiques globales est qu'aucune hypothèse n'est requise, et que l'ensemble des protéines mesurables sera suivi et éventuellement comparées, par une quantification relative, entre les différentes conditions.

I.4. La protéomique quantitative

Un avantage clé de la protéomique à grande échelle pour la biologie des systèmes est l'évaluation de l'abondance des protéines, en plus de leur identification dans des échantillons complexes. En effet, la caractérisation du protéome est souvent insuffisante pour la compréhension du mécanisme biologique complexe et cela nécessite d'avoir recours à des méthodes de protéomique quantitative. L'objectif global de ces méthodes est d'obtenir un instantané des concentrations de protéines associées aux différents états.

Il existe deux grands groupes de méthodes quantitatives dans la protéomique : la protéomique quantitative relative et la protéomique quantitative absolue.

La protéomique quantitative absolue est, plutôt, associée à l'approche ciblée, elle consiste à déterminer la concentration d'une ou plusieurs protéines dans différents échantillons, elle est souvent couplée à un mode d'analyse MRM (Multiple Reaction Monitoring) qui va permettre de suivre un nombre limité de peptides d'intérêt.

La protéomique quantitative relative est, plutôt, associée à l'approche globale et permet de comparer deux échantillons complexes ou plus (par exemple sain/malade, avec /sans traitement) en utilisant des méthodes sans marquage (label free) ou au moyen de marqueurs isotopiques. Ces derniers peuvent être introduits, par voie métabolique, par voie chimique ou par voie enzymatique (Ong and Mann, 2005) (Figure 22).

I.4.a. Les méthodes de quantification sans marquage : Label-free

Grâce à l'analyseur orbitrap, les spectromètres de masse sont capables aujourd'hui d'effectuer des analyses MS de haute résolution. En effet, disposant de leur trappe linéaire, ils sont dotés d'une vitesse de séquençage élevée. Ces spectres de masse peuvent être utilisés dans la quantification sans pour autant se baser sur un marquage isotopique. Cette méthode est appelée Label free.

Ils existent deux techniques en Label free : la première consiste à mesurer et comparer le nombre de spectres MS/MS identifiant les peptides d'une protéine (spectral counting), la deuxième repose sur la comparaison des intensités des signaux des spectres des peptides d'une protéine. Elle nécessite l'exploitation des données MS contenus dans les fichiers bruts issus des spectromètres de masse et donc nécessite des outils bio-informatiques plus élaborées.

Ces deux méthodes sont largement utilisées car elles sont facilement mises en œuvre et peuvent être appliquées à tous types d'échantillons tout en permettant une quantification fiable des protéines (Nielsen *et al.*, 2005). Comparées aux méthodes à marquage, que nous aborderons dans le paragraphe suivant, elles sont moins coûteuses mais nécessitent plusieurs réplicats techniques et biologiques (Chen *et al.*, 2006; Bodenmiller *et al.*, 2010; Lubner *et al.*, 2010; Bildl *et al.*, 2012).

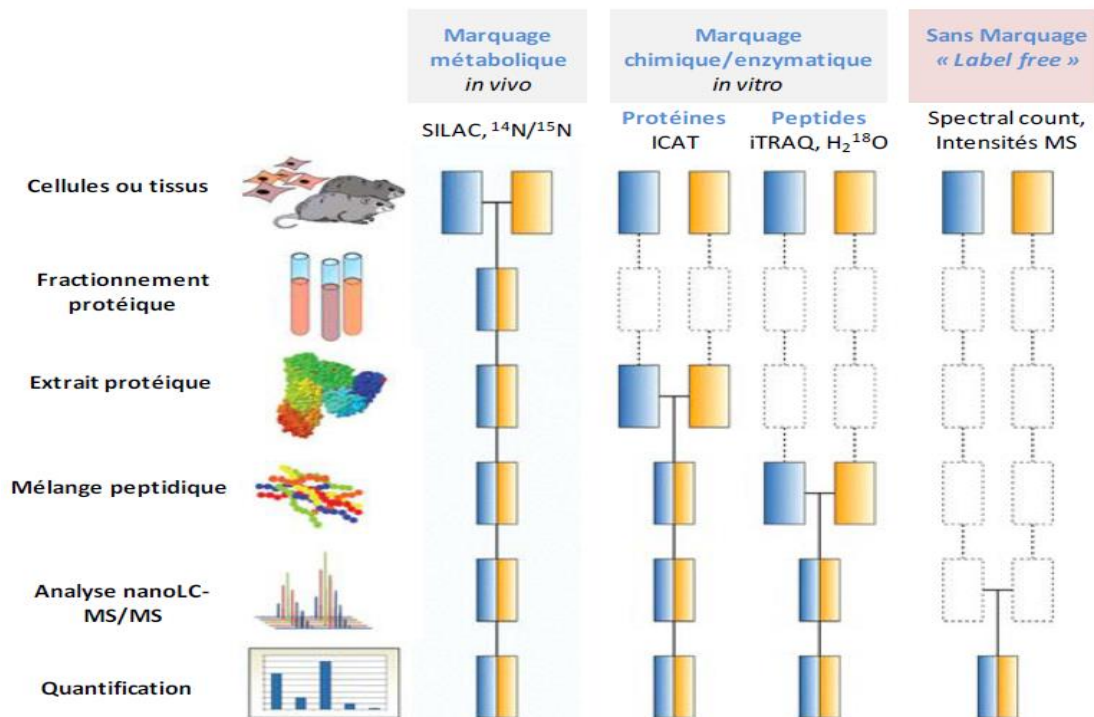


Figure 22 Différentes méthodes de quantification avec ou sans marquage isotopique. Les marquages sont introduits à différents niveaux en fonction de la méthode choisie (Bantscheff *et al.*, 2007).

1.4.b. Les méthodes de quantification avec marquage isotopique

La comparaison du protéome d'échantillons issus de conditions différentes et d'une même acquisition est facilitée s'il existe un élément qui permet de distinguer les différentes conditions. Ainsi les méthodes de marquage isotopique consistent à introduire un marqueur sur les peptides

ou les protéines. En effet, en spectrométrie de masse, il est possible de mesurer la différence de masse entre un peptide marqué et un peptide non marqué (Figure 23).

Cette approche se traduit par le marquage de chaque échantillon par différents isotopes stables (D, C¹³, N¹⁵, O¹⁸) et puis de les comparer entre eux. Les paires peptidiques ainsi formées sont différenciées par un écart de masse (Δm) au sein d'une même acquisition.

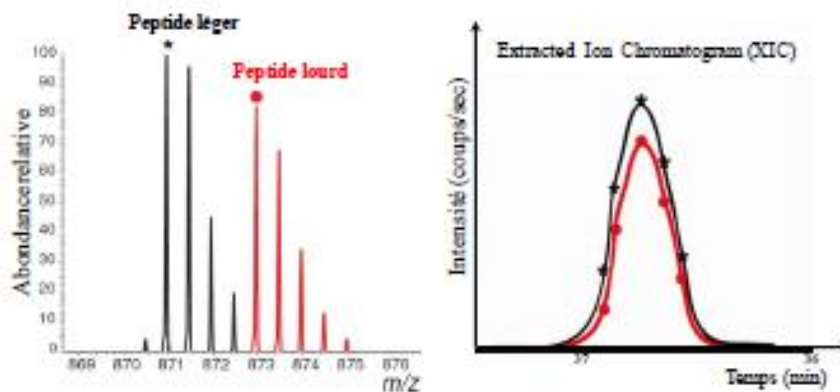


Figure 23 Extraction des données quantitatives à partir d'un spectre de masse. (A gauche) Visualisation de chaque peptide marqué en rouge et non marqué en noir. A droite : courbe de l'éluion chromatographique, le signal peptidique est suivi par la courbe dont l'aire correspond au courant mesuré (XIC), une mesure proportionnelle à l'abondance du peptide (Ong and Mann, 2005).

Parmi les nombreux marquages qui sont introduits par une voie chimique, la technologie ICAT (Isotope Coded Affinity Tag) (Hansen *et al.*, 2003) : cette méthode consiste à utiliser des étiquettes (tags) isotopiques distinctes pour marquer spécifiquement les résidus cystéines des protéines par liaison covalente grâce à un réactif contenant soit du ¹²C ou ¹³C.

Il existe aussi la technique Tandem mass tag (TMT) ou iTRAQ (Isobaric tag for relative and absolute quantitation) (Thompson, Schäfer, *et al.*, 2003) qui va permettre la quantification de plusieurs échantillons simultanément. Cette méthode permet le marquage du groupement amines des peptides générés par digestion trypsique par un réactif associé à des étiquettes isobariques qui génèrent des ions rapporteurs de masses spécifiques lors de la fragmentation MS/MS des ions parents (Timothy J. Griffin *et al.*, 2007). Ce type de marquage peut d'autre part être réalisé par incorporation de ¹⁸O au moment du processus de digestion enzymatique des protéines en présence de H₂¹⁸O (Xudong Yao *et al.*, 2001; Kristy J. Reynolds, Xudong Yao and Fenselau, 2002). Les peptides sont mélangés de façon équimolaire et analysés en LC MS/MS. Lors de la fragmentation en MS/MS, le rapporteur a une grande intensité sur le spectre, et

permet la quantification du peptide dans l'échantillon. Ces techniques de quantification se sont largement répandues et ont été appliquées à différents fluides et tissus.

Il existe aussi un autre marquage, le marquage métabolique type SILAC (Stable Isotope Labelling by Amino acids in Cell culture) qui consiste à mettre en culture les acides aminés marqués qui seront incorporés par la suite dans la chaîne protéique cellulaire de la cellule.

Il est souvent pratique d'avoir recours à un double marquage des lysines et des arginines pour optimiser la quantification notamment lors d'une digestion enzymatique à la trypsine permettant ainsi d'avoir tous les peptides quantifiables.

Cette technique est souvent utilisée dans les cellules pour détecter de faibles variations quantitatives ainsi que pour la caractérisation et la dynamique des modifications post traductionnelles (Blagoev *et al.*, 2003) . Elle peut, notamment, être utilisée pour les tissus et pour les fluides (Zanivan, Krueger and Mann, 2011).

Nous avons eu recours au marquage isobarique au cours de ce projet et nous présentons dans le paragraphe suivant le principe de cette technique :

i. Le marquage isobarique TMT

Le marquage isobarique TMT est une technique quantitative qui a été développée, en 2003, par l'équipe de Thompson (Thompson, Jürgen, *et al.*, 2003).

Le TMT est constitué d'un groupe réactif N-hydroxysuccinimide (NHS) qui permet le marquage en formant, par une liaison covalente avec les amines primaires de l'extrémité N-terminal et de la chaîne latérale des résidus lysine, un groupe rapporteur (dont la masse varie de 126 à 131 Da) permettant d'évaluer l'abondance relatif du peptide en analyse MS/MS dans un échantillon donné, un linker clivable qui sera responsable de la libération du fragment rapporteur TMT en analyse MS/MS et d'un groupe de normalisation de masse servant à équilibrer les différences de masse entre les différents fragments rapporteurs pour que la masse globale des marqueurs soit équivalente (230 Da) (Figure 24A).

Ces différents marqueurs ont, à la fois, la même masse moléculaire de 230 Da et la même structure chimique (Figures 24 et 25). Ainsi, lors de l'analyse de spectrométrie de masse, les peptides marqués seront détectés avec la masse relative du peptide en plus de la masse du réactif TMT. Mais lors de la fragmentation HCD, ces groupements rapporteurs seront libérés.

L'intégration de l'aire sous les pics relatifs au rapporteur, permettra d'évaluer la proportion de peptides marqués dans l'échantillon duquel ils dérivent (Figure 26).

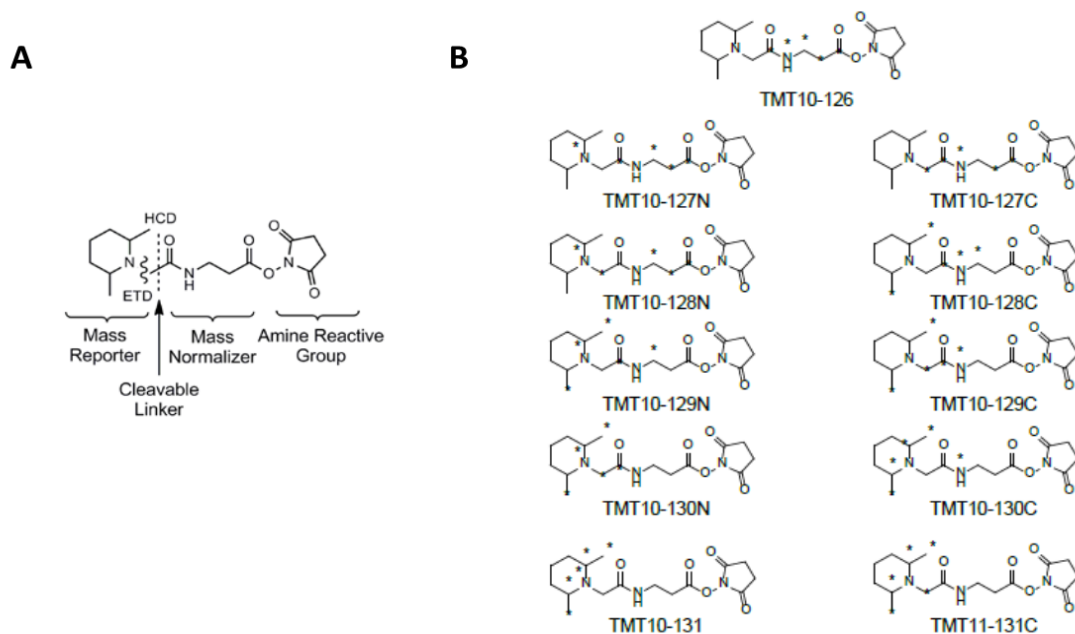


Figure 24 Schéma explicatif représentant la structure chimique des réactifs TMT. (A) les différentes régions composant la structure du TMT et les sites de fragmentation MS/MS par HCD et ETD (B) Les réactifs des TMT10plex et du TMT 11-131C et les positions des isotopes (indiqué par une astérisque) (Scientific, 2014)

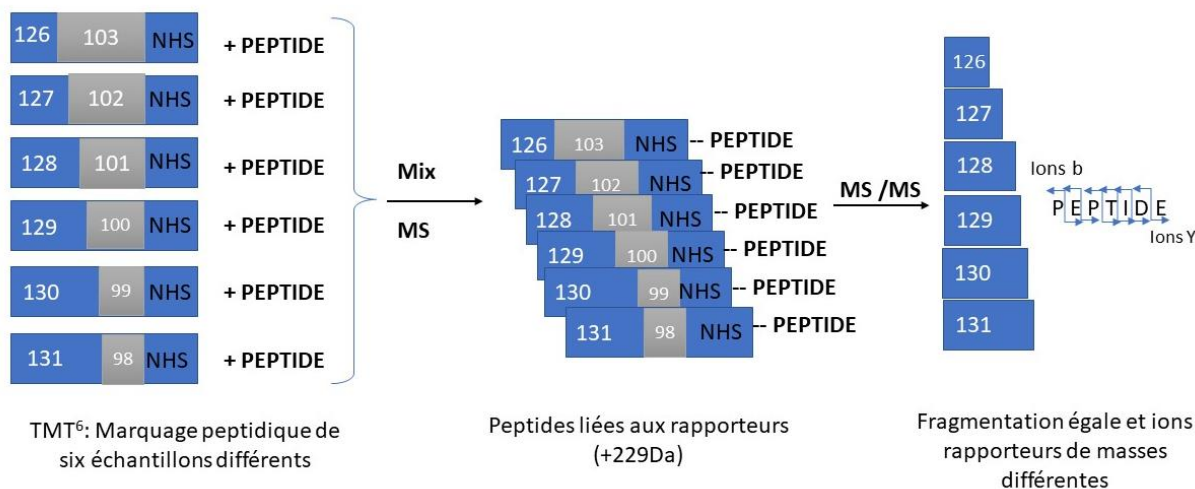


Figure 25 Schéma récapitulatif de la construction des marquages isobariques

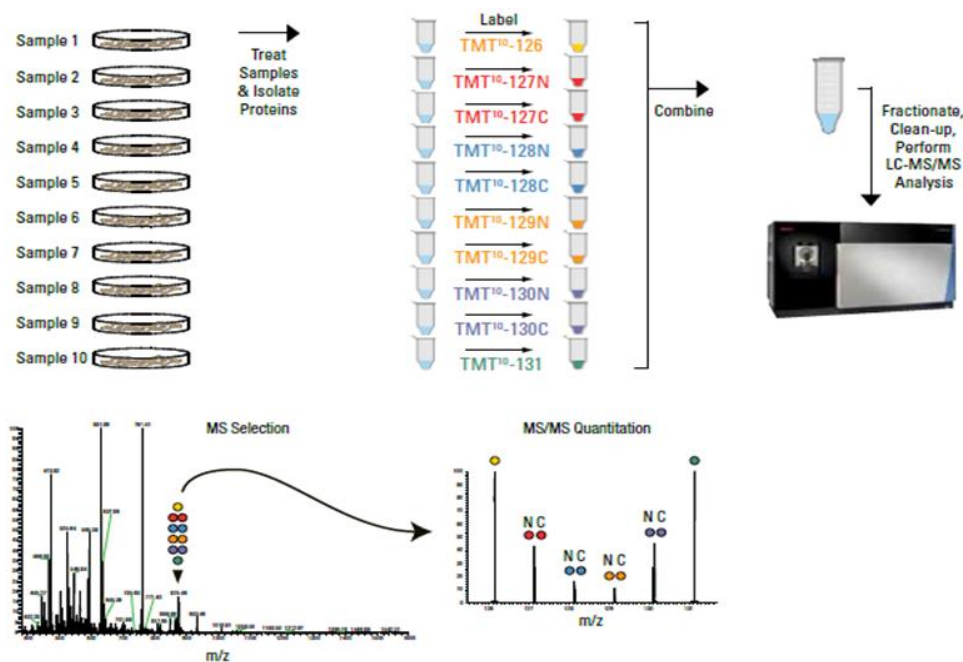


Figure 26 La procédure d'utilisation du kit TMT10plex en utilisant le kit 10plex Label Reagents. (Scientific, 2014)

Ces étiquettes isobares multiplexes apparaissent à la même masse dans un balayage MS, mais lors de la fragmentation CID dans le spectromètre de masse, donnent lieu à des ions de signature MS / MS de faible masse entre 126 et 131 m / z (TMT) correspondant à la perte de rapporteur. Les pics ou zones relatifs au rapporteur indiquent la proportion de peptides marqués de l'échantillon dont ils sont dérivés (Figure 25).

Cette technique a plusieurs avantages dont principalement la quantification simultanée de chaque peptide et en conséquence des protéines, la possibilité de quantifier les peptides d'un protéome complexe en un temps faible par rapport à d'autres méthodes comme la 2D ou le label free. Cette technique permet, notamment, la comparaison de différentes conditions (contrôle et traité) en ayant plusieurs points par condition et aussi comparer différentes conditions par rapport à des contrôles en intégrant les différentes conditions dans la même injection (Figure 26). D'ailleurs, plusieurs combinaisons de Tag existent : les duplex TMT-2plex, les TMT-4Plex, les TMT0 6-plex, les TMT-10 plex et, récemment, ThermoFisher a développé les TMT-11plex.

Au cours de ce projet, nous avons utilisé une quantification par TMT. En effet, ce marquage combiné à une analyse en QExactive Plus en HCD, nous a aussi permis d'obtenir autant d'ions

y que b car le marquage TMT ajoute des charges basiques permettant une meilleure ionisation et une meilleure fragmentation des peptides.

II. Approche transcriptomique

Lors de ce projet, nous avons eu recours à une méthode « omique » largement appliquée. Cette méthode est la transcriptomique qui, tout comme la protéomique étudie les protéines, elle s'intéresse aux acides ribonucléiques : les ARNs.

II.1. Définition de la transcription

La transcription est l'étape qui permet de transférer l'information génétique portée par l'ADN, sous forme de transcrits, du noyau vers le cytoplasme de la cellule où se trouve les outils nécessaires pour la traduction. L'ADN est transcrit en ARN par une classe d'enzymes : les ARN polymérases (Figure 27). Les ARN transcrits appartiennent à différentes classes d'ARN, dont une classe majoritaire : les ARN messagers (ARNm).

L'expression des gènes est ainsi évaluée en mesurant les ARNm. Cependant, le nombre de protéines exprimées est plus élevé par rapport au nombre de transcrits. Ceci est expliqué par l'importance des modifications subies par les ARN avant leurs traductions tel que l'épissage alternatif, mais aussi les différentes modifications post traductionnelles et les maturations subies par les protéines avant de devenir fonctionnelles.

En effet, les premiers transcrits synthétisés sont les transcrits primaires (pre-mRNA). Ces transcrits subissent plusieurs transformations dans le noyau avant qu'ils soient « matures ». La première étape consiste à ajouter une coiffe (CAP) en extrémité 5' qui le protégera de la dégradation. Par la suite, chez les eucaryotes, des étapes de polyadénylation et d'épissage interviennent. Premièrement, la polyadénylation qui se traduit par l'ajout d'une queue poly(A) : une suite de ribonucéotides de type adénosine à l'extrémité 3' de l'ARN. Deuxièmement, l'épissage qui consiste à supprimer des fragments « introns » (parties non-codantes) du pre-mRNA et de garder d'autres « les exons » (parties codantes) (Figure 28). Ce processus est dit « alternatif » car différentes combinaisons d'exons peuvent avoir lieu. On obtient, ainsi, des transcrits matures différents à partir de transcrits primaires identiques.

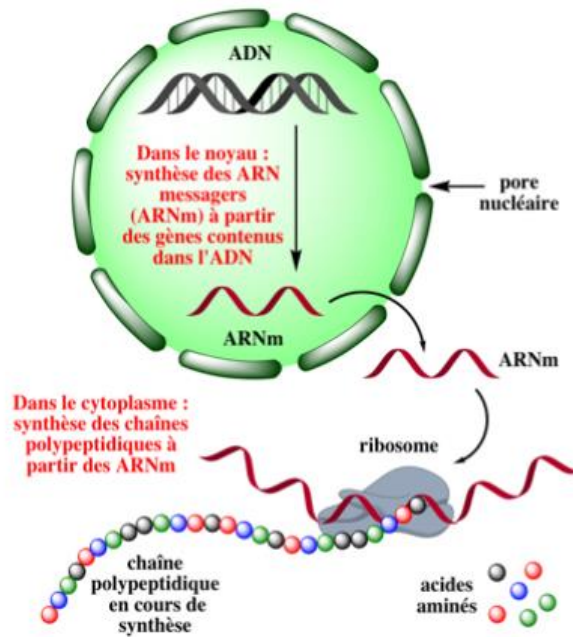


Figure 27 Schéma récapitulatif du passage de l'information génétique portée par l'ADN, sous forme de transcrits ARNm du noyau vers le cytoplasme de la cellule où se trouve les outils nécessaires pour la traduction (Jaspard.E, 2013)

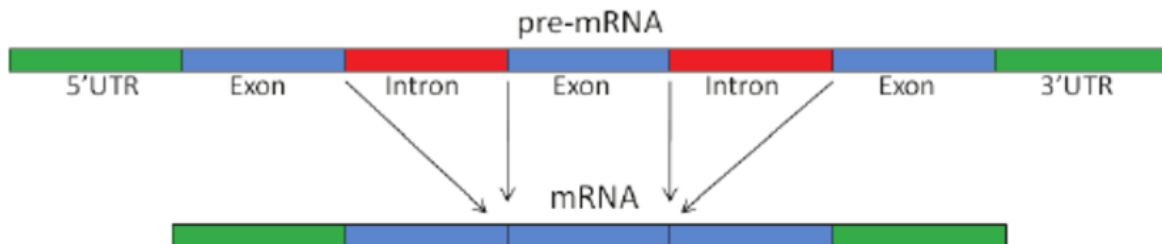


Figure 28 Epissage du pré-ARN messenger : Les introns sont éliminés pour construire la séquence d'ARN mature. Plusieurs exons peuvent être sélectionnés pour former l'ARNm, ce qui résultent en plusieurs variants de séquence d'ARNm (Synnergren and Sartipy, 2011).

Après transcription, les ARNm sont traduits en protéines. Ce processus est appelé traduction. En effet, chaque ARNm est porteur de codons formés par trois nucléotides associés aux acides aminés. Chaque codon est associé à un seul et unique acide aminé : c'est le code génétique. La traduction se déroule en présence d'un ribosome. Ce dernier va permettre en présence d'un complexe de synthétiser le peptide. Ce complexe est constitué d'un ARN messager porteur de codon, des ARN de transferts porteurs d'anticodons et d'une peptidyl transférase, enzyme assurant la liaison entre les acides aminés. Par la suite, la protéine est synthétisée par l'assemblage des différents peptides et subira parfois à son tour plusieurs modifications post traductionnelles afin de devenir fonctionnelle.

II.2. La transcriptomique

Le transcriptome est défini comme l'ensemble des ARN exprimés à un instant donné dans un tissu ou un type cellulaire spécifique. La transcriptomique permet, donc, d'identifier les gènes différentiellement exprimés entre les conditions expérimentales et de quantifier les changements de niveaux d'expression de chaque transcrit sous les différentes conditions expérimentales.

La transcriptomique s'est développée grâce à l'apparition des méthodes de biologie moléculaires « haut débit » tel que les puces ADN « DNA microarrays ». le développement de ces puces a été dynamisé par les grands projets mondiaux de séquençage tel que le « Human Genome project » lancé en 1990 (Sawicki *et al.*, 1993). Le développement de ces projets a été élargi à l'étude du transcriptome.

Il existe deux approches pour étudier le transcriptome : l'hybridation ou le séquençage. L'hybridation consiste à incuber les ADNc (ADN complémentaire) greffés à des molécules fluorescentes sur des sondes ADN qui sont à leur tour fixées à un support physique tel que des membranes ou des lames en verre.

Cette technique, certes peu coûteuse, permet de générer beaucoup de données mais elle est destructive pour l'échantillon et les données générées ne peuvent être obtenues qu'une fois uniquement. Elle présente, aussi, une faible sensibilité des transcrits rares et une forte amplification des transcrits abondants (Royce, Rozowsky and Gerstein, 2007).

Contrairement à l'hybridation, le séquençage permet de déterminer la séquence de l'ADNc et n'est donc pas limité à une liste déjà établie permettant ainsi la découverte de nouveaux transcrits.

La première technique de séquençage à avoir été utilisée est la méthode Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Cette méthode a été durant des années perfectionnée et améliorée pour augmenter le débit de séquençage ce qui a permis le séquençage du génome humain entier en 2004. Ce projet a duré 13 ans et a coûté 13 milliards de dollars. Le coût élevé du séquençage a été à l'origine du développement des séquenceurs de seconde génération NGS (Next Generation Sequencing). L'objectif était de réduire à moins de 1000 dollars le séquençage du génome humain. Les séquenceurs de nouvelles générations permettent de préparer des banques d'ADNc sans passer par le clonage dans des plasmides bactériens et de réaliser plusieurs réactions (des millions) de séquençage en parallèle. Le développement de ces nouvelles plateformes a

contribué à l'apparition du séquençage de l'ARN, RNA seq (RNA Sequencing) en 2008, (Morin *et al.*, 2008), c'était la première technologie à proposer le séquençage aléatoire des ARN.

Cette technique permet de caractériser et quantifier tous les transcrits. On peut distinguer trois techniques de séquençage à haut débit : le pyroséquençage (Roche), le séquençage par ligation (Applied Biosystem) et le séquençage à l'aide de terminateurs réversibles (Illumina). Actuellement, la principale technique de séquençage appliquée est appelée « Illumina ».

II.3. Approche RNA seq par Illumina

II.3.a. L'extraction et isolement des ARN

La première étape consiste à extraire les ARN totaux et d'en sélectionner une partie en fonction de l'objectif de l'étude. En effet, l'ARN total est majoritairement constitué d'ARN ribosomiaux. Ces ARNr masquent la diversité des transcrits. Ainsi il est possible de sélectionner les ARN d'intérêt par différentes techniques :

La sélection des ARN polyadénylés : les transcrits polyA sont synthétisés par l'ARN polymérase II et comprennent les ARN messagers, les précurseurs des micro ARN (miARN) et des petits ARN nucléolaires (snoARN). Du fait de la présence de cette queue polyA, il est possible d'isoler ces ARN au moyen d'une sonde nucléotidique oligo-dT fixée de manière covalente à des billes magnétiques. Par la suite, les ARN ayant une queue polyA sont sélectionnés grâce à des aimants.

La sélection par la déplétion sélective des ARNr (Ribodépletion) : cette sélection peut être réalisée par deux techniques : la première repose sur l'utilisation de sondes nucléotidiques composée d'une séquence spécifique à la partie 5' des ARNr et marquée à la biotine. Le complexe qui en résulte est détaché de l'ARN sélectionné par des billes magnétiques sur lesquelles la streptavidine a été fixée. La deuxième technique repose sur une des caractéristiques des ARNr. Elle fait appel à des exonucléases spécifiques qui vont dégrader les ARN portant un phosphate en 5'. En effet, les ARNr ont cette caractéristique contrairement aux ARNm qui ont une coiffe à la place.

Comparé à la sélection par polyA, la ribodépletion permet de conserver parmi les ARNs sélectionnés, les ARNm non polyA, les ARNt de transfert et également les ARN non codants tel que les microARN, les ARN interférents, et les petits ARN nucléaires qui interviennent dans la régulation des gènes (Costa *et al.*, 2010; Cui *et al.*, 2010; Adiconis *et al.*, 2013; Sultan *et al.*,

2014; Zhao *et al.*, 2014; Abernathy and Overturf, 2016). Ainsi, selon la méthode choisie, on observera des enrichissements de certains transcrits par rapport à d'autres.

II.3.b. La préparation des librairies et séquençage

Après l'extraction et la sélection, les ARN sont convertis en ADNc, cette étape est la préparation des librairies, il s'agit d'une étape importante dans le protocole de NGS. Cette création de librairies varie en fonction de la plateforme choisie. Cependant, la première étape est une étape commune. En effet, avant la création de la librairie, il faut tout d'abord fragmenter les transcrits. La fragmentation peut être réalisée à partir des ARN ou bien à partir des ADNc double-brins issus de la rétrotranscription.

La technologie Illumina est conçu pour la lecture des ADN, il est, alors, indispensable d'avoir une étape de transcription inverse pour convertir les ARN en ADNc. Lors de cette opération, les ARN sont rétrotranscrits par une enzyme la transcriptase inverse.

Pour conserver les informations du brin d'origine, des traitements « orientés » ont été développés :

- le prétraitement de l'ARN avec du bisulfite de sodium pour convertir les cytidines en uridines (He *et al.*, 2008).
- l'incorporation de dUTP lors de la synthèse du brin complémentaire puis digestion par une enzyme uracil-*N*-glycosylase (Parkhomchuk *et al.*, 2009)
- La liaison directe des adaptateurs dans une orientation connue sur les ARN.

L'étape de transcription peut entraîner certains biais comme la formation de fragments chimériques (Peng *et al.*, 2015) mais aussi des biais causés par les primers utilisés lors de la fixation de la transcriptase inverse sur l'ARN (Hansen, Brenner and Dudoit, 2010).

Après transcription, la fragmentation est effectuée par sonication, nébulisation ou par un traitement enzymatique à la DNase (Wang, Gerstein and Snyder, 2009). Des séquences adaptatrices sont liées aux extrémités des fragments d'ADNc. Ces complexes sont ensuite fixés à un support solide recouvert d'adaptateurs oligonucléotidiques. L'extrémité libre se recourbe et s'hybride à l'adaptateur complémentaire sur la surface solide, chaque fragment est amplifié 1000 fois pour former des « clusters » qui seront, par la suite séquencées en parallèle. A chaque cycle un signal fluorescent est émis correspondant à l'ajout d'un nucléotide parmi les quatre.

Chaque nucléotide ou « terminateurs réversibles » est marqué par un signal fluorescent. Une caméra interprète le signal émis permettant ainsi de reconstruire la séquence (Figure 29).

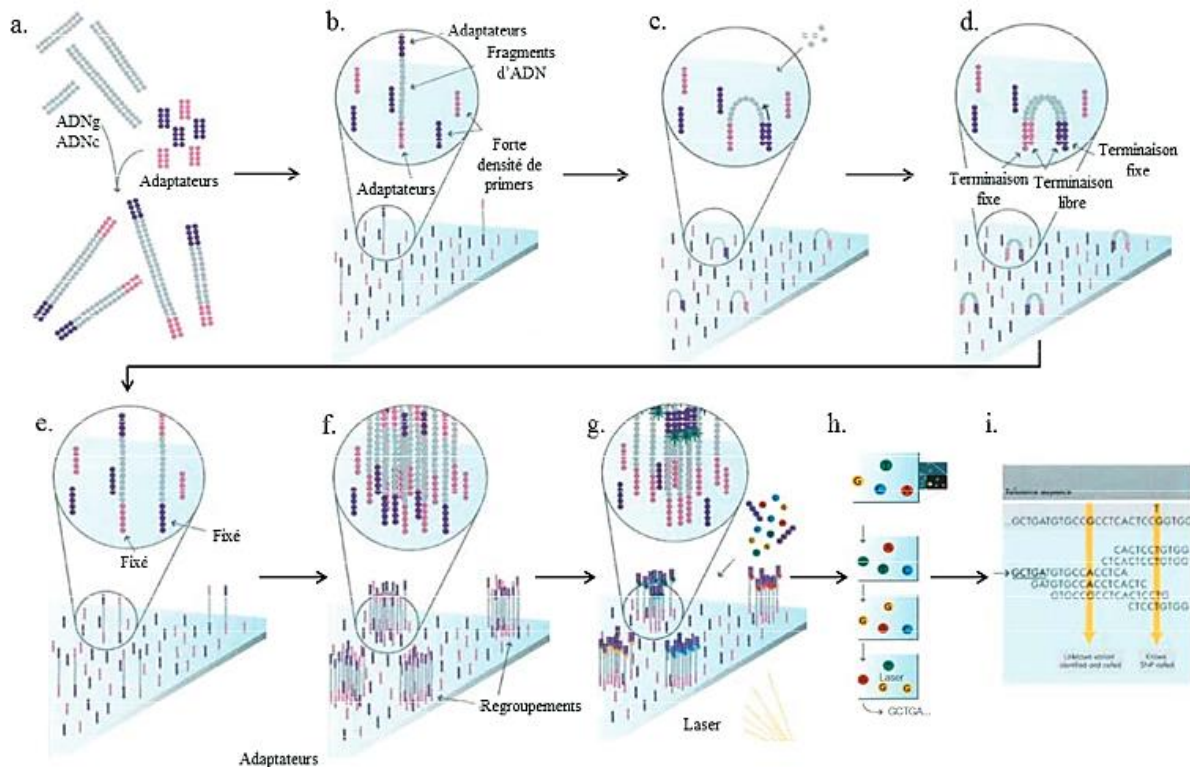


Figure 29 Principe de la technique de séquençage Illumina (a) fragmentation de l'ADN et ligation des adaptateurs (b) Fixation des fragments simple brins sur la lame de verre (c) amplification en pont (d)obtention des brins doubles en pont sur la lame (e) dénaturation afin de garder uniquement le simples brins fixées (f) répétitions des étapes c, d et e (g) début de séquençage par additions de nucléotides fluorescents lors de la polymérisation des brins amplifiés fixés ; (h) lecture du signal fluorescent à chaque cycle et concaténation de la séquence ;(i)alignement des séquences sur une séquence de référence afin de détecter les variations de polymorphisme ou de quantifier l'expression (Illumina, 2010).

L'illumina présente plusieurs avantages par rapport aux autres plateformes car elle offre le meilleur débit, généralement 100 à 150 pb en seulement quelques jours (Glenn, 2011), et un avantage financier : le coût le plus faible par base. Cependant, il est possible de réduire le coût du séquençage en ayant recours au « multiplexage » qui consiste à séquencer une banque d'ADNc renfermant plusieurs échantillons. Chaque échantillon est distingué par un code barre différent. Néanmoins, plus on combine d'échantillons, plus la profondeur du séquençage est réduite. Ce taux de couverture peut être aussi impacté par le type de séquençage : « single-end » (une seule extrémité de l'ADN) ou « pair-end » les deux extrémités de l'ADN sont

successivement séquencés. Le « pair-end » améliore certes l'assemblage des séquences mais il est plus coûteux.

II.3.c. L'analyse des données

Afin de pouvoir analyser cette masse de données générées, plusieurs outils bio-informatiques ont été développés. L'analyse de ces données commence par une analyse des données brutes afin de déterminer la qualité du séquençage et le taux de contamination. Ensuite, une étape de nettoyage est effectuée pour éliminer les séquences d'adaptateurs et les codes-barres. Des outils de bio-informatique ont été développés tel que Cutadapt (Martin, 2011), Adapter removal (Lindgreen, 2012) ou TagCleaner (Schmieder *et al.*, 2010). Pour réaliser ce nettoyage, il existe des outils aussi qui permettent de corriger les erreurs de séquençage ou améliorer l'assemblage notamment Reptile (Yang, Dorman and Aluru, 2010), SGA (Simpson and Durbin, 2010) ou SEECER (Le *et al.*, 2013).

Quand les données sont nettoyées, une étape d'assemblage est réalisée et pour cela il existe 2 techniques « de novo » ou une méthode d'alignement des séquences.

La méthode « de novo » concerne les études réalisées dans des organismes non modèles. Cette méthode permet de découvrir des transcrits non présents dans le génome à cause d'un épissage alternatif ou d'une mauvaise annotation. Dans le cas d'organisme modèle, il est possible d'évaluer le taux d'expression à partir du comptage de séquences issus de l'alignement sur les séquences de référence par l'outil BWA (Li and Durbin, 2009). Il est possible aussi de cartographier les lieux d'épissage en utilisant TopHat (Trapnell, Pachter and Salzberg, 2009) et détecter les SNPs par SAMTools (Li et al., 2009) et GATK (DePristo et al., 2011).

D'autres outils existent permettent de prétraiter les données brutes avant le traitement statistique. En effet, il est important d'évaluer le signal relatif à la mesure de l'intensité et de le distinguer du signal artificiel. L'extension R *limma* propose plusieurs méthodes pour cette correction du « bruit de fond », dont une approche basée sur un modèle de convolution normale + exponentielle. Cette extension est compatible avec la plateforme illumina. Enfin, après prétraitement, une étude exploratoire pour le contrôle des échantillons est réalisée afin de détecter les individus présentant une variabilité importante par rapport aux autres échantillons et qui sont qualifiés d'« extrêmes » par rapport à l'ensemble des conditions expérimentales.

Après ces analyses primaires, des analyses en biostatistiques sont appliquées pour différencier les échantillons (statistiques descriptives) ou distinguer des échantillons traités à d'autres non traités (Statistiques multivariés).

Dans le cadre de cette étude, nous avons utilisé cette approche transcriptomique pour évaluer le taux d'expressions des transcrits altérés par l'invalidation du gène SLC5A8.

III. Approche métabolomique

Afin de compléter cette approche omique appliquée lors de cette thèse, nous avons notamment entrepris une étude métabolomique pour étudier le métabolome de la thyroïde.

L'apparition des techniques de spectrométrie de masse couplée à la chromatographie gazeuse dans les années 1960 a contribué à la naissance de la métabolomique. La première analyse en métabolomique a été réalisée par l'équipe de Pauling en 1971, (Pauling *et al.*, 1971) au cours de laquelle il a effectué une analyse quantitative de métabolites de fluides corporels. Il aura fallu attendre, les travaux menés par Oliver (Oliver *et al.*, 1998) sur la levure *Saccharomyces cerevisiae* pour voir apparaître le terme métabolomique.

La métabolomique est définie comme l'étude de l'ensemble des métabolites dans un système biologique donné (organismes, fluides, organes et cellules) (Tweeddale, Notley-McRobb and Ferenci, 1998; Fiehn *et al.*, 2000).

Le métabolome représente l'ensemble des molécules dont la masse moléculaire est inférieure à 1500 Da provenant du métabolisme primaire et secondaire de l'organisme (Figure 30). Les acides aminés, les sucres, les vitamines, les nucléotides et certains alcools constituent les métabolites primaires provenant de la dégradation de la matière organique et donc du catabolisme cellulaire. Tandis que les métabolites secondaires proviennent de l'anabolisme, processus de synthèse des composants de la cellule.

Le nombre des métabolites existant chez l'homme n'a pas encore été déterminé. Il avait été estimé entre 3500 et 10 000. Et récemment, il a été évalué à 114 100 métabolites lors de la dernière mise à jour de la base de données Human Metabolome Database (HMDB), dont environ 18 000 ont été correctement identifiés et quantifiés (Wishart *et al.*, 2018). Ce nombre s'appuie sur plusieurs techniques de détection et sur la multiplicité des voies de signalisation (Wishart *et al.*, 2018).

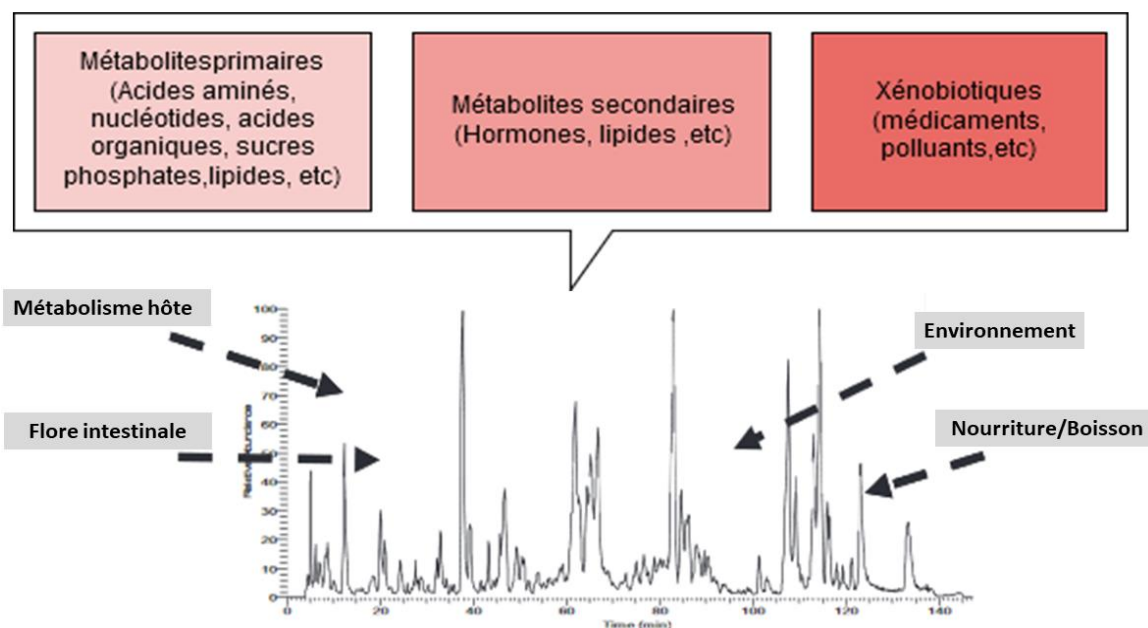


Figure 30 Vue globale du métabolome englobant les différentes classes de métabolites (Junot et al., 2014)

Aujourd'hui, la métabolomique est appliquée dans différents domaines notamment en cancérologie. En effet, depuis la démonstration d'Heinrich Warburg en 1924 du lien étroit de la dépendance des cellules tumorales au glucose et le développement des techniques d'analyse à haut débit, les études métabolomiques se sont multipliées pour détecter les dysfonctionnements métabolomiques et l'identification de potentiels biomarqueurs. Certes en oncologie la métabolomique est largement appliquée, mais il existe d'autres applications comme en agroalimentaire ou en étude environnementales.

En analyse métabolomique, on a recours à l'utilisation de plusieurs techniques d'analyse : la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) couplée à un détecteur UV, la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS), la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS), la spectrométrie de masse (MS) et la spectrométrie par résonance magnétique nucléaire (RMN).

La MS et la RMN, dont l'utilisation est la plus répandue, sont les techniques de références car offrant de grandes possibilités d'application dans divers domaines médicaux et cliniques. Cependant, il est courant d'avoir recours à plusieurs de ces méthodes car elles sont complémentaires puisqu'elles ont, chacune, des avantages et des inconvénients. Leur

association permet d'établir un profil métabolomique approchant l'exhaustivité (Psychogios *et al.*, 2011; Bouatra *et al.*, 2013).

Dans cette étude, nous avons utilisé une seule technique : la LC-MS. Outre la durée de l'étape de préparation de l'échantillon plus longue en LC-MS qu'en RMN pour les échantillons issus de tissus ou d'organes, cette technique est destructive pour l'échantillon car nécessitant l'extraction préalable des métabolites. Néanmoins, l'atout majeur de la MS, réside dans la sensibilité et la sélectivité de la méthode permettant ainsi d'identifier plus de métabolites et une quantification plus fiable (Figure 31).

En effet, la spectrométrie en haute résolution permet la détection des ions dans une gamme de rapport m/z précisée en amont par l'analyste, en plus de la détermination des formules brutes associées à ces rapports. Cette approche permet la détection de plusieurs molécules à la fois et d'établir une empreinte métabolique spécifique à l'échantillon.

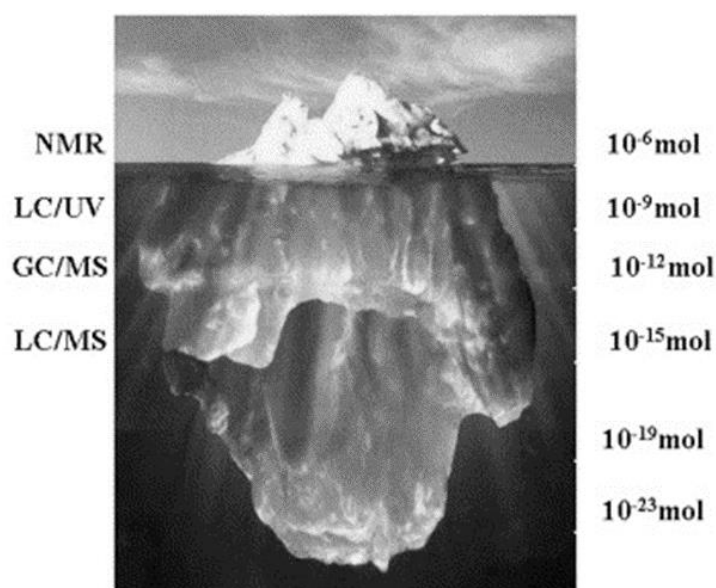


Figure 31. Représentation des différentes sensibilités de détection en fonction de la technique d'analyse suivie. La RMN a une application rapide mais très peu sensible par rapport aux autres techniques favorisant, ainsi, la détection des métabolites les plus concentrés (la partie apparente de l'iceberg). La GC/MS et la HPLC/MS sont plus sensibles (Sumner, Mendes and Dixon, 2003).

Tout comme la protéomique, en analyse métabolomique, il y a deux types d'approches : une approche non ciblée dite « globale » qui s'intéresse à l'ensemble des modifications du métabolome et une deuxième dite « ciblée ».

L'approche globale permet de comparer les empreintes métaboliques d'échantillons provenant de deux ou plusieurs conditions différentes, en définissant dans un premier temps des classes d'échantillons et de caractériser les métabolites discriminants ou biomarqueurs. Cette approche peut être qualitative mais aussi quantitative. Nous avons eu recours à cette approche dans ce travail afin d'obtenir une vue d'ensemble des métabolites et d'identifier les voies métaboliques impactées par l'effet du Wolff-Chaikoff chez les souris invalidées SLC5A8 mais aussi pour comparer l'effet de l'iode à l'effet d'un agent de contraste iodée.

L'analyse ciblée permet de quantifier un ou plusieurs métabolites spécifiques et définis initialement. Cette approche est appliquée dans le cas d'une modification ou la dérégulation d'une voie en particulier.

L'analyse métabolomique se déroule en plusieurs étapes (Figure 32). Elle débute par le traitement de l'échantillon qui doit être le moins sélectif possible afin de pouvoir conserver le maximum de métabolites intacts. Cet extrait est, par la suite, analysé en spectrométrie de masse pour obtenir les données brutes (raw data). Les données sont traitées par des logiciels spécifiques nécessitant une succession d'étapes avant de les confronter à une base de données pour identifier les différents métabolites. L'analyse statistique, univariées ou multivariées, qui suivra dépend de l'objectif de l'étude.

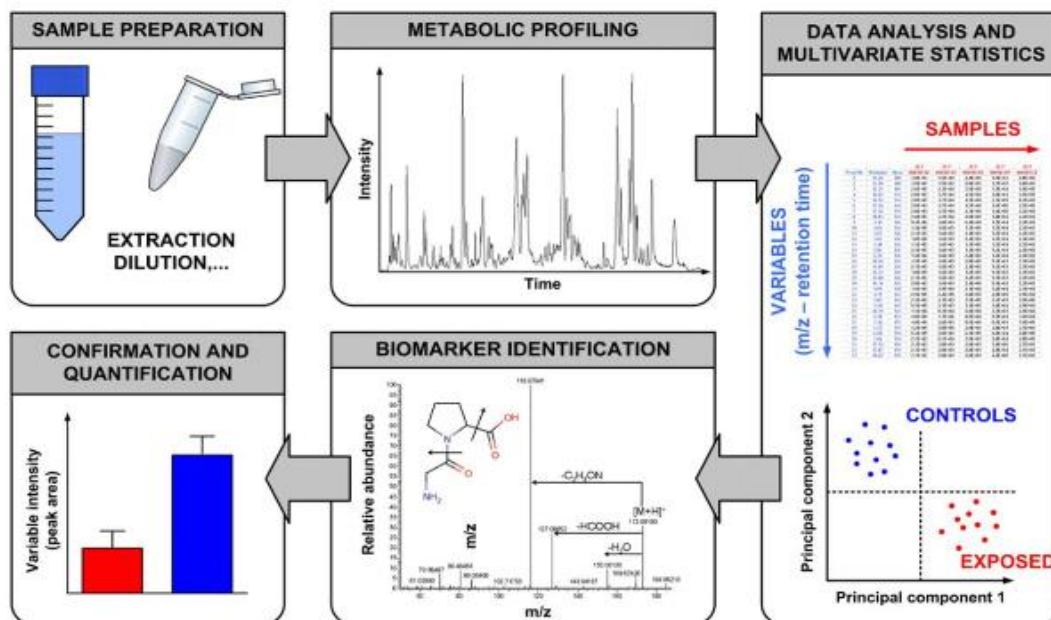


Figure 32 Processus ou workflow d'une analyse métabolomique par spectrométrie de masse haute résolution (Roux et al., 2011)

III.1. La préparation de l'échantillon

L'extraction des métabolites est dépendante à la fois du milieu biologique les contenant (fluides biologiques ou extraits cellulaires) mais aussi de la nature des métabolites à extraire (lipide, polarité etc). Les urines sont seulement diluées avant d'être injectées dans la LC-MS (Werner *et al.*, 2008; Jankevics *et al.*, 2009), tandis que les fluides cérébrospinaux ou le plasma, sont obligatoirement traités dans des solvants organiques tel que le méthanol ou l'éthanol ou encore l'acétonitrile (Elizabeth J. Want *et al.*, 2005; Bruce *et al.*, 2009). Les cellules sont mises en contact d'un solvant organique à basse température afin d'extraire les métabolites qui peuvent alternativement aussi être extraits mécaniquement par sonication ou sous agitation (Croixmarie *et al.*, 2009). Plusieurs méthodes existent pour extraire les métabolites des tissus soit dans une phase organique ou en phase solide (SPE) se basant sur la rétention des métabolites par une phase stationnaire. Cette phase est constituée d'un solide poreux comme la silice. Un exemple largement appliqué en extraction de métabolites est la microextraction sur phase solide (SPME). Cette technique est utilisée après biopsie ou pour l'analyse des drogues dans le sang (Vuckovic *et al.*, 2009, 2010; Ahmad *et al.*, 2015). Cependant, toutes ces méthodes s'accordent sur l'importance de congeler l'échantillon rapidement après prélèvement afin de stopper l'activité enzymatique et ne pas modifier ainsi les métabolites de l'organe (Vuckovic, 2012). Ces différentes extractions sont suivies d'une centrifugation et d'un séchage au vapeur rotatif. Le culot est suspendu à nouveau dans un mélange compatible avec la LC/MS.

III.2. Le traitement des données

Le traitement de données brutes se traduit par la détection des composés à partir des spectres et chromatographes. L'objectif est de convertir les spectres en données analytiques compatibles avec les logiciels statistiques. Différents logiciels permettent la détection automatique des signaux et leur réaligement relatif à chaque échantillon. Certains logiciels sont commercialisés comme par exemple, Compound Discoverer et Sieve® de ThermoScientific, MarkerView™ de SCIEX, MarkerLynx™XS de Waters, MassHunter d'Agilent et d'autres sont « gratuits » ou en « libres accès », comme MetAlign (Plant Research International B.V), MZmine (Katajamaa, Miettinen and Oresic, 2006), et XCMS (Smith *et al.*, 2005) qui sont d'ailleurs les plus largement utilisés. MZmine dispose, aujourd'hui, de modules permettant de gérer un grand ensemble de données et d'intégrer des algorithmes supplémentaires (Pluskal *et al.*, 2010). Il analyse, ainsi, plusieurs spectres du même échantillon (MS ou MSn). MZmine permet une connectivité aux bases de données pour l'identification des métabolites.

Les logiciels ont des algorithmes différents et nécessite donc un paramétrage différent. Pendant ce projet nous avons utilisé MZmine dont les étapes sont les suivantes :

- 1) **Conversion du fichier profile en centroïde** afin d'extraire les m/z, cette conversion supprime certains bruits de fond.
- 2) **Filtrage du bruit de fond et détection des pics** : au cours de cette étape, les artefacts électroniques seront supprimés en se basant soit sur des filtres de bruits comme le ratio signal sur bruit ou encore en comparant la ligne de base au niveau du chromatogramme. L'objectif de la recherche des pics est de détecter les ions et de désigner les sommets des pics chromatographiques. A partir de cette étape, la quantification des métabolites par l'évaluation de l'aire sous pic et de la hauteur maximale du pic est possible.
- 3) **L'alignement inter-échantillons** cette étape consiste à regrouper les pics ayant des m/z et temps de rétention identiques dans chaque échantillon ce qui permettra la comparaison des variations d'un métabolite dans les différents échantillons.
- 4) **La complétion des données manquantes (Gap filling)** cette étape est importante pour l'établissement de la significativité car elle permet d'éviter la multiplicité des valeurs manquantes qui pourrait fausser la significativité plus tard dans l'analyse. Si une variable est présente dans un grand nombre d'échantillons et absente uniquement dans quelques-uns, cette étape remplacera les pics non détectés (bruit de fond important ou pic non gaussien) par 'l'intégration du bruit de fond local.
- 5) **L'annotation** : cette étape consiste à interroger les bases de données en se basant sur l'homologie du rapport m/z détecté par rapport à celui d'un métabolite décrit dans les banques de données publiques chimiques, métabolomiques ou biochimiques. Plusieurs banques de données métabolique sont disponibles tel que KEGG (Kanehisa, 2002), HMBD (Human Metabolome Database) (Wishart *et al.*, 2007), METLIN (Smith *et al.*, 2005), ChemSpider (Pence and Williams, 2010), SciFinder (Wagner, 2006) ou Pubchem.(Sayers *et al.*, 2009).

III.3. La normalisation

L'ionisation entraîne plusieurs dérives analytiques dont des effets de suppression de l'ionisation dans une même analyse ou dans des échantillons différents. Il est important de maîtriser ces artefacts et d'y palier pour ne pas impacter les résultats. Il existe différentes méthodes pour corriger ces fluctuations :

- Intégrer des étalons internes, idéalement marqués, dans tous les échantillons présentant une structure similaire au métabolite d'intérêt. Leur synthèse est longue et coûteuse.
- Il est donc possible d'avoir une alternatif en utilisant des échantillons de contrôle qualité (QC). Les QC sont un mélange des différents échantillons à analyser dans l'étude. Ces QC sont régulièrement injectés lors de l'acquisition. Le but de cette approche est de corriger le signal de chaque métabolite par régression. (Dunn *et al.*, 2011)

L'injection du QC est une solution intéressante néanmoins limitée aux seuls métabolites présents dans le mélange et liée aussi à la stabilité du QC au cours du temps.

- Il est possible de faire une normalisation par la régression locale de type LEOSS (Low order non linear locally estimated smoothing function). Cette méthode s'appuyant sur une modélisation polynomiale locale est réalisée à partir des intensités des QC. Pour chaque métabolite, une régression locale est mesurée en se basant sur les intensités des QC. Les abondances détectées pour les différents échantillons sont divisées par la valeur correspondante sur la courbe de régression puis multiplié par la moyenne des QC afin d'obtenir les abondances normalisées.
- Un autre type de normalisation peut être appliqué : la normalisation des quantiles. Cette méthode normalise les distributions des aires des échantillons. Ainsi, les aires moins intenses des échantillons injectés en fin de séquence sont réévalués grâce à cette méthode.(LEE *et al.*, 2012)

III.4. Les analyses statistiques

Après la normalisation des données, deux types d'analyses statistiques sont utilisables. En premier les analyses univariées, qui sont couramment utilisées en biologie permettant d'évaluer les variables explicatives en fonction d'un ou plusieurs paramètres sans considérer les interactions entre les variables. Le test statistique à appliquer dépend de la distribution de la probabilité de la variable. Si la distribution obéit à une courbe gaussienne, il faut utiliser des tests paramétriques (Student ou Spearman). Dans le cas contraire, il faut utiliser des tests non paramétriques tel que Wilcoxon ou la corrélation de Pearson.

Le deuxième type d'analyse de statistiques sont les analyses multivariés (Johan Trygg, Elaine Holmes and Torbjörn Lundstedt*, 2006) qui s'intéresse à l'étude simultanée de plusieurs

variables et permet de les visualiser dans un espace réduit grâce à la réduction de la dimensionnalité des données. Elles se déclinent en deux types :

- **Les analyses multivariées descriptives** : Cette analyse permet d'avoir une projection du jeu de données sans à priori. Les sorties se présentent en dendrogramme ou en plans factoriels. L'analyse la plus courante est l'Analyse en composantes principales (ACP). Les composantes sont calculées à partir des combinaisons linéaires des variables d'origine pour en extraire le maximum de variance. Les deux ou trois premiers modèles expliquent, en général, plus de 40% de la variance car le calcul est itératif : les premières composantes absorbent le maximum de variances et les dernières contiennent en générale le bruit aléatoire. Les données sont représentées en individus « score plot » selon les coordonnées calculées et un facteur biologique donnée. Une autre carte est générée aussi représentant la projection des variables explicatives sur les composantes latentes. C'est la carte des poids de variables « Loading plot ». Les variables qui ont contribué à la séparation des groupes d'individus sont représentés de part et d'autre du graphique. Cette approche permet de mettre en évidence les variables discriminantes.
- Pour compléter cette première analyse il faudrait réaliser une analyse de **statistiques explicatives ou prédictives**. Le but de cette analyse c'est d'identifier les signaux d'intérêt : la matrice contient des réponses (Y) qui sont expliquées par des variables explicatives (X). La méthode de régression aux moindres carrés partiels (Partial least squares, PLS) et la méthode discriminante PLS -DA (Partial least squares Discriminant analysis) sont des modèles largement utilisées en modèle prédictif. Le modèle établi à partir de données initiales peut être utilisé pour d'autres données dans le but de déterminer leur appartenance. Il est primordial de vérifier ces modèles par des méthodes de validation croisées afin d'éviter le risque de surapprentissage.

Cette approche est souvent appliquée en oncométabolomique qui cherche à caractériser le métabolome tumoral dans la description des profils métabolomiques des tumeurs (Cheng *et al.*, 1998; Bathen *et al.*, 2000; Cavill *et al.*, 2011). Le but de notre étude n'est pas de classer les échantillons mais de comparer les concentrations des métabolites entre les différentes conditions biologiques ainsi nous avons eu recours à des statistiques univariés classiques.

IV. Intérêt des études multi-omiques

Pour clôturer ce chapitre de cette brève présentation des méthodes omiques, nous constatons qu'il paraît évident que la capacité de compréhension des systèmes cellulaires et moléculaires s'est agrandie, depuis l'avancée des techniques et le développement des plateformes d'analyse omiques en plus de l'expansion de leurs champs d'applications.

Chacune des méthodes omiques a un rôle unique et intégral et présente aussi des avantages et des inconvénients dans la compréhension d'un processus physiologique.

Il est vrai que la transcriptomique permet de déterminer les différents niveaux d'expression des gènes qu'ils soient activés (up régulés) ou inhibés (down régulés). Cependant, la variation d'expression des gènes n'est pas souvent corrélée aux variations d'expression protéique comme il a été déjà démontré dans plusieurs études (Ghazalpour et al., 2011). En effet, une surexpression transcriptionnelle du gène n'est pas toujours liée à une surexpression de la protéine relative puisque cette régulation peut intervenir à trois niveaux différents : post transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel comme par exemple : l'épissage alternatif mais aussi la rétention d'introns, la polyadénylation alternative ou encore le trans-épissage. De plus, les microARN interviennent dans la régulation post-transcriptionnelle et sont directement impliqués dans l'inhibition d'une centaine de protéines et interviennent ainsi à la fois au niveau transcriptionnel et traductionnel (Taganov et al., 2006 ; Selbach et al., 2008).

La protéomique identifie et quantifie les protéines et apporte une information des modifications post traductionnelles quel que soit l'organe ou la lignée cellulaire étudiée. Elle permet de mettre en évidence une absence d'une ou plusieurs protéines impliquées dans un mécanisme cellulaire particulier, une augmentation de l'expression d'une protéine ou encore une modification post traductionnelle au niveau peptidique. Néanmoins, cette approche peut manquer de précision en fonction de la méthode d'analyse choisie et de la composition de l'échantillon étudiée. Elle n'apporte pas parfois assez d'éléments dans la détermination des enzymes actives impliquées dans la réponse cellulaire. Ce manque d'informations peut être comblé par une approche métabolomique. En effet, la métabolomique révèle la perturbation ou la présence d'un dysfonctionnement ou anomalie métabolique qui pourrait être la conséquence d'un processus pathologique ou d'une exposition à un agent chimique. Et par conséquent, la combinaison des approches peut mettre en évidence l'activation d'une ou de plusieurs voies de signalisation,

potentiellement absente en approche protéomique ou transcriptomique à travers l'augmentation de concentration d'un ou plusieurs métabolites.

De ce fait, contrairement à une approche omique unique où on se base sur une seule méthode, dans une approche multidimensionnelle, aucune méthode omique n'est isolée de l'autre. Une approche globale multi-omique permet d'explorer la réponse à différents niveaux et de tracer avec plus de précision le déclenchement du mécanisme d'action et de mieux caractériser la réponse. Cette optique exploratoire est très largement appliquée dans différents domaines pharmaceutiques, chimiques, et médicaux.

Chaque méthode apporte une ou plusieurs informations inédites la transcriptomique caractérise la structure transcriptionnelle du gène et identifie les sites d'épissage alternatif, à cela s'ajoute la protéomique qui apporte une information sur l'abondance des protéines et les modifications post-traductionnelles qui régissent l'activité enzymatique et interviennent dans la signalisation et la métabolomique éclaire sur l'impact sur la perturbation du métabolisme.

Ainsi, contrairement au schéma représentant cette relation ascendante entre les méthodes omiques, avoir recours à la combinaison de ces méthodes, permet d'améliorer la compréhension d'un système biologique où différents acteurs interagissent et s'influencent entre eux.

En conclusion, il est important de s'intéresser à la combinaison des différentes méthodes omiques pour une meilleure caractérisation des mécanismes moléculaires (Villar *et al.*, 2015; Lomate *et al.*, 2018) et pour une amélioration de la compréhension de la réponse biologique.

Partie 2 : Résultats et Discussions

I. Contexte

Le Wolff-Chaikoff est un processus physiologique qui permet à la thyroïde de se protéger et s'adapter à des excès de l'iode. Il a déjà été démontré que l'administration d'une pastille de KI, avant une exposition, permet de bloquer l'accumulation de l'iode radioactif par la thyroïde permettant ainsi de limiter l'exposition. Ce projet de thèse s'inscrit dans le cadre du projet Prophylaxie Répétée par l'Iode stable et contre-mesures innovantes en situation Accidentelle (PRIODAC), financé par l'Agence Nationale de la Recherche qui s'est intéressé à la compréhension des mécanismes moléculaires de la régulation du métabolisme de l'iode. Par cet apport scientifique et nouvelles connaissances, de nouvelles stratégies de protection contre des expositions répétées aux iodes radioactifs pourraient être développées.

II. Objectif de la thèse

De nos jours, le criblage omique est un outil très puissant qui permet un gain de temps considérable dans la compréhension des mécanismes moléculaires. Appliqué dans différents domaines, du domaine de la santé à la sécurité des aliments, cet outil s'illustre en plusieurs méthodes, lors de notre étude, nous avons abordé trois niveaux : la transcriptomique, la protéomique et la métabolomique.

Dans le contexte de la radioprotection, la compréhension des interactions moléculaires est primordiale afin de développer d'autres moyens de protection. Ainsi, nous avons mis en place une étude englobant trois méthodes omiques dans le but de définir les mécanismes intervenant dans la régulation par le Wolff-Chaikoff.

Ainsi, en première partie des résultats, dans le cadre de la radioprotection, nous avons étudié l'effet d'une administration d'un agent de contraste dont le mécanisme a longtemps été considéré comme étant un mécanisme de Wolff-Chaikoff.

Dans la deuxième partie des résultats, nous avons abordés l'effet de l'invalidation de la protéine SLC5A8 dans la première phase de régulation de la thyroïde : la phase aigüe du Wolff Chaikoff. Cette étude a consisté à comparer les profils protéomiques, transcriptomiques et métaboliques.

III. Présentation des résultats

Au cours de ce travail, nous avons étudiés les modifications globales et majoritaires observées au niveau, du transcriptome, protéome et métabolome.

Après extraction des analytes à partir des thyroïdes précédemment prélevées et congelées, nous avons analysés ces extraits par les techniques correspondantes aux approches suivies. Après observation du résultat global, nous avons menées une étude des voies de signalisation impactées par le changement physiologique thyroïdien induit par l'administration d'un agent de contraste et par l'inactivation du SLC5A8 sur l'effet de Wolff -Chaikoff.

Les résultats sont présentés sous format de deux articles scientifiques à soumettre.

Article I : Etude comparative des variations du protéome induites par un agent de contraste et de l'iode.

Contexte

Les agents de contraste sont couramment administrés aux patients dans le cadre d'imagerie médicale. Ils sont considérés sans danger et sans effet secondaire. Cependant, Il est recommandé d'attendre un certain délai et de ne pas traiter les patients à l'iode radioactif après un examen radiologique avec administration d'un agent de contraste. Ceci est dû à une inhibition de la captation de l'iode entraînée par cette administration. Cet effet est connu depuis de nombreuses années et les mécanismes moléculaires sous-jacents proposés étaient associés, intuitivement, à des relargages d'iode.

Des travaux précédents dans le laboratoire ont montré que l'inhibition de la capacité de captation d'iode par la thyroïde entraînée par l'administration d'agent de contraste ne peuvent pas être liées par l'iode contenu dans la formulation de ces agents. Ce travail a également montré que l'agent de contraste entraîne une forte baisse dans l'expression du NIS (Vassaux *et al.*, 2018).

Afin d'étudier les mécanismes induits entre les réponses à l'iode et aux agents de contraste, nous avons comparé le métabolome et le protéome de thyroïdes de souris après administration d'un agent de contraste et d'une dose d'iode.

Résultats

En première étape, nous avons évalué le niveau d'iode dans les thyroïdes de souris, par une analyse métabolomique, après une injection intrapéritonéale d'iode et une injection intraveineuse d'un agent de contraste. Cette analyse a révélé une différence de taux d'iode interne insuffisante pour déclencher une inhibition.

L'identification et la quantification des protéines grâce au marquage peptidique (TMT), ont permis d'établir seulement deux protéines qui évoluent similairement. L'analyse du network du protéome global modifié par l'agent de contraste met en évidence un network de protéines plus dense que le protéome modifié par l'iode.

Après une étude des voies de signalisations associées aux variations du protéome induites par chaque traitement, nous avons observé quelques voies potentiellement impliquées dans la régulation de l'iode qui sont aussi modulées dans la réponse de l'agent de contraste.

Des voies exclusivement impliquées dans la réponse thyroïdienne de l'agent de contraste pourraient expliquer l'effet durable de l'inhibition de la captation de l'iode. Nous avons aussi observé une baisse du taux du récepteur à TSH après une administration d'agent de contraste.

Conclusion

En mettant à profit une approche de protéomique quantitative et comparative, cette étude contribue à la compréhension du mode d'action d'un agent de contraste et met aussi en évidence des différences par rapport aux mécanismes induits par l'iode.

Proteomic analysis of iodinated contrast agent-induced perturbation of thyroid iodide uptake

Maha Hichri ^{1, 2}, Georges Vassaux ^{1,2,3}, Jean-Marie Guignonis ^{1, 2, 4}, Thierry Juhel ^{2, 5}, Fanny Graslin ^{1, 2}, Julien Guglielmi ^{1, 2}, Thierry Pourcher ^{1, 2} and Béatrice Cambien ^{1, 2, *}

Degrees:

Maha Hichri: Ph.D. student (Maha.HICHRI@unice.fr)

Georges Vassaux: Ph.D. (Georges.VASSAUX@unice.fr)

Jean-Marie Guignonis : Technician (Jean-Marie.Guignonis@unice.fr)

Thierry Juhel: Technician (Thierry.JUHEL@unice.fr)

Fanny Graslin : Technician (Fanny.GRASLIN@unice.fr)

Julien Guglielmi: Technician (Julien.GUGLIELMI@unice.fr)

Thierry Pourcher: Ph.D. (Thierry.POURCHER@unice.fr)

Béatrice Cambien: Ph.D. (cambien@unice.fr)

Affiliations :

¹ Laboratoire TIRO, UMR E 4320, CEA, Nice, France.

² Université de Nice-Sophia Antipolis, Nice, France.

³ Université Côte d'Azur, INSERM, CNRS, IPMC, France

⁴ Plateforme “Bernard Rossi”, Faculté de médecine, Université de Nice Sophia Antipolis, Nice, France

⁵ Institute for Research on Cancer and Aging, (IRCAN U1081; UMR CNRS 7284), Nice, France.

Running title: NaI vs ICM: comparative proteomic profiles

Key words: iodinated contrast media, free iodide, thyroid, microSPECT/CT imaging, proteomics

***Corresponding author:** cambien@unice.fr

Abstract

Background: Our recent data showed that iodinated contrast media (ICM) reduce thyroid uptake of iodide independently of free iodide, through a mechanism different from that of NaI and involving a dramatic and long-lasting decrease in Na/I symporter (NIS) expression. The present study aimed at comparing the response of the thyroid to ICM and NaI, using a quantitative proteomic approach.

Methods: MicroSPECT/CT imaging was carried out to assess the $^{99m}\text{TcO}_4^-$ thyroid uptake in mice exposed to either ICM or NaI, as well as their response to recombinant human thyroid-stimulating hormone (rhTSH). Total thyroid iodide content and proteome was determined in control, as well as NaI- or ICM-treated animals.

Results: An elevated level of iodide was observed in thyroids obtained from NaI-animals while the level of iodide was not significantly affected in thyroid ICM-treated animals. Exposure of thyroid to NaI modulates 13 cellular pathways. Most of these pathways are also affected by exposure to ICM, among which the eif4 and P706SK cell signaling pathway and according to upstream regulators module, INSR is activated by both NaI and ICM. In addition, ICM modulate 16 distinct pathways and fail to affect thyroid iodide content. Finally, administration of ICM reduces TSH receptor expression which results in a loss of TSH-induced iodide uptake by the thyroid.

Conclusions: Common intracellular mechanisms are involved in the reduction of iodide uptake promoted by ICM and NaI. However, the fact that ICM fails to affect thyroid iodide content suggests that the modulation of these common pathway is triggered by separate effectors. Also, ICM modulates numerous distinct pathways which may account for its long lasting effect on thyroid uptake. These observations may have implication in the management of patients

affected by differentiated thyroid carcinomas who have been exposed to ICM. They also provide the basis for the utilization of ICM-based compounds in radioprotection of the thyroid.

INTRODUCTION

In the thyroid, iodide is taken up from the blood plasma by follicular cells. This uptake is mediated by the Na/I symporter (NIS) protein present at the basolateral membrane of these cells (1). Free iodide is oxidized outside the cells at the apical membrane with Thyroid peroxidase enzyme (TPO) then it is covalently bound to tyrosine residues of the thyroglobulin protein once inside. The administration of high amounts of free iodide prevents entry of iodide into the thyroid. Mechanistically, this effect is the result of a physiological response, referred to as the Wolff-Chaikoff effect, in which the expression of the NIS protein is reduced (2).

Iodinated contrast media (ICM) are routinely administered intravenously to patients worldwide. A well-documented side effect of ICM administration is to decrease dramatically iodide or the iodide surrogate pertechnetate (3, 4) uptake by the thyroid, in humans (5-12). This phenomenon has also been observed in rats (13), cats (14) and mice (15). In humans, intravenous administration of ICM is known to impair thyroid uptake for up to eight weeks. This phenomenon compromises diagnostic thyroid scintigraphy and radio-iodine treatment of thyroid malignancies (5-9). For the latest, guidelines recommend delaying radioactive iodide treatment in patients who have been exposed to ICM (8, 10-12). Historically, this reduced iodide uptake by thyroid tissues in response to ICM was attributed to the high amounts of free iodide associated with (16) and/or released from (8, 17) the ICM formulation. Consistent with this hypothesis, urinary iodide content is elevated for four-to-six weeks before a return to normal levels (18-21). Urinary iodide content has been used as a surrogate marker of the restoration of normal iodide uptake by thyroid tissues (11).

However, the involvement of free iodide in the reduction of iodide uptake by the thyroid in response to ICM had never been formally demonstrated. Recently, we showed, using molecular imaging in mice, that ICM reduces iodide uptake by the thyroid to a greater and longer-lasting

degree than the free iodide found in ICM would explain (15). In addition, the effect of ICM is specific to the thyroid as, it does not affect the uptake of iodide by another NIS expressing tissue, the salivary glands, while administration of potassium iodide (KI) affects both organs. This selectivity of action of ICM to the thyroid was also documented in patients (15). Although indirect, these imaging data strongly suggest that, at the organ level, ICM inhibits thyroid iodide uptake through a mechanism different from that of KI. However, whether ICM induce intracellular events in the thyroid, identical to those triggered by free iodide remains to be determined. In this context, the aim of the present study is to compare the response of the thyroid to ICM and KI, using a quantitative proteomic approach.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Eight-week-old female C57Bl/6J mice were obtained from Janvier (Le Genest Saint Isle, France). Animal housing and procedures were conducted according to French Agriculture Ministry guidelines and were approved by the local ethics committee (Ciepal NCE/2014-211). Intravenous administrations of ICM were performed by injecting 100 μ L Iomeron diluted 50/50 (vol/vol) with phosphate-buffered saline (corresponding to 18 mg iomeprol). Administration of NaI was performed by an intraperitoneal injection of 150 μ L of a solution of 0.5% NaI. TSH treatment was performed by an intraperitoneal administration of 3.2 μ g/ mouse of thyrogen (Genzyme). Thyroids were collected either 24 (Na I) or 48 hours (ICM) after injection and were stored at -80°C until proteins or metabolites extractions.

Small-Animal MicroSPECT/CT Scans

^{99m}Tc pertechnetate ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) was obtained from a freshly eluted $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ generator. Animals were administered intraperitoneally with activities of 20 MBq $^{99m}\text{TcO}_4^-$. Tracer uptake were measured one hour later using a dedicated microSPECT/CT scanner (eXplore speCZT CT120, GE) as previously described (22). Reconstructed images were analyzed and quantified using AMIDE software (23). Tri-dimensional regions of interest were drawn manually around the thyroid and salivary glands, as previously detailed (4, 24). Uptakes were expressed as percentages of the injected activity after decay correction (22).

Metabolites extraction and iodide quantification

Metabolites from thyroid were extracted in Methanol LC-MS grade (Millipore) and left overnight at -20°C. The extract was centrifuged at 13,000 g for 15 min and the supernatant was dried with a rotary vacuum concentrator, and then dissolved in 30 μ L 0.1% formic acid, 5% acetonitrile prior to mass spectrometric analysis. The analysis of all samples was performed

using a DIONEX Ultimate 3000 HPLC system. Chromatographic analysis was performed using following conditions: Column: Phenomenex Synergi4 u Hydro-RP 80A 250x3.0 mm, Column temperature: 40°C, Mobile phase A: 0.1% formic acid in water and mobile phase B: 0.1% formic acid in acetonitrile Flow rate: 0.9 mL/min. The LC gradient began with 5% B for 5 min and was ramped up to 95% B over 22 min. The column was reequilibrated with 100% A for 3 min before the next run. MS analysis was carried out on a Thermo Scientific Exactive Plus benchtop Orbitrap mass spectrometer. The source conditions were as follows: Ion source: Heated electrospray ionization source (HESI II), Ion source polarity: Positive and Negative ion mode, spray voltage: 3800 V in positive mode\2500 V in negative mode, vaporizer temperature: 350 °C, ion sweep gas: 1.0 units, ion transfer tube temperature: 300 °C. Sheath gas pressure (N₂): 60 units, Auxiliary gas pressure (N₂): 15 units. With the exactive plus benchtop orbitrap mass spectrometer, generic conditions and an external mass calibration were used. The instrument was operated in full scan mode from m/z 67–1000. High-resolution accurate mass (HRAM) full-scan MS and top 5 MS/MS spectra were collected in a data-dependent fashion at a resolving power of 70,000 and 35,000 at FWHM m/z 200, respectively. The Stepped NCE (Normalized Collision Energy) setting was 40. MS data were analyzed with MZMine 2.20 and were compared to Human Data Base. Only Iodide metabolite was retained from identified metabolite.

Protein extraction

Proteins from Thyroid were extracted in RIPA buffer (NaCl 150 mM, EDTA 1mM, Triton X-100 1%, SDS 0.1%, Tris-HCl pH7.5 10 mM) in the presence of protease and phosphatase inhibitors (Roche). The lysate was centrifuged at 14,000 g for 15 min, and the supernatant was quantified with the BCA Protein Assay Kit (Bio-Rad, U.S.A.).

Tandem Mass Tag (TMT) labelling

Heat-denatured proteins sample (100 µg) were separated by SDS-PAGE. When marker dye reaches 1 cm from the bottom of the gel, migration was stopped. Protein bands were excised from gel. Each sample were washed three times with 100 mM ammonium bicarbonate, dehydrated with acetonitrile, reduced with 10Mm DTT and alkylated using 55mM Iodoacetamide. Samples were washed twice by 100 Mm Ammonium- bicarbonate and dried in a rotary vacuum concentrator. The dry gel spots were rehydrated with 100 mM ammonium bicarbonate buffer containing 40 ng/µL sequencing grade porcine trypsin (Promega, Madison, WI) and digestion carried out at 37°C for 16 h. The supernatant was removed, and the tryptic peptides were extracted and dried in the rotary vacuum concentrator. Each of the TMT10plex reagents (0.8 mg, Thermo FisherScientific, Rockford, IL) was resuspended in 41 µL of anhydrous acetonitrile and added to 100 µg of thyroid dried proteins digest dissolved in 100 µL of 50 mM TEAB buffer. Control samples were labelled with 126, 127N, and 127C; Thyroids from NaI- and ICM-treated animals were labelled with 128N, 128C, 129N and 129C, 130N, 130C, respectively. After 1 h incubation at room temperature, the reaction was quenched by adding 8 µL of 5% hydroxylamine. The different TMT-labeled samples were cleaned-up using C18Spin Column (Pierce) then pooled at a 1:1 ratio across all samples. The sample was dried with a rotary vacuum concentrator and then dissolved in 30 µL 0.1% formic acid, 5% acetonitrile prior to mass spectrometric analysis.

Peptide fractionation and LC-MS/MS analysis

The TMT-labeled samples were analyzed using a LC-MS/MS system consisting of a DIONEX Ultimate 3000 HPLC system and a Q Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific) equipped with an electrospray source.

Samples digests were analyzed with a capillary LC column (Dionex Acclaim PepMap100 C18, 300µm x 15cm, 2µm particle, 100 Å pore size) and a 300 min gradient on the Q Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific). Samples digests were labeled with TMT 9-plex reagents at a ratio

of (1:1) with a five-hour gradient, analyzed with a data dependent top 15 HCD method on the Q Exactive Plus. The resolution was 70K for full scan and 35K for MS2. The maximum IT was 250 ms for both full scan and MS2 scan, top 15 HCD was selected with MS2 trigger threshold of 1E5 and dynamic exclusion of 60s. Mobile phases A and B were composed of 0 and 100% acetonitrile, respectively, and each contained 0.1% formic acid. The LC gradient began with 2% B for 1 min and was ramped up to 8% B over 5 min, then to 35% B over 180 min, 55% B over 235 min, and finally to 90% B over 275 min. The column was reequilibrated with 2% B for 15 min before the next run.

Protein identification and quantification

All MS raw data files were analyzed by Proteome Discoverer software 2.1.1.21 (ThermoFisher, France) using the Sequest HT search engine against a database of *Mus musculus* protein sequences (Uniprot 10 090_Mus Musculus taxon 09/20/2018). X corr confidence was held upper to 0.7 for all parameters. Precursor mass tolerance was set to 10 ppm and fragment ion tolerance was 0.02 Da with permission of two missed cleavages in the trypsin digests. A decoy database search strategy was also used to estimate the false discovery rate (FDR) to ensure the reliability of the proteins identified: a 1% target FDR as strict criteria and 5% target FDR as relaxed criteria using Percolator. The strict maximum parsimony principle was performed, and only peptide spectra with at least low confidence were considered for protein grouping. Carbamidomethylation on cysteine (+57.021 Da) was set as static modifications. TMT6 tags on N termini (+229.163 Da) and on Lysine were set as Static modifications. Two 10-plex technical replicates were acquired for two proteome experiments with the average and standard deviation reported.

For relative quantitation, both unique and razor peptides were considered a highly confident identification and used for quantification. Reporter ion abundances were corrected for isotopic impurities based on the manufacturer's data sheets. Signal-to-noise (S/N) values were used to

represent the reporter ion abundance with a co-isolation threshold of 75% and an average reporter S/N threshold of 10 and above required for quantitation spectra to be used. The S/N values of peptides, which were summed from the S/N values of the PSMs, were summed to represent the abundance of the proteins. The quantitative protein ratios were calculated and normalized by total peptide amount and scaled on channel average for each sample. For comparison, three identical biological control samples, labeled with TMT 126, 127N, and 127C, were used as references.

Bioinformatics analysis

Pathway analyses were performed using Ingenuity Pathway analysis software. Only pathways with p-values under a threshold of 0.01 were considered significant, Z-score also were observed as a measure and a predictor for the activation state of the regulator. The activation Z-score makes predictions about potential regulators by using information about the direction of gene regulation. It can be used to infer the activation state of a putative regulator (i.e. whether the regulator is activated or inhibited). Proteins network were analyzed with STRING (10.5).

Statistical analysis

Statistical differences were analyzed by paired Student's *t*-test and a value of $P < 0.05$ was regarded as statistically significant. The differentially expressed proteins (DEPs) were defined as proteins with a difference in expression above a factor of 1.3 and under 0.77 with a p-value below 0.05. Data are represented as mean \pm S.D.

RESULTS

Effect of ICM and NaI on ^{99m}pertechnetate Uptake in Mice

We evaluated by SPECT/CT imaging the effect of NaI and iodinated contrast media (ICM) on the uptake of the iodide analog, ^{99m}pertechnetate, by the mouse thyroid. Basal uptake was measured before and after administration of NaI and of ICM. Fig. 1 shows that a marked reduction in radiotracer uptake by the thyroid was observed. This reduction reached up to 38% by 24 hours after NaI administration (1.30 before treatment vs 0.81 after NaI treatment, p=0.03) and up to 50% by 48 hours after ICM injection (1.30 vs 0.65 after ICM treatment, p=0.01).

Measurement of iodide in thyroids from mice treated with ICM or NaI

We performed metabolomic analyses to compare the levels of iodide found in mouse thyroid upon administration of NaI or ICM. Fig. 2 shows an elevated level of iodide in thyroids obtained from animals treated with NaI. By contrast, the level of iodide was not significantly affected in thyroid obtained from animals that received ICM. These results emphasize the fact that ICM affects thyrocyte function independently of free-iodide.

Quantitative proteomic analysis of thyroids from mice treated with ICM or NaI

We next analysed thyroid proteome upon either NaI or ICM administration and compared it to the proteome of thyroid of control animals. The results are presented as ratios of differentially expressed proteins (DEPs) between NaI and control or ICM and control. The DEPs were defined as proteins with a difference in expression above a factor of 1.3 and under 0.77 with a p-value below 0.05. A total of 12 and 57 DEPs were identified in NaI versus control and ICM versus control, respectively (Supplementary Tables S.1 and S.2). From these DEPs, only two proteins are commonly differentially expressed in NaI versus control and ICM versus controls thyroids (Fig3). These proteins are H2-D1 (Q3KQJ3) and Krt25 (Q8VCW2). H2-D1 is the most induced in ICM set.

The most induced and most inhibited DEP's in NaI versus control are listed in Table 1 and those in ICM versus control are showed in Table 2.

An enriched list of proteins was established that contains a total of 72 proteins and 148 proteins identified with p value under 0.05, in NaI versus control and ICM versus control, respectively (Supplementary Tables S.3 and S.4).

Altered pathways

To determine the top pathways altered by NaI or ICM, the whole DEP's dataset was analysed using STRING. Networks of DEPs were created (Fig. 4A). A higher density of interactions can be observed in the DEP/ICM versus control than in the DEP/NaI versus control dataset (Fig. 4A).

IPA analysis was run with the enriched list of proteins. Statistically significant canonical pathways for which the p-values < 0.01 were identified. Nine pathways are common to the two enriched datasets (Fig. 4B) (Table.3). They include metabolic pathways and signalling pathways. Only six are exclusive to the NaI versus control enriched dataset (Supplementary table S.5). Finally, 16 pathways are exclusive to the ICM versus control enriched dataset (Supplementary Tables S.6 and S.7).

Focus on the TSH receptor

Considering its pivotal role in thyroid function, we decided to focus on the regulation of the TSH receptor in ICM-treated animals. As this protein is not abundant, we had to enlarge the overview of the proteome by increasing the false discovery rate to 15%. The other parameters of the analysis were kept unchanged. The TSH receptor was found to be downregulated in thyroids from ICM-treated animals versus control (fold change 0.68, p-value = $4 \cdot 10^{-3}$). To determine whether this decrease had physiologically-relevant implications, we examined whether thyroids from control or ICM-treated animals were responsive to TSH. Fig. 5 shows

that administration of human, recombinant TSH leads to an increased in ^{99m}Tc pertechnetate (used as a surrogate for I- uptake, (4)) uptake by the thyroid. In mice treated with ICM, radiotracer uptake was lower one day after ICM administration and administration of human recombinant TSH failed to increase significantly this radiotracer uptake (Fig. 5).

DISCUSSION

In a recent report, we provided an indirect but strong argumentation based on SPECT/CT imaging of ^{123}I and $^{99\text{m}}\text{Tc}$ to demonstrate that ICM reduce thyroid uptake of iodide independently of free iodide (15). The effect of ICM is thyroid-specific and involves a dramatic decrease in NIS expression in thyrocytes (15). In the present study, we used a quantitative proteomic approach to examine the variations in protein content in thyroids from mice treated with either NaI or ICM. Overall, our data demonstrate that ICM induces a dramatic change in the level of many different proteins affecting numerous pathways. In comparison, administration of NaI leads to a lower level of changes only 12 proteins are differentially expressed in thyroids from NaI- treated animals. When pathways are considered, the similarity between the two conditions is much higher: about 30% of total pathways are commonly modulated in the two conditions and these modulated pathways could be the signature of common mechanisms leading to reduced NIS expression and reduced iodide uptake. One of these pathways is the Regulation of eIF4 and p70S6K Signaling pathway. The upstream analysis module of Ingenuity Pathway Analysis suggested that Insulin Receptor (INSR) was significantly unbiased upstream activator in both treatments: NaI (z-score =2.219, P= $1.63 \cdot 10^{-4}$) and ICM (z-score =2.433, P= $1.34 \cdot 10^{-4}$) (Fig .6). INSR upregulates mTOR that is known to downregulates iodide uptake in thyrocytes (Souza *et al.*, 2010). Although, mTOR is modulated by ICM (Supplementary Table S.6). mTOR is regulated by PI3K/AKT that has been involved in the acute inhibitory effect of iodide excess on the Na/I symporter (26), is generally recognized as important in NIS regulation (27-29). It could also be involved in the inhibitory effect exerted by ICM. TCA Cycle is unregulated uniquely in NaI administrated mice.

In addition to these common effects, our proteomic analysis reveals that ICM induce a dramatic change in cellular proteins leading to the modulation of 16 distinct pathways. This profound modification of the thyroid state could be responsible for the long-lasting effects of ICM.

The effect of ICM on TSH-induced iodide uptake by the thyroid is not well-documented. A study reported that the inhibition of iodide uptake by the thyroid could be reversed by intramuscular administration of recombinant human TSH (35). However, the ICM stunning reported in this study was relatively low and a large heterogeneity was observed in the nine patients of the cohort (35). In another study, the anecdotic case of a patient with differentiated thyroid carcinoma and who had previously received ICM was reported. This patient showed a lack of TSH-induced iodide uptake at the site of tumor recurrence or thyroid remnants (36). Isobaric chemical labelling of peptides provides a reliable quantitative method to compare protein expression in different conditions (37, 38). However, this accuracy is obtained at the expense of sensitivity and lowly expressed proteins are not necessarily detected. This is the case, for example of NIS. The TSH receptor can be detected if the false discovery rate is increased to 15%. This issue can be overcome by protein fractionation upstream of proteomic analysis, this fractionation can be based on isoelectric point or subcellular compartment for example. Our functional data show unambiguously that administration of ICM reduces TSH receptor expression which results in a loss of TSH-induced iodide uptake by the thyroid. These data, predicted by the proteomic analysis demonstrate that the cellular changes induced by ICM affect the TSH receptor in addition to NIS (15).

Measurement of total iodide in the thyroid upon administration of NaI showed, as expected, a marked increase in free-iodide in the thyroid. This is likely to be due to the large amount of iodide entering NIS-expressing thyrocytes. This entry results in intracellular events leading to a classical Wolff-Chaikoff effect for which a consequence is a reduction in the expression of the NIS protein (2). Measurement of the iodide levels in the thyroids of animals treated with ICM failed to show a significant difference. Our observation in mice is in agreement with a dataset obtained in humans in which the authors demonstrated that intra-thyroidal iodine was

unaffected by ICM (39). Altogether, these data confirm that ICM induces thyroid stunning independently of free-iodide.

Guidelines recommend a delay in the radioactive-iodide treatment of patients with differentiated thyroid carcinoma who have been injected previously with ICM (8, 10-12). As upon ICM injection, urinary iodide levels are elevated for several weeks (18-21) and as free-iodide was considered to be the cause of thyroid stunning by ICM (8, 35), urinary iodide content has been proposed as a surrogate marker of recovery of iodide uptake by the thyroid (11, 18-21). In the light of our results, the relevance of the measurement of urinary iodide to predict the recovery of iodide uptake by the thyroid is questionable. To determine, in patients, the duration of the decrease in NIS functional expression with the aim of refining the currently recommended four-to-six weeks before a radioiodine therapy, we advocate for the need of a dedicated trial. Although this problem is highly relevant for cancer patients it is difficult to envisage a trial involving this category of individuals. One possibility could be to have a group of healthy subjects who would receive intravenous administration of ICM and a control group. A scintigraphy aiming at measuring the uptake of iodide by the thyroid would be performed at time zero and then a group would receive an intravenous administration of the ICM while the other would receive a mock injection. This scintigraphy would be repeated on a weekly basis until the radiotracer uptake in the “ICM” group returns to the value obtained before the administration of the contrast agent. In addition, the measurement of urinary iodide could be performed to determine whether there is a correlation between these parameters and the capacity of the thyroid to take up iodide.

Numerous volatiles radionuclides are emitted as a result of a nuclear incident, amongst which ¹³¹I is abundant. The well-established preventive countermeasure to protect populations is the ingestion of potassium iodide (KI) tablets that prevent the entry of ¹³¹I to the thyroid. Nevertheless, the effect of KI tablets is transient, and the protective effect only lasts for 24

hours. As a result, the United States Food and Drug Administration recommends KI tablets to be ingested on a daily basis in cases of prolonged ¹³¹I exposures (<http://www.fda.gov/Drugs/EmergencyPreparedness/BioterrorismandDrugPreparedness/ucm072265.htm>) such as those observed in the Fukushima prefecture (40) . Considering the safety profile of ICM, the long-lasting effect of single ICM administration on thyroid iodide uptake and in the light of the mechanistic observations presented in this report, we advocate that formulations based on ICM could be used in conjunction or instead of KI tablets in radioprotection.

In conclusion our study demonstrates that exposure of thyroid to NaI modulate 15 cellular pathways. Most of these pathways (9/15) are also affected by exposure of thyroids to ICM. This observation suggests that common intracellular mechanisms are involved in the reduction of iodide uptake promoted by the two effectors. However, the fact that ICM fails to affect thyroid iodide content suggests that the modulation of these common pathway is triggered by separate effectors. In addition, ICM modulate 16 distinct pathways and these large and dramatic cellular changes may be responsible for the long-lasting effect of ICM on iodide uptake by the thyroid. These observations may have implication in the management of patients affected by differentiated thyroid carcinomas who have been exposed to ICM. They also provide the basis for the utilization of ICM-based compounds in radioprotection of the thyroid.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the IRCAN Animal Core Facility for providing access to their equipment. This work was supported by INSERM, and the French National Research Agency (ANR).

AUTHOR DISCLOSURE STATEMENT

All authors (Maha Hichri, Georges Vassaux, Jean-Marie Guignonis, Thierry Juhel, Fanny Graslin, Julien Guglielmi, Thierry Pourcher and Béatrice Cambien) declare that no competing financial interests exist. A patent on the utilization of ICM in radioprotection is currently being processed.

Ethical approval: All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

NAME AND ADDRESS OF CORRESPONDING AUTHOR:

Béatrice CAMBIEN

Laboratoire TIRO, UMR E 4320, 28 avenue de Valombrose, Université de Nice-Sophia
Antipolis, Nice, France.

email: cambien@unice.fr

[Phone: +33 493377715](tel:+33493377715)

REFERENCES

1. Hingorani M, Spitzweg C, Vassaux G, Newbold K, Melcher A, Pandha H, Vile R, Harrington K 2010 The biology of the sodium iodide symporter and its potential for targeted gene delivery. *Curr Cancer Drug Targets* **10**:242-267.
2. Dayem M, Navarro V, Marsault R, Darcourt J, Lindenthal S, Pourcher T 2006 From the molecular characterization of iodide transporters to the prevention of radioactive iodide exposure. *Biochimie* **88**:1793-1806.
3. Zuckier LS, Dohan O, Li Y, Chang CJ, Carrasco N, Dadachova E 2004 Kinetics of perrhenate uptake and comparative biodistribution of perrhenate, pertechnetate, and iodide by Nal symporter-expressing tissues in vivo. *J Nucl Med* **45**:500-507.
4. Zwarthoed C, Chatti K, Guglielmi J, Hichri M, Compin C, Darcourt J, Vassaux G, Benisvy D, Pourcher T, Cambien B 2016 Single-Photon Emission Computed Tomography for Preclinical Assessment of Thyroid Radioiodide Uptake Following Various Combinations of Preparative Measures. *Thyroid* **26**:1614-1622.
5. Grayson RR 1960 Factors which influence the radioactive iodine thyroidal uptake test. *Am J Med* **28**:397-415.
6. Rogers WR, Robbins LR 1955 Iodipamide (cholografin) administration; its effect on the thyroid uptake of I131 and the serum precipitable iodine in euthyroid persons. *N Engl J Med* **253**:424-425.
7. Slingerland DW 1957 Effects of an organic iodine compound priodax on tests of thyroid function. *J Clin Endocrinol Metab* **17**:82-93.
8. van der Molen AJ, Thomsen HS, Morcos SK 2004 Effect of iodinated contrast media on thyroid function in adults. *Eur Radiol* **14**:902-907.
9. Jaffiol C, Baldet L, Bada M, Vierne Y 1982 The influence on thyroid function of two iodine-containing radiological contrast media. *Br J Radiol* **55**:263-265.
10. Pacini F, Schlumberger M, Dralle H, Elisei R, Smit JW, Wiersinga W 2006 European consensus for the management of patients with differentiated thyroid carcinoma of the follicular epithelium. *Eur J Endocrinol* **154**:787-803.
11. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, Pacini F, Randolph GW, Sawka AM, Schlumberger M, Schuff KG, Sherman SI, Sosa JA, Steward DL, Tuttle RM, Wartofsky L 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.
12. Luster M, Clarke SE, Dietlein M, Lassmann M, Lind P, Oyen WJ, Tennvall J, Bombardieri E 2008 Guidelines for radioiodine therapy of differentiated thyroid cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **35**:1941-1959.
13. Yu MD, Shaw SM 2003 Potential interference of agents on radioiodide thyroid uptake in the euthyroid rat. *J Nucl Med* **44**:832-838.
14. Lee WR, Pease AP, Berry CR 2010 The effects of iohexol administration on technetium thyroid scintigraphy in normal cats. *Vet Radiol Ultrasound* **51**:182-185.
15. Vassaux G, Zwarthoed C, Signetti L, Guglielmi J, Compin C, Guignon JM, Juhel T, Humbert O, Benisvy D, Pourcher T, Cambien B 2018 Iodinated Contrast Agents Perturb Iodide Uptake by the Thyroid Independently of Free Iodide. *J Nucl Med* **59**:121-126.
16. Laurie AJ, Lyon SG, Lasser EC 1992 Contrast material iodides: potential effects on radioactive iodine thyroid uptake. *J Nucl Med* **33**:237-238.
17. Talner LB, Coel MN, Lang JH 1973 Salivary secretion of iodine after urography. Further evidence for in vivo deiodination and salivary secretion of contrast media. *Radiology* **106**:263-268.
18. Padovani RP, Kasamatsu TS, Nakabashi CC, Camacho CP, Andreoni DM, Malouf EZ, Marone MM, Maciel RM, Biscolla RP 2012 One month is sufficient for urinary iodine to return to its

- baseline value after the use of water-soluble iodinated contrast agents in post-thyroidectomy patients requiring radioiodine therapy. *Thyroid* **22**:926-930.
19. Lee SY, Chang DL, He X, Pearce EN, Braverman LE, Leung AM 2015 Urinary iodine excretion and serum thyroid function in adults after iodinated contrast administration. *Thyroid* **25**:471-477.
 20. Sohn SY, Choi JH, Kim NK, Joung JY, Cho YY, Park SM, Kim TH, Jin SM, Bae JC, Lee SY, Chung JH, Kim SW 2014 The impact of iodinated contrast agent administered during preoperative computed tomography scan on body iodine pool in patients with differentiated thyroid cancer preparing for radioactive iodine treatment. *Thyroid* **24**:872-877.
 21. Mishra A, Pradhan PK, Gambhir S, Sabaretnam M, Gupta A, Babu S 2015 Preoperative contrast-enhanced computerized tomography should not delay radioiodine ablation in differentiated thyroid carcinoma patients. *J Surg Res* **193**:731-737.
 22. Cambien B, Franken PR, Lamit A, Mauxion T, Richard-Fiardo P, Guglielmi J, Crescence L, Mari B, Pourcher T, Darcourt J, Bardies M, Vassaux G 2014 (9)(9)mTcO(4)--, auger-mediated thyroid stunning: dosimetric requirements and associated molecular events. *PLoS One* **9**:e92729.
 23. Loening AM, Gambhir SS 2003 AMIDE: a free software tool for multimodality medical image analysis. *Mol Imaging* **2**:131-137.
 24. Richard-Fiardo P, Hervouet C, Marsault R, Franken PR, Cambien B, Guglielmi J, Warnez-Soulie J, Darcourt J, Pourcher T, Colombani T, Haudebourg T, Peuziat P, Pitard B, Vassaux G 2015 Evaluation of tetrafunctional block copolymers as synthetic vectors for lung gene transfer. *Biomaterials* **45**:10-17.
 25. Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, Kuhn M, Wyder S, Simonovic M, Santos A, Doncheva NT, Roth A, Bork P, Jensen LJ, von Mering C 2017 The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res* **45**:D362-D368.
 26. Serrano-Nascimento C, da Silva Teixeira S, Nicola JP, Nachbar RT, Masini-Repiso AM, Nunes MT 2014 The acute inhibitory effect of iodide excess on sodium/iodide symporter expression and activity involves the PI3K/Akt signaling pathway. *Endocrinology* **155**:1145-1156.
 27. Garcia B, Santisteban P 2002 PI3K is involved in the IGF-I inhibition of TSH-induced sodium/iodide symporter gene expression. *Mol Endocrinol* **16**:342-352.
 28. Zaballos MA, Garcia B, Santisteban P 2008 Gbetagamma dimers released in response to thyrotropin activate phosphoinositide 3-kinase and regulate gene expression in thyroid cells. *Mol Endocrinol* **22**:1183-1199.
 29. Kogai T, Sajid-Crockett S, Newmarch LS, Liu YY, Brent GA 2008 Phosphoinositide-3-kinase inhibition induces sodium/iodide symporter expression in rat thyroid cells and human papillary thyroid cancer cells. *J Endocrinol* **199**:243-252.
 30. Kogai T, Taki K, Brent GA 2006 Enhancement of sodium/iodide symporter expression in thyroid and breast cancer. *Endocr Relat Cancer* **13**:797-826.
 31. Vadysirisack DD, Venkateswaran A, Zhang Z, Jhiang SM 2007 MEK signaling modulates sodium iodide symporter at multiple levels and in a paradoxical manner. *Endocr Relat Cancer* **14**:421-432.
 32. Jung KH, Paik JY, Ko BH, Lee KH 2008 Mitogen-activated protein kinase signaling enhances sodium iodide symporter function and efficacy of radioiodide therapy in nonthyroidal cancer cells. *J Nucl Med* **49**:1966-1972.
 33. Arriagada AA, Albornoz E, Opazo MC, Becerra A, Vidal G, Fardella C, Michea L, Carrasco N, Simon F, Elorza AA, Bueno SM, Kalergis AM, Riedel CA 2015 Excess iodide induces an acute inhibition of the sodium/iodide symporter in thyroid male rat cells by increasing reactive oxygen species. *Endocrinology* **156**:1540-1551.
 34. Goncalves CFL, de Freitas ML, Fortunato RS, Miranda-Alves L, Carvalho DP, Ferreira ACF 2018 Rutin Scavenges Reactive Oxygen Species, Inactivates 5'-Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase, and Increases Sodium-Iodide Symporter Expression in Thyroid PCCL3 Cells. *Thyroid* **28**:265-275.

35. Resende M, Corbo R, Vaisman M 2010 The effect of recombinant human TSH on ¹²³I thyroid uptake after intravenous iodide contrast agent. *Nucl Med Commun* **31**:315-319.
36. Mariani G, Ferdeghini M, Augeri C, Villa G, Taddei GZ, Scopinaro G, Boni G, Bodei L, Rabitti C, Molinari E, Bianchi R 2000 Clinical experience with recombinant human thyrotrophin (rhTSH) in the management of patients with differentiated thyroid cancer. *Cancer Biother Radiopharm* **15**:211-217.
37. Li Z, Adams RM, Chourey K, Hurst GB, Hettich RL, Pan C 2012 Systematic comparison of label-free, metabolic labeling, and isobaric chemical labeling for quantitative proteomics on LTQ Orbitrap Velos. *J Proteome Res* **11**:1582-1590.
38. O'Connell JD, Paulo JA, O'Brien JJ, Gygi SP 2018 Proteome-Wide Evaluation of Two Common Protein Quantification Methods. *J Proteome Res* **17**:1934-1942.
39. Schaffhauser K, Hanscheid H, Rendl J, Grelle I, Reiners C 2005 [Intrathyroidal iodine concentration after application of non-ionic contrast media with and without prophylactic application of perchlorate]. *Nuklearmedizin* **44**:143-148.
40. Kinoshita N, Sueki K, Sasa K, Kitagawa J, Ikarashi S, Nishimura T, Wong YS, Satou Y, Handa K, Takahashi T, Sato M, Yamagata T 2011 Assessment of individual radionuclide distributions from the Fukushima nuclear accident covering central-east Japan. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**:19526-19529.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Effect of ICM and NaI on the uptake of ^{99m}perchnetate by the mouse thyroid.

SPECT/CT imaging of mice administered 20 MBq ^{99m}perchnetate was performed (day 0). At the end of the scan, ICM or NaI was administered. One and two days later, animals were injected with 20 MBq ^{99m}perchnetate and new scans were performed. (A) Representative microSPECT/CT images of thyroid uptake upon NaI and ICM administration. (B) The data presented represent the percentage of radiotracer injected taken up by the thyroid. (n = 3 per condition). * p < 0.05; % IA: percentage of the injected activity.

Figure 2. Assessment of iodide concentration through metabolomics comparison between ICM and NaI treatment.

Samples for LC-MS measurement are analyzed after metabolites extraction from treated mouse thyroids. Iodide concentration was evaluated by peak height from three independent organs. ** p < 0.01; n.s : non statistically significant

Figure 3. Identification of the significant differentially expressed proteins (DEPs) induced by each treatment.

A Venn diagram illustrating the common and unique DEPs in the thyroid between NaI and ICM. The numbers represent the proportion of significantly changed proteins in each comparison with CTRL.

Figure 4. The DEP's proteins in both treatments shows up different network which leads to different pathways.

(A) NaI treatment induced 12 DEP's proteins which interact less than the 57 DEP's proteins induced in ICM treatment. The network is denser with more observed relations. The networks were conduct by STRING. (B) IPA analysis of enriched list of proteins

in ICA conducts to 25 pathways while NaI list of proteins conduct to less pathways (15). The Venn Diagram is illustrating 6 unique pathways in NaI while 16 after pathways analysis of ICM proteins. 9 pathways are common to both.

Figure 5. 99m Pertechnetate thyroid uptake on control and ICM treated animals before and after recombinant Human TSH administration. SPECT/CT imaging on control and ICM-treated mice was performed before and 24 hours after intraperitoneal administration of 3.2 μ g/ mouse of TSH. The data represent the averaged values of radiotracer accumulation in the thyroid at 60 min (n=4 per group). ns : not statistically significant; *** : $p < 0.001$.

Figure 6. Upstream analysis of DEPs from NaI vs. CTRL set (A) and ICM vs. CTRL set (B). Activated ($z\text{-score} \geq 2$) and inhibited ($z\text{-score} \leq -2$) upstream regulators are highlighted in orange and blue, respectively. (C, D) INSR regulated proteins both treatments. Up-regulated and down-regulated proteins are highlighted in red and green, respectively, and the color depth is correlated to the fold change. Orange and blue dashed lines with arrows indicate indirect activation and inhibition, respectively. Gray dashed lines with arrows depict no prediction.

Table 1. Top 10 list of the most induced and most inhibited proteins in NaI vs CTRL

Accession	Description	Gene	Abundance Ratio NaI vs. CTRL	P.value
A1YYN9	Fibroblast growth factor receptor	Fgfr2	1.44	0.02
P02535	Keratin, type I cytoskeletal 10	Krt10	1.32	0.01
P55264	Adenosine kinase	Adk	1.32	0.05
Q3KQJ3	H2-D1 protein (Fragment)	H2-D1	1.31	0.02
G3UXX7	N6-adenosine-methyltransferase subunit METTL3 (Fragment)	Mettl3	1.30	0.04
D3Z722	40S ribosomal protein S19	Rps19	1.29	0.01
Q64378	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP5	Fkbp5	0.59	0.02
Q8VCW2	Keratin, type I cytoskeletal 25	Krt25	0.51	0.04
A0A0G2JDV3	Guanylate-binding protein 6	Gbp6	0.49	0.01
F7C2Y9	Zinc finger CCCH-type with G patch domain-containing protein (Fragment)	Zgpat	0.35	0.01

Table 2. Top 10 list of the most induced and most inhibited proteins in ICM vs CTRL

Accession	Description	Gene	Abundance Ratio ICM vs. CTRL	P.value
Q3KQJ3	H2-D1 protein (Fragment)	H2-D1	1.75	0.05
H3BJB6	T-complex protein 1 subunit theta (Fragment)	Cct8	1.73	0.03
Q8CGR9	NDR2 (Fragment)	Ndr2	1.47	0.04
P13707	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)], cytoplasmic	Gpd1	1.46	0.04
P21550	Beta-enolase	Eno3	1.46	0.04
Q3UD06	ATP synthase subunit gamma	Atp5c1	0.48	0.05
G3UWS4	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A beta isoform	Ppp2r1b	0.45	0.03
O88456	Calpain small subunit 1	Capns1	0.43	0.02
Q8CG71	Prolyl 3-hydroxylase 2	P3h2	0.37	0.03
Q3UHW5	Uncharacterized protein	Rab8a	0.33	0.03

Table 3. Common pathways list affected in NaI-treated animals and ICM-treated animals

Canonical Pathway	-LOG(P.value)			Z Score			Nal Proteins	ICA proteins
	(Nal)	(ICA)	(ICA)	(Nal)	(ICA)	(ICA)		
	vs (CTRL)	vs (CTRL)	vs (Nal)	vs (CTRL)	vs (CTRL)	vs (Nal)		
Actin Cytoskeleton Signaling	4.291	2.503	1.423	1	0.377	N/A	ITGB1,FLNA,FGFR2,MYLK,MYH7,ACTN4,NCKAP1	ITGB1,ACTR3,PTPN11,Actn3,MYH7,GSN,ACTG1
Clathrin-mediated Endocytosis Signaling	4.695	2.860	1.583	N/A	N/A	N/A	ITGB1,PICALM,FGFR2,SERPINA1,UBC,CTTN,AP1G1	ITGB1,HSPA8,ACTR3,PTPN11,UBC,ACTG1,AP1G1
CTLA4 Signaling in Cytotoxic T Lymphocytes	2.140	2.113	0.583	N/A	N/A	N/A	HLA-A,FGFR2,AP1G1	PTPN11,HLA-A,PPP2R1B,AP1G1
EIF2 Signaling	2.718	3.432	0.835	N/A	N/A	N/A	RPL27,PABPC1,RPS19,EIF5,FGFR2	PABPC1,RPS7,PTBP1,EIF3B,PTPN11,EIF2S3,EIF3E,RPS3
ILK Signaling	3.785	2.250	0.331	0	0.816	N/A	ITGB1,FLNA,FERMT2,FGFR2,MYH7,ACTN4	ITGB1,PTPN11,Actn3,MYH7,PPP2R1B,ACTG1
Integrin Signaling	3.537	3.359	1.497	2.449	1.133	N/A	ITGB1,FGFR2,CAPN2,MYLK,ACTN4,CTTN	ITGB1,CAPNS1,ACTR3,PTPN11,CAPN1,Actn3,GSN,ACTG1
Regulation of Cellular Mechanics by Calpain Protease	2.593	2.692	0.725	N/A	N/A	N/A	ITGB1,CAPN2,ACTN4	ITGB1,CAPNS1,CAPN1,Actn3
Regulation of eIF4 and p70S6K Signaling	2.381	5.238	0.404	N/A	N/A	N/A	PABPC1,ITGB1,RPS19,FGFR2	PABPC1,RPS7,ITGB1,EIF3B,PTPN11,EIF2S3,EIF3E,RPS3,PPP2R1B
Virus Entry via Endocytic Pathways	3.907	2.563	1.276	N/A	N/A	N/A	ITGB1,FLNA,HLA-A,FGFR2,AP1G1	ITGB1,PTPN11,HLA-A,ACTG1,AP1G1

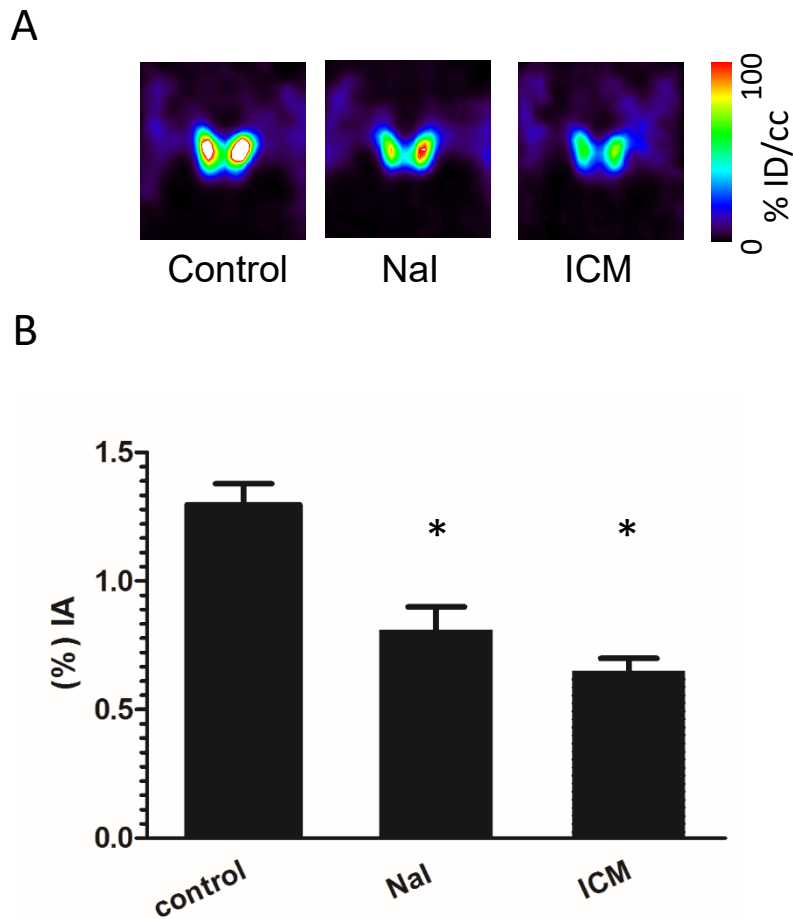


Figure 1. Effect of ICM and NaI on the uptake of 99m perchnetate by the mouse thyroid. SPECT/CT imaging of mice administered 20 MBq 99m perchnetate was performed (day 0). At the end of the scan, ICM or NaI was administered. One and two days later, animals were injected with 20 MBq 99m perchnetate and new scans were performed. (A) Representative microSPECT/CT images of thyroid uptake upon NaI and ICM administration. (B) The data presented represent the percentage of radiotracer injected taken up by the thyroid . (n = 3 per condition). * p < 0.05; % IA: percentage of the injected activity.

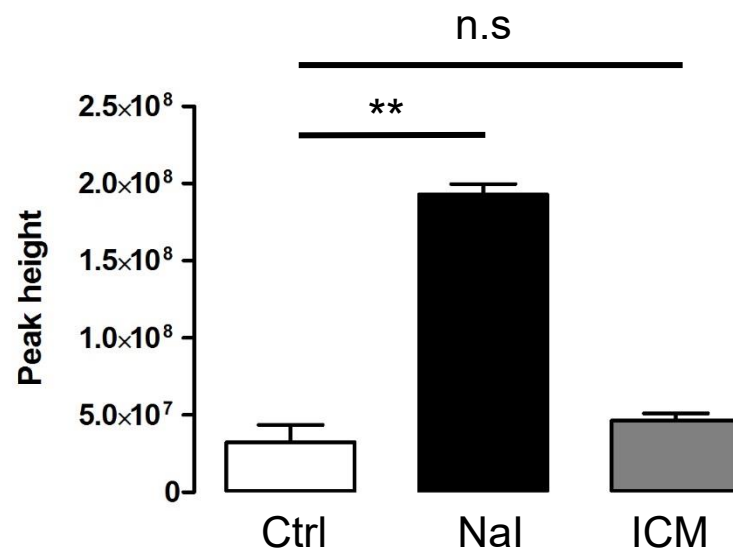


Figure 2. Assessment of iodide concentration through metabolomics comparison between ICM and NaI treatment. Samples for LC-MS measurement are analyzed after metabolites extraction from treated mouse thyroids. Iodide concentration was evaluated by peak height from three independent organs. ** $p < 0.01$; n.s : non statistically significant

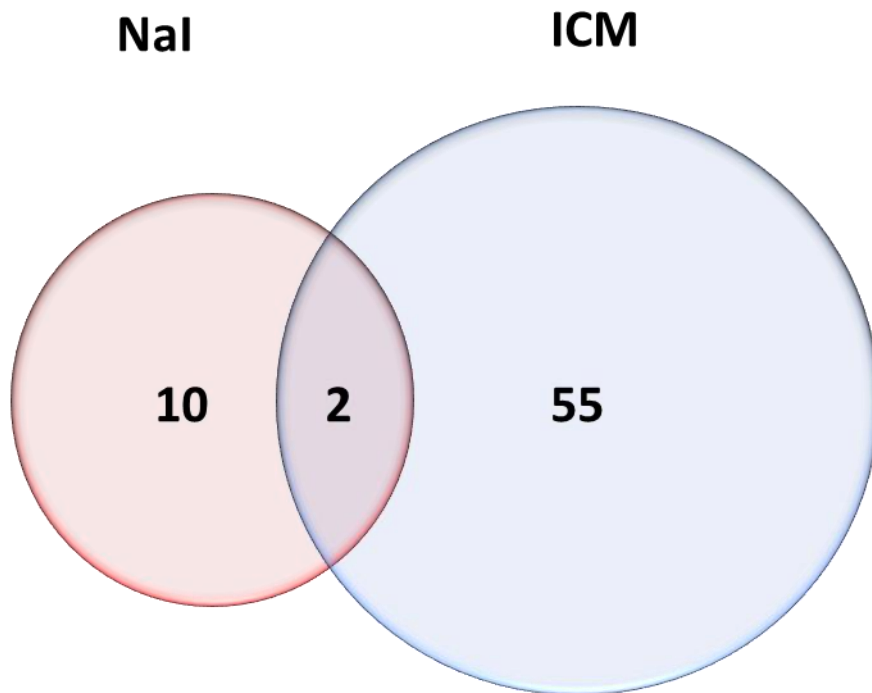


Figure 3. Identification of the significant differentially expressed proteins (DEPs) induced by each treatment. A Venn diagram illustrating the common and unique DEPs in the thyroid between NaI and ICM. The numbers represent the proportion of significantly changed proteins in each comparison with CTRL.

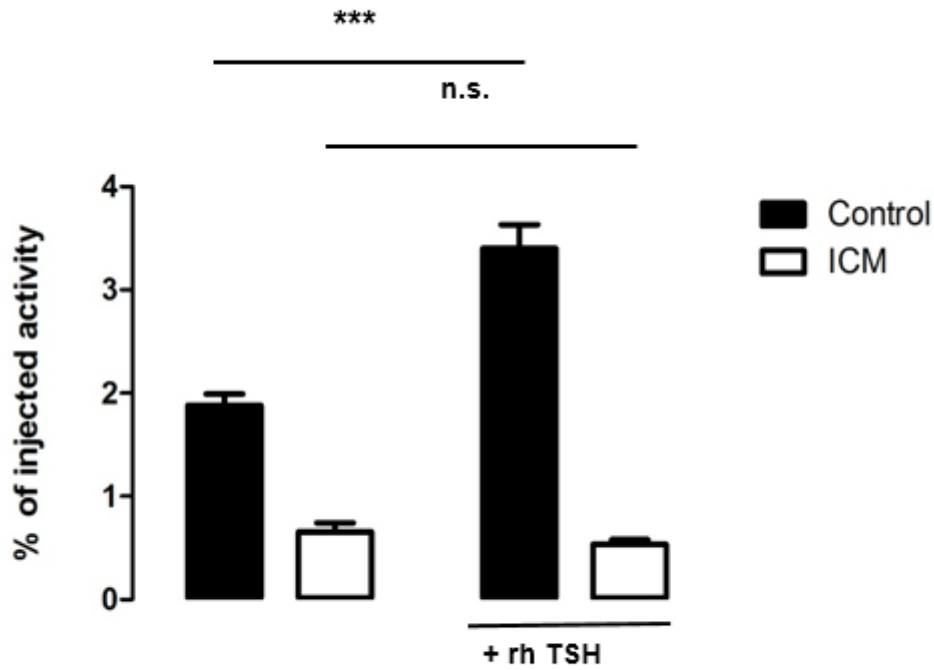


Figure 5. ^{99m}Tc thyroid uptake on control and ICM treated animals before and after recombinant Human TSH administration. SPECT/CT imaging on control and ICM-treated mice was performed before and 24 hours after intraperitoneal administration of $3.2 \mu\text{g}/\text{mouse}$ of TSH. The data represent the averaged values of radiotracer accumulation in the thyroid at 60 min ($n=4$ per group). ns : not statistically significant; *** : $p < 0.001$.

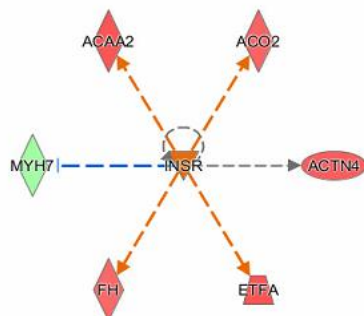
A

Upstream Regulator	Predicted Activation State	Activation z-score	p-value of overlap	Target molecules in da...
INSR	Activated	2,219	1,63E-04	↑ACAA2, ↑ACO2, ↑AC... all 6
TP53		0,718	4,70E-10	↑ACAA2, ↑ACO2, ↑A... all 13
NFE2L2		-0,365	3,17E-03	↑DDX39B, ↑FKBP5, ↑N... all 5
RICTOR		-0,447	2,77E-03	↑ATP12A, ↑ATP6V1A, ↑... all 5

B

Upstream Regulator	Predicted Activation State	Activation z-score	p-value of overlap	Target molecules in da...
DMD	Activated	2,449	2,30E-05	↑Actn3, ↑GPD1, ↑HSPAB... all 9
INSR	Activated	2,433	1,34E-03	↑ACO2, ↑ALDH2, ↑CP... all 7
PPARA	Activated	2,406	2,73E-02	↑ALDH2, ↑ARHGDI1, ↑... all 7
IL10RA		0,508	1,75E-04	↑ALDH2, ↑Ces1g, ↑D... all 10
PPARG		0,314	8,95E-03	↑CPT1B, ↑GPD1, ↑IVD... all 5
TP53		0,302	7,07E-05	↑ACO2, ↑ATP5F1C, ↑... all 11
NFE2L2		-0,436	9,27E-04	↑ACTG1, ↑Ces1g, ↑EIF3E... all 8
UCP1		-1,000	2,38E-02	↑MTHFD1, ↑PCK2, ↑U... all 4
LEP		-1,172	6,75E-03	↑ATP2A2, ↑CPT1B, ↑ID... all 6
HOXA10		-1,342	8,60E-04	↑ATP1A2, ↑KRT15, ↑N... all 5
NOS2		-1,342	5,26E-03	↑ATP2A2, ↑CYCS, ↑DD... all 5

C



D

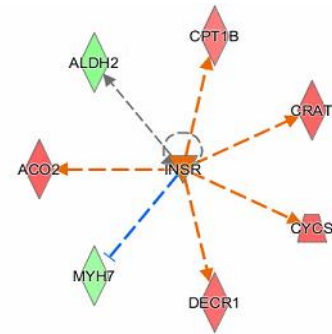


Figure 6. Upstream analysis of DEPs from NaI vs. CTRL set (A) and ICM vs. CTRL set (B). Activated ($z\text{-score} \geq 2$) and inhibited ($z\text{-score} \leq -2$) upstream regulators are highlighted in orange and blue, respectively. (C, D) INSR regulated proteins both treatments. Up-regulated and down-regulated proteins are highlighted in red and green, respectively, and the color depth is correlated to the fold change. Orange and blue dashed lines with arrows indicate indirect activation and inhibition, respectively. Gray dashed lines with arrows depict no prediction.

Article II : Etude du rôle de SLC5A8 dans la thyroïde dans le cas d'un Wolff Chaikoff par une approche multi-omiques

Contexte

SLC5A8 est une protéine membranaire exprimée dans différents organes (Gopal, Y.-J. Fei, *et al.*, 2004; TAKEBE *et al.*, 2005; Gupta *et al.*, 2006; Pamela M Martin *et al.*, 2007; Ganapathy *et al.*, 2008; Henning. Frank *et al.*, 2008). Cette protéine a un rôle de transporteur de monocarboxylates comme le butyrate, le pyruvate, lactate, nicotinate et le pyroglutamate (Coady *et al.*, 2004; Gopal, Y.-J. Fei, *et al.*, 2004; Miyauchi, Gopal, Y.-J. Fei, *et al.*, 2004; Ganapathy *et al.*, 2008; Miyauchi *et al.*, 2010). Cette protéine est aussi exprimée dans la thyroïde et est situé au niveau apical de la membrane du thyrocyte (Rodriguez, Perron, Lacroix, Caillou, Leblanc, M. Schlumberger, *et al.*, 2002).

Des observations précédentes, non publiées, dans le laboratoire s'intéressant à l'effet Wolff-Chaikoff ont permis de mettre en évidence, une différence de réponse à une administration d'iode au niveau des variations de taux de T4 et T3 circulants entre le modèle invalidé Slc5a8 (KO) et son homologue sauvage (WT). Par une approche multiomiques, combinant, la transcriptomique, la protéomique et la métabolomique, nous avons explorés les effets de l'invalidation de SLC5A8 afin de caractériser son rôle dans la thyroïde.

Résultats

Les analyses transcriptomiques ont mis en évidence, différents groupes de gènes intervenant dans les deux phases du Wolff Chaikoff. L'invalidation peut entrainer une augmentation du nombre de gène dont l'expression varie après administration d'iode mais aussi l'iode entraine également une variation d'expression inverse à celle liée à l'invalidation.

Par une approche en protéomique quantitative en TMT, nous avons caractérisé les protéines potentiellement intervenant dans la régulation de l'effet d'inhibition et de l'effet d'échappement, les deux étapes du Wolff-Chaikoff. L'analyse des voies de signalisation a permis l'identification des mécanismes d'action impactés par cette autorégulation de la thyroïde par l'iode mais aussi le rôle de SLC5A8 dans cette régulation.

Dans le but d'approfondir et de vérifier cet effet, une étude en métabolomique a été réalisée. Cette analyse a permis de mettre en évidence à la fois des différences dans les profils métabolomiques entre les deux souris invalidées et non mutées mais aussi a révélé une anomalie dans l'absorption de l'iode et une différence dans l'iodation de la thyroglobuline.

La combinaison des trois méthodes omiques a permis de mettre en exergue l'intervention de SLC5A8 dans la régulation du stress oxydatif dans la thyroïde, la modification du métabolisme énergétique de la thyroïde dans la première phase de la régulation du Wolff- Chaikoff et aussi de suggérer l'importance de SLC5A8 dans l'organification de la thyroglobuline.

Conclusion

A travers une étude du transcriptome, protéome et métabolome de la thyroïde de la souris, nous avons cartographié la diversité des transcrits, la fonction, et la dynamique des protéines ainsi que la variation des métabolites ce qui constituent de nos jours un enjeu majeur dans la compréhension des mécanismes de régulation.

Par cette approche omiques, nous apportons un nouvel éclairage pour la compréhension du rôle de SLC5A8 dans la thyroïde et son implication dans le processus de la régulation thyroïdienne par l'iode.

Nos résultats suggèrent que cette protéine interviendrait dans la régulation du stress oxydatif mais elle serait aussi impliquée dans l'organification de la thyroglobuline.

Par une combinaison des différentes méthodes omiques, nous mettons aussi en évidence une possible corrélation entre l'iode et la régulation du métabolisme énergétique cellulaire.

New insights in the physiological role of SLC5A8 in the thyroid and regulation of the thyroid by iodide assessed by integrated transcriptomic, proteomic and metabolomic profiling.

Maha Hichri 1, 2, 3, Jean-Marie Guigonis 1, 2, 3, Guglielmi Julien 1, 2, 3, Philippe Claude 4, Lindenthal Sabine 1, 2, 3, * and Thierry Pourcher 1, 2, 3, *

1Laboratory Transporter in Imaging and Radiotherapy in Oncology (TIRO), University Nice Sophia Antipolis, Nice, France

2Laboratory Transporter in Imaging and Radiotherapy in Oncology (TIRO), Institut de biosciences et biotechnologies d'Aix-Marseille (BIAM), Commissariat a l'Energie Atomique, Nice, France

3Laboratory Transporter in Imaging and Radiotherapy in Oncology (TIRO), University Côte d'Azur, Nice, France

4 Plateforme de génomique, Institute for Research on Cancer and Aging, , Nice, France.

Running title:

Key words: SLC5A8, thyroid, TMTplex, iodide metabolism

*These authors contributed equally to this study

Corresponding author: Thierry Pourcher, TIRO, Faculté de Médecine, 28 Avenue de Valombrose, 06107 Nice Cedex 2, France. Phone: +33 493377712. Email: pourcher@unice.fr

Disclosure statement: The authors declare no potential conflict of interest.

Abstract

SLC5A8 is expressed in the apical membrane of the thyrocytes. SLC5A8 mediates monocarboxylate transport but its physiological role in the thyroid is still unknown. SLC5A8-deficient mice do not show thyroid dysfunction.

Using a multiomics approach, we studied the effects of iodide administration on the thyroid of SLC5A8-deficient and wild-type mice. Our results showed that SLC5A8 knock-down impairs the acute thyroid response evoked by iodide administration. Our analysis indicates that SLC5A8 knock-down leads to an increase of oxidative stress in thyrocytes and decreases thyroglobulin iodation. Our data suggest for the first time a putative relationship between carbohydrate catabolism and thyroid regulation by iodide.

In conclusion, this work allows new insights in the molecular mechanisms underlying the thyroid regulation by iodide and the SCL5A8 function in the thyroid. This study also revealed the promising use of SLC5A8-deficient mice for the study of the acute thyroid response after iodide administration.

Introduction

SLC5A8 was first identified by our group from a kidney cDNA library as a protein highly homologous to the Sodium Iodide Symporter (NIS) (1). We showed that SLC5A8 is expressed in the apical membrane of the thyroid. We observed an increase of passive ¹²⁵Iodide influx in cultured SLC5A8-expressing mammalian cells and a decrease in iodide uptake in cells transiently expressing both SCL5A8 and NIS. Consequently, it has been proposed that SLC5A8 functions as a putative apical iodide transporter. In 2003, the human Slc5a8 gene has been associated, by Li and collaborators, with a tumor suppressor function in colon cancer (2) and in 2004, two groups reported sodium-dependent inward currents induced by various monocarboxylates under voltage-clamp conditions with SLC5A8-expressing *Xenopus laevis* oocytes (3-5). Then, it was proposed that the physiological roles of SLC5A8 are mainly those of sodium-coupled lactate absorption in the kidney and butyrate absorption in the colon (4,6,7). SLC5A8 expression was found in the apical membranes of various epithelial cell types (kidney, colon, thyroid and salivary glands). Frank and collaborators showed that SCL5A8-deficient mice are viable, fertile and that they lack a morphological phenotype (7). The group clearly demonstrated the role of SLC5A8 in lactate reabsorption in the kidney, salivary glands and colon. Despite its tumor suppressor function, SLC5A8-deficient mice did not show a higher incidence of colon tumor formation than control animals (7). Under used conditions (normal iodide diet), no thyroid dysfunction was observed in SLC5A8-deficient mice. Frank and collaborators showed that SLC5A8 and SLC26A4 alone and in combination are dispensable for normal function of the thyroid indicating that SLC5A8 does not mediate iodide transport (7). It is well established that thyroid function is stimulated by Thyroid Stimulating Hormone (TSH) and that thyroid function is inhibited by iodide (8,9). The first observations of the iodide-induced block of thyroid function were reported at the beginning of the 20th century. Morton

and collaborators (1944) showed that the biosynthesis of thyroid hormones is inhibited by high doses of iodide (10). The so-called acute Wolff- Chaikoff effect, i.e. the inhibition of iodide organification in the presence of high plasma iodide levels, was described in rats that were given single doses of stable iodide (11). The escape from the acute Wolff-Chaikoff effect was reported by the same authors in rats that were subjected for 2 days to continuous high iodide plasma concentrations (12). The same year, Raben (13) showed that the inhibition of iodide organification by high iodide concentrations depends on the intrathyroidal iodide accumulation. More recently, it has been shown that the molecular mechanisms responsible for this physiological response are partly mediated by the inhibition of iodine uptake through a decreased NIS expression and of iodide organification through decreased Thyroperoxidase (TPO) expression (14). Eng and collaborators also showed that the acute inhibition of iodide uptake evokes a transient hypothyroidy in rats (14). Several studies have shown that various forms of iodolipids (notably, 6-iodolactone) could partly reproduce the iodide effect (15). During thyroid hormone synthesis, reactive oxygen species (ROS) are produced for the oxidation of iodine and the iodination of thyroglobulin. The increased generation of ROS triggered by iodide excess is responsible for its cytotoxic effect on thyrocytes. Publications also report that iodide induce an increase in oxidative stress (16-18) and involve several related pathways such as the PI3K/Akt signaling pathway (19) or the Nrf2-Keap 1 pathway (20). But to date, the molecular mechanism involved in this regulation are unknown or speculative.

To obtain new insights in the physiological role of SLC5A8 in the thyroid and the regulation of the thyroid by iodide, we performed RNA sequencing, proteomics and metabolomics profiling with thyroid of SLC5A8-deficient and control mice.

Experimental procedures

Animals

The generation of SLC5A8-deficient mice has been described by Suissa and collaborators (Suissa et al, in press). A procedure similar to the one used by Frank et al (7) was used. Animal housing and procedures were conducted according to French Agriculture Ministry guidelines and were approved by the local ethics committee (Ciepal NCE/2016–211 and APAFIS#4205-2016012714424849). Animals were fed a normal-iodide diet (NID, approximately 1g iodide per day).

Iodide administration

Iodide was administrated to eight-week-old female SLC5A8-deficient (KO) and wild type (WT) mice by intraperitoneal injection of 375 µg sodium iodide (in 150 µL 0.9% NaCl). Subsequently, animals had free access to drinking water supplemented with 0.05% sodium iodide. Control animals were injected with 0.9% NaCl solution only and no iodide was added to the drinking water. Mice were sacrificed by cervical dislocation 24hours or 6 days after injection. For serum hormone measurements, blood was collected by cardiac puncture. Thyroids were rapidly removed and stored at -80°C until use.

Serum hormone measurements

Serum samples were prepared from freshly collected blood by centrifugation (30 min, 4°C, 13 000xg) after coagulation for 20 min at room temperature. Serum thyroid hormone (T3 and T4) concentrations were measured in duplicate by radioimmunoassay (RIA).

RNA extraction and transcriptomic analysis

Thyroid total RNA was isolated using the RNAqueous-MicroKit (Ambion) following the manufacturer's instructions. RNA concentrations were measured using a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop technologies). RNA quality was assessed with a RNA 6000Pico LabChip Kit (Agilent 2100 Bioanalyzer). Only RNA samples with an integrity number from 8.8 to 10 were used.

RNA-seq profiling libraries were prepared using the commercial kit NEBNext® Ultra™ II RNA library for Illumina® (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) and sequenced using the Illumina HiSeq platform. Briefly, 8µg total RNA was used as starting material for library preparation. Messenger RNA was isolated using oligo-dT-charged magnetic beads (Poly(A)RNA Magnetic Isolation Module, New England Biolabs). The purified poly(A)+RNA was chemically fragmented and reverse transcribed. Samples were end repaired followed by adaptor ligation and removal of excess nucleotides by AMPure selection according to the manufacturer's recommendations. Adaptor of oligonucleotides allowed multiplexing in the sequencing run as it contained the signal for subsequent amplification and sequencing, and the sample specific identifiers. PCR was performed to verify that the adaptors were kept at both ends in all library molecules. PCR cycles were 15 for the four biological replicates for each condition and each genotype. The quality of the final library was verified with a bioanalyzer 2100 (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Libraries were denatured and seeded on the surface of a Pair-End Flowcell where clusters were generated and sequenced using a HiSeq2000 equipment (Illumina, San Diego, CA, USA).

The 1*100 bp pair-ends reads were mapped to *Mus musculus* reference genome sequence. Outlier samples were assessed by hierarchical clustering and excluded. Three biological replicates were used for analysis. Differentially expressed transcripts were selected with an adjusted p.value ≤ 0.05 according to Benjamini-Hochberg's adjustment.

Supplementary Table1 shows the identified transcripts of all samples analyzed.

Protein extraction and proteomic analysis

Proteins from thyroid were extracted in RIPA buffer (NaCl 150 mM, EDTA 1mM, Triton X-100, 1%, SDS 0.1%, Tris-HCl pH7.5 10 mM) in the presence of protease and phosphatase inhibitors (Roche). The lysate was centrifuged at 14,000 g for 15 min, and the supernatant was quantified with the BCA Protein Assay Kit (Bio-Rad, U.S.A.).

Heat-denatured protein samples (100 µg each) were separated on SDS-PAGE. Coomassie-stained protein bands were excised from the gel. The obtained slices were washed three times with 100 mM ammonium bicarbonate, dehydrated with acetonitrile, reduced with 10Mm DTT and alkylated using 55mM Iodoacetamide. Gel slices were washed twice with 100 Mm Ammonium bicarbonate and lyophilized in a rotary vacuum concentrator. Rehydration and proteolysis were performed with 100 mM ammonium bicarbonate buffer containing 40 ng/µL sequencing grade porcine trypsin (Promega, Madison, WI) at 37°C for 16 h. The peptide-containing supernatant was removed and lyophilized in the rotary vacuum concentrator. Peptides were then resuspended in 100 µL of 50 mM TEAB buffer and TMT10plex reagent (0.8 mg, Thermo FisherScientific, Rockford, IL) previously resuspended in 41 µL of anhydrous acetonitrile was added to each sample. Samples were labelled following the description in the table below (Table1). After 1 h incubation at room temperature, the reaction was quenched by adding 8 µL of 5% hydroxylamine. The different TMT-labelled samples were cleaned-up using C18 Spin Columns (Pierce) and pooled at a 1:1:1:1:1:1:1:1:1 ratio across all samples. Sample were lyophilized in a rotary vacuum concentrator and dissolved in 30 µL 0.1% formic acid, 5% acetonitrile prior to mass spectrometric analysis.

Peptide fractionation and LC-MS/MS analysis

The TMT-labeled samples were analyzed using a LC-MS/MS system consisting of a DIONEX Ultimate 3000 HPLC system and a Q Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific) equipped with an electrospray source.

Samples were passed through a capillary LC column (Dionex Acclaim PepMap100 C18, 300µm x 15cm, 2µm particle, 100 Å pore size) and eluted with a 300 min gradient on the Q Exactive Plus. Peptides were labeled with TMT 6-plex for comparisons of wild-type mice versus wild-type mice without iodide administration, after 1 day of iodide administration or after 6 days of iodide administration (WTD0 vs KOD0, WTD1 vs KOD1 or WTD6 vs KOD6 respectively) and TMT 9-plex reagents for comparison of wild-type mice without iodide administration, after 1 day of iodide administration or after 6 days of iodide administration and SLC5A8-deficient mice without iodide administration, after 1 day of iodide administration or after 6 days of iodide administration (WTD0 vs WTD1 vs WTD6 and KOD0 vs KOD1 vs KOD6). Samples were analyzed with a five-hour gradient and a data dependent top 15 HCD method on the Q Exactive Plus. The resolution was 70K for full scan and 35K for MS2. The maximum IT was 250 ms for both full scan and MS2 scan, top 15 HCD was selected with MS2 trigger threshold of 1E5 and dynamic exclusion of 60s. Mobile phases A and B were composed of 0% and 100% acetonitrile, respectively, each containing 0.1% formic acid. The LC gradient began with 2% B for 1 min and was ramped up to 8% B over 5 min, then to 35% B over 180 min, 55% B over 235 min, and finally to 90% B over 275 min. The column was equilibrated with 2% B for 15 min before the next run.

Protein identification and quantification

All MS raw data files were analyzed by Proteome Discoverer software 2.1.1.21 (ThermoFisher, France) using the Sequest HT search engine against a database of *Mus musculus* protein sequences (Uniprot 10 090_ *Mus Musculus* taxon- consulted 22th September 2018). X corr confidence was held upper to 0.7 for all parameters. Precursor mass tolerance was set to 10 ppm

and fragment ion tolerance was 0.02 Da with permission of two missed cleavages in the trypsin digests. A decoy database search strategy was also used to estimate the false discovery rate (FDR) and to ensure the reliability of the proteins identified: a 1% target FDR as strict criteria and 5% target FDR as relaxed criteria using Percolator. At least two peptides were required for matching with a protein. The strict maximum parsimony principle was performed, and only peptide spectra with at least medium confidence were considered for protein grouping. Carbamidomethylation on cysteine residues (+57.021 Da) were set as static modifications. TMT6 tags on N termini (+229.163 Da) and on lysines were set as Static modifications. Two 9-plex technical replicates were acquired for each proteome experiment.

For relative quantitation, both unique and razor peptides were used because their identification was considered as highly confident. Reporter ion abundances were corrected for isotopic impurities based on the manufacturer's data sheets. Signal-to-noise (S/N) values were used to represent the reporter ion abundance with a co-isolation threshold of 75% and an average reporter S/N threshold of 10 and above as required for the use of quantitation spectra. The S/N values of peptides, which were summed from the S/N values of the PSMs, were summed to represent the abundance of the proteins. The quantitative protein ratios were calculated and normalized by total peptide amount and scaled on channel average for each sample. For comparison, three identical control samples, labeled with TMT 126, 127N, and 127C, were used as references in 9plex and with TMT 126, 127 and 128 in 6plex (for details see table 1 below).

Peptide modification

Thyroglobulin peptides are monoiodinated or diiodinated on tyrosine in the follicular cells. Using Proteome Discoverer software 2.1.1.21 (ThermoFisher, France), we followed three peptides and compared the iodination rate between the conditions and in wild type mice compared to SLC5A8 invalidated mice.

Metabolite extraction

Frozen tissues (100-200 mm³) were placed in microcentrifuge tubes and ground in 1 mL cold methanol (HPLC grade, Merck Millipore, Molsheim, France) using pestles. Homogenized samples were incubated overnight at -20 °C and then centrifuged at 15 000 g for 15 minutes. The supernatants were removed and lyophilized in a SpeedVac concentrator (SVC100H, SAVANT, Thermo Fisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France). The lyophilized samples were resuspended in 180 µL of 50:50 acetonitrile-H₂O mix (HPLC grade, Merck Millipore) prior to LC-MS/MS analyses.

LC-MS/MS

Liquid chromatographic analysis was performed using the DIONEX Ultimate 3000 HPLC system (Thermo Fisher Scientific). 10 µL of each sample was injected into a Synergi 4 µm Hydro-RP 80 Å, 250 x 3.0 mm column (Phenomenex, Le Pecq, France). The mobile phases consisted of 0.1% formic acid (Thermo Fisher Scientific) in water (A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (B). The gradient was set as follows with a flow rate of 0.9 mL/min: 0% phase B from 0 to 5 min, 0 – 95% B from 5 to 21 min, holding at 95% B to 21.5 min, 95 – 0% B from 21.5 to 22 min, holding at 0% B until 25 min for column equilibration. Mass spectrometry analysis was carried out on a Q Exactive Plus Orbitrap mass spectrometer (Thermo Scientific) with a heated electrospray ionization source, HESI II, operating in both, positive and negative modes. High-resolution accurate-mass full-scan MS and top 5 MS/MS spectra were collected in a data-dependent fashion at a resolving power of 70 000 and 35 000, respectively. Raw data files were converted to mzXML files using MSconvert (Version 2.1, ProteoWizard) (21). The data obtained from positive and negative ionization modes were analyzed separately using MzMine (Version 2.29) (22). Metabolites were quantified using peak height. Metabolites

differentially expressed were selected with a p value ≤ 0.05 and Fold Change up to 1.4 and under 0.5. Pathway analyses were performed using Metaboanalyst 3.0 (23).

Bioinformatic analyses

Pathway analyses were performed using Ingenuity Pathway analysis software. Only pathways with p-value under a threshold of 0.05 were considered significant.

Z-score also were observed as a measure and a predictor for the activation state of the regulator. The activation Z-score makes predictions about potential regulators by using information about the direction of gene regulation. It can be used to infer the activation state of a putative regulator (i.e. whether the regulator is activated or inhibited).

Statistical analysis

For statistical analyses paired Student's t-test was used. Statistical significance was set at P value < 0.05 and data were represented as mean \pm S.D. The DEPs were defined as proteins with a difference in expression above a factor of 1.3 and under 0.77 with a p-value below 0.05.

Integromic analysis

Biological networks were investigated using Omicsnet tool (<https://www.omicsnet.ca/OmicsNet/faces/home.xhtml>) that allows to combine genes/proteins, microRNAs, transcription factors and metabolites (Zhou and Xia, 2018).

Results

SLC5A8-deficient mice show normal thyroid hormone levels but do not respond to high circulating iodide concentrations

To study the role of SLC5A8 in thyroid regulation by iodide, we generated SLC5A8-deficient mice (see Suissa et al, in press). These animals were viable and fertile and did not show any obvious phenotype when compared to wild-type mice. A similar observation was reported by Frank and collaborators with animals lacking the Slc5a8 fourth and fifth exons (7). In accordance with the findings reported by this group, our SLC5A8-deficient mice showed increased urine lactate concentrations and normal plasma lactate concentrations (Suissa et al, in press). Histological studies and thyroid hormone level analyses showed no impairment of thyroid function in the mutant mice. These results are also in accordance with those obtained by Frank and collaborators.

We hypothesized that SLC5A8 loss could impair the regulation of the thyroid by iodide. It has been known for a long time that acute iodide administration leads to a rapid, but transient, inhibition of thyroid hormone secretion, the so-called Wolff-Chaikoff effect. This effect is characterized by a blocking of the iodide uptake capacity via NIS, followed by a decrease of thyroid hormone production (14), which resumes after some days while iodide accumulation remains low (the so-called escape phenomena). To evaluate whether SLC5A8 loss could impair the regulation of the thyroid by iodide, we measured the plasma concentrations of the thyroid hormones T3 and T4 after iodide administration, in SLC5A8-deficient and in wild-type mice (**Figure 1**). We observed that the blood T4 concentration in wild-type mice decreased more than 3-fold (from 6.5 ± 2 pmol/L to 1.9 ± 0.7 pmol/L) on day 1 after iodide administration. Subsequently, on day 6, the T4 concentration almost doubled (increased to 3.7 ± 1.8 pmol/L), compared to that on day 1. The T3 concentration decreased from 2.9 ± 0.3 pmol/L to 2 ± 0.4 pmol/L (0.7-fold) on day 1 after iodide administration and increased on day 6 to 3.6 ± 0.4

pmol/L (1.2-fold increase compared with the value obtained for day 0). As illustrated in **Figure 1**, SLC5A8-deficient mice lacked the Wolff-Chaikoff effect: no significant decreases of T4 or T3 thyroid hormone concentrations after iodide administration were detected on day 1. Before iodide administration, the T4 serum concentration was slightly higher in SLC5A8-deficient than wild-type mice (9.6 ± 1 pmol/L and 6.5 ± 2 pmol/L, respectively), but remained unaltered at day 1 (9.6 ± 1.7 pmol/L) or at day 6 (8.7 ± 1.4 pmol/L). No differences were found for the initial T3 serum concentrations between wild-type and mutant mice (2.9 ± 0.3 pmol/L and 2.9 ± 0.2 pmol/L). However, similarly to T4, the animals did not respond to iodide administration with a decrease of T3 concentration on day 1 (2.7 ± 0.3 pmol/L). These results are consistent with the expected effect of SLC5A8-function loss in the initial phase of the Wolff-Chaikoff effect.

RNAseq differential expression analyses reveal that SLC5A8 invalidation and iodide administration affects similar cellular processes

Then, we studied the mouse thyroid transcriptomes of wild-type and SLC5A8-deficient mice, and of animals exposed to iodide excess. RNAseq experiments were performed using mRNA isolated from thyroids of 6 different groups of animals. SLC5A8-deficient mice and wild-type mice were separated in 3 groups each: (1) animals sacrificed on day 1 after iodide administration (KOD1, WTD1); (2) animals sacrificed on day 6 after iodide administration (KOD6, WTD6); (3) control animals sacrificed without iodide administration (KOD0, WTD0). Only samples with high quality reads for the isolated mRNA were used. The obtained sequencing data were aligned to 20 620 transcripts of the *Mus musculus* reference genome and analyzed as described above (Supplementary Table1).

We first compared SLC5A8-deficient mice without iodide administration to control wild-type mice without iodide administration (KOD0 vs WTD0). We found that 49 transcripts were

significantly expressed ($FDR \leq 0.05$) with 20 up regulated (fold change ≥ 1.5) and 16 down regulated (fold change ≤ 0.66) (Supplementary Table2).

We then compared wild-type mice after 1 day of iodide administration to wild-type mice without iodide treatment (WTD1 vs WTD0): we obtained 37 transcripts; 15 of these transcripts were upregulated (fold change ≥ 1.5) and 22 down regulated (fold change ≤ 0.66) (Supplementary Table3). We compared wild-type mice after 6 days of iodide administration to wild-type mice without iodide treatment (WTD6 vs WTD0): we obtained for 29 transcripts; 18 of these transcripts were upregulated (fold change ≥ 1.5) and 11 down regulated (fold change ≤ 0.66) (Supplementary Table4). We also compared SLC5A8-deficient mice after 1 day of iodide administration to SLC5A8-deficient mice without iodide treatment (KOD1 vs KOD0): we obtained 1149 transcripts; 285 of these transcripts were upregulated (fold change ≥ 1.5) and 759 down regulated (fold change ≤ 0.66) (Supplementary Table5). We compared SLC5A8-deficient mice after 6 days of iodide administration to SLC5A8-deficient mice without iodide treatment (KOD6 vs KOD0): we obtained FDR values at 0.05 or lower for 21 transcripts; 6 of these transcripts were upregulated (fold change ≥ 1.5) and 14 down regulated (fold change ≤ 0.66). All data are provided in Supplementary Table6.

Cluster heatmap analyses of differentially expressed genes were performed using unsupervised hierarchical clustering with a Pearson correlation. In the first analysis, we compared transcripts significantly expressed in SLC5A8-deficient mice and wild-type mice with and without iodide administration without iodide administration (Figure2A). SLC5A8 deficiency was at the root of 17 transcripts modified after iodide administration, among 503 (Figure 2B). Then, we performed a similar study, but we now used the 2 mouse groups after 6 days of iodide administration (WTD6 and KOD6. 13 Transcripts among 21 are induced by SLC5A8 deficiency (Figure 2 B). 12 transcripts are modified after SCL5A8 invalidation and iodide.

1149 transcripts are regulated in SLC5A8-deficient mice after 1 day of iodide administration versus SLC5A8-deficient mice without iodide administration (KOD1 vs KOD0) and 37 in wild-type mice after 1 day of iodide administration versus wild-type mice without iodide administration (WTD1 vs WTD0). 16 transcripts are in common (Figure 3).

Analysis of transcripts expression data from wild-type mice after 1 day of iodide administration and from wild-type mice without iodide administration (WTD1 vs WTD0) using Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software revealed 135 related canonical pathways that were statistically significant (P values ≤ 0.05) (Supplementary Table 7) and 59 SLC5A8-deficient mice after 1 day of iodide administration versus SLC5A8-deficient mice without iodide administration (KOD1 vs KOD0) (Supplementary Table 8). 11 are in common as GP6 Signaling Pathway and UVC-Induced MAPK Signaling. (Figure 4). Then, we performed a similar analysis with 2 mouse groups after 6 days of iodide administration (WTD6 and WTD0) (KOD6 and KOD0), GP6 Signaling Pathway is one among the 4 pathways in common (Supplementary Figure 1 and 2). Ingenuity pathways provides also the upstream regulators analysis, this option has shown 3 inhibited and 7 activated unbiased upstream regulators in SLC5A8-deficient mice after 1 day of iodide administration versus SLC5A8-deficient mice without iodide administration (KOD1 vs KOD0) (Figure 5A) while 5 other totally different unbiased activated upstream regulators have been suggested 37 in wild-type mice after 1 day of iodide administration versus wild-type mice without iodide administration (WTD1 vs WTD0) (Figure 5B).

All together these results indicate that even SLC5A8 knock-down upregulated and downregulated genes are similar to those that were upregulated and downregulated after iodide administration, upstream regulators and pathways analysis suggest more differences in iodide regulation mechanism than similarity. This insight a strong relationship between thyroid regulation by iodide and SLC5A8 function in the thyroid.

Comparative and quantitative global proteomic analyses strengthen the hypothesis that SLC5A8 invalidation and iodide administration effect similar cellular processes

Alterations in cell function cannot easily be deduced from alterations in gene expression especially not when very specific regulations are studied. Therefore, we analyzed protein expression using a quantitative global proteomics approach with Tandem Mass Tags (TMT). Experiments were performed with protein extracts of thyroids from the same animals as were used above (KOD0, KOD1, KOD6, WTD0, WTD1 and WTD6).

In a first set of experiments (TMT 9plex), thyroid protein extracts were prepared from wild-type and from SLC5A8-deficient mice without iodide administration, after 1 day of iodide administration and after 6 days of iodide administration. After trypsin proteolysis, peptides were labelled by different isobaric compounds (3 samples for each mouse group). Labelled samples were combined (WTD0+WTD1+WTD6 and KOD0+KOD1+KOD6) and analyzed 2 times by LC-MS/MS. Identification of the peptides and the proteins was performed using Protein Discoverer. All results obtained are shown in Supplementary Table 4 (TMT 9plex). 2859 proteins were identified when higher and medium filter (FDR confidence) was used (see Supplementary Table 9).

We first compared the identified proteins from wild-type mice after 1 day of iodide administration to those of wild-type mice without iodide administration (WTD1 vs WTD0). We obtained P values at 0.05 or lower for 25 proteins: 12 upregulated proteins with a fold change of ≥ 1.3 and 13 downregulated proteins with a fold change of ≤ 0.77 (supplementary Table 10). The 10 most significantly upregulated and most significantly downregulated proteins are shown in **Table 1A**. When we compared the obtained protein expression data from SLC5A8-deficient mice after 1 day of iodide administration to those of SLC5A8-deficient mice without iodide administration (KOD1 vs KOD0), we obtained P values of 0.05 or lower for 238 proteins. 132

of these proteins were found to be upregulated (fold change ≥ 1.3) and 106 were found to be downregulated (fold change ≤ 0.66) (supplementary Table 11). The 10 most significantly affected proteins are shown in **Table 1B**. Surprisingly, Ketohexokinase is the most upregulated protein. When we analyzed the two previous comparisons (WTD1 vs WTD0 versus KOD1 vs KOD0), we found that only 4 proteins were in common (see **Figure 6**).

Analysis of our protein expression data from wild-type mice after 1 day of iodide administration and from wild-type mice without iodide administration (WTD1 vs WTD0) using Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software revealed 61 related canonical pathways that were statistically significant (P values ≤ 0.05) (supplementary Table 12). The top 10 pathways are shown in **Table 2A**. 196 significant canonical pathways were found for SLC5A8-deficient mice after 1 day of iodide administration versus SLC5A8-deficient without iodide administration (KOD1 vs KOD0) (supplementary Table 13). See **Table 2B for the major 14 pathways**. As illustrated by the Venn diagram in **Figure 7**, only 40 common pathways were obtained for 1 day of iodide administration in both, wild-type and SLC5A8-deficient mice (WTD1 vs WTD0 versus KOD1 vs KOD0). Alterations in these pathways are shown in **Table 3**. Interestingly, some common pathways are related to cellular energy metabolism (Glycolysis I). 21 significant pathways were found only for wild-type mice (WTD1 vs WTD0). 156 significant pathways were exclusively found in SLC5A8-deficient mice (KOD1 vs KOD0) (including Oxidative Phosphorylation).

Table 4A provides more details on the significant protein variations of the glycolysis pathway induced after 1 day of iodide administration in wild-type mice and SLC5A8-deficient mice (WTD1 vs WTD0 and KOD1 vs KOD0). Eight proteins of this pathway were identified, 1 in wild-type mice and 8 in SLC5A8-deficient mice. Two enzymes were upregulated while six were downregulated after 1 day of iodide administration in both mouse group wild-type mice and SLC5A8-deficient mice. In **Table 4B** we show more details on the obtained data of the

oxidative phosphorylation pathway, the major pathway obtained for SLC5A8-deficient mice (KOD1 vs KOD0). Ten proteins of this pathway were significantly identified, 1 in the thyroid of wild-type mice (WTD1 vs WTD0) and 10 in the thyroid of the SLC5A8-deficient mice (KOD1 vs KOD0). In thyroids of SLC5A8-deficient mice, all identified proteins were downregulated after 1 day of iodide administration (KOD1 vs KOD0).

The upstream analysis module of Ingenuity Pathway Analysis suggested that INSR (z-score = -3.373, p.value = 1.02E-09) and IGF1R (z-score = -3.273, p.value = 1.02E-06) were the significantly unbiased upstream inhibitor of 146 detected DEPs in SLC5A8-deficient mice (KOD1 vs KOD0). In addition, RICTOR (z-score = 3.43, p.value = 1.27E-13) was the significantly unbiased upstream activator (Figure 8). In the thyroid of wild type mice (WTD1 vs WTD0), NFEL2L2 (z-score = 2.17, p.value = 1.51E-08) was suggested as the unbiased upstream activator of the DEP's (Figure 9) while it's suggested as inhibited (z-score = -1.478, p.value = 4.32E-11) in in SLC5A8-deficient mice (KOD1 vs KOD0) (Figure 8C).

We then compared proteins from wild-type mice after 6 days of iodide administration to wild-type mice without iodide administration (WTD6 vs WTD0). When the P value was set at 0.05 or lower with fold change up to 1.3 and under 0.6, 41 proteins were obtained including 35 downregulated proteins and 6 upregulated protein (fold change ≥ 1.5) protein (supplementary Table 14). The 10 most significantly affected proteins are shown in **Table 5A**.

Besides, we compared our data to proteins from SLC5A8-deficient mice after 6 days of iodide administration versus SLC5A8-deficient mice without iodide administration (KOD6 vs KOD0). A total of 130 proteins including 87 upregulated proteins (fold change ≥ 1.3) and 43 downregulated proteins (fold change ≤ 0.6) were obtained using P values at 0.05 or lower (supplementary Table 15). The 10 most significantly affected proteins are shown in **Table 5B**.

Between proteomic data of SLC5A8-deficient mice, after 6 days of iodide administration compared to SLC5A8-deficient mice without iodide administration, and wild-type mice, after 6 days of iodide administration compared to wild-type mice without iodide administration (WTD6 vs WTD0 and KOD6 vs KOD0), one protein was in common as illustrated in **Figure 10 A**.

Analyses of the protein expression data from wild-type mice after 6 days of iodide administration versus wild-type mice without iodide administration (WTD6 vs WTD0) with Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software revealed 35 statistically significant canonical pathways (P values ≤ 0.05) (supplementary Table16). 161 statistically significant canonical pathways were found in SLC5A8-deficient mice after 6 days of iodide administration versus SLC5A8-deficient mice without iodide administration (KOD6 vs KOD0) (supplementary Table17). **As illustrated in Figure 10B**, 14 pathways were commonly related to 6 days of iodide administration in wild-type mice and SLC5A8-deficient mice (WTD6 vs WTD0 and KOD6 vs KOD0). Interestingly, several common pathways (**Figure 10C**) were related to cellular energy metabolism and oxidative stress (mitochondrial dysfunction; NRF2-mediated Oxidative Stress Response).

Table 4B show more details on the obtained data of the oxidative phosphorylation pathway, the major pathway obtained for SLC5A8-deficient mice (KOD1 vs KOD0). Seventeen proteins of this pathway were significantly identified in the thyroid of the SLC5A8-deficient mice (KOD6 vs KOD0) and no proteins in the thyroid of wild-type mice (WTD6 vs WTD0) all identified proteins were downregulated after 6 day of iodide administration (KOD1 vs KOD0). According to the upstream analysis module of IPA, INSR (z -score = -3.569, p .value =3.86E-05) and IGF1R (z -score=-2.449, p .value=4.31E-03) were the significantly unbiased upstream inhibitor in SLC5A8-deficient mice (KOD6 vs KOD0) and RICTOR (z -score=2.449,

p.value=3.71E-11) was the significantly unbiased upstream activator (Figure 11). Whereas, in the thyroid of wild-type mice (WTD6 vs WTD0), all upstream regulators were biased.

To further study the effects of SLC5A8 knock-down, we also performed 6-plex experiments to compare thyroid protein expression variations in wild-type and SLC5A8-deficient mice without iodide administration, after 1 day and after 6 days of iodide administration. After trypsin proteolysis, peptides were labelled by different isobaric compounds (3 samples for each mouse group). Labelled samples were mixed (WTD0+KOD0, WTD1+KOD1 and WTD6+KOD6) and analyzed by LC-MS/MS. Without iodide administration (WTD0 vs KOD0), 31 proteins including 26 upregulated proteins (fold change ≥ 1.3) and 5 downregulated proteins (fold change ≤ 0.66) were obtained when the P value was set at 0.05 or lower (supplementary Table17). After 1 day of iodide administration (WTD1 vs KOD1), 47 proteins including 35 upregulated proteins (fold change ≥ 1.3) and 12 downregulated proteins (fold change ≤ 0.6) were revealed with a P value set at 0.05 or lower (supplementary Table18). At day 6 after iodide administration (WTD6 vs KOD6), 53 proteins including 9 upregulated proteins (fold change ≥ 1.3) but 1 downregulated protein (fold change ≤ 0.6) were obtained using a P value at 0.05 or lower (supplementary Table19). According to IPA analyses, the most inhibited pathways related to SLC5A8 knock-down were Oxidative phosphorylation, NRF2-mediated oxidative stress response, EIF2, AMPK, and mTOR signaling and pathways.

In summary, if changes in protein expression after 1 day of iodide administration in wild-type mice were compared to changes in SLC5A8-deficient mice (WTD1 vs WTD0 versus KOD1 vs KOD0), our 9-plex experiments showed much more differences in protein expressions related to acute iodide administration for SLC5A8-deficient mice than for wild-type mice. Similar to RNAseq experiments, much less effects on protein expressions are observed at 6 days after

iodide administration. Interestingly, several pathways related to cellular energy metabolism and oxidative stress control pathways are modulated by iodide administration and SLC5A8 knock-out.

Analyses of iodinated peptides of thyroglobulin indicate that SLC5A8 knock-down impairs iodide organification

Quantification of 3 noniodinated thyroglobulin peptides and their corresponding iodinated ones by evaluating the ratio Iodinated vs Non-iodinated in each condition D0, D1 and D6 in deficient-mice and wild type mice, revealed a lower level of iodination in thyroids of SLC5A8-deficient mice if compared to wild-type mice (KOD0 vs WTD0) (**Figure 12**). Under the conditions 1 and 6 days after iodide administration, this difference was reduced (**Figure 12**).

Metabolomic analyses indicate that both, iodide administration and SLC5A8 knock-down affect cellular energy metabolism; SLC5A8 knock-down also impairs iodide organification

Metabolites were extracted from the thyroids of same groups of mice (WTD0, WTD1, WTD6, KOD0, KOD1 and KOD6). After LC-MS analysis, 4211 metabolites were identified using the Human Metabolome Database (HMDB). The levels of 125 metabolites were significantly different (P values ≤ 0.05) including 19 upregulated metabolites (fold change ≥ 1.3) and 106 downregulated metabolites (fold change ≤ 0.6) were obtained when the P value was set at 0.05 or lower (supplementary Table20) in wild-type mice after 1 day of iodide administration compared to wild-type mice without iodide administration (WTD1 vs WTD0).

The levels of 81 metabolites were significantly different (P values ≤ 0.05) in SLC5A8-deficient mice after 1 day of iodide administration versus SLC5A8-deficient mice without iodide administration (KOD1 vs KOD0). 46 metabolites were upregulated (fold change ≥ 1.3) and 35

were downregulated (fold change ≤ 0.6) (supplementary Table 21). We used MetaboAnalyst studies, including Fisher exact tests, to identify significant changes in metabolite levels. In wild-type mice after 1 day of iodide administration compared to wild-type mice without iodide administration (WTD1 vs WTD0), the identified metabolites belonged to cysteine and methionine metabolism, glycerophospholipid metabolism and citrate cycle (**Figure 13**). The metabolites identified through comparison of thyroids from SLC5A8-deficient mice after 1 day of iodide administration to those from SLC5A8-deficient mice without iodide administration (KOD1 vs KOD0), belonged to several pathways that are glycerophospholipid metabolism, sphingolipid metabolism and glutathione metabolism (**Figure 14**). From the 125 metabolites selected for significant level changes from samples 1 day after iodide administration of wild-type mice versus control mice (WTD1 vs WTD0) and the 81 metabolites selected for significant level changes from samples 1 day after iodide administration in SLC5A8-deficient mice versus control animals (KOD1 vs KOD0), only 6 metabolites were in common (**Figure 15**). After 6 days of iodide administration in wild-type mice (WTD6 vs WTD0), 145 metabolites are significantly modified while 138 are modified in SLC5A8-deficient mice (KOD6 vs KOD0). The identified pathways are shown as supplementary data (Supplementary table 22 and 23). The 7 common metabolites detected related to 1 day of iodide administration in wild-type mice and SLC5A8-deficient mice (Figure 15) include iodide and pyruvate. According to the effect of SLC5A8 knock-out on thyroglobulin iodination (Figure 12) and that pyruvic acid is a substrate of SLC5A8, the values of these 2 metabolites obtained from all the mouse groups are shown in detail in **Figure 16**.

We also compared different omics methods results separately, **Supplementary data Figure 3** showed no common elements between transcripts and proteins. Although comparing significant modulated pathways that were obtained from each method from different conditions revealed

several common cellular processes. In SLC5A8-deficient mice after 1 day of iodide administration compared to those from SLC5A8-deficient mice without iodide administration (KOD1 vs KOD0), 38 pathways were revealed modulated in both transcriptomic and proteomic analysis. Among these pathways, UVC-induced MAPK signaling and Protein Kinase signaling (Supplementary data Figure 3A). In wild type mice after 1 day of iodide administration compared to those from wild type mice without iodide administration (WTD1 vs WTD0), NRF2-mediated Oxidative Stress Response and 14-3-3-mediated Signaling are two of the 7 pathways that were identified from transcriptomic and proteomic data (Supplementary data Figure 3B). Only 9 pathways were modulated in common from transcriptomic and proteomic data from SLC5A8-deficient mice after 6 day of iodide administration compared to those from SLC5A8-deficient mice without iodide administration (KOD6 vs KOD0) (Supplementary data Figure 3C).

When previous transcriptomic, proteomic and metabolomic data were uploaded in omics.net (<http://www.omicsnet.ca>), the alterations within pathways observed previously in separated pathway analysis obtained in wild type mice after 1 day of iodide administration compared to those from wild type mice without iodide administration (WTD1 vs WTD0) were almost similar. The integromic analysis revealed 2 major networks, first one is constructed with 3 nodes and the second with 2 nodes. In the first network, the first node involved in **Insulin signaling pathway** (p.value= 1.76e-8), the second in **MAPK signalling pathway** (p value =0.00027) and the last in **Glycolysis**. (p value =0.00195) (Figure 17A). Only 2 nodes formed the second network, first node involved in **Pyruvate Metabolism** (p.value= 4.96e-25) and the second involved in **Cysteine and methionine metabolism** (p.value= 2.23.e-26) (Figure 17B). We, similarly, performed the analysis on transcriptomic, proteomic and metabolomic data obtained in SLC5A8-deficient mice after 1 day of iodide administration compared to those from

SLC5A8-deficient mice without iodide administration (KOD1 vs KOD0). Four distinct networks were identified. First network is formed by AMP metabolite and the proteins from the submitted list and involved in **Purine Pyrimidine metabolism** (p value= $1.01e-58$) Nicotinate and nicotinamide metabolism (p value= $7.37e-20$) and Pyrimidine metabolism ($1.01e-11$) (Figure 18A). Second network involved in **MAPK signaling pathway** (p value = $2.69e-8$), the third network is about **P450 Cytochrome C** responsible of the oxidative metabolism (p value= $3.27e-4$) and the last one represents pyruvate metabolism (p value = $1.55e-28$) and **glycolysis** (p value= $3.43e-15$) (Figure 18B).

Discussion

In this work, we studied the transcriptome, the proteome and the metabolome of thyroids from wild-type and SLC5A8-deficient mice under control condition (i.e. no iodide administration) and under exposure to high circulating iodide concentration for one up to six days. We investigated the effects of SLC5A8 knock-down and of iodide excess alone or when combined. We aimed to obtain new insights in the molecular mechanisms related to thyroid regulation by iodide and in the role of SLC5A8 in the thyroid.

This study showed for the first time an unexpected link between the acute response of the thyroid to iodide excess and SLC5A8 expression. First, we observed that under high iodide condition, SLC5A8 knock-down leads to the loss of the transient decrease of thyroid hormone concentration in the blood (Figure 1). This decrease of thyroid hormone concentration in the blood is a major hallmark of the acute phase of thyroid regulation by iodide in healthy, genetically non-modified organisms. In contrast, no significant difference between SLC5A8-deficient and WT mice was observed during the late phase thyroid regulation by iodide (i.e. 6 days after of iodide administration). Second, our study of the transcriptome revealed two different gene clusters related to SLC5A8 knock-down (KOD0 vs WTD0), and also related to 1 day of iodide administration for wild-type and SLC5A8-deficient mice.

A relationship between acute thyroid regulation by iodide and the appearance of oxidative stress was reported by several other groups (18-20,24). Our results revealed that 15 oxidative stress and cellular injury signaling pathways are significantly modified after 1 day of iodide administration in SLC5A8-deficient mice (KOD1 vs KOD0). Oxidative phosphorylation and Eif2 signaling are the most significant modified pathways. 40 are also found in wild-type mice after 1 day of iodide administration (WTD1 vs WTD0). Expressions of thioredoxin reductase 1

and stress induced phosphoprotein1 are downregulated in SLC5A8-deficient mice after 1 day of iodide administration (KOD1 vs KOD0). Thioredoxins are small proteins that regulate the redox status of various target proteins (25).

The pathway analysis showed an increase in NRF2 mediated oxidative stress in SLC5A8-deficient mice without iodide administration if compared to wild-type mice without iodide administration (KOD0 vs WTD0) (z score =2.24) and the same pathway is downregulated after the acute iodide administration in SLC5A8-deficient mice (KOD1 vs KOD0) (z score=0.53).

In addition, NFE2L2, a transcription factor related to Nrf2-dependent antioxidant responses, was suggested as an upstream inhibitor in SLC5A8-deficient mice after 1 day of iodide administration (KOD1 vs KOD0) while it was an activator in wild-type mice after 1 day of iodide administration (WTD1 vs WTD0).

Altogether these results confirm the relationship between acute regulation of the thyroid by iodide and the appearance of oxidative stress. One should note that the synthesis of thyroid hormones depends on H₂O₂ production required for iodination activity of thyroperoxidase (26) but this cannot explain the iodide-evoked increase of oxygen reactive species. If compared to wild-type mice, the effect of 1 day of iodide administration on oxidative stress pathways in SLC5A8-deficient mice is highly amplified. Our study suggests that SLC5A8 function is required to prevent oxidative stress.

Glycolysis, the tricarboxylic acid (TCA) cycle, and oxidative phosphorylation are important energy transforming pathways in cells. In the thyroid of SLC5A8-deficient mice at 1 day of iodide exposure, we detected a significant decreased of the expression of 8 glycolytic enzymes (Table 4A) and of 10enzymes involved in oxidative phosphorylation (Table 4B). The decrease

of enzyme of oxidative phosphorylation were also observed in wild-type mice after 1 day of iodide administration (Table 4A).

Pyruvic acid is a substrate of SLC5A8. Using a metabolomic approach, our results indicate that its level is higher in wild-type mice compared to SLC5A8-deficient mice (Figure 17) under control conditions. One day after iodide administration, pyruvic acid levels are decreased in wild-type mice while they are increased in SLC5A8-deficient mice.

We hypothesize that the acute thyroid response to iodide administration influences processes involved in ATP synthesis. Further experiments are required to explain this result.

Our results on the levels of iodinated peptides of the thyroglobulin (Figure 12) indicate that iodination processes are impaired in the thyroid of SLC5A8-deficient mice without iodide administration. Considering that SLC5A8 is expressed in the apical membrane of the thyrocytes and, therefore, should mediate an active transport of monocarboxylate from the colloid into the cell, several hypotheses could be proposed. Further studies are required to explain the observed inhibition of the iodination.

The free iodide levels measured by LC-MS (Figure 17) suggest also that SLC5A8 knock-down modifies the regulation of free iodide amount in the thyroid. In wild-type mice, free iodide level increases after 1 day of iodide administration, this increase is strongly reduced at day 6. In SLC5A8-deficient mice, free iodide level increases after 1 day of iodide administration (less than for wild-type mice) and remains at the same level after 6 days. Here again additional studies are required to explain these differences.

In conclusion, using a multiomics approach this work opens new research avenues in the fields of the molecular mechanisms underlying the thyroid regulation by iodide and the SCL5A8

function in the thyroid. Our work also revealed the promising use of SLC5A8-deficient mice for the study of the acute thyroid response after iodide administration.

Figures

Table. 6plex and 9plex Labeling plan

9plex Labeling								
126	127N	127C	128N	128C	129N	129C	130N	130C
D0 WT	D0 WT	D0 WT	D1 WT	D1 WT	D1 WT	D6 WT	D6 WT	D6 WT
D0 KO	D0 KO	D0 KO	D1 KO	D1 KO	D1 KO	D6 KO	D6 KO	D6 KO
6plex Labeling								
126	127	128	129	130	131			
WT D6	WT D6	WT D6	KO D6	KO D6	KO D6			
WT D1	WT D1	WT D1	KO D1	KO D1	KO D1			
WT D0	WT D0	WT D0	KO D0	KO D0	KO D0			

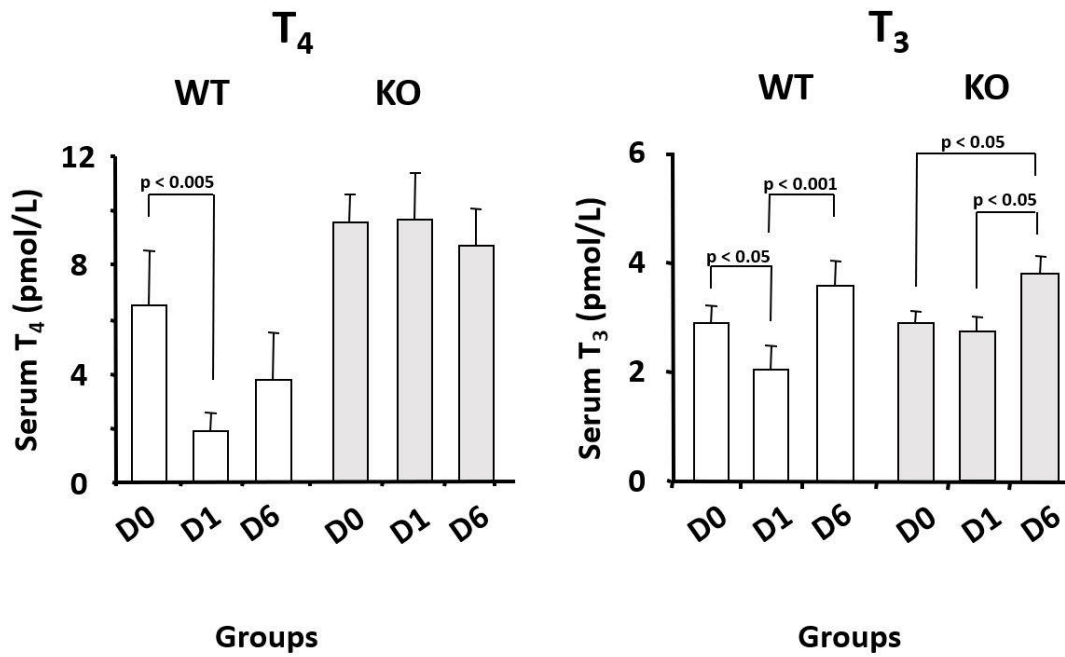
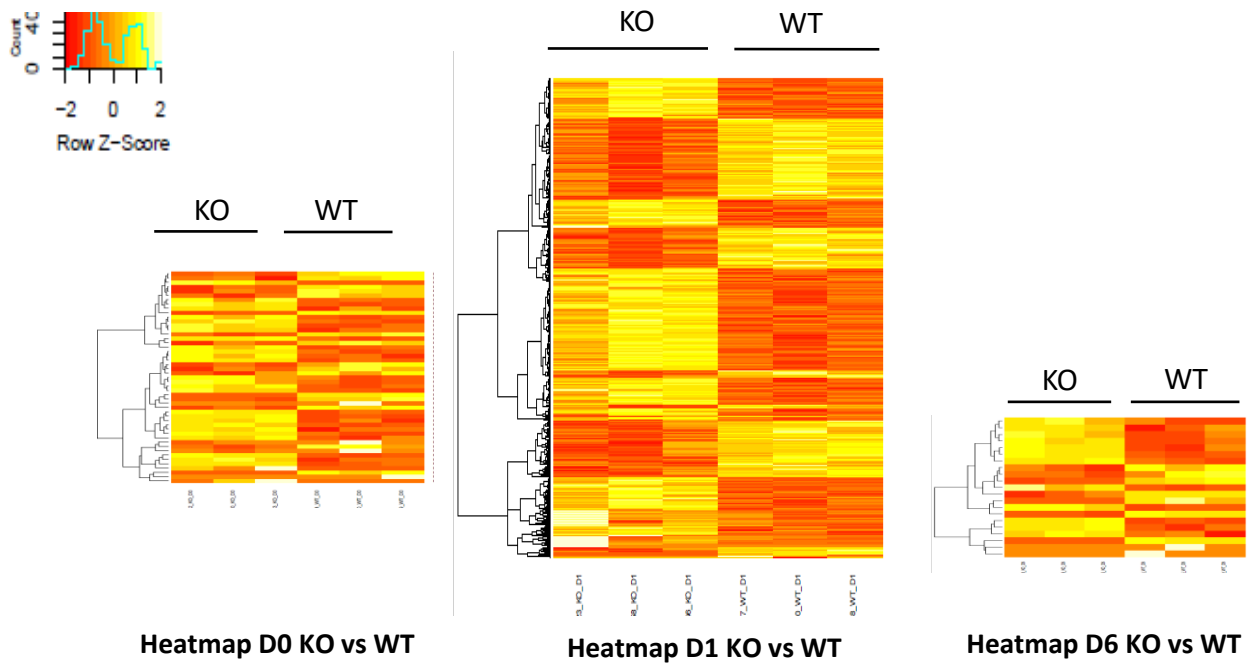


Figure 1. Effect of iodide administration on thyroid hormone concentration of SLC5A8-deficient mice (KO) and wild type mice (WT). Serum concentration of T3 and T4 hormones before (D0) and 1 day (D1) and 6 days (D6) after iodide administration in SLC5A8-deficient and control mice. Values are means of at least six independent experiments.

A



B

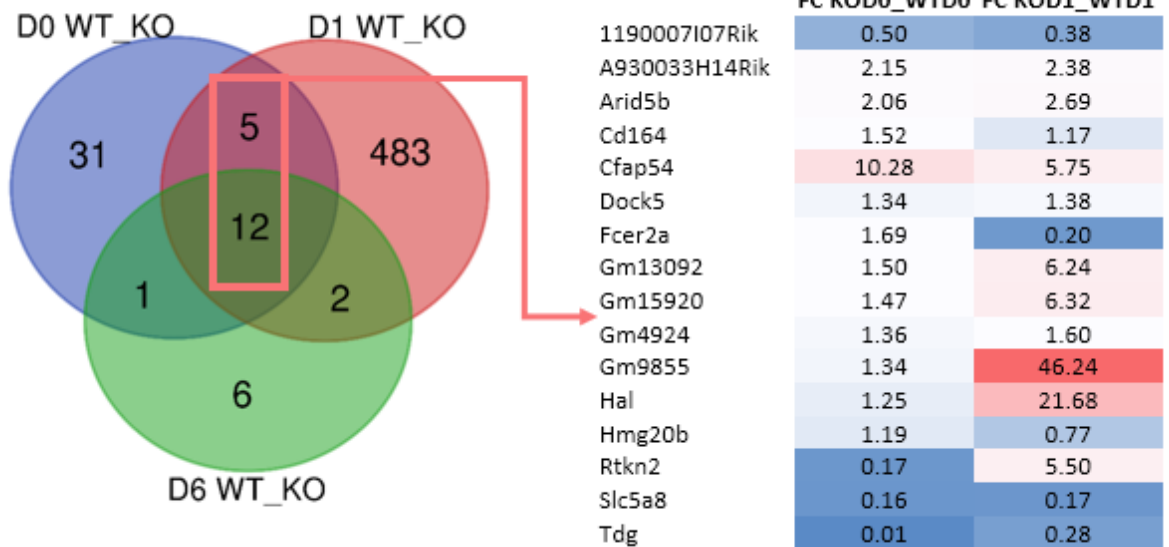


Figure 2. Effect of iodide administration on thyroid transcriptome of SLC5A8-deficient mice (KO) and wild type mice (WT). (A) Cluster heatmap analyses that were performed using unsupervised hierarchical clustering with Pearson correlation merges differences after iodide administration in wild type mice and SCL5A8 deficient mice. (B) 17 transcripts that were involved in SLC5A8 deficient mice after 1 day of iodide administration are also regulated by SLC5A8 deficiency before iodide administration.

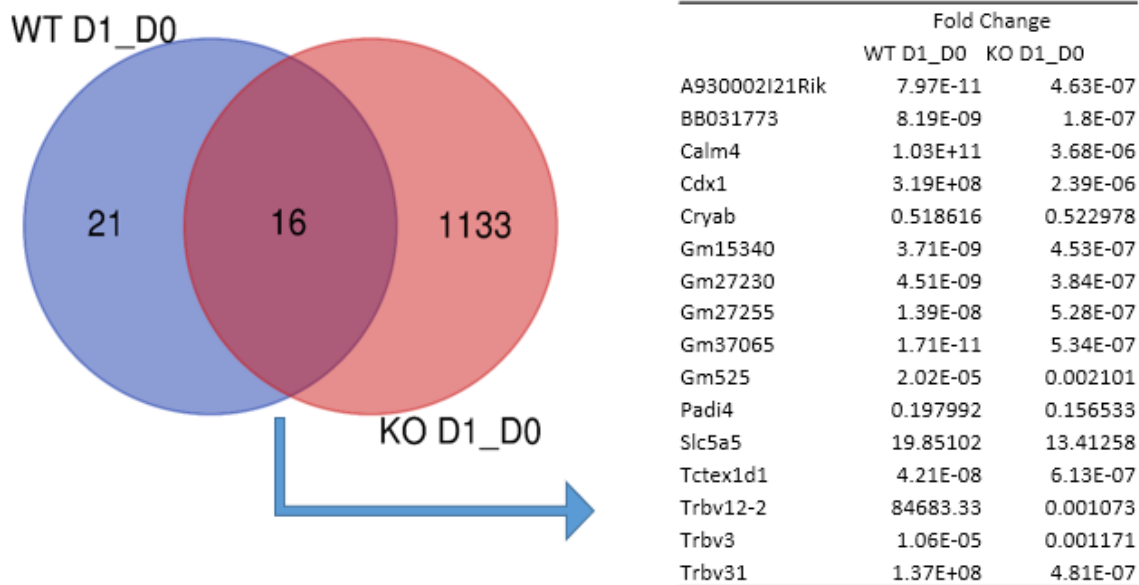


Figure 3 Effect of iodide administration on thyroid transcriptome of SLC5A8-deficient mice (KO) and wild type mice (WT).

37 transcripts are modified after iodide administration in wild type mice compared to 1149 in SLC5A8 deficient mice. 16 transcripts are involved in both response to iodide administration.

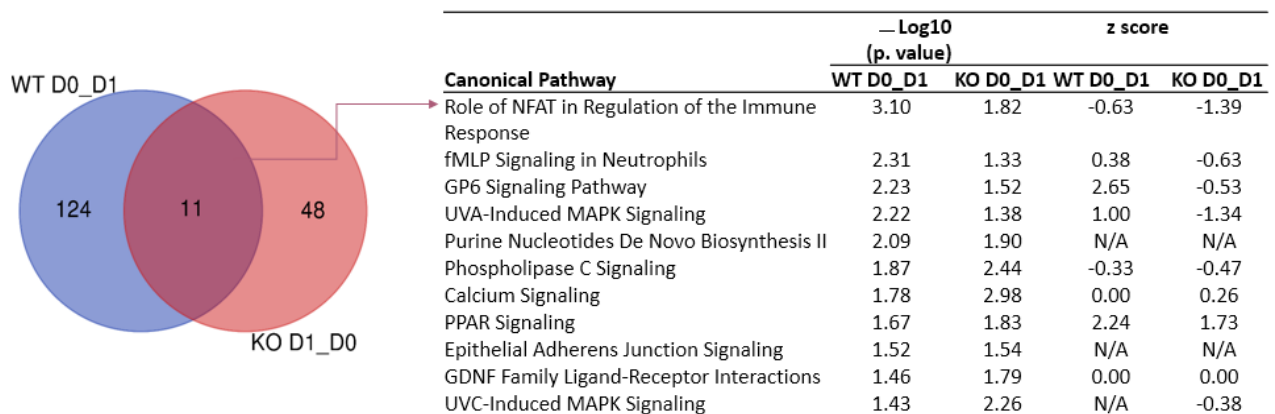


Figure 4. Effect of iodide administration on thyroid transcriptome pathways of SLC5A8-deficient mice (KO) and wild type mice (WT). IPA analysis revealed that differentially expressed transcripts are involved in 135 pathways in wild type mice after iodide administration while only 59 pathways merged in SLC5A8 deficient mice. 11 pathways are in common.

Upstream Regulat...	Expr Log Ratio	Predicted Activa...	Activation z-score	p-value of overlap	Target molecules ...
PPARD	↑0,206	Activated	2,216	4,49E-02	↑ACAA1, ↑FBP1, ...all 5
IL5		Activated	2,449	2,10E-02	↑GADD45G, ↑GCAT...all 6
CEBPA	↑0,481	Activated	2,200	3,83E-03	↑CEBPD, ↑G0S2, ↑...all 7
CEBPB	↑0,425	Activated	2,449	5,62E-03	↑CEBPD, ↑GAS1, ↑...all 6
CD38	↓-0,285	Activated	2,423	2,67E-02	↑GADD45G, ↑GCAT...all 6
AKAP5	↓-0,660			1,78E-02	↑MYH7 ...all 1
SGPP1	↓-0,029			1,85E-02	↑Krt10, ↑LOR ...all 2
FNIP1	↓-0,154			4,50E-03	↑MYH7, ↑TNNT1 ...all 2
FAM3B				5,82E-03	↑IGFBP3, ↑RNASE1, ...all 3
SRF	↓-0,120			1,63E-02	↑CSRP1, ↓EGR2, ↑...all 4

Figure 5A Effect on upstream regulators of acute iodide administration and SLC5A8 invalidation thyroid transcriptome of wild type mice (WT). IPA analysis merged 5 upstream regulators involved in iodide administration effect in wild type mice.

*Overlap *P*-value indicates the enrichment of network-regulated genes in the dataset and activation Z-score is used to find likely regulating molecules based on a statistically significant pattern match of up- and down-regulation, and to predict the activation state (either activated or inhibited) of a putative regulator.

*Activated (z-score ≥ 2) and inhibited (z-score ≤ -2) upstream regulators are highlighted in orange and blue, respectively.

Upstream Regulat...	Expr Log Ratio	Predicted Activa...	Activation z-score	p-value of overlap	Target molecules ...
INSIG1	↑0,614	Inhibited	-2,967	1,43E-01	↑ACSL4, ↑CYP51A1...all 9
PLG		Inhibited	-2,213	1,38E-01	↓CNN2, ↓MFG8, ...all 5
ESRRB	↑0,057	Inhibited	-2,000	8,88E-03	↓ADIPOR1, ↑MEF...all 4
ATP7B	↑0,342	Activated	2,000	2,35E-01	↑CYP51A1, ↑HM...all 4
SCAP	↑0,113	Activated	2,795	1,38E-02	↑ACSL4, ↑CYP51A1...all 8
TOB1	↓-0,184	Activated	2,449	3,52E-02	↑ATR, ↑BANP, ↑I...all 6
IL2RG	↑0,001	Activated	2,449	3,12E-02	↓ARHGAP45, ↓C...all 6
ATF4	↑0,208	Activated	2,000	4,05E-01	↑ARHGAP24, ↑G...all 4
INSR	↑0,037	Activated	2,959	2,49E-01	↑ACSL4, ↓ACTN4, ...all 15
SIRT1	↓-0,090	Activated	2,138	2,13E-01	↓ANXA4, ↓CCN...all 14

Figure 5B Effect on upstream regulators of acute iodide administration and SLC5A8 invalidation thyroid transcriptome of SLC5A8-deficient mice (KO). IPA analysis merged 4 significant upstream regulators involved in iodide administration effect in SLC5A8 deficient mice. Three are activated predicted while only one is predicted as inhibited.

*Overlap *P*-value indicates the enrichment of network-regulated genes in the dataset and activation Z-score is used to find likely regulating molecules based on a statistically significant pattern match of up- and down-regulation, and to predict the activation state (either activated or inhibited) of a putative regulator.

*Activated (z-score ≥ 2) and inhibited (z-score ≤ -2) upstream regulators are highlighted in orange and blue, respectively.

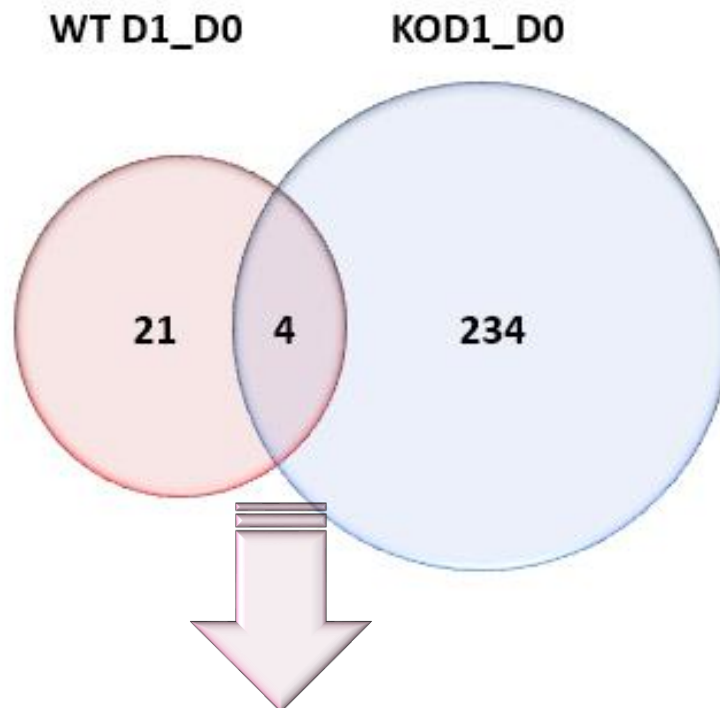
Table 1A. Top10 up and down regulated proteins WTD1 vs. WTD0

Accession	Description	Fold Change WT_D1/WT_D0	P value
E9Q2R6	Glyoxalase domain-containing protein 4 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Glod4 PE=1 SV=1	2.587	0.0099
G3UWV7	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11 (Fragment) OS=Mus musculus OX=10090 GN=Psm11 PE=1 SV=1	2.278	0.0246
Q5FW91	Tubulin alpha chain OS=Mus musculus OX=10090 GN=Tuba3a PE=1 SV=1	1.572	0.0143
A0A0N4SVU1	Uncharacterized protein OS=Mus musculus OX=10090 GN=Gm7298 PE=4 SV=1	1.508	0.0483
F6ZQQ3	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13 (Fragment) OS=Mus musculus OX=10090 GN=Psm13 PE=1 SV=1	1.435	0.0291
P24668	Cation-dependent mannose-6-phosphate receptor OS=Mus musculus OX=10090 GN=M6pr PE=1 SV=1	0.682	0.0063
P08730	Keratin, type I cytoskeletal 13 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Krt13 PE=1 SV=2	0.634	0.0004
Q9D1M0	Protein SEC13 homolog OS=Mus musculus OX=10090 GN=Sec13 PE=1 SV=3	0.521	0.0436
Q8BJE2	Butyrophilin-like protein 9 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Btl9 PE=1 SV=1	0.504	0.0072
Q80WJ7	Protein LYRIC OS=Mus musculus OX=10090 GN=Mtdh PE=1 SV=1	0.498	0.028

Table 2B. Top10 up and down regulated proteins KOD1 vs. KOD0

Accession	Description	Fold Change KO_D1/KO_D0	P value
E9Q1Q9	Ketohexokinase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Khk PE=1 SV=1	4.148	0.0432
Q9JJ28	Protein flightless-1 homolog OS=Mus musculus OX=10090 GN=Flii PE=1 SV=1	3.833	0.0346
Q4FZE6	40S ribosomal protein S7 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Rps7 PE=2 SV=1	3.384	0.0232
H3BK65	Epidermal growth factor receptor substrate 15 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Eps15 PE=1 SV=1	3.364	0.0395
Q3UIZ8	Myosin light chain kinase 3 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Mylk3 PE=1 SV=1	3.078	0.0160
Q8BH43	Wiskott-Aldrich syndrome protein family member 2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Wasf2 PE=1 SV=1	0.411	0.0156
P17225	Polypyrimidine tract-binding protein 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ptbp1 PE=1 SV=2	0.373	0.0153
Q80XN0	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Bdh1 PE=1 SV=2	0.365	0.0276
H3BLN1	Golgi-specific brefeldin A-resistance factor 1 (Fragment) OS=Mus musculus OX=10090 GN=Gbf1 PE=1 SV=1	0.337	0.0071
Q64176	Carboxylesterase 1E OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ces1e PE=1 SV=1	0.247	0.0181

A



Accession	Description	Fold Change WT D1vs.D0	P.value	Fold Change KO D1vs. D0	P.value
G3UWV7	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11 (Fragment)	2.278	0.024	2.447	0.022
A0A0N4SVU1	Uncharacterized protein	1.508	0.048	1.691	0.034
Q8BH43	Wiskott-Aldrich syndrome protein family member 2	0.768	0.016	0.411	0.015
Q545G1	Uncharacterized protein	0.762	0.029	0.563	0.00007

Figure 6. Effect of iodide administration at day 1 on thyroid proteome of SLC5A8-deficient mice (KO) and wild type mice (WT). 26 proteins are involved in iodide administration effect in wild type mice compared to 236 in SLC5A8 deficient mice. 4 proteins are in common.

*FC: Fold Change

Table 2A. *Top 10 pathways (out of 61) related to 24 hours iodide administration in wild type mice *NA: not available*

Canonical Pathway	P. value WT_D1vs.D0 -	Z score WT_D1vs.D0 -
14-3-3-mediated Signaling	1.84	N/A
Actin Cytoskeleton Signaling	2.93	0.81
Agrin Interactions at Neuromuscular Junction	2.67	-2,00
Arsenate Detoxification I (Glutaredoxin)	1.64	N/A
Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling	1.76	N/A
tRNA Charging	1.69	N/A
Tryptophan Degradation X (Mammalian, via Tryptamine)	2.01	N/A
UDP-N-acetyl-D-galactosamine Biosynthesis I	2.12	N/A
Xenobiotic Metabolism Signaling	1.34	N/A
Zymosterol Biosynthesis	1.35	N/A

Table 2B. *Top 10 pathways (out of 196) related to 24 hours iodide administration in SLC5A8-deficient mice *NA: not available*

Canonical Pathway	P.value KO_D1vs.D0	Z Score KO_D1vs.D0
Mitochondrial Dysfunction	10.47	N/A
Oxidative Phosphorylation	7.27	-4.00
Xenobiotic Metabolism Signaling	7.10	N/A
Sirtuin Signaling Pathway	6.86	0.00
EIF2 Signaling	6.58	-1.00
NRF2-mediated Oxidative Stress Response	6.55	0.53
Regulation of eIF4 and p70S6K Signaling	6.29	1.41
Glycolysis I	6.23	-1.41
mTOR Signaling	5.82	1.51
Ethanol Degradation II	5.63	-1.41

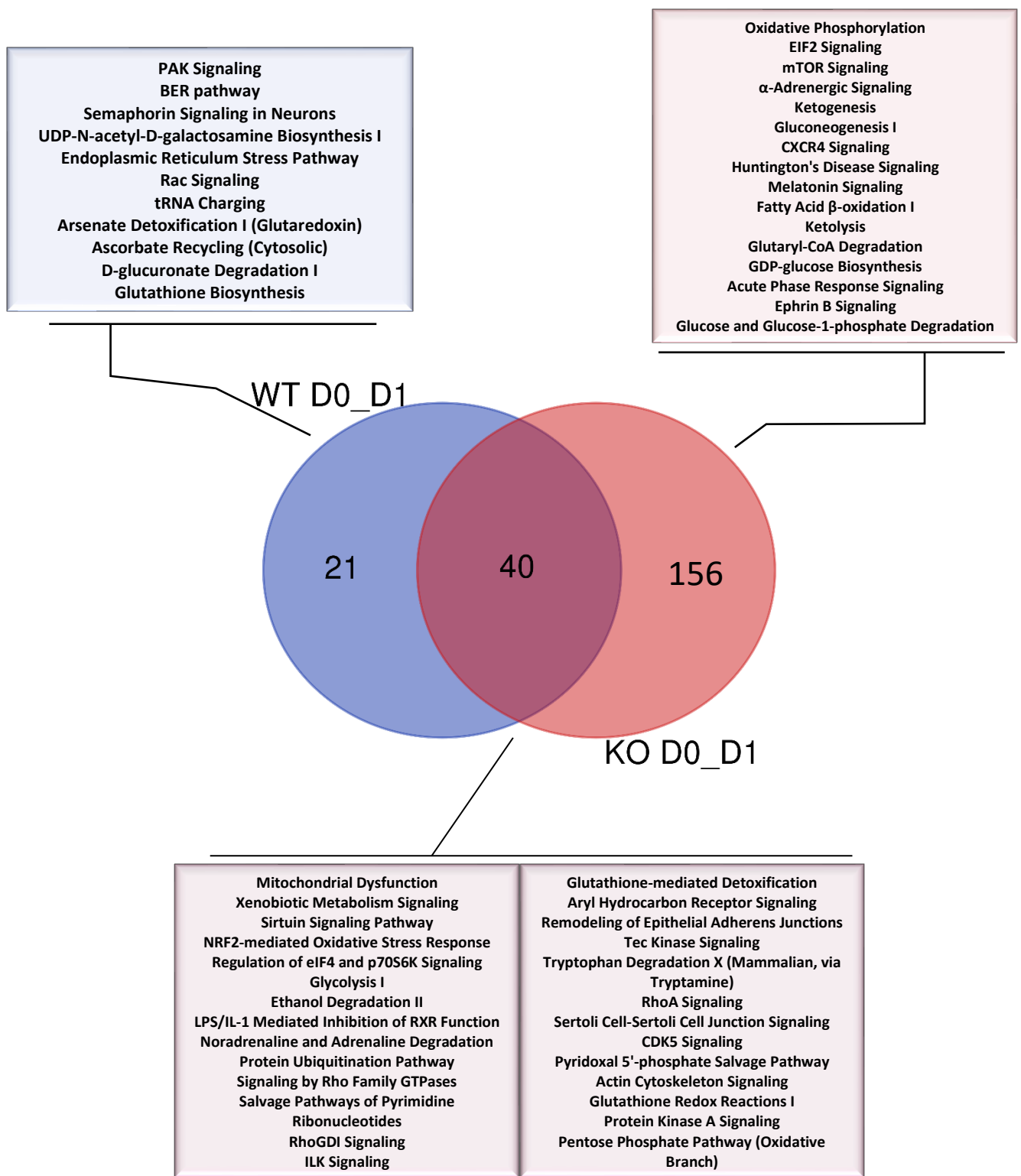


Figure 7. Effect of iodide administration on thyroid pathways of SLC5A8-deficient mice (KO) and wild type mice (WT). IPA analysis revealed that differentially expressed proteins are involved in 61 pathways in wild type mice after iodide administration while 206 pathways merged in SLC5A8 deficient mice. Venn diagram shows 40 common pathways.

The complete list of pathways is provided on supplementary data (Supl.table 13 &12)

Table 3. Iodide administration effect on significant pathways involved in proteomes in SLC5A8 deficient mice and wild type mice

Z score		Canonical Pathway	p value	
WT_D1vs.D0	KO_D1vs.D0		WT D1 vs.D0	KO D1 vs.D0
		Glycolysis I	1.89	6.23
		Glutathione-mediated Detoxification	1.86	3.89
		Regulation of eIF4 and p70S6K Signaling	2.33	6.29
		Ethanol Degradation II	1.76	5.63
		14-3-3-mediated Signaling	1.84	1.56
		Pyridoxal 5'-phosphate Salvage Pathway	1.98	3.00
		Agrin Interactions at Neuromuscular Junction	2.68	1.93
		Paxillin Signaling	2.01	1.42
		RhoA Signaling	1.98	3.29
		RhoGDI Signaling	3.64	4.32
		Tec Kinase Signaling	1.51	3.46
		Agrin Interactions at Neuromuscular Junction	2.68	1.93
		Integrin Signaling	2.39	1.35
		Cdc42 Signaling	3.66	1.77
		Signaling by Rho Family GTPases	2.10	4.81
		RhoGDI Signaling	3.64	4.32
		Protein Kinase A Signaling	2.28	2.26

Table4A. Protein expressions related to glycolysis. *FC: Fold Change

Symbol	Gene Name	Log2 F.C (KO D1_D0)	Log2 F.C (KO D6_D0)	Log2 F.C (WT D1_D0)	Log2 F.C (WT D6_D0)
FBP1	fructose-bisphosphatase 1	1.317	-1.167		
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-1.263			
GPI	glucose-6-phosphate isomerase	1.522			
PFKM	phosphofructokinase. muscle	-1.311		-1.107	
PGAM1	phosphoglycerate mutase 1	-1.199			
PGAM2	phosphoglycerate mutase 2	-1.404	-1.271		
PGK1	phosphoglycerate kinase 1	-1.160	-1.114		
PKM	pyruvate kinase M1/2	-1.172			

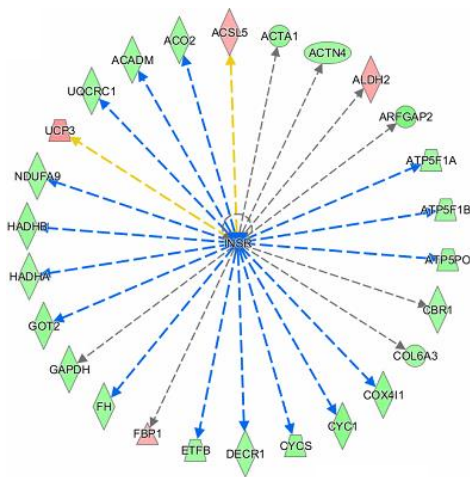
Table4B. Protein expressions related to oxidative phosphorylation *FC: Fold change

Symbol	Gene Name	Log2 F.C	Log2F.C	Log2F.C	Log2F.C
		KO D1_D0	KO D6_D0	WT D1_D0	WT D6_D0
ATP5F1A	ATP synthase F1 subunit alpha	-1.209	-1.115		
ATP5F1C	ATP synthase F1 subunit gamma	-1.252	-1.198		
ATP5MF	ATP synthase membrane subunit f		-1.212		
ATP5PB	ATP synthase peripheral stalk-membrane subunit b	-1.195	-1.163		
ATP5PO	ATP synthase peripheral stalk subunit OSCP	-1.282	-1.203	-1.186	
COX5A	cytochrome c oxidase subunit 5A		-1.429		
COX6B1	cytochrome c oxidase subunit 6B1		-1.167		
COX7A1	cytochrome c oxidase subunit 7A1		-1.541		
CYC1	cytochrome c1	-1.414	-1.183		
CYCS	cytochrome c. somatic	-1.332	-1.153		
MT-CO2	cytochrome c oxidase subunit II		-1.188		
MT-ND4	NADH dehydrogenase. subunit 4 (complex I)		1.252		
NDUFA9	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit A9	-1.178	-1.252		
NDUFA10	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit A10	-1.221	-1.147		
NDUFV1	NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit V1		-1.110		
UQCRC1	ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 1	-1.211	-1.148		
UQCRRS1	ubiquinol-cytochrome c reductase. Rieske iron-sulfur polypeptide 1	-1.486	-1.217		

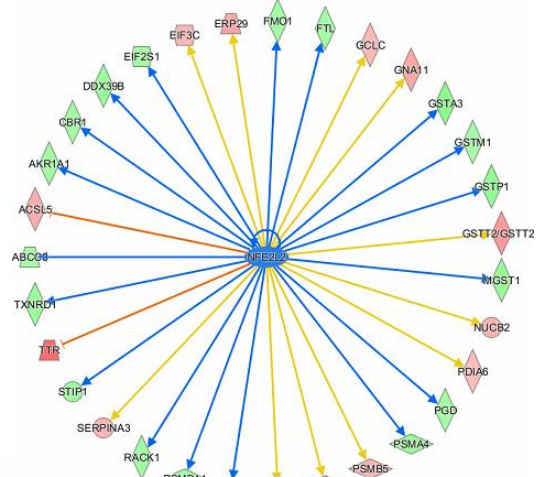
A

Expression Analysis - 9Plex KO D1vs.D0					
Upstream Regulator	Predicted Activation S...	Activation z-score	p-value of overlap	Target molecules in dat...	
INSR	Inhibited	-3,373	1,02E-09	↑ACADM, ↑ACO2, ↑A...all 26	
IGF1R	Inhibited	-3,273	1,02E-06	↑ACADM, ↑ACTA1, ↓...all 13	
PPARGC1A	Inhibited	-2,485	4,96E-04	↑ACADM, ↑ACAT1, ↓...all 11	
PTEN	Inhibited	-2,525	5,66E-03	↑ACO2, ↑ACOX1, ↑CFD...all 10	
UCP1	Inhibited	-2,333	2,54E-02	↑ALDH18A1, ↑BZW2, ↑...all 9	
SLC13A1	Inhibited	-2,449	7,56E-02	↑ACSL5, ↑ALDH1A1, ↑...all 6	
RICTOR	Activated	3,430	1,27E-13	↑ATP5F1A, ↑ATP5F1B, ...all 34	
SMTNL1	Activated	2,000	1,18E-02	↑ACTA1, ↑GAPDH, ↑P...all 4	
DNMT3B	Activated	2,000	2,49E-01	↑ACTA1, ↑ATP2A2, ↑C...all 4	
IL4	Activated	2,236	3,51E-01	↑ACOX1, ↑ANXA2, ↑G...all 5	
NFE2L2		-1,478	4,32E-11	↓ABCC3, ↑ACSL5, ↓A...all 31	

B



C



D

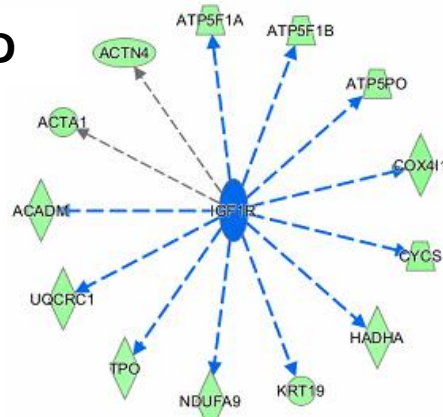


Figure 8. Effect of iodide administration on upstream regulators of DEP in thyroid of SLC5A8-deficient mice (KO) (A) List of unbiased upstream regulators (B) INSR inhibition, (C) NFE2L2 inhibition and (D) IGF1R inhibition and their respective causal networks. IPA analysis merged 8 significant upstream regulators involved in iodide administration effect in SLC5A8 deficient mice. Two are activated predicted while 6 are predicted as inhibited.

Up-regulated and down-regulated proteins are highlighted in red and green, respectively, and the color depth is correlated to the fold change. Orange and blue lines with arrows indicate predicted activation and inhibition, respectively. Gray lines with arrows depict that the effect is not predicted. Yellow lines represent findings inconsistent with state of downstream molecule. Dashed lines indicate indirect relationship.

*Overlap *P*-value indicates the enrichment of network-regulated genes in the dataset and activation Z-score is used to find likely regulating molecules based on a statistically significant pattern match of up- and down-regulation, and to predict the activation state (either activated or inhibited) of a putative regulator.

*Activated ($z\text{-score} \geq 2$) and inhibited ($z\text{-score} \leq -2$) upstream regulators (z are highlighted in orange and blue, respectively).

A

Upstream Regulator	Predicted Activation S...	Activation z-score	p-value of overlap	Target molecules in da...
NFE2L2	Activated	2,170	1,51E-08	↑AKR1A1, ↑ARF1, ↑El... all 13
RICTOR		1,000	4,15E-05	↓ATP5PO, ↓ATP6V1E1, ↓... all 9
TP53		-0,777	8,54E-05	↓ADD3, ↓Cyb5r3, ↓G... all 10

B

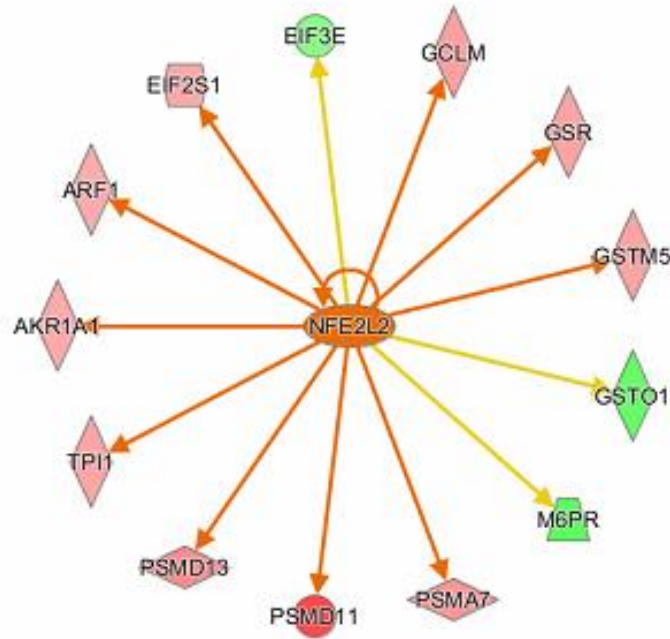


Figure 9. Effect of iodide administration on upstream regulators of DEP in thyroid of wild type mouse (WT) (A) List of unbiased upstream regulators (B) NFE2L2 predicted activation and causal network. IPA analysis merged only one significant upstream regulator involved in iodide administration effect in SLC5A8 deficient mice that is highly activated.

*Up-regulated and down-regulated proteins are highlighted in red and green, respectively, and the color depth is correlated to the fold change. Orange and blue lines with arrows indicate predicted activation and inhibition, respectively. Gray lines with arrows depict that the effect is not predicted. Yellow lines represent findings inconsistent with state of downstream molecule. Dashed lines indicate indirect relationship.

*Overlap *P*-value indicates the enrichment of network-regulated genes in the dataset and activation Z-score is used to find likely regulating molecules based on a statistically significant pattern match of up- and down-regulation, and to predict the activation state (either activated or inhibited) of a putative regulator.

*Activated ($z\text{-score} \geq 2$) and inhibited ($z\text{-score} \leq -2$) upstream regulators are highlighted in orange and blue, respectively.

Table5A. Top 10 up and down regulated proteins WT_D6 vs WT_D0

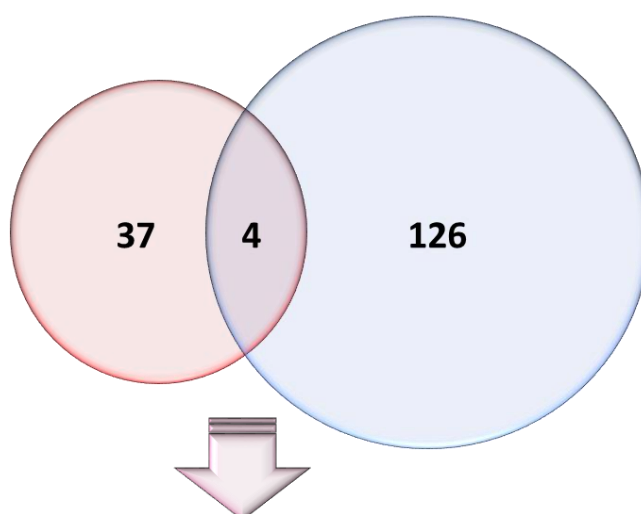
Accession	Description	Fold Change WT _D6/WT_D00	P value
Q3U621	Uncharacterized protein OS=Mus musculus OX=10090 GN=Rab10 PE=2 SV=1	1.784	0.0405
Q3TIT6	Uncharacterized protein OS=Mus musculus OX=10090 GN=Dnajb1 PE=2 SV=1	1.75	0.0261
Q3UV17	Keratin, type II cytoskeletal 2 oral OS=Mus musculus OX=10090 GN=Krt76 PE=1 SV=1	1.381	0.0112
A2CG35	Ras-related protein Rab-12 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Rab12 PE=1 SV=1	1.317	0.0149
Q61781	Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Krt14 PE=1 SV=2	1.312	0.0377
Q76I26	Methyltransferase hypoxia-inducible domain-containing 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Methig1 PE=2 SV=1	0.579	0.0399
Q3UVI9	Uncharacterized protein OS=Mus musculus OX=10090 GN=Abcf2 PE=2 SV=1	0.566	0.0264
Q9CRT0	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Mus musculus OX=10090 GN=Tubb3 PE=2 SV=1	0.559	0.0229
B2RXM2	EG627828 protein OS=Mus musculus OX=10090 GN=Gm6793 PE=1 SV=1	0.533	0.0093
P50114	Protein S100-B OS=Mus musculus OX=10090 GN=S100b PE=1 SV=2	0.424	0.0312

Table5B. Top 10 up and down regulated proteins KO_D6 vs KO_D0

Accession	Description	Fold Change KOD6/KOD0	P value
Q9JKL4	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex assembly factor 3 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ndufaf3 PE=1 SV=1	2.773	0.0037
Q8C3X8	Lipase maturation factor 2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Lmf2 PE=1 SV=1	2.511	0.0275
Q6PDB7	Carboxylic ester hydrolase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ces2b PE=1 SV=1	2.5	0.0104
Q80TU3	MKIAA0684 protein (Fragment) OS=Mus musculus OX=10090 GN=mKIAA0684 PE=2 SV=1	2.412	0.0129
J3QP59	Ataxin-2-like protein (Fragment) OS=Mus musculus OX=10090 GN=Atxn2l PE=1 SV=8	2.407	0.0056
E0CXB9	Catenin alpha-2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ctnna2 PE=1 SV=1	0.579	0.0106
Q9CQE8	RNA transcription, translation and transport factor protein OS=Mus musculus OX=10090 GN=RTRAF PE=1 SV=1	0.578	0.0026
B2ZRS8	Depdc6-003 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Depdc6 PE=4 SV=1	0.567	0.0413
Q9DBC3	Cap-specific mRNA (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Cmtr1 PE=1 SV=1	0.561	0.0058
Q64176	Carboxylesterase 1E OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ces1e PE=1 SV=1	0.383	0.0434

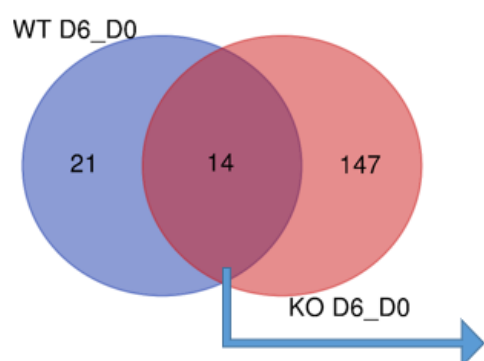
A

WT D6_D0 KO D6_D0



Accession	Description	F.C KO D6vs.D0	P.value	F.C WT D6vs.D0	P.value
Q3TIT6	Uncharacterized protein OS=Mus musculus OX=10090 GN=Dnabj1 PE=2 SV=1	1.517	0.0013	1.75	0.026
Q8VDI9	Alpha-1,2-mannosyltransferase ALG9 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Alg9 PE=2 SV=1	1.747	0.0472	0.759	0.041
Q5DU67	MFLJ00088 protein (Fragment) OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ganc PE=2 SV=1	1.4	0.0078	0.671	0.048
Q80W22	Threonine synthase-like 2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Thnsl2 PE=1 SV=1	1.515	0.0117	0.649	0.011

B



Canonical Pathway	P.value		Z.score	
	WT D6vs.D0	KO D6 vs.D0	WT D6vs.D0	KO D6 vs.D0
4-hydroxyproline Degradation I	1.65	2.87	N/A	N/A
Aspartate Biosynthesis	1.65	2.87	N/A	N/A
CDK5 Signaling	1.40	2.24	N/A	1.13
Cellular Effects of Sildenafil (Viagra)	2.05	2.06	N/A	N/A
Estrogen Biosynthesis	1.53	1.39	N/A	N/A
Gap Junction Signaling	1.31	2.21	N/A	N/A
Glutamate Degradation II	1.65	2.87	N/A	N/A
L-cysteine Degradation I	1.53	2.58	N/A	N/A
Mechanisms of Viral Exit from Host Cells	1.53	1.39	N/A	N/A
Mitochondrial Dysfunction	1.61	13.18	N/A	N/A
NRF2-mediated Oxidative Stress Response	1.33	4.47	N/A	1.13
Protein Ubiquitination Pathway	1.55	2.43	N/A	N/A
Superpathway of Methionine Degradation	1.65	1.56	N/A	N/A
tRNA Charging	1.71	2.50	N/A	0.00

Figure 10. Iodide administration effect at day 6 on thyroid proteom (A) and related pathways (B) of SLC5A8-deficient mice(KO) and wild type mice(WT). (A) 41 proteins are involved in iodide administration effect in wild type mice compared to 130 in SLC5A8 deficient mice at day 6 after iodide administration. 4 proteins are in common. (B) Ingenuity pathway analysis (IPA) revealed that differentially expressed proteins are involved in 35 pathways in wild type mice after iodide administration and 161 pathways merged in SLC5A8 deficient mice. Venn diagram shows 14 common pathways.

*N/A: not available

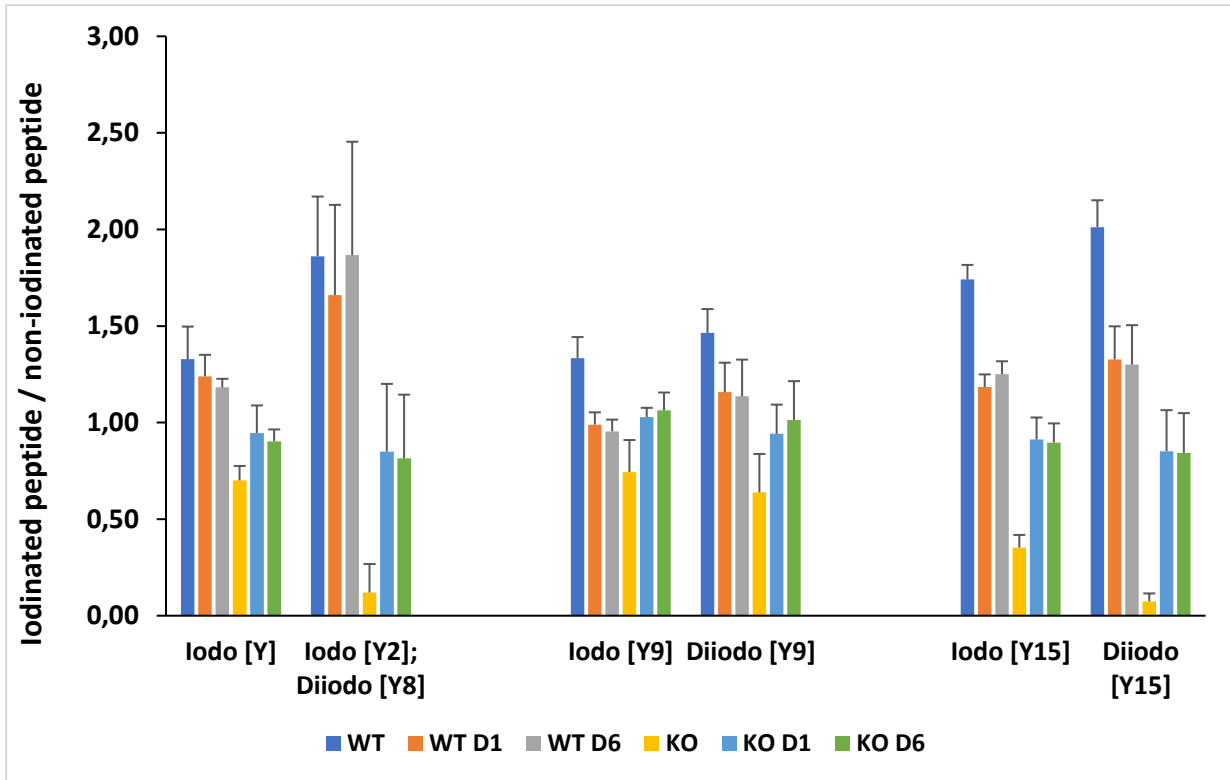
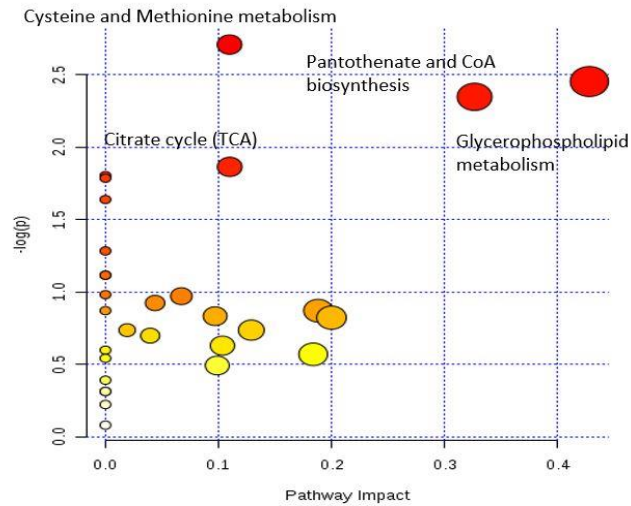


Figure 12. Iodinated peptides of the thyroglobulin in control and SLC5A8-deficient mice after or without iodide administration. Iodinated peptides were quantified on LC-MS analysis, ratio of iodinated peptides compared to noniodinated on Y-axis and peptide iodination and deiodination on X-axis. Ratio is higher in control rather than the ratio in SLC5A8-deficient mice.

Overview of pathways
WT D1 vs D0



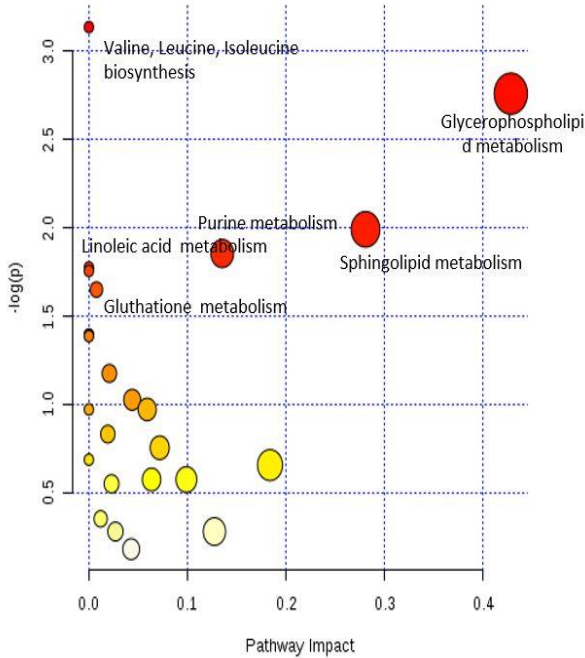
Pathway Name	$-\log(p)$	Impact
Cysteine and methionine metabolism	2.7078	0.10977
Glycerophospholipid metabolism	2.4531	0.42809
Pantothenate and CoA biosynthesis	2.3471	0.32653
Citrate cycle (TCA cycle)	1.864	0.10992
Sulfur metabolism	1.8041	0.0
Sphingolipid metabolism	1.7857	0.0
Linoleic acid metabolism	1.6388	0.0
alpha-Linolenic acid metabolism	1.284	0.0
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	1.1166	0.0

Figure 13. Effect of iodide administration at day 1 on pathways related to thyroid metabolome changes of wild type mice (WT).

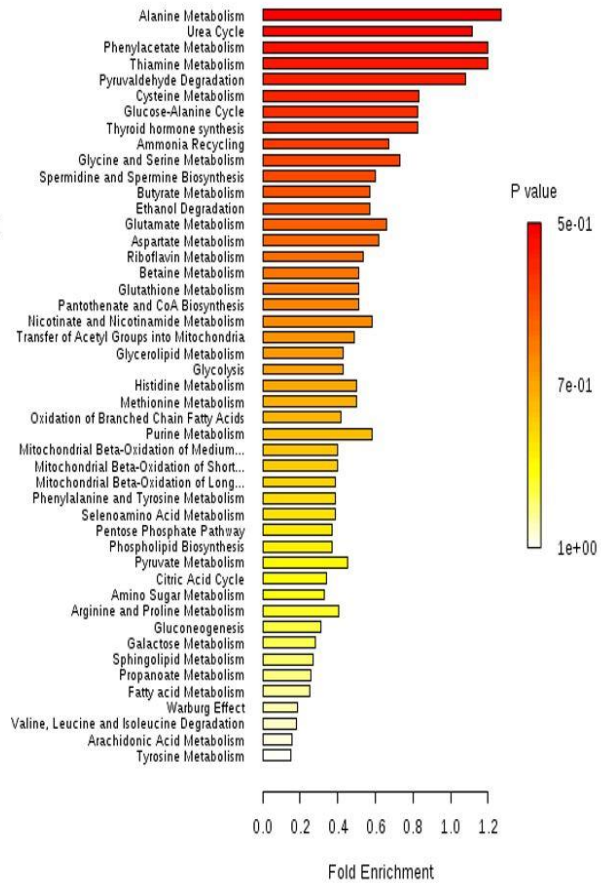
Metabolome view, obtained with metaboanalyst analysis, shows all the matched pathways arranged by $-\log p$ values on Y-axis and pathway impact values on X-axis. The color is based on the p value.

*pathway impact is the cumulative percentage from the matched metabolite nodes

Overview of pathways
KO D1 vs D0



Metabolite Sets Enrichment Overview



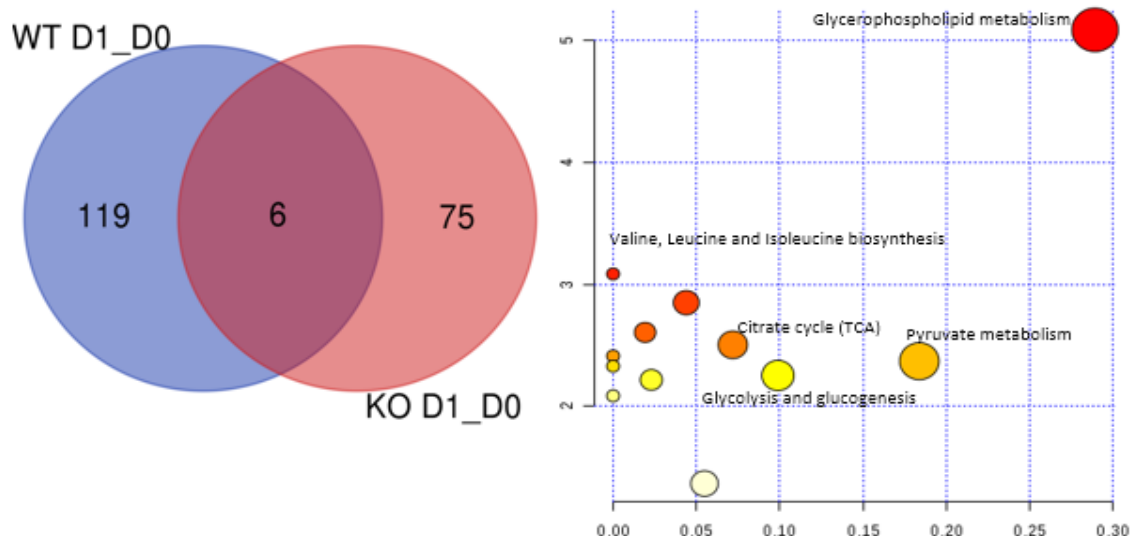
Pathway Name	$-\log(p)$	Impact
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	3.1376	0.0
Glycerophospholipid metabolism	2.7605	0.42809
Sphingolipid metabolism	1.9919	0.2807
Purine metabolism	1.8551	0.13529
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	1.776	0.0
Linoleic acid metabolism	1.7561	0.0
Glutathione metabolism	1.6506	0.00763
alpha-Linolenic acid metabolism	1.3953	0.0
Methane metabolism	1.3953	0.0
Glycine, serine and threonine metabolism	1.3866	0.0

Figure 14. Effect of iodide administration at day 1 on pathways related to thyroid metabolome changes of wild type mice (WT). Metabolome view, obtained with metaboanalyst analysis, shows all the matched pathways arranged by $-\log p$ values on Y-axis and pathway impact values on X-axis. The color is based on the p value.

*pathway impact is the cumulative percentage from the matched metabolite nodes

Common Metabolites KO D1 vs D0 and WT D1 vs D0

main ID	FC WT D1 Vs. D0	P value	FC KO D1 Vs. D0	P value
I(-)	33.15	0.02	219.05	0.01
Cohibin C	2.43	0.02	0.27	0.02
Norpropoxyphene	1.85	0.03	2.54	0.02
Pyruvic acid	0.52	0.01	1.66	0.002
Terbinafine	0.37	0.05	1.51	0.03
Pentadecanoylcarnitine	0.00	0.04	0.15	0.01



Pathway Name	$-\log(p)$	Impact
Glycerophospholipid metabolism	5.0884	0.2892
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	3.0843	0.0
Glycosylphosphatidylinositol(GPI)-anchor biosynthesis	2.8484	0.0439
Glycerolipid metabolism	2.6042	0.0192
Citrate cycle (TCA cycle)	2.5023	0.07184
Butanoate metabolism	2.4106	0.0
Pyruvate metabolism	2.3679	0.18375
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	2.3271	0.0
Glycolysis or Gluconeogenesis	2.2506	0.09891
Cysteine and methionine metabolism	2.2146	0.02292
Glycine, serine and threonine metabolism	2.0835	0.0
Purine metabolism	1.3629	0.05482

Figure 15. Effect of iodide administration at day 1 on pathways related to thyroid metabolome changes of wild type mice (WT) and SLC5A8-deficient mice (KO). Metabolome view, obtained with metaboanalyst analysis, shows all the matched pathways arranged by $-\log p$ values on Y-axis and pathway impact values on X-axis. The color is based on the p value. Venn diagram shows 125 metabolites that are involved in iodide administration effect in wild type mice compared to 81 in SLC5A8 deficient mice 24 hours after iodide administration. 6 metabolites are in common. These metabolites are analyzed with Metaboanalyst. Pathways are listed on the table below the venn diagram.

*pathway impact is the cumulative percentage from the matched metabolite nodes

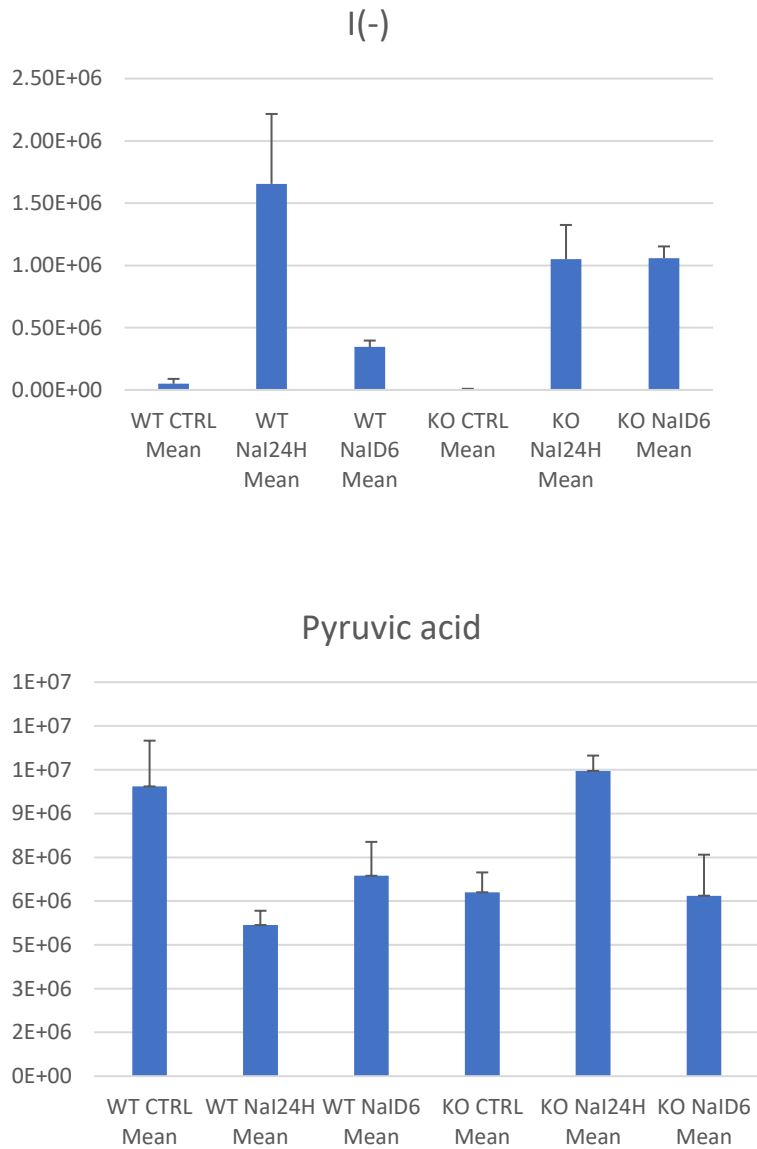
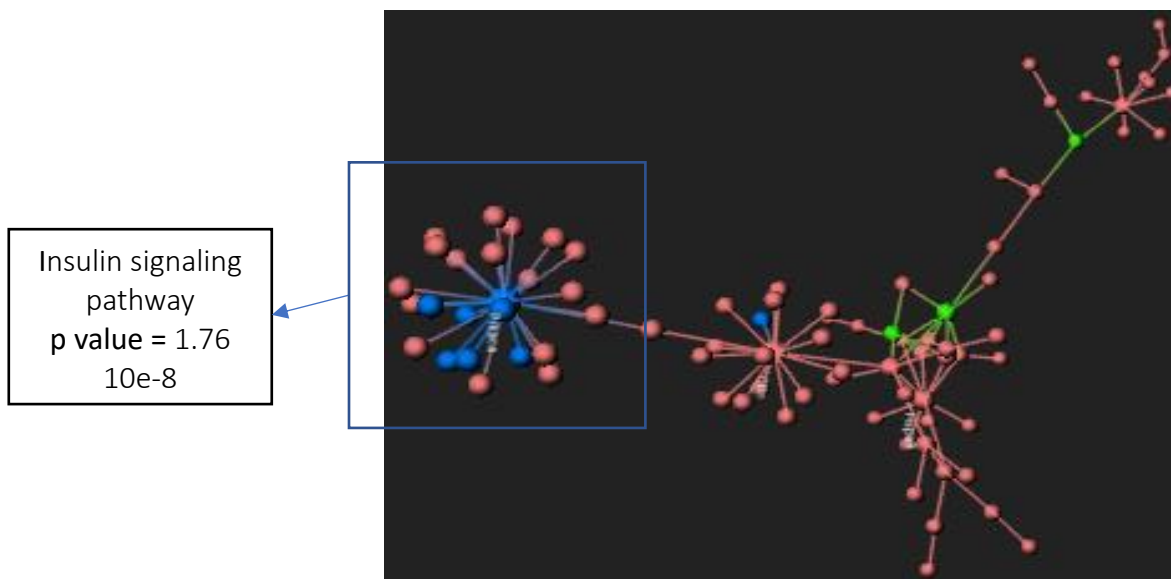
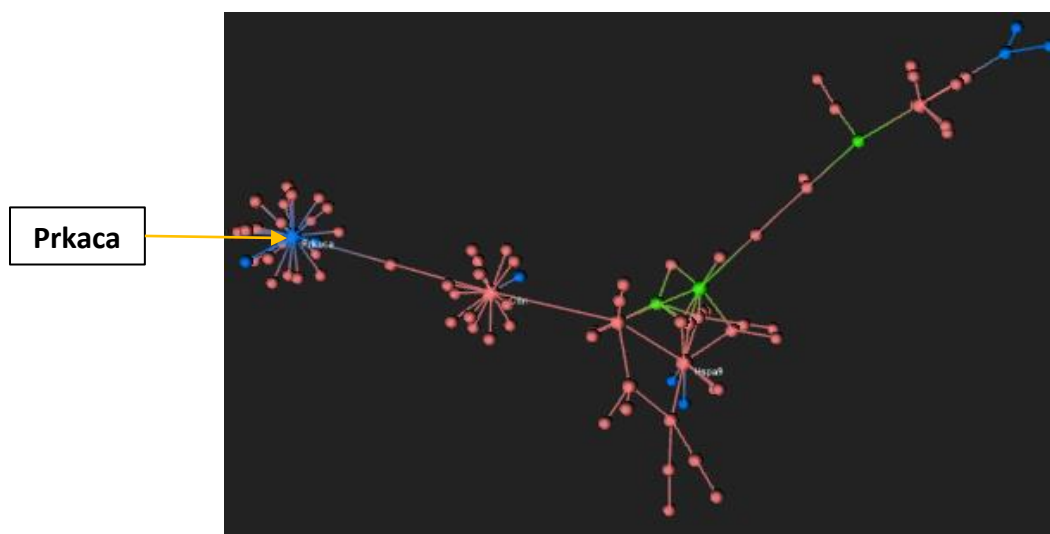


Figure 16. Effect of iodide administration on iodide and pyruvic acid levels in wild type mice (WT) and SLC5A8-deficient mice (KO). Iodide and pyruvic acid are quantified by metabolomic analysis. Concentration of iodide and pyruvic acid are on Y axis, experimental conditions are on X-axis.



MAPK signaling pathway p value =0.00027
Glycolyse p value =0.00195



- Gene/Protein
- Metabolite
- RNA
- Path.Hits molecules

Figure 17 A. First network based on transcriptomic, proteomic and metabolomic data obtained in wild type mice after 1 day of iodide administration compared to those from wild type mice without iodide administration (WTD1 vs WTD0). Integromic analyses were performed with OmicsNet. Significant RNA, proteins and metabolites are involving in Insulin pathway, MAPK signaling and Glycolyse pathway.

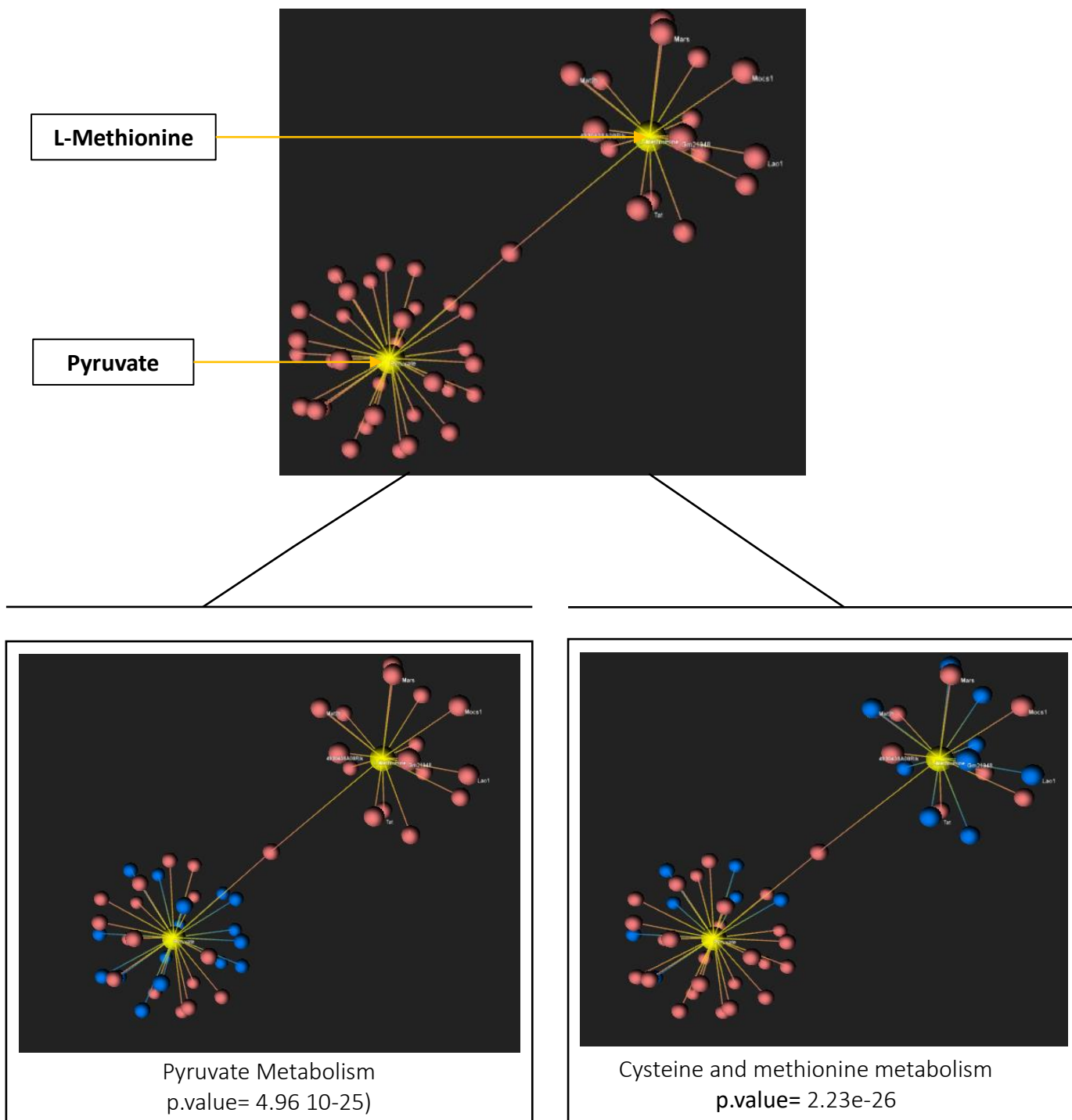


Figure 17 B. Second network based on transcriptomic, proteomic and metabolomic data obtained in wild type mice after 1 day of iodide administration compared to those from wild type mice without iodide administration (WTD1 vs WTD0). Integromic analyses were performed with OmicsNet. Pyruvate metabolite is the main node in pyruvate and Cysteine and methionine metabolism.

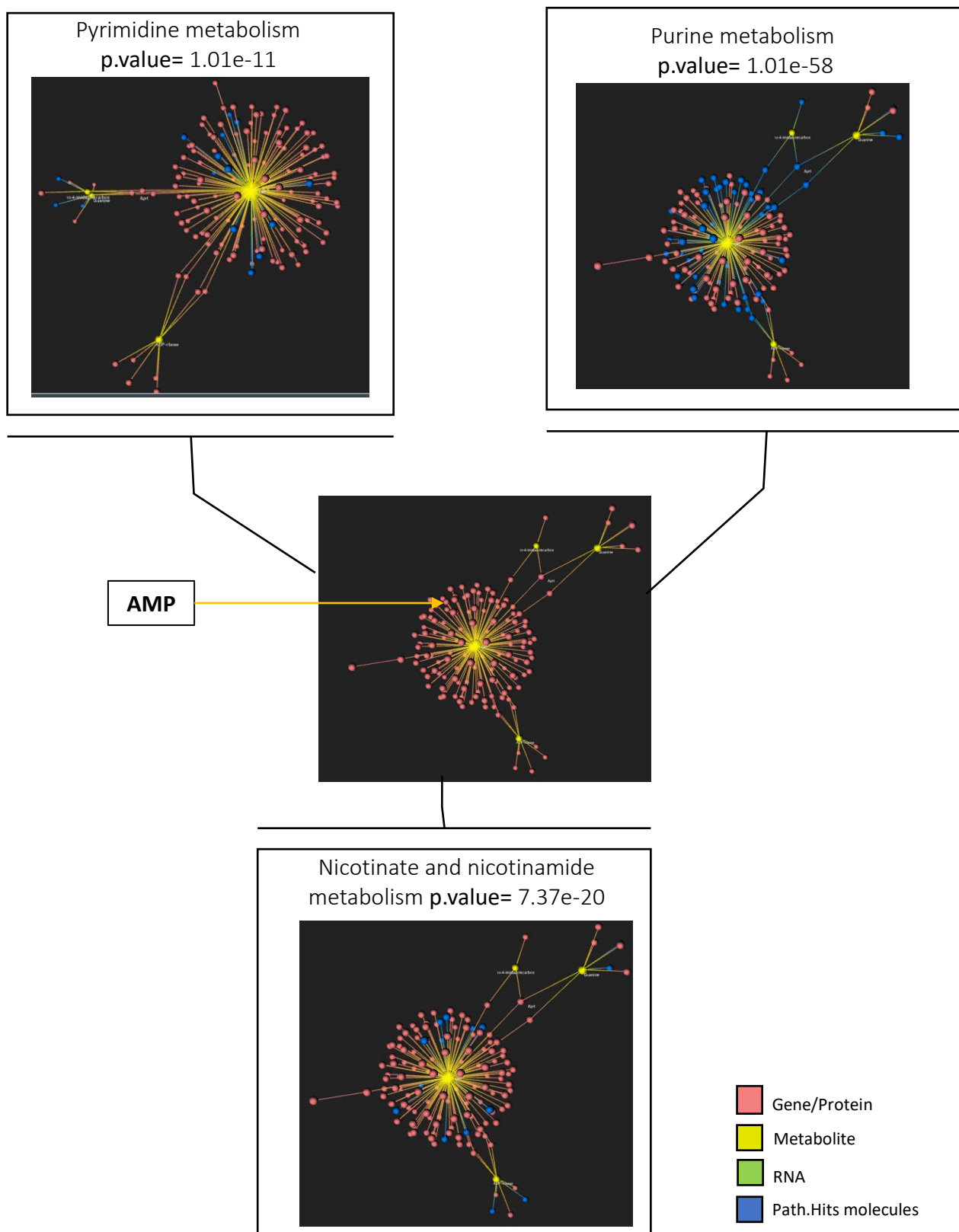
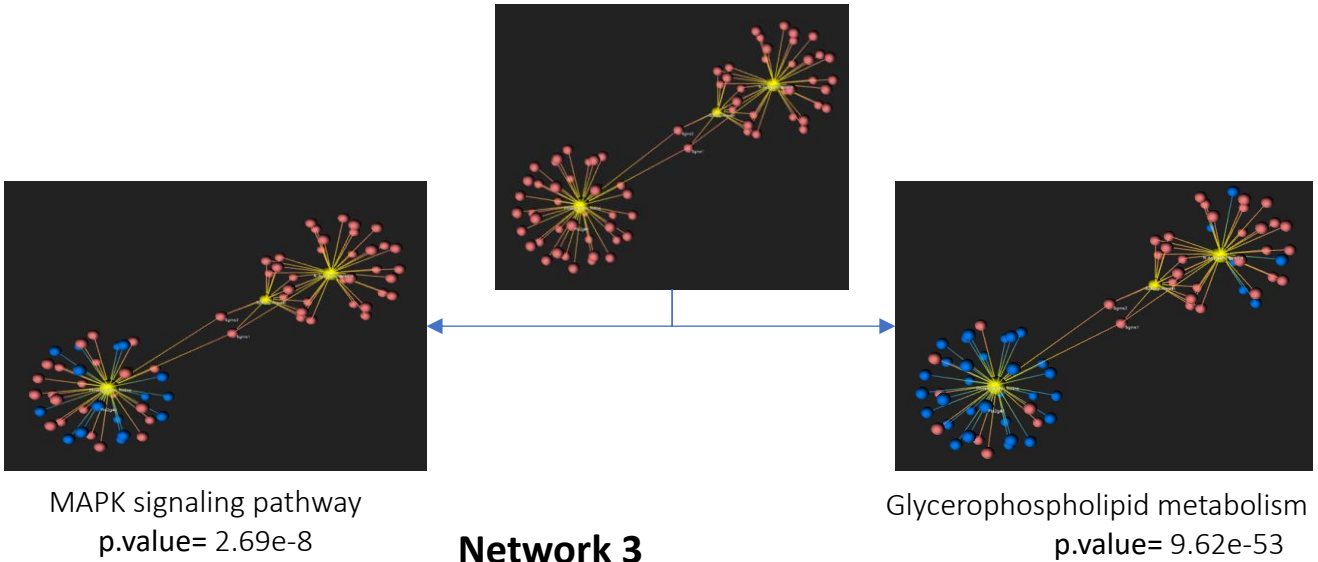
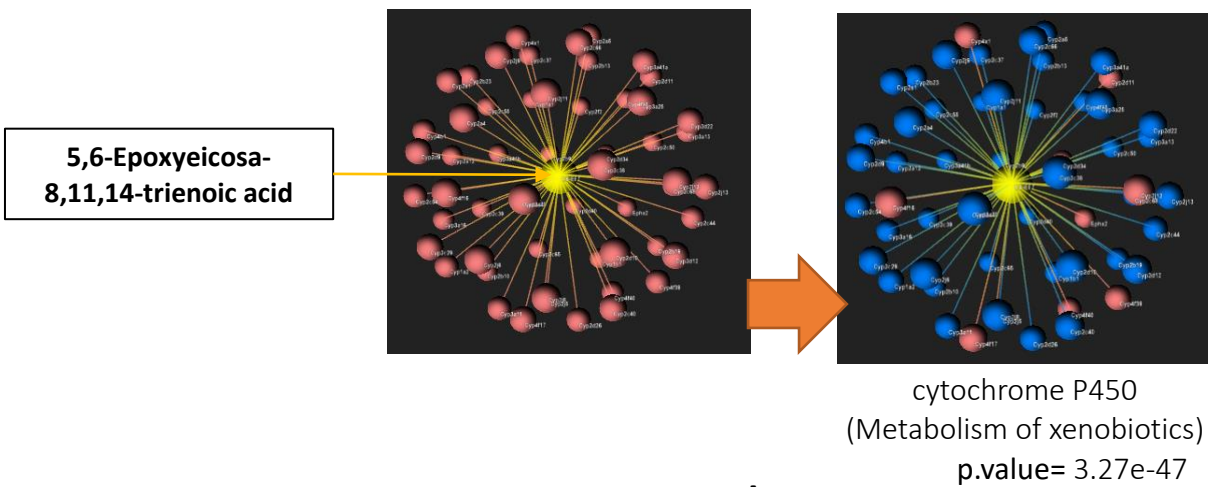


Figure 18 A. First network based on transcriptomic, proteomic and metabolomic data obtained in SLC5A8-deficient mice after 1 day of iodide administration compared to those from SLC5A8-deficient mice without iodide administration (KOD1 vs. KOD0). Integromic analyses were performed with OmicsNet. Three pathways are involving in the omic set data, Pyrimidine metabolism, Purine metabolism and Nicotinate and nicotinamide metabolism.

Network 2



Network 3



Network 4

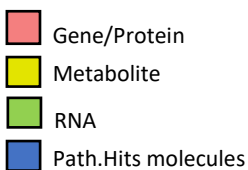
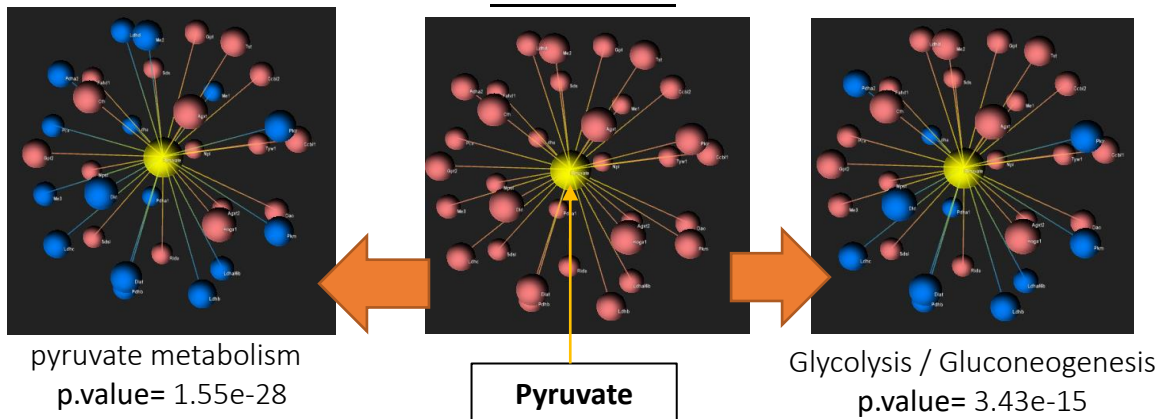
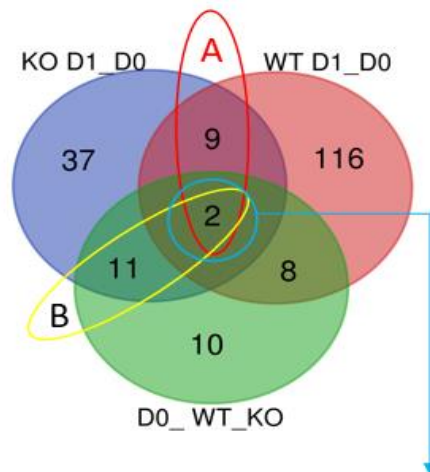


Figure 19 B. 3 networks based on transcriptomic, proteomic and metabolomic data obtained in SLC5A8-deficient mice after 1 day of iodide administration compared to those from SLC5A8-deficient mice without iodide administration (KOD1 vs. KOD0). Integromic analyses were performed with OmicsNet.



Canonical Pathway	p value			z score		
	WT D0_vs_D1	KO D0_vs_D1	D0 KO vs WT	WT D0_vs_D1	KO D0_vs_D1	D0 KO vs WT
GP6 Signaling Pathway	2.232	1.522	1.901	2.646	-0.535	-0.333
Epithelial Adherens Junction Signaling	1.516	1.536	2.113	N/A	N/A	N/A

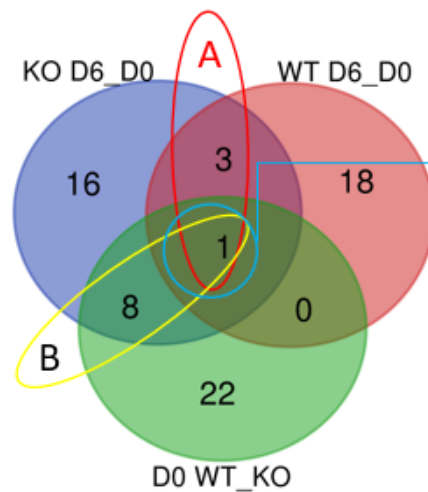
A)

Canonical Pathway	p value		z score	
	WT D0_D1	KO D0_D1	WT D0_D1	KO D0_D1
Role of NFAT in Regulation of the Immune Response	3.10	1.82	-0.63	-1.39
fMLP Signaling in Neutrophils	2.31	1.33	0.38	-0.63
GP6 Signaling Pathway	2.23	1.52	2.65	-0.53
UVA-Induced MAPK Signaling	2.22	1.38	1.00	-1.34
Purine Nucleotides De Novo Biosynthesis II	2.09	1.90	N/A	N/A
Phospholipase C Signaling	1.87	2.44	-0.33	-0.47
Calcium Signaling	1.78	2.98	0.00	0.26
PPAR Signaling	1.67	1.83	2.24	1.73
Epithelial Adherens Junction Signaling	1.52	1.54	N/A	N/A
GDNF Family Ligand-Receptor Interactions	1.46	1.79	0.00	0.00
UVC-Induced MAPK Signaling	1.43	2.26	N/A	-0.38

B)

Canonical Pathway	p value		z score	
	KO_D0_vs_D1	D0 KO vs WT	KO_D0_vs_D1	D0 KO vs WT
Axonal Guidance Signaling	3.644	1.601	N/A	N/A
Cellular Effects of Sildenafil (Viagra)	1.909	1.730	N/A	N/A
CREB Signaling in Neurons	1.319	1.836	-0.577	-0.707
G Beta Gamma Signaling	1.656	1.797	0.905	0.000
Gap Junction Signaling	1.587	1.676	N/A	N/A
Germ Cell-Sertoli Cell Junction Signaling	1.594	2.560	N/A	N/A
GPCR-Mediated Nutrient Sensing in Enteroendocrine Cells	1.501	1.474	1.155	0.378
GP6 Signaling Pathway	1.522	1.901	-0.535	-0.333
Nitric Oxide Signaling in the Cardiovascular System	1.387	1.842	0.000	0.707
Phospholipases	2.730	1.679	N/A	N/A
Role of MAPK Signaling in the Pathogenesis of Influenza	2.282	1.727	N/A	N/A
Epithelial Adherens Junction Signaling	1.536	2.113	N/A	N/A
Sertoli Cell-Sertoli Cell Junction Signaling	1.477	2.011	N/A	N/A

Supplementary data Figure 1 Effect of acute iodide administration and SLC5A8 invalidation thyroid transcriptome pathways of SLC5A8-deficient mice (KO) and wild type mice (WT).



Canonical Pathway	P value			Z score		
	D0 KO vs WT	WT_D0_vs_D6	KO_D0_vs_D6	D0 KO vs WT	WT_D0_vs_D6	KO_D0_vs_D6
GP6 Signaling Pathway	1.90	1.44	6.47	-0.33	N/A	-2.18

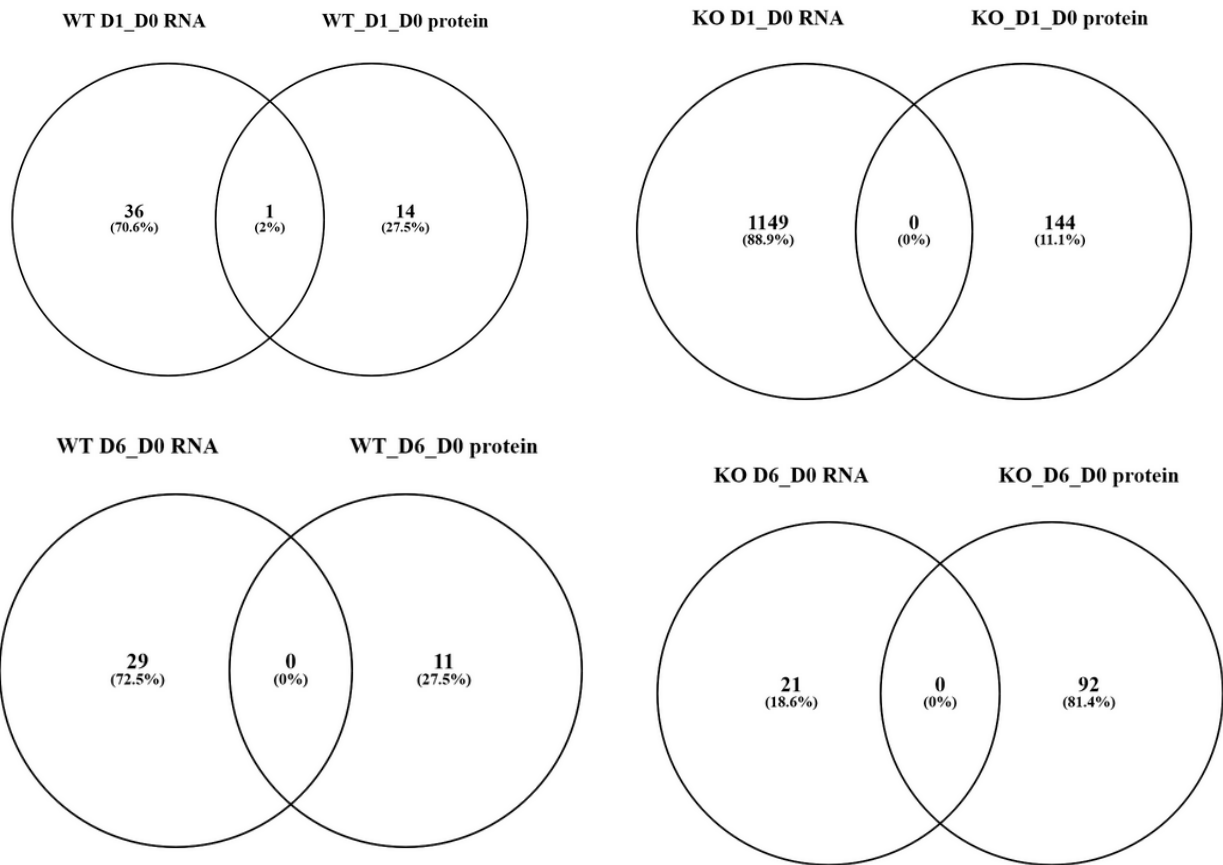
A)

Canonical Pathway	p value		z score	
	WT_D0_vs_D6	KO_D0_vs_D6	WT_D0_vs_D6	KO_D0_vs_D6
GP6 Signaling Pathway	1.44	6.47	N/A	-2.18
Hepatic Fibrosis / Hepatic Stellate Cell Activation	2.06	7.18	N/A	N/A
T Cell Receptor Signaling	2.36	1.88	N/A	N/A
Th2 Pathway	1.35	1.34	0.00	-1.13

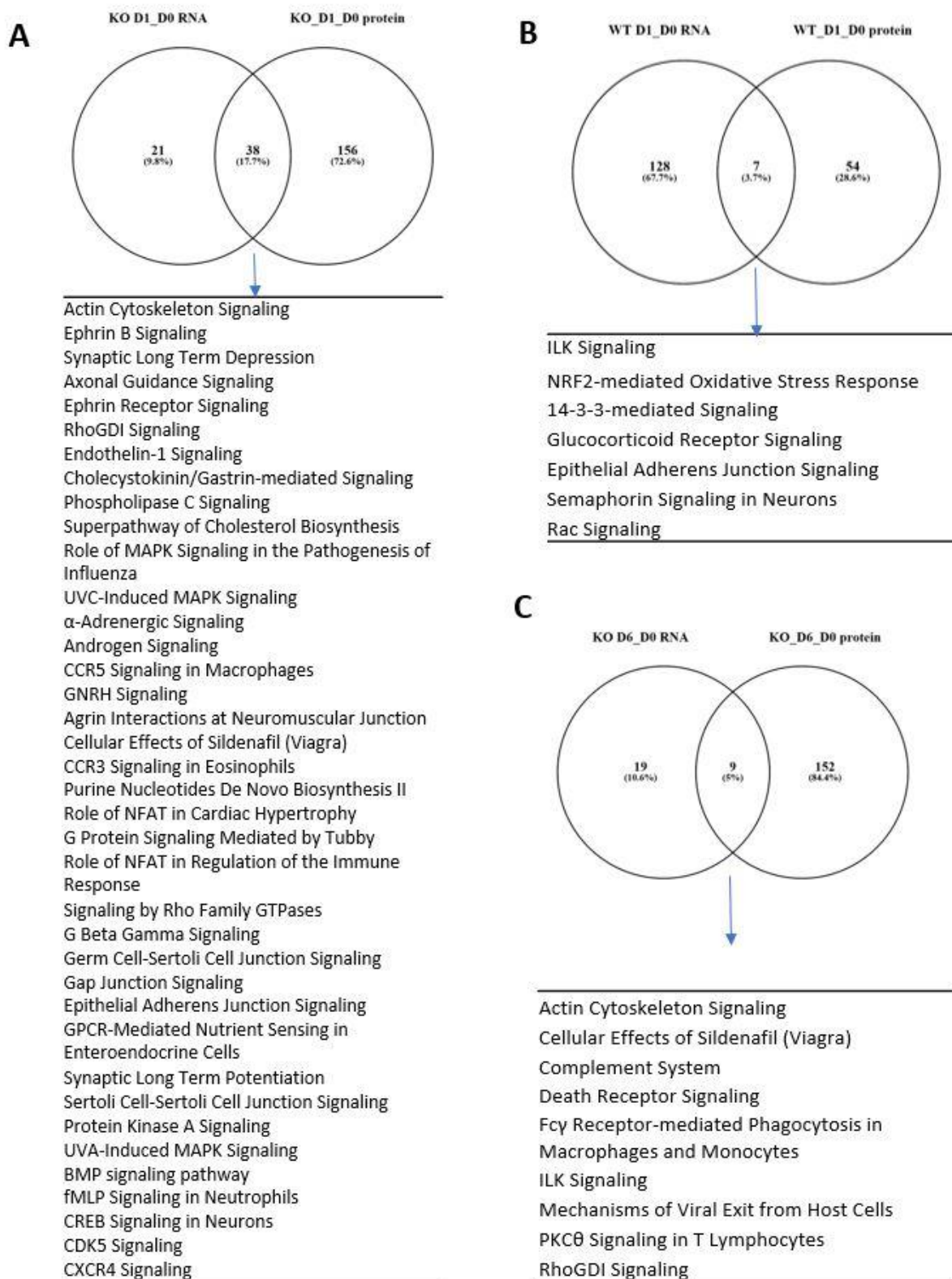
B)

Canonical Pathway	P value		Z score	
	D0 KO vs WT	KO_D0_vs_D6	D0 KO vs WT	KO_D0_vs_D6
Cellular Effects of Sildenafil (Viagra)	1.73	2.24	N/A	N/A
Death Receptor Signaling	1.72	2.34	0.38	-0.33
Epithelial Adherens Junction Signaling	2.11	1.30	N/A	N/A
Germ Cell-Sertoli Cell Junction Signaling	2.56	1.64	N/A	N/A
GP6 Signaling Pathway	1.90	6.47	-0.33	-2.18
ILK Signaling	2.44	1.54	-0.58	-1.73
Phospholipases	1.68	1.42	N/A	N/A
PI3K Signaling in B Lymphocytes	1.92	1.52	-0.33	-1.67
Remodeling of Epithelial Adherens Junctions	1.42	1.66	N/A	N/A

Supplementary data Figure2 Effect of chronic iodide administration and SLC5A8 invalidation thyroid transcriptome pathways of SLC5A8-deficient mice (KO) and wild type mice (WT).



Supplementary data Figure3 Effect of chronic iodide administration and SLC5A8 invalidation thyroid transcriptome and proteome of SLC5A8-deficient mice (KO) and wild type mice (WT). No correlation were observed between proteomic and transcriptomic results.



Supplementary data Figure 4 Comparing IPA analysis : Effect of chronic iodide administration and SLC5A8 invalidation thyroid transcriptome and proteome modified pathways of SLC5A8-deficient mice (KO) and wild type mice (WT). No correlation were observed between proteomic and transcriptomic results of wild type mice (WT) after 6days iodide administration

References

1. Rodriguez, A. M., Perron, B., Lacroix, L., Caillou, B., Leblanc, G., Schlumberger, M., Bidart, J. M., and Pourcher, T. (2002) Identification and characterization of a putative human iodide transporter located at the apical membrane of thyrocytes. *J Clin Endocrinol Metab* **87**, 3500-3503
2. Li, H., Myeroff, L., Smiraglia, D., Romero, M. F., Pretlow, T. P., Kasturi, L., Lutterbaugh, J., Rerko, R. M., Casey, G., Issa, J. P., Willis, J., Willson, J. K., Plass, C., and Markowitz, S. D. (2003) SLC5A8, a sodium transporter, is a tumor suppressor gene silenced by methylation in human colon aberrant crypt foci and cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8412-8417
3. Coady, M. J., Chang, M. H., Charron, F. M., Plata, C., Wallendorff, B., Sah, J. F., Markowitz, S. D., Romero, M. F., and Lapointe, J. Y. (2004) The human tumour suppressor gene SLC5A8 expresses a Na⁺-monocarboxylate cotransporter. *J Physiol* **557**, 719-731
4. Gopal, E., Fei, Y. J., Sugawara, M., Miyauchi, S., Zhuang, L., Martin, P., Smith, S. B., Prasad, P. D., and Ganapathy, V. (2004) Expression of slc5a8 in kidney and its role in Na⁽⁺⁾-coupled transport of lactate. *J Biol Chem* **279**, 44522-44532
5. Miyauchi, S., Gopal, E., Fei, Y. J., and Ganapathy, V. (2004) Functional identification of SLC5A8, a tumor suppressor down-regulated in colon cancer, as a Na⁽⁺⁾-coupled transporter for short-chain fatty acids. *J Biol Chem* **279**, 13293-13296
6. Gupta, N., Martin, P. M., Prasad, P. D., and Ganapathy, V. (2006) SLC5A8 (SMCT1)-mediated transport of butyrate forms the basis for the tumor suppressive function of the transporter. *Life Sci* **78**, 2419-2425

7. Frank, H., Groger, N., Diener, M., Becker, C., Braun, T., and Boettger, T. (2008) Lactaturia and loss of sodium-dependent lactate uptake in the colon of SLC5A8-deficient mice. *J Biol Chem* **283**, 24729-24737
8. Pisarev, M. A. (1985) Thyroid autoregulation. *J Endocrinol Invest* **8**, 475-484
9. Dayem, M., Navarro, V., Marsault, R., Darcourt, J., Lindenthal, S., and Pourcher, T. (2006) From the molecular characterization of iodide transporters to the prevention of radioactive iodide exposure. *Biochimie* **88**, 1793-1806
10. Morton, M. E., Chaikoff, I. L., and Rosenfeld, S. (1944) Inhibiting effect of inorganic iodide on the formation in vitro of thyroxine and diiodotyrosine by surviving thyroid tissue. *J Biol Chem* **174**, 555-564
11. Wolff, J., and Chaikoff, I. L. (1948) Plasma inorganic iodide as a homeostatic regulator of thyroid function. *J Biol Chem* **174**, 555-564
12. Wolff, J., Chaikoff, I. L., and et al. (1949) The temporary nature of the inhibitory action of excess iodine on organic iodine synthesis in the normal thyroid. *Endocrinology* **45**, 504-513, illust
13. Raben, M. S. (1949) The paradoxical effect of thiocyanate and of thyrotropin on the organic binding of iodine by the thyroid in the presence of large amounts of iodide. *Endocrinology* **45**, 296-304
14. Eng, P. H., Cardona, G. R., Fang, S. L., Previti, M., Alex, S., Carrasco, N., Chin, W. W., and Braverman, L. E. (1999) Escape from the acute Wolff-Chaikoff effect is associated with a decrease in thyroid sodium/iodide symporter messenger ribonucleic acid and protein. *Endocrinology* **140**, 3404-3410
15. Rossich, L. E., Thomasz, L., Nicola, J. P., Nazar, M., Salvarredi, L. A., Pisarev, M., Masini-Repiso, A. M., Christophe-Hobertus, C., Christophe, D., and Juvenal, G. J.

- (2016) Effects of 2-ikkkkjkkkodohehexadecanal in the physiology of thyroid cells. *Mol Cell Endocrinol* **437**, 292-301
16. Vitale, M., Di Matola, T., D'Ascoli, F., Salzano, S., Bogazzi, F., Fenzi, G., Martino, E., and Rossi, G. (2000) Iodide excess induces apoptosis in thyroid cells through a p53-independent mechanism involving oxidative stress. *Endocrinology* **141**, 598-605
 17. Leoni, S. G., Kimura, E. T., Santisteban, P., and De la Vieja, A. (2011) Regulation of thyroid oxidative state by thioredoxin reductase has a crucial role in thyroid responses to iodide excess. *Mol Endocrinol* **25**, 1924-1935
 18. Yao, X., Li, M., He, J., Zhang, G., Wang, M., Ma, J., Sun, Y., Zhang, W., and Li, L. (2012) Effect of early acute high concentrations of iodide exposure on mitochondrial superoxide production in FRTL cells. *Free Radic Biol Med* **52**, 1343-1352
 19. Serrano-Nascimento, C., da Silva Teixeira, S., Nicola, J. P., Nachbar, R. T., Masini-Repiso, A. M., and Nunes, M. T. (2014) The acute inhibitory effect of iodide excess on sodium/iodide symporter expression and activity involves the PI3K/Akt signaling pathway. *Endocrinology* **155**, 1145-1156
 20. Wang, T., Liang, X., Abeysekera, I. R., Iqbal, U., Duan, Q., Naha, G., Lin, L., and Yao, X. (2017) Activation of the Nrf2-Keap 1 Pathway in Short-Term Iodide Excess in Thyroid in Rats. *Oxid Med Cell Longev* **2017**, 4383652
 21. Holman, J. D., Tabb, D. L., and Mallick, P. (2014) Employing ProteoWizard to Convert Raw Mass Spectrometry Data. *Current protocols in bioinformatics* **46**, 13 24 11-19
 22. Pluskal, T., Castillo, S., Villar-Briones, A., and Oresic, M. (2010) MZmine 2: modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics* **11**, 395

23. Xia, J., and Wishart, D. S. (2016) Using MetaboAnalyst 3.0 for Comprehensive Metabolomics Data Analysis. *Current protocols in bioinformatics* **55**, 14 10 11-14 10 91
24. Poncin, S., Gerard, A. C., Boucquey, M., Senou, M., Calderon, P. B., Knoops, B., Lengele, B., Many, M. C., and Colin, I. M. (2008) Oxidative stress in the thyroid gland: from harmlessness to hazard depending on the iodine content. *Endocrinology* **149**, 424-433
25. Holmgren, A., Johansson, C., Berndt, C., Lonn, M. E., Hudemann, C., and Lillig, C. H. (2005) Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems. *Biochem Soc Trans* **33**, 1375-1377
26. Corvilain, B., Collyn, L., van Sande, J., and Dumont, J. E. (2000) Stimulation by iodide of H₂O₂ generation in thyroid slices from several species. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **278**, E692-699

Partie 3 : Discussions & Perspectives

Discussions et Perspectives

L'essor actuel des méthodes analytiques à haute résolution résulte du développement des nouvelles méthodes et des progrès technologiques réalisés ces dernières années. L'amélioration des techniques de séparation, l'augmentation de la vitesse de séquençage et l'enrichissement des banques des données ont permis de révolutionner les approches classiques en biologie.

Ces méthodes « omiques » ont ouvert un nouveau champ d'investigation qui permet de comprendre les mécanismes biologiques.

Lors de cette étude nous avons eu recours, en premier, à une approche protéomique globale quantitative par à un marquage isotopique TMT (Thompson, Schäfer, *et al.*, 2003) qui implique le regroupement des échantillons avant l'analyse en spectrométrie de masse. Ce type d'approche comprend une analyse simultanée des nombreuses espèces peptidiques dans une même fenêtre de temps, l'analyse est principalement axée sur la fragmentation des formes majoritaires au détriment d'autres peptides pouvant provenir d'espèces minoritaires ce qui représente une des principales limites de la méthode. La quantification sans marquage, dans laquelle les échantillons peptidiques sont analysés séparément, peut conduire à une plus grande couverture et augmenter de 20% le nombre de protéines identifiées, cependant elle nécessite de nombreux réplicats biologiques pour obtenir une information quantitative (Bantscheff *et al.*, 2007; Thakur *et al.*, 2011).

Cette approche protéomique peut être complétée par d'autres approches globales, notamment le séquençage ARN à haut débit nouvelle génération.

Cette technique présente l'avantage majeur par rapport à la protéomique, de permettre d'obtenir des informations sur tous les gènes exprimés. Ainsi, dans une deuxième partie de cette thèse, j'ai combiné les deux approches pour étudier le rôle de la protéine SLC5A8 dans la thyroïde.

Les deux approches sont différentes de la génomique. Elles étudient une dynamique à un instant donné tandis que la génomique étudie un phénomène statique. En outre, à la suite de la régulation de la traduction et d'un épissage différent des ARNm et l'ajout de modification post traductionnelles des protéines, un même génome peut produire des protéomes avec de fortes différences.

Les données issues de la transcriptomique sont ainsi également utilisées pour identifier des sites d'épissage alternatif ou autres modifications post transcriptionnelles. Cette technique permet de détecter du polymorphisme génétique, ou encore quantifier les changements de niveaux d'expression de chaque transcrit dans différentes conditions environnementales

Nos travaux de corrélation entre les données de protéomiques et les données de transcriptomiques ont montré très peu de similitudes au niveau des comparaisons entre les transcrits identifiés comme variants et les protéines exprimées différemment, ceci suggère l'importance d'autres mécanismes impliqués dans la réponse à l'iode comme des effets possibles sur la traduction des protéines, sur leur stabilité ou des modifications post-traductionnels. Néanmoins, nous avons constaté une similitude dans les voies impliquées dans la réponse de l'iode dans le cas des souris invalidés SLC5A8.

Plusieurs études se sont intéressées à la corrélation entre les résultats de la transcriptomique et de la protéomique, l'une des premières fut menée par Ruedi Aebersold en 1999, qui s'est intéressé à comparer chez *Saccharomyces cerevisiae* (Patterson and Aebersold, 2003). Cette étude a mis en évidence la difficulté à utiliser des données quantitatives obtenus par transcriptomiques pour prédire les niveaux d'expression protéique.

Une étude portant sur le cycle cellulaire de *Prochlorococcus*, a conclu que la divergence entre les niveaux d'expression des protéines et les ARNm, divergent significativement. Ces résultats peuvent être expliqués par les différents mécanismes de régulation post transcriptomique (Waldbauer *et al.*, 2012). D'autres études, ont mis en évidence des corrélations paradoxales, telle que l'étude de *Saccharomyces cerevisiae* dans un environnement de stress osmolaire (Lee *et al.*, 2011) : les gènes qui sont activés sont fortement corrélés à une augmentation de l'expression des protéines relatifs, mais cela ne s'appliquait pas aux gènes inhibés. En revanche, dans le cas d'un stress oxydatif, une forte régulation post transcriptionnelle a été notée indépendamment des activations ou inhibitions des protéines (Vogel, Silva and Marcotte, 2011). En outre, une récente étude s'intéressant au vieillissement chez le rat et combinant des approches omiques, a conclu d'une différence de niveaux de corrélation en fonction de l'organe étudié (Ori *et al.*, 2015).

Ces différentes observations renforcent l'importance d'une approche multidimensionnelle. Les mécanismes paraissent dirigés du génome au métabolome, en passant par le transcriptome et le protéome. Cette relation s'avère, en réalité, beaucoup plus complexe avec des régulations plus ou moins directes de certains métabolites sur la transcription et la régulation des transcrits.

Outre l'importance d'une approche multidimensionnelle, un des défis majeurs des méthodes omiques, demeure le traitement bio-informatique et la qualité des données. Ces techniques génèrent beaucoup de données et même si les outils existants sont déjà efficaces. Ils nécessitent une évaluation objective sur la qualité de ses données, il est ainsi important de considérer que des faux négatifs sont inhérents à tous types de données biologiques. Il est nécessaire d'accorder de l'importance à la qualité des données et de développer de nouvelles méthodes d'analyse et/ou d'affiner les méthodes existantes.

La compréhension des mécanismes moléculaires permet de développer de nouvelles stratégies qu'elle soit dans un but curatif ou préventif. Dans ce cadre, afin de comprendre les mécanismes moléculaires régissant le processus physiologique du Wolff-Chaikoff, qui se déclenche dans le cas d'un apport élevé en iode, nous avons entrepris deux études. Une première, portant sur les mécanismes induits par un agent de contraste, longtemps considéré comme étant le même mécanisme du Wolff-Chaikoff et une deuxième étudiant l'effet de l'inactivation de SLC5A8 dans la thyroïde.

Nos résultats révèlent l'importance du métabolisme énergétique dans la réponse aiguë dans la régulation thyroïdienne par l'iode, et du stress oxydatif déclenché par l'apport de l'iode. Nous avons observé des voies redondantes dans les différentes analyses de voies de signalisation dont la voie PI3K/AKT, mTOR ainsi que les voies impliquant ERK/MAPK. Ces données-là confirment des précédents résultats décrits dans la thyroïde impactant la régulation du NIS dans le cadre d'un apport aiguë de l'iode (Jung *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2010; Alejandro A Arriagada *et al.*, 2015; Serrano-Nascimento *et al.*, 2016).

Nos données mettent aussi en évidence l'implication du métabolisme énergétique cellulaire tel que le cycle du Citrate, la glycolyse, la phosphorylation oxydative et la synthèse des AMP dans la réponse aiguë du Wolff Chaikoff.

Par ailleurs, nos résultats obtenus chez le modèle invalidé pour le gène codant SLC5A8 en présence d'iode comparé au modèle invalidé non exposé, mettent notamment une variation dans la teneur de l'iode interne observé par notre analyse par approche métabolomique. Nos observations révèlent des profils omiques après administration d'un excès d'iode entre les souris invalidées pour le gène codant SLC5A8 et les souris contrôles. L'iode induirait aussi une diminution de la phosphorylation oxydative via une réduction de l'expression de plusieurs enzymes mitochondriales. Nous avons également observé que l'iode module la réponse au stress oxydatif par la voie Nrf2.

NRF2 est un facteur de transcription dont l'activation a déjà été décrite dans le cas d'une réponse à un apport aiguë d'iode (Wang *et al.*, 2017). Il est impliqué dans le processus de protection contre les stress oxydatif engendrée par la présence des radicaux libres. Ces radicaux sont générés lors de l'absorption de l'iode, son oxydation et son organification (Karbownik and Lewinski, 2003).

Ces résultats nous suggèrent l'implication de SLC5A8 dans la réponse à un stress oxydatif dans la thyroïde en jouant un rôle de protection. Afin de confirmer, en premier lieu, ces observations, il est important d'effectuer des dosages de radicaux libres et d'évaluer l'abondance des protéines relatives à ses voies ou d'évaluer le stress oxydatif chez ce modèle de souris par des approches classiques de biochimie analytique comme un dosage enzymatique.

Une autre analyse du protéome globale pourrait être envisagée mais en SRM en sélectionnant les protéines d'intérêt qui correspondent à des enzymes clefs de ces voies de signalisation.

Le passage du glucose dans le follicule nécessite la présence d'un transporteur de glucose qui permettrait le passage du glucose du colloïde vers la cellule folliculaire. Ainsi, en second lieu, Nous pouvons envisager la recherche d'un transporteur de glucose et de suivre sa métabolisation jusqu'à sa transformation en pyruvate. Cette approche nous permettrait de mieux caractériser ce transporteur hypothétique.

Ce travail de thèse améliore la compréhension des mécanismes sous-jacents au Wolff-Chaikoff dans la thyroïde mais une validation complémentaire et une caractérisation des effets et voies identifiées demeure nécessaire. Une amélioration de l'analyse protéomique à travers un fractionnement globale préalable en amont ou un enrichissement en se basant sur le compartiment cellulaire par isolation des protéines cytoplasmiques des protéines membranaires permet d'augmenter la couverture et l'ionisation des peptides. Il est aussi possible d'enrichir le phosphoprotéome en utilisant des kits qui permettent de mieux étudier ces modifications qui sont impactées par le traitement à l'iode selon nos résultats. Afin d'outrepasser la problématique de la quantification en TMT en MS2, une MS3 pourrait être appliquée pour avoir une meilleure quantification des peptides.

Cette étude multiomique met en évidence le rôle de SLC5A8 dans cet organe et son effet sur la voie NRF2/Keap. Cependant, le mécanisme d'action reste à explorer.

De même, très peu de similitude ont été observées entre le mécanisme induit par l'iode (effet Wolff-Chaikoff) et celui induit par l'agent de contraste (ICM) testé. Ce résultat a permis de

confirmer notre hypothèse sur la différence entre les deux inductions. Néanmoins quelques voies de signalisation sont communes pouvant éventuellement expliquer l'inhibition du NIS par l'ICM. Les voies de signalisation exclusives à la réponse de l'agent de contraste sont des voies à étudier plus en détails car elles pourraient apporter les informations sur les mécanismes d'inhibition de longue durée de ce composé. Identifier ces voies permettrait de mettre au point une potentielle application innovante en radioprotection.

Aujourd'hui, de nombreuses recherches s'orientent vers les méthodes omiques puisqu'elles permettent un gain de temps considérable dans la compréhension des mécanismes. Elles révèlent le dysfonctionnement, la dégradation, l'activation ou l'inactivation, le changement du niveau d'expression, ou du niveau de modifications post-traductionnelles d'une ou de plusieurs protéines.

Aujourd'hui, l'enjeu majeur de ces approches réside dans leur capacité de transformer la quantité de données acquises en une réponse à une question biologique.

Annexes

Résumé

Contexte

Les effets du mode d'administration de l'iode, de l'injection de TSH recombinante humaine (rhTSH) ou d'un régime pauvre en iode (LID) sur la capacité d'absorption de cet élément par la thyroïde, ont été évalués par Imagerie Micro SPECT/CT chez des souris traitées au T3 en les comparant à des animaux contrôles.

Résultats

L'administration de l'iode radioactif par voie systémique entraîne une capacité de captation plus importante de l'iode dans la thyroïde par rapport à une administration par voie orale. Cette captation a été évaluée à 2,35 fois plus importante par rapport aux souris ayant un régime alimentaire normo iodé (NID).

L'administration par voie systémique des souris soumises à un régime LID a montré une augmentation de la captation deux fois plus importante pouvant atteindre un niveau 5 fois plus élevé comparé à une absorption d'iode d'une souris sous un régime NID et ayant reçu de l'iode radioactif par la même voie.

L'injection de rhTSH induit une stimulation de l'activité thyroïdienne des souris traitées T3 et sous régime NID.

La combinaison d'un régime LID et d'un traitement rhTSH des souris traitées T3 entraîne une absorption 2,8 fois supérieure par rapport aux souris NID/T3/rhTSH.

Conclusion

L'administration par voie systémique de l'iode radioactif entraîne une captation plus importante d'iode radioactif au niveau de la thyroïde comparé à une administration orale, cet effet est encore plus important chez les souris sous régime LID.

Ces observations pourraient être appliquée en clinique, dans les examens médicaux des patients atteints d'un cancer différencié et qui sont traités à la T3, en effet un régime LID pourrait améliorer l'efficacité du traitement par rhTSH.

Single-Photon Emission Computed Tomography for Preclinical Assessment of Thyroid Radioiodide Uptake Following Various Combinations of Preparative Measures

Colette Zwarthoed,^{1,2,3,*} Kaouther Chatti,^{1,2,*} Julien Guglielmi,^{1,2} Maha Hichri,^{1,2} Cathy Compin,^{1,2} Jacques Darcourt,^{1,2,3} Georges Vassaux,^{1,2} Danielle Benisvy,³ Thierry Pourcher,^{1,2} and Béatrice Cambien^{1,2}

Background: MicroSPECT/CT imaging was used to quantitatively evaluate how iodide uptake in the mouse thyroid is influenced by (i) route of iodine administration; (ii) injection of recombinant human thyrotropin (rhTSH); and (iii) low iodide diet (LID) in euthyroid and triiodothyronine (T3)-treated mice.

Methods: Pertechnetate ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) and ^{123}I thyroid uptake in euthyroid and T3-treated animals fed either a normal-iodine diet (NID) or an LID, treated or not with rhTSH, and radiotracer administered intravenously, subcutaneously, intraperitoneally or by gavage, were assessed using microSPECT/CT imaging. Western blotting was performed to measure sodium/iodide symporter expression levels in the thyroid.

Results: Systemic administration of radioiodide resulted in a higher (2.35-fold in NID mice) accumulation of iodide in the thyroid than oral administration. Mice fed LID with systemic radioiodide administration showed a further two-fold increase in thyroid iodide uptake to yield a ~5-fold increase in uptake compared to the standard NID/oral route. Although rhTSH injections stimulated thyroid activity in both euthyroid and T3-treated mice fed the NID, uptake levels for T3-treated mice remained low compared with those for the euthyroid mice. Combining LID and rhTSH in T3-treated mice resulted in a 2.8-fold higher uptake compared with NID/T3/rhTSH mice and helped restore thyroid activity to levels equivalent to those of euthyroid animals.

Conclusions: Systemic radioiodide administration results in higher thyroidal iodide levels than oral administration, particularly in LID-fed mice. These data highlight the importance of LID, both in euthyroid and T3-treated, rhTSH-injected mice. Extrapolated to human patients, and in the context of clinical guidelines for the preparation of differentiated thyroid cancer patients, our data indicate that LID can potentiate the efficacy of rhTSH treatment in T3-treated patients.

Introduction

THE USE OF RADIOACTIVE IODINE (^{131}I) to treat hyperthyroidism or differentiated thyroid carcinoma was first reported in the 1940s (1,2). In current clinical practice, ^{131}I is used routinely as an adjuvant treatment for differentiated thyroid carcinoma (DTC). Radioiodine therapy (RAIT) is mainly used for remnant ablation, adjuvant therapy after surgery, or to treat persistent disease. To optimize RAIT efficiency and guarantee a high serum thyrotropin (TSH) level, the European Association of Nuclear Medicine (3) and the American Thyroid Association (4) guidelines suggest two strategies for patient preparation. The first method involves

thyroid hormone withdrawal, which may increase the risk of hypothyroidism and can be associated with physical and psychological morbidity. The second, and more recent, method is based on the administration of recombinant human TSH (rhTSH), which has been approved for radioiodine ablation. The rhTSH method is generally better tolerated than hormone withdrawal.

Additional factors may affect RAIT efficacy. Dietary iodine restriction can be used to increase radioiodine uptake and possibly improve the efficiency of ^{131}I therapy, especially in the context of hormone withdrawal (5). The route of iodine administration (oral or intravenous) might also influence bioavailability and therefore uptake by target organs (6,7).

¹Laboratory of Transporters, Imaging, Radiotherapy in Oncology, Unité Mixte de Recherche E4320, Institut de Biosciences et Biotechnologies, CEA, Nice, France.

²Université de Nice–Sophia Antipolis, Nice, France.

³Department of Nuclear Medicine, Centre Antoine Lacassagne, Nice, France.

*These authors contributed equally to this work.

According to American Thyroid Association recommendations, dietary iodine restriction for patients receiving hormone replacement therapy is considered to be a weak recommendation with “low-quality evidence” (4) due to insufficient preclinical and clinical evidence on the impact of dietary iodine before RAIT treatment. To our knowledge, only one clinical study has explored RAIT and iodine restriction together (8), but only the urinary iodine-to-creatinine ratio was examined and no quantitative analysis of thyroid iodine uptake was performed. Data concerning the route of iodine administration are also limited and the results are controversial. A recent study performed in rats suggested that oral administration favors radioactive iodine uptake by the thyroid over the intravenous route (6), whereas some clinical data suggest that both routes have equal treatment efficacy (7).

In a clinical setting, assessing the impact of various combinations of preparative measures to treat differentiated thyroid cancer (DTC), including dietary iodine, hormone replacement therapy, rhTSH treatment, and intravenous iodine administration, is complex. With the development of dedicated high-resolution small-animal scanners, functional thyroid imaging can now be performed in rodents and these images can provide quantitative information on thyroid uptake under different experimental conditions. For instance, micro single-photon emission computed tomography (microSPECT/CT) imaging of mice was used to define the radiation dose required to induce thyroid stunning (9). Moreover, radiotracers such as ^{99m}Tc pertechnetate ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) or ^{123}I can be useful to refine imaging analyses. Both radiotracers are detectable using SPECT and are taken up by the thyroid and other organs that express the sodium iodide symporter (NIS) (10). However, unlike ^{123}I , $^{99m}\text{TcO}_4^-$ is not covalently bound to thyroglobulin and therefore can be used as an iodide uptake marker (11).

The aim of this preclinical study was to use microSPECT/CT imaging to determine the influence of the administration route of either $^{99m}\text{TcO}_4^-$ or ^{123}I on biodistribution, and to measure how different dietary iodide intake and recombinant human TSH (rhTSH) affects euthyroid and triiodothyronine (T3)-treated mice. Considering the lack of clinically relevant DTC animal models, we performed these experiments with mice, which are reported to have a similar NIS expression pattern to that of humans (12–14).

Materials and Methods

Animals

Female, eight-week-old C57B/6J mice were obtained from Janvier. Animal housing and procedures were conducted according to French Agriculture Ministry guidelines and were approved by the local ethics committee (Ciepal NCE/2014-211).

Animal study protocols

To determine the influence of dietary iodide intake and the route of radiotracer administration, animals were fed either a normal-iodide diet (NID, around $1\ \mu\text{g}$ iodide per day) or a low-iodide diet (LID $<0.01\ \mu\text{g}$ iodide per day) for 11 days. For T3 treatment, T3 at a final concentration of $3\ \mu\text{g}/\text{mL}$ was added to the drinking water, which was available to animals *ad libitum*. The various experimental protocols used in this study are summarized in Figure 1.

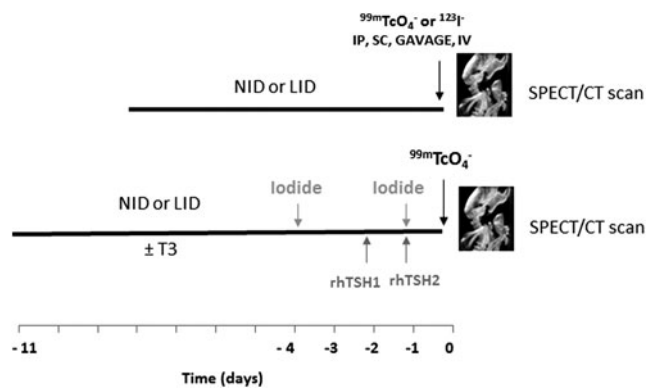


FIG. 1. Study protocols. (A) Mice were fed either the normal-iodide diet (NID) or low-iodide diet (LID) for 8 days and radiotracer ($^{99m}\text{TcO}_4^-$ or $^{123}\text{I}^-$) was administered intraperitoneally (IP), subcutaneously (SC), intravenously (IV), or by gavage at time zero of the kinetic measurements. Animals were then anesthetized, positioned on the scanner, and data were acquired. (B) Mice were fed either the NID or LID and treated with T3 (triiodothyronine) for 11 days. Sodium iodide was administered by IP injection at day -4 ($0.5\ \text{mg}$) or day -1 ($10\ \mu\text{g}$). Recombinant human thyrotropin (rhTSH) injections were given on two consecutive days (at days -2 and -1). Radiotracer ($^{99m}\text{TcO}_4^-$ or $^{123}\text{I}^-$) was administered by IP at day 0, which corresponds to time zero of the kinetic measurements. Animals were then anesthetized, positioned on the scanner, and data were acquired. $^{99m}\text{TcO}_4^-$, ^{99m}Tc pertechnetate; ^{123}I , iodine 123.

In vivo microSPECT/CT studies

$^{99m}\text{TcO}_4^-$ was obtained from a freshly eluted $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ generator, and $^{123}\text{I}^-$ sodium iodide was purchased from IBA Molecular. Animals were administered activities of $20\ \text{MBq}$ $^{99m}\text{TcO}_4^-$ or $10\ \text{MBq}$ $^{123}\text{I}^-$ intravenously, subcutaneously, intraperitoneally, or by gavage. Thyroid, salivary gland, and stomach tracer uptake was measured at different times using a dedicated microSPECT/CT scanner (eXplore specCZT CT120, GE) under gas anesthesia (air and 1–2% isoflurane) in an air-warmed imaging chamber (Minerve) to maintain body temperature at 37°C . The SPECT scanner uses a stationary full ring of cadmium zinc telluride (CZT) detectors and a rotating seven-pinhole (1 mm opening) collimator. A total of 350 projections were acquired over 360°C in 8 minutes.

Image analysis

Images were reconstructed using the manufacturer’s 3D-ordered subset expectation maximization algorithm (5 subsets and 11 iterations), which incorporates the system’s collimator–detector response function and scatter correction. Reconstructed images were analyzed and quantified using AMIDE software (15). Tracer activity in the various relevant organs was calculated as previously described (16). Three-dimensional regions of interest were drawn manually around the thyroid, salivary glands, and stomach. Pertechnetate uptake values were expressed as a percentage of the injected dose after decay corrections. Iodide-123 activity values were not corrected for nuclear decay. The results are expressed as the mean \pm standard error of the mean.

TSH analysis

The quantitative determination of mouse TSH serum levels was performed by enzyme-linked immunosorbent assay (kit CEA463Mu, Euromedex) according to the manufacturer's instructions.

Membrane vesicle preparation, SDS-PAGE, and Western blot analyses

Thyroid membrane proteins were obtained as previously described (9,17) and subjected to SDS-PAGE electrophoresis. Western blotting was performed with an anti-mouse NIS antibody using an affinity-purified rabbit immunoreactive serum fraction, as previously described (18), or with an anti- β -actin antibody (Sigma).

Statistical analysis

Statistical analysis and determination of the areas under the curves (AUC) were performed using Prism (GraphPad software). Dual comparisons were made using Student's *t*-test and comparisons between multiple conditions were analyzed using ANOVA. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

MicroSPECT/CT images

Typical SPECT/CT images of a naïve mouse showing $^{99m}\text{TcO}_4^-$ uptake in the thyroid, salivary glands, and stomach regions were acquired (Fig. 2). Similar images were obtained when $^{123}\text{I}^-$ was used as the radiotracer (not shown).

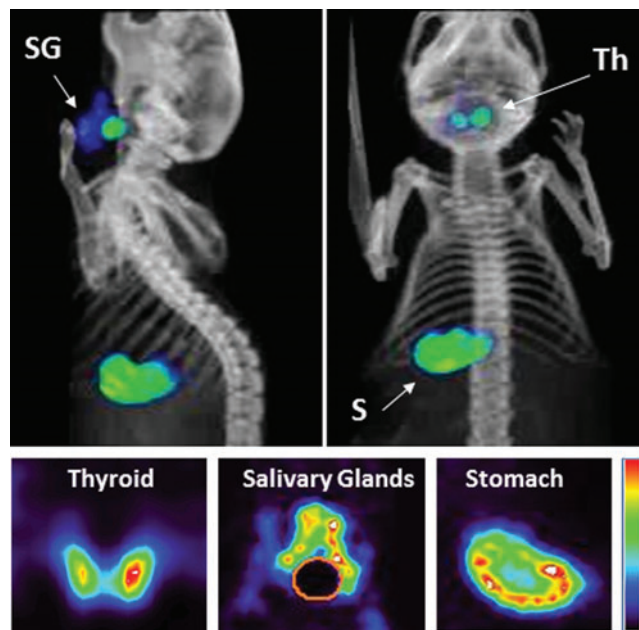


FIG. 2. Representative microSPECT/CT images. Upper panels: Fused SPECT/CT, whole body images of control mice: anterior and lateral views show $^{99m}\text{TcO}_4^-$ uptake in the thyroid lobes (Th), salivary glands (SG), and stomach (S). Lower panels: Coronal slices of the thyroid, salivary glands, and stomach from a control mouse 60 minutes after ^{99m}Tc pertechnetate injection.

Influence of radiotracer administration route

To determine the influence of administration route on radiotracer uptake by different organs expressing NIS, mice were fed an NID for 8 days and were scanned at different time points after radiotracer administration ($^{99m}\text{TcO}_4^-$ or $^{123}\text{I}^-$). At early time points (≤ 80 min), $^{99m}\text{TcO}_4^-$ accumulation in the thyroid was higher when the radiotracer was administered intraperitoneally or subcutaneously relative to gavage administration (Fig. 3A), which tended to result in accumulation of the radiotracer in the stomach (Fig. 3B). For both the thyroid and stomach, intraperitoneal and subcutaneous (Fig. 3) as well as intravenous (not shown) administration showed similar radiotracer uptake kinetics. These data suggest that gavage administration promotes radiotracer accumulation in the stomach rather than in other NIS-expressing organs. To confirm these outcomes, mice were administered $^{123}\text{I}^-$ intraperitoneally or by gavage. Thyroid and salivary gland uptake were monitored over a longer time period—up to 24 hours. The representative kinetics of $^{123}\text{I}^-$ accumulation in the thyroid showed that for both modes of administration, the radiotracer levels peaked four hours after administration (Fig. 4A). The AUC of $^{123}\text{I}^-$ thyroid uptake in the intraperitoneal group was 3.63-fold higher than that of the gavage group (Figs. 4A, 5). Statistical analysis of thyroid uptake 1 and 4 hours after administration confirmed these results (Fig. 4B), which were consistent with those for NIS-expressing salivary glands (Fig. 4B).

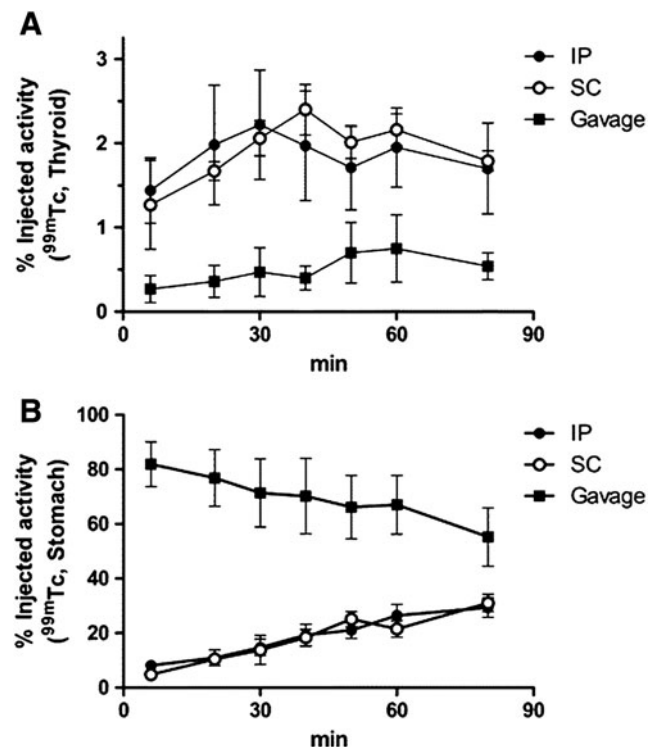


FIG. 3. Effect of radiotracer administration route on short-term $^{99m}\text{TcO}_4^-$ uptake in the thyroid and stomach. A schematic representation of the general protocol is shown in Fig. 1A. Mice were fed only the NID and $^{99m}\text{TcO}_4^-$ was administered IP, SC, or by gavage. (A) Uptake in the thyroid. (B) Uptake in the stomach. The results are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM). ($n = 5$ per group.)

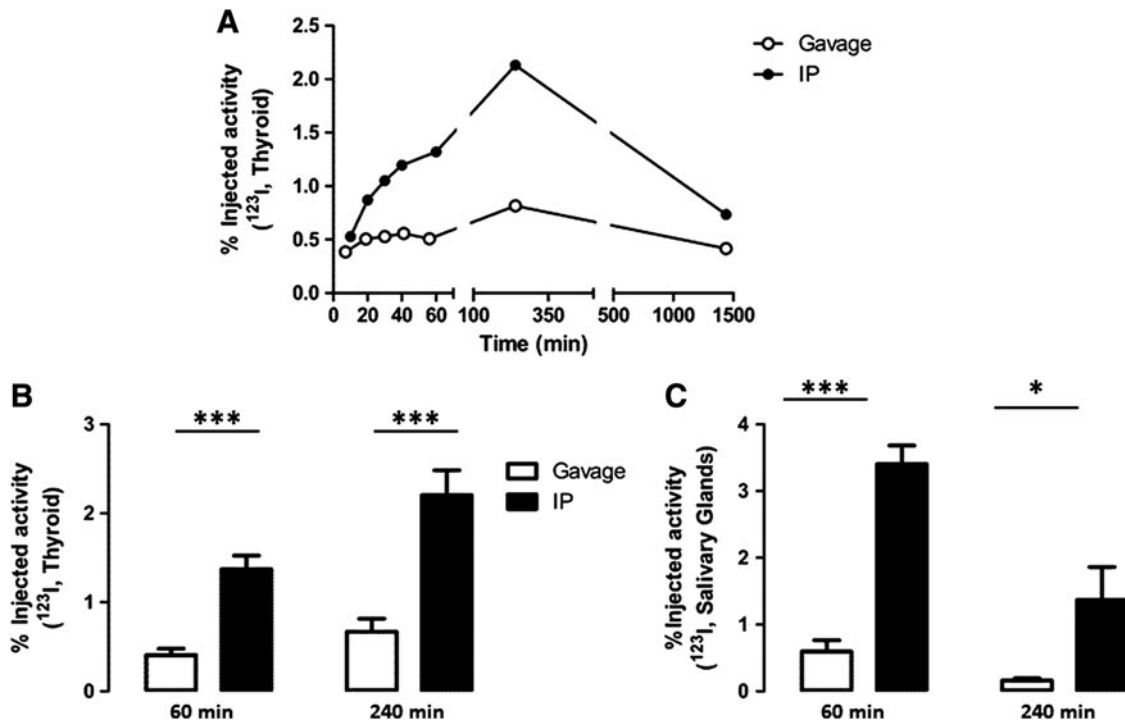


FIG. 4. Effect of the radiotracer administration route on the kinetics of $^{123}\text{I}^-$ accumulation in thyroids and salivary glands of NID mice. A schematic representation of the general protocol is shown in Fig. 1A. The mice were fed only the NID and $^{123}\text{I}^-$ was administered either IP (black bars or signs) or by gavage (white bars or signs). **(A)** Long-term kinetics of radiotracer accumulation in the thyroid. **(B)** Averaged values of radiotracer accumulation in the thyroid at 60 and 240 min ($n=5$). **(C)** Averaged values of radiotracer accumulation in the salivary glands at 60 and 240 min ($n=4$). The results are expressed as the mean \pm sSEM. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

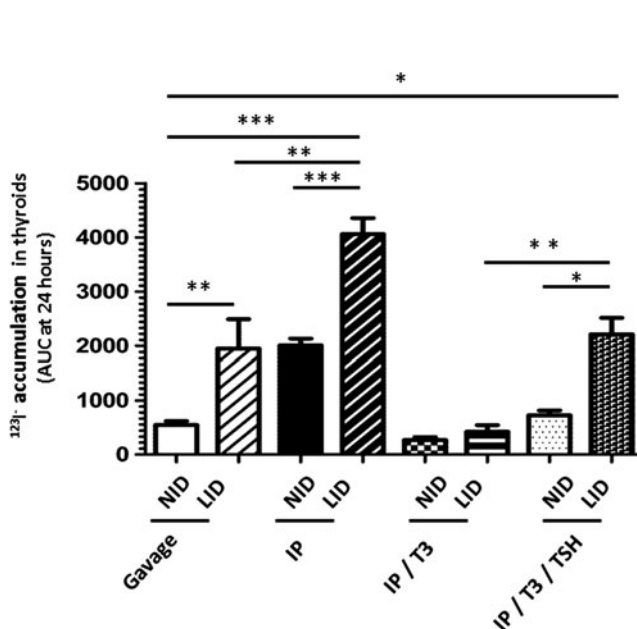


FIG. 5. Comparative analysis of $^{123}\text{I}^-$ accumulation in the thyroids of mice prepared with different protocols. Iodine ^{123}I thyroid uptake was measured by microSPECT/CT over time and expressed as the AUC (area under the curve) at 24 hours. The data represent averages ($n=2-6$) of radiotracer accumulation in the thyroids of the mice. The results are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Effect of dietary iodide intake on radiotracer uptake by the thyroid

For mice fed a low-iodide diet (LID) for 10 days before the SPECT/CT scans, the kinetics of iodide accumulation in the thyroid were similar to those obtained for mice fed the NID, with peak radiotracer uptake 4 hours after administration (Fig. 6A). The AUC of ^{123}I thyroid uptake following intraperitoneal tracer administration was two-fold higher than the AUC for the gavage group, thus confirming that intraperitoneal radiotracer administration results in a higher accumulation in the thyroid relative to gavage administration. In addition, radiotracer administration to LID mice resulted in a higher uptake in the thyroid than that seen for NID mice (Fig. 4B versus Fig. 6B and Fig. 5). For intraperitoneal administration of $^{123}\text{I}^-$, thyroid activity at peak radiotracer levels was $2.2 \pm 0.27\%$ of the injected activity in NID mice, but reached $3.42 \pm 0.5\%$ in the LID mice ($p < 0.05$). Overall, combining the LID and systemic radiotracer administration produced a seven-fold higher accumulation of $^{123}\text{I}^-$ compared with NID/gavage.

Effect of rhTSH injection on radiotracer uptake by the thyroid

We first compared $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ thyroid uptake in rhTSH-treated and untreated NID mice. As expected, rhTSH injection resulted in increased $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ uptake by the thyroid (1.7-fold increase) (Fig. 7A). We next assessed the effect of rhTSH on mice treated with T3. The T3-treated mice showed

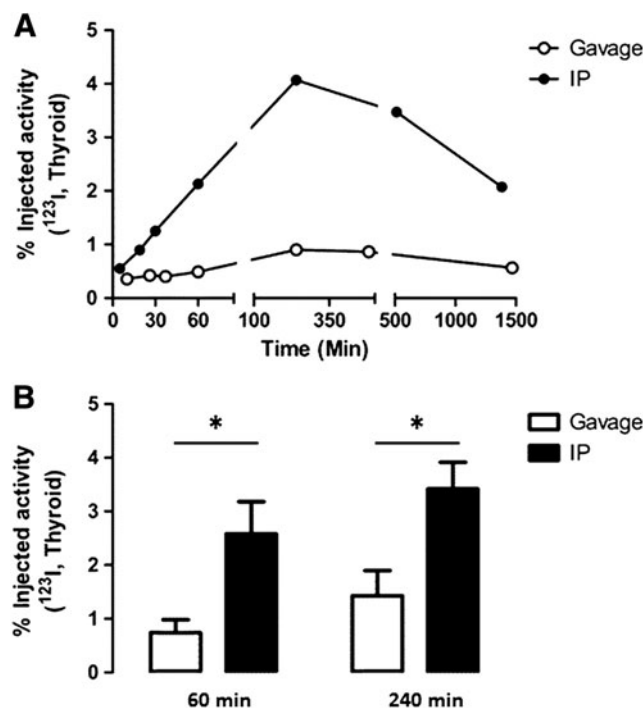


FIG. 6. Effect of the radiotracer administration route on the kinetics of $^{123}\text{I}^-$ accumulation in the thyroids of LID mice. A schematic representation of the general protocol is shown in Fig. 1A. Mice were fed only the LID and administered $^{123}\text{I}^-$ either IP (black bars or signs) or by gavage (white bars or signs). (A) Long-term kinetics of radiotracer accumulation in the thyroid. (B) Averaged values of radiotracer accumulation in the thyroid at 60 ($n=6$) and 240 ($n=3$) min. The results are expressed as the mean \pm SEM. $*p < 0.05$.

a dramatic drop in thyroid uptake that was increased by rhTSH injections, but not to the levels seen for NID-fed mice that did not receive T3 (Fig. 7A). To evaluate the impact of a large, transient increase in dietary iodine, 0.5 mg iodide was injected 4 days before the T3-treated NID animals were scanned. Although the 0.5 mg iodide dose did not affect thyroid uptake 4 days later, a smaller dose of iodide (10 μg) administered just 24 hours prior to the scan reduced thyroid uptake by 50%, suggesting that excess iodide can have a short-term effect on radiotracer uptake (Fig. 7B). We next evaluated the effect of a low-iodide diet using the same experimental protocol. In LID mice, T3 treatment mimicked that seen for T3-treated NID animals in that there was a significant decrease in the TSH levels as measured by enzyme-linked immunosorbent assay (301 ± 26 pg/mL mTSH in LID/T3 mice versus 691 ± 44 pg/mL mTSH in the LID mice). Meanwhile, rhTSH treatment of T3-treated LID mice resulted in a significantly higher increase in thyroid $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ uptake than that produced by rhTSH injection in T3-treated NID animals (Fig. 7C). These results mirror those for western blot measurement of NIS expression (Fig. 7D), which showed that NIS expression was higher in T3-treated LID animals than in T3-treated NID mice. Moreover, rhTSH injections resulted in higher NIS expression levels in T3-treated LID animals relative to T3-treated NID mice.

These data were further confirmed in a kinetic evaluation spanning 48 hours using $^{123}\text{I}^-$ as the radiotracer (Figs. 5, 8). The AUC of $^{123}\text{I}^-$ thyroid uptake in the LID/T3 group was 1.6-fold higher than that for the NID/T3 group. For both groups, rhTSH treatment produced an increase in the AUC (2.9-fold and 5-fold for NID/T3 and LID/T3 mice, respectively). Finally, the AUC for the LID/T3/rhTSH group was 2.8-fold higher than that of the NID/T3/rhTSH group, and contributed to a restoration of thyroid activity to levels that were equivalent to that of euthyroid animals (AUC = 2111 in the LID/T3/TSH animals versus AUC = 2082 in the NID mice, Fig. 5).

Discussion

Radioiodide is commonly used as an adjuvant treatment for DTC. Treatment effectiveness is dependent on the amount of radioiodide that accumulates in the thyroid, but there is little information about the impact of both dietary iodine and the route of ^{131}I administration on RAIT efficacy. Thus, this study examined different preparative measures and how they affected the level of uptake by the thyroid. Here we show that systemic or subcutaneous administration of the radiotracer favors thyroid (and salivary gland) uptake of the radiotracer, while oral administration produces a significantly higher accumulation of the radiotracer in the stomach. In patients with Graves' disease, the route of administration (oral versus intravenous) of iodide does not affect the dose received by the thyroid or the outcome (7). In hyperthyroid cats, thyroid uptake and outcome were similar in animals administered radioiodide intravenously or subcutaneously (19). A recent study in rats suggested that the oral route of administration favors radioiodide accumulation in the thyroid compared with the intravenous route (6). This result is in contrast to our finding that oral administration produces lower levels of radioiodide uptake by the thyroid compared with systemic or subcutaneous administration. Notably, unlike human salivary glands, rat salivary glands are known to lack NIS expression (14), which suggests that radiotracer biodistribution in rats and humans may differ qualitatively. Considering the close proximity of the salivary gland to the thyroid, the lack of iodide retention in rat salivary glands may have important repercussions for biodistribution kinetics, and thus the quantitative data obtained using a rat model may not be relevant to humans. Meanwhile, mice and humans have similar NIS expression patterns (12,13), and this similarity together with our results obtained with mice suggests that systemic administration in humans may be better able to increase radioactive iodide uptake by extragastric tissues.

In standard practice, logistic considerations and ease of implementation of a clinical protocol are the main reasons to choose an enteral route for radioiodide administration. In this context, clinicians should consider whether the gain in radioactive accessibility for thyroid remnants and metastases outweighs the logistical advantages provided by the oral route of administration. In DTC patients, capsules containing 1–3.7 GBq are routinely given orally. When necessary, the treatment can be repeated, leading to a cumulative administered activity as high as 11.1 GBq (20). A recent retrospective study involving 2468 DTC patients concluded that a cumulative ^{131}I dose < 37 GBq did not increase the risk of a second primary malignancy (21). As such, in standard, routine

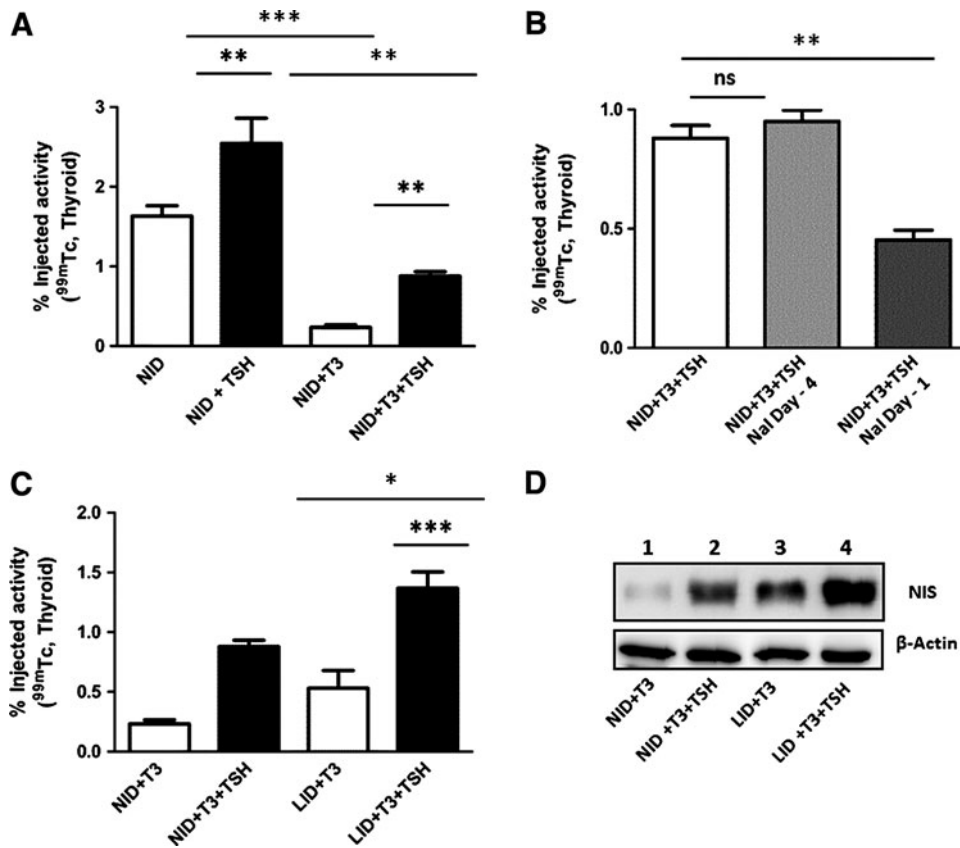


FIG. 7. Effect of rhTSH injection on radiotracer uptake by the thyroids of NID and LID mice. **(A)** The general protocol is shown schematically in Fig. 1B, without additional iodide administration. The data represent the averaged values of radiotracer accumulation at 60 min in the thyroids of control mice (NID, $n=6$), after TSH injections (NID + TSH, $n=6$), after T3 administration (NID + T3, $n=6$), and after TSH injections in T3-treated mice (NID + T3 + TSH, $n=6$). **(B)** The general protocol is shown schematically in Fig. 1B, with administration of iodide. T3-treated mice were administered 0.5 mg iodide for 4 days (light gray bar) or 10 μ g iodide for 1 day (dark gray bar) before IP injection of the $^{99m}\text{TcO}_4^-$. The data represent the averaged values of radiotracer accumulation in the thyroid at 60 min ($n=3$). ns: not statistically significant; $**p < 0.01$. **(C)** The general protocol is shown schematically in Fig. 1B, in which $^{99m}\text{TcO}_4^-$ was administered IP. The data represent the averaged values of radiotracer accumulation in the thyroid at 60 min ($n=4$). In A, B, and C, the results are expressed as the mean \pm SEM. $*p < 0.05$, $***p < 0.001$. **(D)** Thyroids from mice in Fig. 6C were collected and proteins were extracted and subjected to Western blot analysis. The blots were probed with a sodium/iodide symporter-specific antibody or a β -actin-specific antibody.

situations the gains yielded by systemic administration would likely not outweigh the logistic advantages of oral delivery. However, the situation may be different for other therapeutic approaches. For example, a new therapeutic strategy based on the use of gene therapy to induce ectopic NIS expression in nonthyroid cancers is emerging (22,23). Moreover, replication-deficient viruses (24,25) and oncolytic viruses (26,27) have been used to deliver the *NIS* cDNA to several different types of cancer, and preclinical studies in rodent models were used to validate this approach as a proof of principle. However, when ectopic NIS expression was evaluated using SPECT/CT imaging and dosimetric calculations in a phase 1 clinical trial involving prostate cancer patients, men who were administered a ^{131}I dose of 7.4 GBq had a mean absorbed dose in the prostate that was well below the dose required to eliminate cancerous lesions (28). Therefore, in this experimental situation, improvements related to a parenteral administration route of radioiodide would significantly increase the radiation dose received by the target tissue and should be considered.

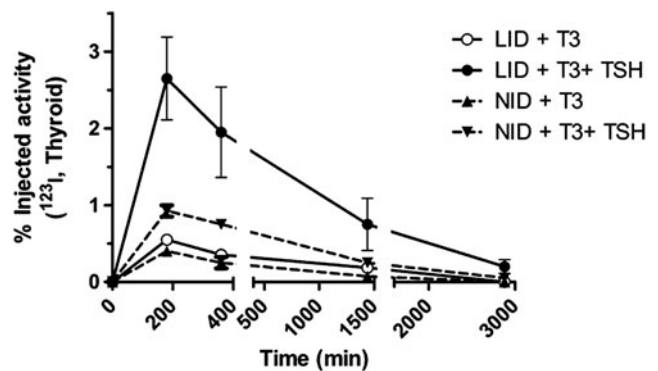


FIG. 8. Long-term kinetics of $^{123}\text{I}^-$ accumulation in the thyroids of NID and LID mice, stimulated or not with rhTSH. The general protocol is shown schematically in Fig. 1B, in which $^{123}\text{I}^-$ was administered by IP. The data represent averages ($n=2$) of radiotracer accumulation in the thyroids of NID mice and LID mice. Thyroid activities were not corrected for nuclear decay. The results are expressed as the mean \pm SEM.

We also found that mice fed an LID showed increased thyroid uptake of radioactive iodide. Considering that similar effects were observed when $^{99m}\text{TcO}_4^-$ and $^{123}\text{I}^-$ uptake were measured, the trapping function is likely to be more affected by dietary changes than is organification. It is well established that NIS protein expression is upregulated under conditions of an LID. The LID-induced increase in iodide uptake was present in both euthyroid and T3-treated mice; the T3 administration was designed to mimic the clinical preparation of patients receiving rhTSH while on substitution therapy with levothyroxine. This model system was initially developed by Colzani *et al.*, who observed that the effect of rhTSH on thyroid uptake was higher in T3-treated mice compared with euthyroid animals (29). Alternatively, a mouse model that spontaneously develops metastatic follicular thyroid cancer exists. *Thrb*^{PV/PV} mice harbor a knockin dominant negative mutation, known as PV, in the *Thrb* gene, and thus could be used to validate our conclusions in the context of experimental metastatic disease (30,31). In our model system, the data show that LID-fed animals had increased iodide uptake ranging between 55% and 128% over that seen for NID-fed animals. This result is in agreement with a recent systematic review of dietary iodine restriction in preparation for radioactive treatment or scanning in DTC patients, which concluded that LID increases radioactive iodide uptake and could improve ^{131}I treatment outcomes (5). However, the majority of the studies reviewed included patients under thyroid hormone withdrawal; the only clinical study performed on patients with rhTSH preparation also concluded that a two-week LID optimizes radioiodine uptake (8). This conclusion was based on the urinary iodine-to-creatinine ratio and no quantitative analysis of thyroid iodine uptake was performed. Therefore, our data provide preclinical information to confirm and better understand the relevance of dietary iodine when patients are given rhTSH. Mechanistically, the Western blot experiments demonstrated that part, if not all, of this iodide-dependent effect is due to an elevation in NIS protein levels in the thyrocyte plasma membrane. The relevance of the results we obtained for euthyroid and T3-treated mice to human patients will probably depend on whether the thyroid cancer tissue retains the regulatory mechanisms of normal thyroid tissue. While this may vary among tumors, in general LID has been shown to increase radioiodine uptake by remnant tissue or tumors (32,33). Given the conflicting evidence on how an LID affects remnant ablation outcomes (5), additional studies will be needed for a complete demonstration of the effect of LID on iodide uptake.

Finally, the effect of rhTSH injections on thyroid radioiodide uptake was determined under different conditions. An increase in radiotracer uptake by the thyroid was observed in both euthyroid and T3-treated mice fed an NID. These data are in complete agreement with those of Colzani *et al.* (29), who studied the effect of rhTSH on NID-fed rats and mice. In this context, a large excess of iodide intake given four days before the scan failed to significantly affect radiotracer uptake. In contrast, iodide intake 24 hours before the scan reduced radiotracer uptake by 50%, probably through the Wolff-Chaikoff effect, which occurs in response to an acute iodide excess (34). These data also highlight the short duration of the effect of excess iodide intake on rhTSH-induced iodide uptake by the thyroid. In addition, our data extend the observations of

Colzani *et al.* (29) to the LID condition. Evaluation of $^{123}\text{I}^-$ accumulation kinetics in the thyroid showed that administration of rhTSH to LID/T3 mice resulted in a 2.8-fold increase in the AUC compared with NID/T3 mice. In this model system, LID clearly increased the effect of rhTSH and helped to restore a thyroid activity that was equivalent to that of the euthyroid animals. These data suggest that a combination of LID and rhTSH for patients receiving thyroid hormone replacement therapy may be useful.

In conclusion, our data show that a series of preparative measures can increase thyroid radioiodine uptake and possibly improve ^{131}I treatment outcomes, especially in the context of hormone replacement therapy. First, the systemic administration of radioiodide favors its accumulation in the thyroid compared to the oral route. While this approach is probably not needed for routine DTC cases, it may be relevant to improve the treatment of NIS-expressing tumors through gene therapy. Furthermore, our data highlight the importance of LID in both euthyroid or in T3-treated, rhTSH-injected mice. Extrapolated to the human situation, and in the context of clinical guidelines for preparation of DTC patients, our data indicate that LID may potentiate the efficacy of rhTSH treatment in T3-treated patients.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Recherche en matières de Sûreté Nucléaire et Radioprotection program from the French National Research Agency and by a grant from Plan Cancer 2014–2019 (MTS201403). The authors thank Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and the radiopharmaceutical team of the Centre Antoine Lacassagne (Nadine Sapin, Guy Martinico, Stéphane Espitalier, and Didier Alberato) for their help with radioisotope production and handling. The authors gratefully acknowledge the Institute for Research on Cancer and Aging, Nice animal core facility. Equipment for this study was purchased through grants from la Région Provence Alpes-Côte d'Azur and INSERM. We thank Colette Ricort for assistance in preparing the manuscript.

All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

1. Soley MH, Foreman N 1949 Radioiodine therapy in Graves' disease: a review. *J Clin Invest* **28**:1367–1374.
2. Soley MH, Miller ER, Foreman N 1949 Graves' disease; treatment with radioiodine (I131). *J Clin Endocrinol Metab* **9**:29–35.
3. Luster M, Clarke SE, Dietlein M, Lassmann M, Lind P, Oyen WJ, Tennvall J, Bombardieri E; European Association of Nuclear Medicine (EANM) 2008 Guidelines for radioiodine therapy of differentiated thyroid cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **35**:1941–1959.
4. Haugen BRM, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, Pacini F, Randolph GW, Sawka AM, Schlumberger M, Schuff KG, Sherman SI, Sosa JA, Steward DL, Tuttle RM, Wartofsky L 2015 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult

- Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid* **26**:1–133.
5. Sawka AM, Ibrahim-Zada I, Galacgac P, Tsang RW, Brierley JD, Ezzat S, Goldstein DP 2010 Dietary iodine restriction in preparation for radioactive iodine treatment or scanning in well-differentiated thyroid cancer: a systematic review. *Thyroid* **20**:1129–1138.
 6. Kurosawa H, Sakurai K, Hasegawa H, Uchida K, Kasahara H, Minamizawa T, Nakajo M, Nakajo M 2014 Comparison of radioactive iodide uptake in the rat thyroid between oral and intravenous bolus administration. *Ann Nucl Med* **28**: 986–993.
 7. Schneider P, Biko J, Hanscheid H, Hilliger S, Koutsampelas C, Kranzfelder M, Ladner S, Reiners C 2005 The route of administration (oral vs intravenous) does not influence dose or outcome in Graves' disease and unifocal autonomy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **32**: 788–793.
 8. Park JT, 2nd, Hennessey JV 2004 Two-week low iodine diet is necessary for adequate outpatient preparation for radioiodine rhTSH scanning in patients taking levothyroxine. *Thyroid* **14**:57–63.
 9. Cambien B, Franken PR, Lamit A, Mauxion T, Richard-Fiardo P, Guglielmi J, Crescence L, Mari B, Pourcher T, Darcourt J, Bardiès M, Vassaux G 2014 $^{99m}\text{TcO}_4^-$, auger-mediated thyroid stunning: dosimetric requirements and associated molecular events. *PLoS One* **9**:e92729.
 10. Zuckier LS, Dohan O, Li Y, Chang CJ, Carrasco N, Dadachova E 2004 Kinetics of perchlorate uptake and comparative biodistribution of perchlorate, pertechnetate, and iodide by NaI symporter-expressing tissues in vivo. *J Nucl Med* **45**:500–507.
 11. Franken PR, Guglielmi J, Vanhove C, Koulibaly M, Defrise M, Darcourt J, Pourcher T 2010 Distribution and dynamics of (^{99m}Tc)-pertechnetate uptake in the thyroid and other organs assessed by single-photon emission computed tomography in living mice. *Thyroid* **20**:519–526.
 12. Spitzweg C, Joba W, Schriever K, Goellner JR, Morris JC, Heufelder AE 1999 Analysis of human sodium iodide symporter immunoreactivity in human exocrine glands. *J Clin Endocrinol Metab* **84**:4178–4184.
 13. Josefsson M, Grunditz T, Ohlsson T, Ekblad E 2002 Sodium/iodide-symporter: distribution in different mammals and role in entero-thyroid circulation of iodide. *Acta Physiol Scand* **175**:129–137.
 14. Kotani T, Ogata Y, Yamamoto I, Aratake Y, Kawano JJ, Suganuma T, Ohtaki S 1998 Characterization of gastric Na^+/I^- symporter of the rat. *Clin Immunol Immunopathol* **89**:271–278.
 15. Loening AM, Gambhir SS 2003 AMIDE: a free software tool for multimodality medical image analysis. *Mol Imaging* **2**:131–137.
 16. Richard-Fiardo P, Hervouet C, Marsault R, Franken PR, Cambien B, Guglielmi J, Warnez-Soulie J, Darcourt J, Pourcher T, Colombani T, Haudebourg T, Peuziat P, Pitard B, Vassaux G 2015 Evaluation of tetrafunctional block copolymers as synthetic vectors for lung gene transfer. *Biomaterials* **45**:10–17.
 17. Peyrottes I, Navarro V, Ondo-Mendez A, Marcellin D, Bellanger L, Marsault R, Lindenthal S, Ettore F, Darcourt J, Pourcher T 2009 Immunoanalysis indicates that the sodium iodide symporter is not overexpressed in intracellular compartments in thyroid and breast cancers. *Eur J Endocrinol* **160**:215–225.
 18. Huc-Brandt S, Marcellin D, Graslin F, Averseng O, Bellanger L, Hivin P, Quemeneur E, Basquin C, Navarro V, Pourcher T, Darrouzet E 2011 Characterisation of the purified human sodium/iodide symporter reveals that the protein is mainly present in a dimeric form and permits the detailed study of a native C-terminal fragment. *Biochim Biophys Acta* **1808**:65–77.
 19. Theon AP, Van Vechten MK, Feldman E 1994 Prospective randomized comparison of intravenous versus subcutaneous administration of radioiodine for treatment of hyperthyroidism in cats. *Am J Vet Res* **55**:1734–1738.
 20. Menzel C, Grunwald F, Schomburg A, Palmedo H, Bender H, Späth G, Biersack HJ 1996 "High-dose" radioiodine therapy in advanced differentiated thyroid carcinoma. *J Nucl Med* **37**:1496–1503.
 21. Khang AR, Cho SW, Choi HS, Ahn HY, Yoo WS, Kim KW, Kang KW, Yi KH, Park do J, Lee DS, Chung JK, Cho BY, Park YJ 2015 The risk of second primary malignancy is increased in differentiated thyroid cancer patients with a cumulative (^{131}I) dose over 37 GBq. *Clin Endocrinol (Oxf)* **83**:117–123.
 22. Baril P, Martin-Duque P, Vassaux G 2010 Visualization of gene expression in the live subject using the Na/I symporter as a reporter gene: applications in biotherapy. *Br J Pharmacol* **159**:761–771.
 23. Hingorani M, Spitzweg C, Vassaux G, Newbold K, Melcher A, Pandha H, Vile R, Harrington K 2010 The biology of the sodium iodide symporter and its potential for targeted gene delivery. *Curr Cancer Drug Targets* **10**:242–267.
 24. Faivre J, Clerc J, Gerolami R, Hervé J, Longuet M, Liu B, Roux J, Moal F, Perricaudet M, Bréchet C 2004 Long-term radioiodine retention and regression of liver cancer after sodium iodide symporter gene transfer in wistar rats. *Cancer Res* **64**:8045–8051.
 25. Hingorani M, White CL, Zaidi S, Merron A, Peerlinck I, Gore ME, Nutting CM, Pandha HS, Melcher AA, Vile RG, Vassaux G, Harrington KJ 2008 Radiation-mediated up-regulation of gene expression from replication-defective adenoviral vectors: implications for sodium iodide symporter gene therapy. *Clin Cancer Res* **14**:4915–4924.
 26. Peerlinck I, Merron A, Baril P, Conchon S, Martin-Duque P, Hindorf C, Burnet J, Quintanilla M, Hingorani M, Iggo R, Lemoine NR, Harrington K, Vassaux G 2009 Targeted radionuclide therapy using a Wnt-targeted replicating adenovirus encoding the Na/I symporter. *Clin Cancer Res* **15**: 6595–6601.
 27. Haddad D, Zanzonico PB, Carlin S, Chen CH, Chen NG, Zhang Q, Yu YA, Longo V, Mojica K, Aguilar 2012 A vaccinia virus encoding the human sodium iodide symporter facilitates long-term image monitoring of virotherapy and targeted radiotherapy of pancreatic cancer. *J Nucl Med* **53**:1933–1942.
 28. Barton KN, Stricker H, Elshaikh MA, Pegg J, Cheng J, Zhang Y, Karvelis KC, Lu M, Movsas B, Freytag SO 2011 Feasibility of adenovirus-mediated hNIS gene transfer and ^{131}I radioiodine therapy as a definitive treatment for localized prostate cancer. *Mol Ther* **19**:1353–1359.
 29. Colzani RM, Alex S, Fang SL, Braverman LE, Emerson CH 1998 The effect of recombinant human thyrotropin (rhTSH) on thyroid function in mice and rats. *Thyroid* **8**: 797–801.
 30. Kaneshige M, Kaneshige K, Zhu X, Dace A, Garrett L, Carter TA, Kazlauskaitė R, Pankratz DG, Wynshaw-Boris

- A, Refetoff S, Weintraub B, Willingham MC, Barlow C, Cheng S 2000 Mice with a targeted mutation in the thyroid hormone beta receptor gene exhibit impaired growth and resistance to thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 13209–13214.
31. Lu C, Mishra A, Zhu YJ, Meltzer P, Cheng SY 2011 Genomic profiling of genes contributing to metastasis in a mouse model of thyroid follicular carcinoma. *Am J Cancer Res* **1**:1–13.
32. Goslings BM 1975 Proceedings: Effect of a low iodine diet on ¹³¹I therapy in follicular thyroid carcinomata. *J Endocrinol* **64**:30P.
33. Maruca J, Santner S, Miller K, Santen RJ 1984 Prolonged iodine clearance with a depletion regimen for thyroid carcinoma: concise communication. *J Nucl Med* **25**:1089–1093.
34. Dayem M, Navarro V, Marsault R, Darcourt J, Lindenthal S, Pourcher T 2006 From the molecular characterization of iodide transporters to the prevention of radioactive iodide exposure. *Biochimie* **88**:1793–1806.

Address correspondence to:
Béatrice Cambien, PhD
Laboratoire TIRO
UMRE 4320
Faculté de Médecine
28 Avenue Valombrose
Nice, Cedex 2, 06107
France

E-mail: cambien@unice.fr

Partie 4 : Références bibliographiques

- Abernathy, J. and Overturf, K. (2016) ‘Comparison of Ribosomal RNA Removal Methods for Transcriptome Sequencing Workflows in Teleost Fish’, *Animal Biotechnology*. Taylor & Francis, 27(1), pp. 60–65. doi: 10.1080/10495398.2015.1086365.
- Adiconis, X. *et al.* (2013) ‘Comparative analysis of RNA sequencing methods for degraded or low-input samples’, *Nature Methods*. Nature Publishing Group, 10(7), pp. 623–629. doi: 10.1038/nmeth.2483.
- Adjadj, E., Schlumberger, M. and de Vathaire, F. (2009) ‘Germ-line DNA polymorphisms and susceptibility to differentiated thyroid cancer’, *The Lancet Oncology*. Elsevier Ltd, 10(2), pp. 181–190. doi: 10.1016/S1470-2045(09)70020-8.
- AFSSA (2009) ‘Étude Individuelle Nationale des Consommations Alimentaires 2 (INCA 2) 2006-2007’, 2(Inca 2), pp. 1–225. doi: www.anses.fr/Documents/PASER-Ra-INCA2.pdf.
- Ahmad, S. *et al.* (2015) ‘Direct Ionization of Solid-Phase Microextraction Fibers for Quantitative Drug Bioanalysis: From Peripheral Circulation to Mass Spectrometry Detection’, *Analytical Chemistry*, 87(1), pp. 754–759. doi: 10.1021/ac503706n.
- Ajjan, R. A. *et al.* (1998) ‘The sodium iodide symporter gene and its regulation by cytokines found in autoimmunity’, *Journal of Endocrinology*, 158(3), pp. 351–358. doi: 10.1677/joe.0.1580351.
- Anderson, L. and Hunter, C. L. (2006) ‘Quantitative mass spectrometric multiple reaction monitoring assays for major plasma proteins.’, *Molecular & cellular proteomics: MCP*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 5(4), pp. 573–88. doi: 10.1074/mcp.M500331-MCP200.
- Anderson, N. L. and Anderson, N. G. (1998) ‘Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words.’, *Electrophoresis*, 19(11), pp. 1853–61. doi: 10.1002/elps.1150191103.
- Andrew Keller, *,† *et al.* (2002) ‘Empirical Statistical Model To Estimate the Accuracy of Peptide Identifications Made by MS/MS and Database Search’. American Chemical Society . doi: 10.1021/AC025747H.
- Apweiler, R. *et al.* (2009) ‘Approaching clinical proteomics: current state and future fields of application in fluid proteomics’, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. Walter de Gruyter, 47(6), pp. 724–744. doi: 10.1515/CCLM.2009.167.
- Arriagada, A. A. *et al.* (2015) ‘Excess iodide induces an acute inhibition of the sodium/iodide symporter in thyroid male rat cells by increasing reactive oxygen species.’, *Endocrinology*. The Endocrine Society, 156(4), pp. 1540–51. doi: 10.1210/en.2014-1371.
- Arriagada, A. A. *et al.* (2015) ‘Excess iodide induces an acute inhibition of the sodium/iodide symporter in thyroid male rat cells by increasing reactive oxygen species’, *Endocrinology*. doi: 10.1210/en.2014-1371.
- Augeron, C. and Laboisse, C. L. (1984) ‘Emergence of permanently differentiated cell clones in a human colonic cancer cell line in culture after treatment with sodium butyrate.’, *Cancer research*. American Association for Cancer Research, 44(9), pp. 3961–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6744312> (Accessed: 6 June 2018).

Bantscheff, M. *et al.* (2007) 'Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Springer-Verlag, 389(4), pp. 1017–1031. doi: 10.1007/s00216-007-1486-6.

Bastemir, M. *et al.* (2006) 'High Prevalence of Thyroid Dysfunction and Autoimmune Thyroiditis in Adolescents after Elimination of Iodine Deficiency in the Eastern Black Sea Region of Turkey', *Thyroid*. Mary Ann Liebert, Inc. 2 Madison Avenue Larchmont, NY 10538 USA , 16(12), pp. 1265–1271. doi: 10.1089/thy.2006.16.1265.

Bathen, T. F. *et al.* (2000) 'Analysis and classification of proton NMR spectra of lipoprotein fractions from healthy volunteers and patients with cancer or CHD.', *Anticancer research*, 20(4), pp. 2393–408. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10953302> (Accessed: 29 September 2018).

Becker, D. . (1987) 'Reactor Accidents Public Health Strategies and their Medical Implications', *JAMA*, 258(5), pp. 649–654.

Becker, D. V. (1983) 'Physiological basis for the use of potassium iodide as a thyroid blocking agent logistic issues in its distribution.', *Bulletin of the New York Academy of Medicine: Journal of Urban Health*, 59(10), pp. 1003–1008. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1911930/pdf/bullnyacadmed00086-0149.pdf> <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0020998056&partnerID=tZOtx3y1>.

Becker, D. V. *et al.* (1984) 'The Use of Iodine as a Thyroidal Blocking Agent in the Event of a Reactor Accident: Report of the Environmental Hazards Committee of the American Thyroid Association', *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 252(5), pp. 659–661. doi: 10.1001/jama.1984.03350050047025.

Becks, G. P., Eggo, M. C. and Burrow, G. N. (1987) 'Regulation of differentiated thyroid function by iodide: Preferential inhibitory effect of excess iodide on thyroid hormone secretion in sheep thyroid cell cultures', *Endocrinology*, 120(6), pp. 2569–2575. doi: 10.1210/endo-120-6-2569.

Bedard, K., Lardy, B. and Krause, K. H. (2007) 'NOX family NADPH oxidases: Not just in mammals', *Biochimie*, 89(9), pp. 1107–1112. doi: 10.1016/j.biochi.2007.01.012.

Bennett, K. L. *et al.* (2008) 'Frequently methylated tumor suppressor genes in head and neck squamous cell carcinoma.', *Cancer research*. American Association for Cancer Research, 68(12), pp. 4494–9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6509.

Berghout, A. and Wiersinga, W. (1998) 'Thyroid size and thyroid function during pregnancy: An analysis', *European Journal of Endocrinology*, 138(5), pp. 536–542. doi: 10.1530/eje.0.1380536.

Bildl, W. *et al.* (2012) 'Extending the dynamic range of label-free mass spectrometric quantification of affinity purifications.', *Molecular & cellular proteomics: MCP*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 11(2), p. M111.007955. doi: 10.1074/mcp.M111.007955.

Bizhanova, A. and Kopp, P. (2010) 'Genetics and phenomics of Pendred syndrome', *Molecular and Cellular Endocrinology*. Elsevier Ireland Ltd, 322(1–2), pp. 83–90. doi:

10.1016/j.mce.2010.03.006.

Blagoev, B. *et al.* (2003) 'A proteomics strategy to elucidate functional protein-protein interactions applied to EGF signaling', *Nature Biotechnology*. Nature Publishing Group, 21(3), pp. 315–318. doi: 10.1038/nbt790.

Bleichrodt, N. and Born Ph, M. (1994) 'A meta-analysis of research on iodine and its relationship to cognitive developmen', in ed. JB Stanbury (ed.) *The Damaged Brain of Iodine Deficiency*, ed. JB Stanbury, pp. 195–200. New York: Cognizant Comm. New York, pp. 195–200.

Bodenmiller, B. *et al.* (2010) 'Phosphoproteomic analysis reveals interconnected system-wide responses to perturbations of kinases and phosphatases in yeast.', *Science signaling*. American Association for the Advancement of Science, 3(153), p. rs4. doi: 10.1126/scisignal.2001182.

Bogazzi, F. *et al.* (2001) 'The Various Effect of Amiodarone on Thyroid Function', *Thyroid*, 11(5), pp. 511–519. doi: 10.1210/er.22.2.240.

Bouatra, S. *et al.* (2013) 'The Human Urine Metabolome', *PLoS ONE*. Edited by P. Dzeja. Public Library of Science, 8(9), p. e73076. doi: 10.1371/journal.pone.0073076.

Braverman, L. E. and Cooper, D. (2012) *Werner & Ingbar's the thyroid: a fundamental and clinical text*. Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health. Available at: https://books.google.fr/books?hl=fr&lr=&id=U7lnJ6X82QYC&oi=fnd&pg=PA48&dq=PETER+KOPP+HORMONE+BIOSYNTHESIS&ots=gTbqrdFLu5&sig=cUkdT-hBX_MbZf6mMiv0ZGf91hA&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false (Accessed: 11 May 2018).

Braverman, L. E., Woeber, K. A. and Ingbar, S. H. (1969) 'Induction of Myxedema by Iodide in Patients Euthyroid after Radioiodine or Surgical Treatment of Diffuse Toxic Goiter', *New England Journal of Medicine*, 281(15), pp. 816–821. doi: 10.1056/NEJM196910092811504.

Brent, G. A. (2012) 'Mechanisms of thyroid hormone action.', *The Journal of clinical investigation*. American Society for Clinical Investigation, 122(9), pp. 3035–43. doi: 10.1172/JCI60047.

Breuel, H. P. *et al.* (1979) '[Changes in thyroid function after application of iodinated contrast media to normal subjects (author's transl)].', *Medizinische Klinik*, 74(41), pp. 1492–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/119903> (Accessed: 21 May 2018).

Breuker, K. *et al.* (2008) 'Top-Down Identification and Characterization of Biomolecules by Mass Spectrometry', *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. No longer published by Elsevier, 19(8), pp. 1045–1053. doi: 10.1016/J.JASMS.2008.05.013.

Brim, H. *et al.* (2011) 'Slc5a8 gene, a transporter of butyrate: A gut flora metabolite, is frequently methylated in african american colon adenomas', *PLoS ONE*, 6(6), pp. 3–8. doi: 10.1371/journal.pone.0020216.

Bruce, S. J. *et al.* (2009) 'Investigation of Human Blood Plasma Sample Preparation for Performing Metabolomics Using Ultrahigh Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry', *Analytical Chemistry*. American Chemical Society, 81(9), pp. 3285–3296. doi: 10.1021/ac8024569.

Bülow Pedersen, I. *et al.* (2006) 'Increase in Incidence of Hyperthyroidism Predominantly Occurs in Young People after Iodine Fortification of Salt in Denmark', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. Oxford University Press, 91(10), pp. 3830–3834. doi: 10.1210/jc.2006-0652.

Cardis, E. *et al.* (2005) 'Risk of cancer after low doses of ionising radiation: retrospective cohort study in 15 countries', *BMJ*. British Medical Journal Publishing Group, 331(7508), p. 77. doi: 10.1136/BMJ.38499.599861.E0.

Cargile, B. J., McLuckey, S. A. and Stephenson, J. L. (2001) 'Identification of bacteriophage MS2 coat protein from *E. coli* lysates via ion trap collisional activation of intact protein ions.', *Analytical chemistry*, 73(6), pp. 1277–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11305663> (Accessed: 8 June 2018).

Carvalho, D. P. and Dupuy, C. (2017) 'Thyroid hormone biosynthesis and release', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 458, pp. 6–15. doi: 10.1016/j.mce.2017.01.038.

Cavill, R. *et al.* (2011) 'Consensus-Phenotype Integration of Transcriptomic and Metabolomic Data Implies a Role for Metabolism in the Chemosensitivity of Tumour Cells', *PLoS Computational Biology*. Edited by G. Tucker-Kellogg. Public Library of Science, 7(3), p. e1001113. doi: 10.1371/journal.pcbi.1001113.

Chait, B. T. (2006) 'Chemistry. Mass spectrometry: bottom-up or top-down?', *Science (New York, N.Y.)*. American Association for the Advancement of Science, 314(5796), pp. 65–6. doi: 10.1126/science.1133987.

Chambard, M. *et al.* (1983) 'Polarization of thyroid cells in culture: Evidence for the basolateral localization of the iodide "pump" and of the thyroid-stimulating hormone receptor-adenyl cyclase complex', *Journal of Cell Biology*, 96(4), pp. 1172–1177. doi: 10.1083/jcb.96.4.1172.

Chambers, E. *et al.* (2007) 'Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses', *Journal of Chromatography B*. Elsevier, 852(1–2), pp. 22–34. doi: 10.1016/J.JCHROMB.2006.12.030.

Chen, P. *et al.* (2006) 'Proteomic analysis of rat hippocampal plasma membrane: characterization of potential neuronal-specific plasma membrane proteins', *J. Neurochem*, 98, pp. 1126–1140. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03934.x.

Cheng, L. L. *et al.* (1998) 'Evaluating Human Breast Ductal Carcinomas with High-Resolution Magic-Angle Spinning Proton Magnetic Resonance Spectroscopy', *Journal of Magnetic Resonance*. Academic Press, 135(1), pp. 194–202. doi: 10.1006/JMRE.1998.1578.

Chow, C. C. *et al.* (1991) 'Effect of low dose iodide supplementation on thyroid function in potentially susceptible subjects: are dietary iodide levels in Britain acceptable?', *Clinical Endocrinology*. Wiley/Blackwell (10.1111), 34(5), pp. 413–416. doi: 10.1111/j.1365-2265.1991.tb00314.x.

Coady, M. J. *et al.* (2004) 'The human tumour suppressor gene SLC5A8 expresses a Na⁺ - monocarboxylate cotransporter', *Journal of Physiology*, 557(3), pp. 719–731. doi: 10.1113/jphysiol.2004.063859.

CONN, J. J. *et al.* (1996) 'A Prospective Study of the Effect of Nonionic Contrast Media on

Thyroid Function', *Thyroid*, 6(2), pp. 107–110. doi: 10.1089/thy.1996.6.107.

Coon, J. J. *et al.* (2005) 'Protein identification using sequential ion/ion reactions and tandem mass spectrometry', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(27), pp. 9463–9468. doi: 10.1073/pnas.0503189102.

Corvilain, B. *et al.* (2000) 'Stimulation by iodide of H₂O₂ generation in thyroid slices from several species.', *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 278(4), pp. E692–E699. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10751204>.

Costa, V. *et al.* (2010) 'Uncovering the complexity of transcriptomes with RNA-Seq.', *Journal of biomedicine & biotechnology*. Hindawi, 2010, p. 853916. doi: 10.1155/2010/853916.

Cox, J. *et al.* (2011) 'Andromeda: A Peptide Search Engine Integrated into the MaxQuant Environment', *Journal of Proteome Research*, 10(4), pp. 1794–1805. doi: 10.1021/pr101065j.

Croixmarie, V. *et al.* (2009) 'Integrated Comparison of Drug-Related and Drug-Induced Ultra Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Metabonomic Profiles Using Human Hepatocyte Cultures', *Analytical Chemistry*. American Chemical Society, 81(15), pp. 6061–6069. doi: 10.1021/ac900333e.

Cui, P. *et al.* (2010) 'A comparison between ribo-minus RNA-sequencing and polyA-selected RNA-sequencing', *Genomics*. Academic Press, 96(5), pp. 259–265. doi: 10.1016/J.YGENO.2010.07.010.

D'Agostino, M. *et al.* (2014) 'Different expression of TSH receptor and NIS genes in thyroid cancer: Role of epigenetics', *Journal of Molecular Endocrinology*, 52(2), pp. 121–131. doi: 10.1530/JME-13-0160.

Dai, G., Levy, O. and Carrasco, N. (1996) 'Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter', *Nature*, pp. 458–460. doi: 10.1038/379458a0.

Darrouzet, E. *et al.* (2014) 'The sodium/iodide symporter: State of the art of its molecular characterization', *BBA - Biomembranes*, 1838, pp. 244–253. doi: 10.1016/j.bbamem.2013.08.013.

Dedieu, A. *et al.* (2010) 'Revisiting Iodination Sites in Thyroglobulin with an Organ-oriented Shotgun Strategy'. doi: 10.1074/jbc.M110.159483.

Degroot, L. J. (1966) 'Kinetic Analysis of Iodine Metabolism', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. Oxford University Press, 26(2), pp. 149–173. doi: 10.1210/jcem-26-2-149.

Delange, F. *et al.* (2002) 'Disorders Control Programs', *Thyroid*, 12(10).

Denef, J. F., Many, M. C. and Van Den Hove, M. F. (1996) 'Iodine-induced thyroid inhibition and cell necrosis: Two consequences of the same free-radical mediated mechanism?', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 121(1), pp. 101–103. doi: 10.1016/0303-7207(96)03848-8.

DePristo, M. A. *et al.* (2011) 'A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data', *Nature Genetics*. Nature Publishing Group, 43(5), pp. 491–

498. doi: 10.1038/ng.806.

Dirk A. Wolters, †, Michael P. Washburn, † and John R. Yates, I. (2001) 'An Automated Multidimensional Protein Identification Technology for Shotgun Proteomics'. American Chemical Society . doi: 10.1021/AC010617E.

Doggui, R. and El Atia, J. (2015) 'Iodine deficiency: Physiological, clinical and epidemiological features, and pre-analytical considerations', *Annales d'Endocrinologie*. Elsevier Masson SAS, 76(1), pp. 59–66. doi: 10.1016/j.ando.2014.12.002.

Dong, S. M. *et al.* (2005) 'Progressive methylation during the serrated neoplasia pathway of the colorectum', *Modern Pathology*, 18(2), pp. 170–178. doi: 10.1038/modpathol.3800261.

Dong Yun, S. *et al.* (2003) 'Redox stress regulates cell proliferation and apoptosis of human hepatoma through Akt protein phosphorylation', *FEBS Letters*, 542(1–3), pp. 60–64. doi: 10.1016/S0014-5793(03)00338-7.

Dugrillon, A. and Gartner, R. (1995) '-Iodolactones decrease epidermal growth factor-induced proliferation and inositol-1,4,5-trisphosphate generation in porcine thyroid follicles--a possible mechanism of growth inhibition by iodide', *European Journal of Endocrinology*, 132(6), pp. 735–743. doi: 10.1530/eje.0.1320735.

Dunn, J. T. and Delange, F. (2001) 'COMMENTARY Damaged Reproduction: The Most Important Consequence of Iodine Deficiency', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(6), pp. 2360–2363. Available at: https://watermark.silverchair.com/jcem2360.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kkhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ysgAAAacwggGjBgkqhkiG9w0BBwagggGUMIIBkAIBADCCA YkGCSqGSib3DQEHATAeBglghkgBZQMEAS4wEQQMvfjHNxg7KbNygyU5AgEQgIIB WIGVmSjG5LbyXCidTaiwccPXYLijAtDcCgGCVgkTn08Jvp (Accessed: 27 April 2018).

Dunn, W. B. *et al.* (2011) 'Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry', *Nature Protocols*. Nature Publishing Group, 6(7), pp. 1060–1083. doi: 10.1038/nprot.2011.335.

Eheman, C. R., Garbe, P. and Tuttle, R. M. (2003) 'Autoimmune Thyroid Disease Associated with Environmental Thyroidal Irradiation', *Thyroid*. Mary Ann Liebert, Inc. , 13(5), pp. 453–464. doi: 10.1089/105072503322021115.

Elizabeth J. Want, † *et al.* (2005) 'Solvent-Dependent Metabolite Distribution, Clustering, and Protein Extraction for Serum Profiling with Mass Spectrometry'. American Chemical Society . doi: 10.1021/AC051312T.

Eng, J. K., McCormack, A. L. and Yates, J. R. (1994) 'An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database', *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. No longer published by Elsevier, 5(11), pp. 976–989. doi: 10.1016/1044-0305(94)80016-2.

Eng, P. H. *et al.* (2001) 'Regulation of the sodium iodide symporter by iodide in FRTL-5 cells.', *European journal of endocrinology*, 144(2), pp. 139–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11182750> (Accessed: 21 July 2018).

Eng, P. H. K. *et al.* (1999) 'Escape from the Acute Wolff-Chaikoff Effect Is Associated with a

Decrease in Thyroid Sodium / Iodide Symporter Messenger Ribonucleic Acid and Protein', *The Endocrine Society*, 140(8), pp. 3404–3410. doi: 10.1210/endo.140.8.6893.

van Erven, L. and Schalij, M. J. (2010) 'Amiodarone: an effective antiarrhythmic drug with unusual side effects.', *Heart (British Cardiac Society)*. BMJ Publishing Group Ltd, 96(19), pp. 1593–600. doi: 10.1136/hrt.2008.152652.

Everett, L. A. *et al.* (1997) 'Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS).', *Nature genetics*, 17(4), pp. 411–22. doi: 10.1038/ng1297-411.

Fenn, J. B. *et al.* (1989) 'Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules.', *Science (New York, N.Y.)*. American Association for the Advancement of Science, 246(4926), pp. 64–71. doi: 10.1126/SCIENCE.2675315.

Fiehn, O. *et al.* (2000) 'Metabolite profiling for plant functional genomics', *Nature Biotechnology*. Nature Publishing Group, 18(11), pp. 1157–1161. doi: 10.1038/81137.

Frank, H. *et al.* (2008) 'Lactaturia and loss of sodium-dependent lactate uptake in the colon of SLC5A8-deficient mice', *Journal of Biological Chemistry*, 283(36), pp. 24729–24737. doi: 10.1074/jbc.M802681200.

Frank, H. *et al.* (2008) 'Lactaturia and loss of sodium-dependent lactate uptake in the colon of SLC5A8-deficient mice', *Journal of Biological Chemistry*, 283(36), pp. 24729–24737. doi: 10.1074/jbc.M802681200.

Frewen, B. and MacCoss, M. J. (2007) 'Using BiblioSpec for Creating and Searching Tandem MS Peptide Libraries', in *Current Protocols in Bioinformatics*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., p. 13.7.1-13.7.12. doi: 10.1002/0471250953.bi1307s20.

Ganapathy, V. *et al.* (2005) 'Biological functions of SLC5A8, a candidate tumour suppressor.', *Biochemical Society transactions*, 33(Pt 1), pp. 237–40. doi: 10.1042/BST0330237.

Ganapathy, V. *et al.* (2008) 'Sodium-coupled Monocarboxylate Transporters in Normal Tissues and in Cancer', *The AAPS Journal*, 10(1), pp. 193–199. doi: 10.1208/s12248-008-9022-y.

Gartner, W. and Weissel, M. (2004) 'Do Iodine-Containing Contrast Media Induce Clinically Relevant Changes in Thyroid Function Parameters of Euthyroid Patients Within the First Week?', *Thyroid*, 14(7), pp. 521–524. doi: 10.1089/1050725041517075.

Gavaret, J., Cahnmann, H. J. and Nunez, J. (1981) 'Thyroid Hormone Synthesis in Thyroglobulin', *Journal of Biological Chemistry*, 256(17), pp. 9167–9173.

Geer, L. Y. *et al.* (2004) 'Open Mass Spectrometry Search Algorithm', *Journal of Proteome Research*, 3(5), pp. 958–964. doi: 10.1021/pr0499491.

Glenn, T. C. (2011) 'Field guide to next-generation DNA sequencers', *molecular ecology resources*, 11, pp. 759–769. doi: 10.1111/j.1755-0998.2011.03024.x.

Glinoe, D. (1997) 'The regulation of thyroid function in pregnancy pathways of endocrine adaption from physiology to pathology', *Endocr Rev*, 18(3), pp. 404–433. doi: 10.1210/er.18.3.404.

- Godley, A. F. and Stanbury, J. B. (1954) 'Preliminary experience in the treatment of hyperthyroidism with potassium perchlorate.', *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 14(1), pp. 70–78. doi: 10.1210/jcem-14-1-70.
- Golstein, J. and Dumont, J. E. (1996) 'Cytotoxic effects of iodide on thyroid cells: Difference between rat thyroid FRTL-5 cell and primary dog thyrocyte responsiveness', *Journal of Endocrinological Investigation*, 19(2), pp. 119–126. doi: 10.1007/BF03349847.
- Goodacre, R. (2004) 'Making sense of the metabolome using evolutionary computation: seeing the wood with the trees', *Journal of Experimental Botany*. Oxford University Press, 56(410), pp. 245–254. doi: 10.1093/jxb/eri043.
- Gopal, E., Fei, Y. J., *et al.* (2004) 'Expression of slc5a8 in kidney and its role in Na⁺-coupled transport of lactate', *Journal of Biological Chemistry*, 279(43), pp. 44522–44532. doi: 10.1074/jbc.M405365200.
- Gopal, E., Fei, Y.-J., *et al.* (2004) 'Expression of slc5a8 in Kidney and Its Role in Na⁺-coupled Transport of Lactate*'. doi: 10.1074/jbc.M405365200.
- Gopal, E. *et al.* (2007) 'Transport of nicotinate and structurally related compounds by human SMCT1 (SLC5A8) and its relevance to drug transport in the mammalian intestinal tract', *Pharmaceutical Research*, 24(3), pp. 575–584. doi: 10.1007/s11095-006-9176-1.
- Grant, E. J. *et al.* (2017) 'Solid Cancer Incidence among the Life Span Study of Atomic Bomb Survivors: 1958–2009', *Radiation Research*. The Radiation Research Society , 187(5), pp. 513–537. doi: 10.1667/RR14492.1.
- Grayson, R. R. (1960) 'Factors which influence the radioactive iodine thyroidal uptake test', *The American Journal of Medicine*, 28(3), pp. 397–415. doi: 10.1016/0002-9343(60)90171-6.
- Guével, E. *et al.* (2004) 'Dysfonctionnement thyroïdien et surcharge iodée professionnelle', *Archives des maladies professionnelles et de l'environnement*, 65(4), pp. 438–441.
- Gupta, N. *et al.* (2006) 'SLC5A8 (SMCT1)-mediated transport of butyrate forms the basis for the tumor suppressive function of the transporter', *Life Sciences*. Pergamon, 78(21), pp. 2419–2425. doi: 10.1016/J.LFS.2005.10.028.
- Hague, A. *et al.* (1993) 'Sodium butyrate induces apoptosis in human colonic tumour cell lines in a p53-independent pathway: implications for the possible role of dietary fibre in the prevention of large-bowel cancer.', *International journal of cancer*, 55(3), pp. 498–505. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8397167> (Accessed: 6 June 2018).
- Halestrap, A. P. and Price, N. T. (1999) 'The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation', *Biochem J*, 343 Pt 2, pp. 281–299. doi: 10.1042/0264-6021:3430281.
- Halmi, N. S. *et al.* (1959) 'Biphasic effect of TSH on thyroidal iodide collection in rats.', *Endocrinology* ., 67(october), pp. 70–81.
- Hancock, S. L., Cox, R. S. and McDougall, I. R. (1991) 'Thyroid Diseases after Treatment of Hodgkin's Disease', *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society , 325(9), pp. 599–605. doi: 10.1056/NEJM199108293250902.

- Hansen, K. C. *et al.* (2003) ‘Mass spectrometric analysis of protein mixtures at low levels using cleavable ¹³C-isotope-coded affinity tag and multidimensional chromatography.’, *Molecular & cellular proteomics : MCP*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 2(5), pp. 299–314. doi: 10.1074/mcp.M300021-MCP200.
- Hansen, K. D., Brenner, S. E. and Dudoit, S. (2010) ‘Biases in Illumina transcriptome sequencing caused by random hexamer priming.’, *Nucleic acids research*. Oxford University Press, 38(12), p. e131. doi: 10.1093/nar/gkq224.
- Hatzia Apostolou, M. and Iliopoulos, D. (2011) ‘Epigenetic aberrations during oncogenesis’, *Cellular and Molecular Life Sciences*. SP Birkhäuser Verlag Basel, 68(10), pp. 1681–1702. doi: 10.1007/s00018-010-0624-z.
- Haugen, B. R. *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*. Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA , 26(1), pp. 1–133. doi: 10.1089/thy.2015.0020.
- He, Y. *et al.* (2008) ‘The antisense transcriptomes of human cells.’, *Science (New York, N.Y.)*. American Association for the Advancement of Science, 322(5909), pp. 1855–7. doi: 10.1126/science.1163853.
- Heidenreich, W. F. *et al.* (1999) ‘Time trends of thyroid cancer incidence in Belarus after the Chernobyl accident.’, *Radiation research*, 151(5), pp. 617–625. doi: 10.2307/3580038.
- Hong, C. *et al.* (2005) ‘Shared Epigenetic Mechanisms in Human and Mouse Gliomas Inactivate Expression of the Growth Suppressor Shared Epigenetic Mechanisms in Human and Mouse Gliomas Inactivate Expression of the Growth Suppressor SLC5A8’, *cancer research*, (26), pp. 3617–3623. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0048.
- Horn, D. M., Zubarev, R. A. and McLafferty, F. W. (2000) ‘Automated de novo sequencing of proteins by tandem high-resolution mass spectrometry.’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(19), pp. 10313–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10984529> (Accessed: 8 June 2018).
- Hsu, W.-L. *et al.* (2013) ‘The Incidence of Leukemia, Lymphoma and Multiple Myeloma among Atomic Bomb Survivors: 1950–2001’, *Radiation Research*. The Radiation Research Society , 179(3), pp. 361–382. doi: 10.1667/RR2892.1.
- Hu, S. *et al.* (2006) ‘Association of aberrant methylation of tumor suppressor genes with tumor aggressiveness and BRAF mutation in papillary thyroid cancer’, *International Journal of Cancer*. Wiley-Blackwell, 119(10), pp. 2322–2329. doi: 10.1002/ijc.22110.
- Iglesias, M. L. *et al.* (2017) ‘Radiation exposure and thyroid cancer: a review’, *Archives of Endocrinology and Metabolism*, 61(2), pp. 180–187. doi: 10.1590/2359-3997000000257.
- Illumina (2010) ‘Illumina sequencing technology’, *Technology Spotlight: Illumina Sequencing*, pp. 1–5. doi: 10.1016/S0167-7799(03)00189-6.
- Iwanaga, T. *et al.* (2006) ‘Cellular expression of monocarboxylate transporters (MCT) in the digestive tract of the mouse, rat, and humans, with special reference to slc5a8.’, *Biomedical*

research (Tokyo, Japan), 27(5), pp. 243–254. doi: 10.2220/biomedres.27.243.

Jaffiol, C. *et al.* (1982) ‘The influence on thyroid function of two iodine-containing radiological contrast media’, *The British Journal of Radiology*. The British Institute of Radiology, 55(652), pp. 263–265. doi: 10.1259/0007-1285-55-652-263.

Jankevics, A. *et al.* (2009) ‘Metabolomic studies of experimental diabetic urine samples by ¹H NMR spectroscopy and LC/MS method’, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. Elsevier, 97(1), pp. 11–17. doi: 10.1016/J.CHEMOLAB.2008.06.012.

Johan Trygg, †, Elaine Holmes, ‡ and and Torbjörn Lundstedt*, §,|| (2006) ‘Chemometrics in Metabonomics’. American Chemical Society. doi: 10.1021/PR060594Q.

John, B. *et al.* (1955) ‘THE OCCURRENCE OF MONO- AND DI-IODO- TYROSINE IN THE BLOOD OF A PATIENT WITH CONGENITAL GOITER’, *J Clin Endocrinol Metab.*, (15), pp. 1216–1227.

Jubiz, W., Carlile, S. and Lagerquist, L. D. (1977) ‘Serum Thyrotropin and Thyroid Hormone Levels in Humans Receiving Chronic Potassium Iodide’, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. Oxford University Press, 44(2), pp. 379–382. doi: 10.1210/jcem-44-2-379.

Jung, K.-H. *et al.* (2008) ‘Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Enhances Sodium Iodide Symporter Function and Efficacy of Radioiodide Therapy in Nonthyroidal Cancer Cells’, *Journal of Nuclear Medicine*, 49(12), pp. 1966–1972. doi: 10.2967/jnumed.108.055764.

Junot, C. *et al.* (2014) ‘High resolution mass spectrometry based techniques at the crossroads of metabolic pathways’, *Mass Spectrometry Reviews*. Wiley-Blackwell, 33(6), pp. 471–500. doi: 10.1002/mas.21401.

Juvenal, G. J. *et al.* (1980) ‘Uptake, metabolism and action of triiodothyronine in calf-thyroid slices’, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 22, pp. 31–40.

Käll, L. *et al.* (2007) ‘Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets’, *Nature Methods*. Nature Publishing Group, 4(11), pp. 923–925. doi: 10.1038/nmeth1113.

Kaminsky, S. M. *et al.* (1994) ‘Na⁺-I⁻-symport activity is present in membrane vesicles from thyrotropin-deprived non-I⁻-transporting cultured thyroid cells’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(9), p. 3789. Available at: <http://www.pnas.org/content/91/9/3789.full.pdf>.

Kanehisa, M. (2002) ‘The KEGG Database 2002’, in *Novartis*. Wiley-Blackwell, pp. 91–103. doi: 10.1002/0470857897.ch8.

Karas, M. and Hillenkamp, F. (1988) ‘Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons’, *Analytical Chemistry*. American Chemical Society, 60(20), pp. 2299–2301. doi: 10.1021/ac00171a028.

Karbownik, M. and Lewinski, A. (2003) ‘The role of oxidative stress in physiological and pathological processes in the thyroid gland; possible involvement in pineal-thyroid interactions.’, *Neuro endocrinology letters*, 24(5), pp. 293–303. Available at:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14647000> (Accessed: 23 October 2018).

Katajamaa, M., Miettinen, J. and Oresic, M. (2006) 'MZmine: toolbox for processing and visualization of mass spectrometry based molecular profile data', *Bioinformatics*. Oxford University Press, 22(5), pp. 634–636. doi: 10.1093/bioinformatics/btk039.

Katzberg, R. W. and Haller, C. (2006) 'Contrast-induced nephrotoxicity: Clinical landscape', *Kidney International*, 69(100), pp. S3–S7. doi: 10.1038/sj.ki.5000366.

Kazakov, V. S., Demidchik, E. P. and Astakhova, L. N. (1992) 'Thyroid cancer after Chernobyl', *Nature*, 359(6390), pp. 21–21. doi: 10.1038/359021a0.

Keller, A. *et al.* (2005) 'A uniform proteomics MS/MS analysis platform utilizing open XML file formats', *Molecular Systems Biology*, 1(1), pp. E1–E8. doi: 10.1038/msb4100024.

Kim, E.-Y. *et al.* (2012) 'A susceptible protein by proteomic analysis from *Vibrio anguillarum* under various environmental conditions.', *Bioprocess and biosystems engineering*, 35(1–2), pp. 273–82. doi: 10.1007/s00449-011-0636-6.

Kim, Y. (2000) 'AGA technical review: Impact of dietary fiber on colon cancer occurrence', *Gastroenterology*. Elsevier, 118(6), pp. 1235–1257. doi: 10.1016/S0016-5085(00)70377-5.

Kogai, T. *et al.* (1997) 'Regulation by Thyroid-Stimulating Hormone of Sodium/ Iodide Symporter gene expression and protein levels in FRTL-5 Cells', *Endocrinology*, 138(6), pp. 2227–2232.

Kogai, T. *et al.* (2000) 'Induction of follicle formation in long-term cultured normal human thyroid cells treated with thyrotropin stimulates iodide uptake but not sodium/iodide symporter messenger RNA and protein expression', *Journal of Endocrinology*, 167(1), pp. 125–135. doi: 10.1677/joe.0.1670125.

Kogai, T., Taki, K. and Brent, G. A. (2006) 'Enhancement of sodium/iodide symporter expression in thyroid and breast cancer', *Endocrine-Related Cancer*, 13(3), pp. 797–826. doi: 10.1677/erc.1.01143.

Kopp, P. (2000) 'Pendred's Syndrome and Genetic Defects in Thyroid Hormone Synthesis', *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*. Kluwer Academic Publishers, 1.

Krevans, J. R., Asper, S. P. and Rienhoff, William F. (1962) 'Fatal Aplastic Anemia Following Use of potassium perchlorate in thyrotoxicosis', *JAMA*, 181(2), pp. 162–164.

Krieger, C. C. *et al.* (2017) 'TSH/IGF-1 receptor cross-Talk rapidly activates extracellular signal-regulated kinases in multiple cell types', *Endocrinology*, 158(10), pp. 3676–3683. doi: 10.1210/en.2017-00528.

Kristy J. Reynolds, Xudong Yao, and Fenselau*, C. (2002) 'Proteolytic ¹⁸O Labeling for Comparative Proteomics: Evaluation of Endoprotease Glu-C as the Catalytic Agent†'. American Chemical Society . doi: 10.1021/PR0100016.

Kruh, J. (1982) 'Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture.', *Molecular and cellular biochemistry*, 42(2), pp. 65–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6174854> (Accessed: 6 June 2018).

- Kuhn, E. *et al.* (2004) 'Quantification of C-reactive protein in the serum of patients with rheumatoid arthritis using multiple reaction monitoring mass spectrometry and ¹³C-labeled peptide standards', *PROTEOMICS*. Wiley-Blackwell, 4(4), pp. 1175–1186. doi: 10.1002/pmic.200300670.
- Lacroix, L. *et al.* (2004) 'Expression of the apical iodide transporter in human thyroid tissues: A comparison study with other iodide transporters', *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(3), pp. 1423–1428. doi: 10.1210/jc.2003-030542.
- Lamas, L. and Ingbar, S. H. (1978) 'The Effect of Varying Iodine Content on the Susceptibility of Thyroglobulin to Hydrolysis by Thyroid Acid Protease*', 102(1), pp. 188–197.
- Laurberg, P. *et al.* (1998) 'Iodine intake and the pattern of thyroid disorders: A comparative epidemiological study of thyroid abnormalities in the elderly in iceland and in Jutland, Denmark', *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 83(3), pp. 765–769. doi: 10.1210/jc.83.3.765.
- Laurie, A. J., Lyon, S. G. and Lasser, E. C. (1992) 'Contrast material iodides: potential effects on radioactive iodine thyroid uptake.', *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine*, 33(2), pp. 237–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1732445>.
- Le, H.-S. *et al.* (2013) 'Probabilistic error correction for RNA sequencing', *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 41(10), pp. e109–e109. doi: 10.1093/nar/gkt215.
- LEE, J. *et al.* (2012) 'Quantile Normalization Approach for Liquid Chromatography[^]ndash;Mass Spectrometry-based Metabolomic Data from Healthy Human Volunteers', *Analytical Sciences*. The Japan Society for Analytical Chemistry, 28(8), pp. 801–805. doi: 10.2116/analsci.28.801.
- Lee, M. V. *et al.* (2011) 'A dynamic model of proteome changes reveals new roles for transcript alteration in yeast', *Molecular Systems Biology*. Nature Publishing Group, 7(514), pp. 1–12. doi: 10.1038/msb.2011.48.
- Lee, S. Y. *et al.* (2015) 'A review: Radiographic iodinated contrast media-induced thyroid dysfunction', *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 100(2), pp. 376–383. doi: 10.1210/jc.2014-3292.
- Lee, S. Y. *et al.* (2015) 'Urinary iodine excretion and serum thyroid function in adults after iodinated contrast administration.', *Thyroid: official journal of the American Thyroid Association*. Mary Ann Liebert, Inc., 25(5), pp. 471–7. doi: 10.1089/thy.2015.0024.
- Lee, W. R., Pease, A. P. and Berry, C. R. (2010) 'The effects of iohexol administration on technetium thyroid scintigraphy in normal cats.', *Veterinary Radiology & Ultrasound*. Wiley/Blackwell (10.1111), 51(2), pp. 182–185. doi: 10.1111/j.1740-8261.2009.01649.x.
- Leoni, S. G. *et al.* (2011) 'Regulation of Thyroid Oxidative State by Thioredoxin Reductase Has a Crucial Role in Thyroid Responses to Iodide Excess', *Molecular Endocrinology*, 25(11), pp. 1924–1935. doi: 10.1210/me.2011-0038.
- Leung, A. M. and Braverman, L. E. (2014) 'Consequences of excess iodine', *Nature Reviews Endocrinology*. Nature Publishing Group, 10(3), pp. 136–142. doi: 10.1038/nrendo.2013.251.

- Levy, O. *et al.* (1997) 'Characterization of the thyroid Na⁺/I⁻ symporter with an anti-COOH terminus antibody.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(11), pp. 5568–5573. doi: 10.1073/pnas.94.11.5568.
- Levy, O., De la Vieja, a and Carrasco, N. (1998) 'The Na⁺/I⁻ symporter (NIS): recent advances.', *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 30(2), pp. 195–206. doi: 10.1023/A:1020577426732.
- Li, H. *et al.* (2003) 'SLC5A8, a sodium transporter, is a tumor suppressor gene silenced by methylation in human colon aberrant crypt foci and cancers', *PNAS*, 100(14), pp. 8412–8417. Available at: <http://www.pnas.org/content/pnas/100/14/8412.full.pdf> (Accessed: 26 April 2018).
- Li, H. *et al.* (2009) 'The Sequence Alignment/Map format and SAMtools', *Bioinformatics*. Oxford University Press, 25(16), pp. 2078–2079. doi: 10.1093/bioinformatics/btp352.
- Li, H. and Durbin, R. (2009) 'Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform', *Bioinformatics*. Oxford University Press, 25(14), pp. 1754–1760. doi: 10.1093/bioinformatics/btp324.
- Li, H., Ganta, S. and Fong, P. (2010) 'Altered ion transport by thyroid epithelia from CFTR^{-/-} pigs suggests mechanisms for hypothyroidism in cystic fibrosis', *Experimental Physiology*, 95(12), pp. 1132–1144. doi: 10.1113/expphysiol.2010.054700.
- Lindgreen, S. (2012) 'AdapterRemoval: Easy Cleaning of Next Generation Sequencing Reads', *BMC Research Notes*. BioMed Central, 5(1), p. 337. doi: 10.1186/1756-0500-5-337.
- Link, A. J. *et al.* (1999) 'Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry', *Nature Biotechnology*. Nature Publishing Group, 17(7), pp. 676–682. doi: 10.1038/10890.
- Lissitzky, S., Benevent, M.-T. and Roques, M. (1961) 'Désiodation photochimique des dérivés iodés de la thyronine et de la tyrosine en présence de flavinemononucléotide', *Biochimica et Biophysica Acta*. Elsevier, 51(2), pp. 407–410. doi: 10.1016/0006-3002(61)90194-9.
- Lomate, P. R. *et al.* (2018) 'Integrated transcriptomic and proteomic analyses suggest the participation of endogenous protease inhibitors in the regulation of protease gene expression in *Helicoverpa armigera*', *Molecular & Cellular Proteomics*, p. mcp.RA117.000533. doi: 10.1074/mcp.RA117.000533.
- Luber, C. A. *et al.* (2010) 'Quantitative Proteomics Reveals Subset-Specific Viral Recognition in Dendritic Cells', *Immunity*. Cell Press, 32(2), pp. 279–289. doi: 10.1016/J.IMMUNI.2010.01.013.
- De Luca, F. *et al.* (1982) 'Thyroid function in Children with Cystic Fibrosis', *European journal of pediatrics*, 138, pp. 327–330.
- Luster, M. *et al.* (2008) 'Guidelines for radioiodine therapy of differentiated thyroid cancer', *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. Springer-Verlag, 35(10), pp. 1941–1959. doi: 10.1007/s00259-008-0883-1.
- Macek, B. *et al.* (2006) 'Top-down Protein Sequencing and MS³ on a Hybrid Linear Quadrupole Ion Trap-Orbitrap Mass Spectrometer', *Molecular & Cellular Proteomics*, 5(5),

pp. 949–958. doi: 10.1074/mcp.T500042-MCP200.

Makarov, A. *et al.* (no date) ‘Performance Investigation of an Orbitrap Mass Analyzer Combined with a Quadrupole Mass Filter Instrumentomics in action’, *ASMS Poster*, 2011.

Many, M. C. *et al.* (1992) ‘In vitro study of acute toxic effects of high iodide doses in human thyroid follicles’, *Endocrinology*, 131(2), pp. 621–630.

Martin, M. (2011) ‘Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads’, *EMBnet.journal*, 17(1), p. 10. doi: 10.14806/ej.17.1.200.

Martin, P. M. *et al.* (2007) ‘Expression of the sodium-coupled monocarboxylate transporters SMCT1 (SLC5A8) and SMCT2 (SLC5A12) in retina’, *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 48(7), pp. 3356–3363. doi: 10.1167/iovs.06-0888.

Martin, P. M. *et al.* (2007) ‘Expression of the Sodium-Coupled Monocarboxylate Transporters SMCT1 (SLC5A8) and SMCT2 (SLC5A12) in Retina’, *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 48(7), pp. 3356–3363. doi: 10.1167/iovs.06-0888.

Massart, C. *et al.* (2011) ‘Cell biology of H₂O₂ generation in the thyroid: Investigation of the control of dual oxidases (DUOX) activity in intact ex vivo thyroid tissue and cell lines’, *Molecular and Cellular Endocrinology*. Elsevier, 343(1–2), pp. 32–44. doi: 10.1016/J.MCE.2011.05.047.

McDonald, W. H. and Yates, J. R. (2002) ‘Shotgun proteomics and biomarker discovery.’, *Disease markers*, 18(2), pp. 99–105. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12364816> (Accessed: 8 June 2018).

McLafferty, F. W. *et al.* (1999) ‘Techview: biochemistry. Biomolecule mass spectrometry.’, *Science (New York, N.Y.)*, 284(5418), pp. 1289–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10383309> (Accessed: 8 June 2018).

McLafferty, F. W. *et al.* (2001) ‘Electron capture dissociation of gaseous multiply charged ions by fourier-transform ion cyclotron resonance’, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. No longer published by Elsevier, 12(3), pp. 245–249. doi: 10.1016/S1044-0305(00)00223-3.

Medvei, V. C. (1993) *The history of clinical endocrinology: a comprehensive account of endocrinology from earliest times to the present day*. Parthenon Pub. Group. Available at: <https://books.google.fr/books?id=zRxQImynEsoC&pg=PA140&lpg=PA140&dq=baumann+thyroid&source=bl&ots=w5rZ1k1F6Q&sig=Nvd3kxTbUWWyHy1yHDeU9uipLyI&hl=fr&sa=X&ved=0ahUKEwi4gqfQ687bAhVLa8AKHcBiCWIQ6AEIWjAG#v=onepage&q=baumann thyroid&f=false> (Accessed: 12 June 2018).

Michalski, A. *et al.* (2011) ‘Mass Spectrometry-based Proteomics Using Q Exactive, a High-performance Benchtop Quadrupole Orbitrap Mass Spectrometer’, *Molecular & Cellular Proteomics*, 10(9), p. M111.011015-M111.011015. doi: 10.1074/mcp.M111.011015.

Miyauchi, S., Gopal, E., Fei, Y. J., *et al.* (2004) ‘Functional Identification of SLC5A8, a Tumor Suppressor Down-regulated in Colon Cancer, as a Na⁺-coupled Transporter for Short-chain Fatty Acids’, *Journal of Biological Chemistry*, 279(14), pp. 13293–13296. doi: 10.1074/jbc.C400059200.

Miyauchi, S., Gopal, E., Fei, Y.-J., *et al.* (2004) 'Functional Identification of SLC5A8, a Tumor Suppressor Down-regulated in Colon Cancer, as a Na⁺-coupled Transporter for Short-chain Fatty Acids*'. doi: 10.1074/jbc.C400059200.

Miyauchi, S. *et al.* (2010) 'Sodium-coupled electrogenic transport of pyroglutamate (5-oxoproline) via SLC5A8, a monocarboxylate transporter', *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. Elsevier B.V., 1798(6), pp. 1164–1171. doi: 10.1016/j.bbamem.2010.03.002.

Moisey, R. S. *et al.* (2007) 'Thyroiditis and iodide mumps following an angioplasty', *Nephrology Dialysis Transplantation*, 22(4), pp. 1250–1252. doi: 10.1093/ndt/gfl777.

van der Molen, A. J., Thomsen, H. S. and Morcos, S. K. (2004) 'Effect of iodinated contrast media on thyroid function in adults', *European Radiology*, 14(5), pp. 902–907. doi: 10.1007/s00330-004-2238-z.

Moore, R. E., Young, M. K. and Lee, T. D. (2000) 'Method for screening peptide fragment ion mass spectra prior to database searching', *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. No longer published by Elsevier, 11(5), pp. 422–426. doi: 10.1016/S1044-0305(00)00097-0.

Moreno, J. C. *et al.* (2002) 'Inactivating Mutations in the Gene for Thyroid Oxidase 2 (*THOX2*) and Congenital Hypothyroidism', *New England Journal of Medicine*, 347(2), pp. 95–102. doi: 10.1056/NEJMoa012752.

Moreno, J. C. *et al.* (2008) 'Mutations in the Iodotyrosine Deiodinase Gene and Hypothyroidism', *New England Journal of Medicine*, 358(17), pp. 1811–1818. doi: 10.1056/NEJMoa0706819.

Morgan, S. J. *et al.* (2016) 'Thyrotropin and Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor Crosstalk Upregulates Sodium-Iodide Symporter Expression in Primary Cultures of Human Thyrocytes', *Thyroid*, 26(12), pp. 1794–1803. doi: 10.1089/thy.2016.0323.

Morin, R. D. *et al.* (2008) 'Profiling the HeLa S3 transcriptome using randomly primed cDNA and massively parallel short-read sequencing', *BioTechniques*, 45(1), pp. 81–94. doi: 10.2144/000112900.

Morreale De Escobar, G., Jesus Obregon, M. and Escobar Del Rey, F. (2000) 'CLINICAL PERSPECTIV: Is Neuropsychological Development Related to Maternal Hypothyroidism or to Maternal Hypothyroxinemia?*', *J Clin Endocrinol Metab*, 85, pp. 3975–3987. Available at: https://watermark.silverchair.com/jcem3975.pdf?token=AQECAHi208BE49Oan9kKhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ysgAAAaowggGmBkgqhkIG9w0BBwagggGXMIIBkwIBADCCAYwGCSqGSib3DQEHATAeBglghkgBZQMEAS4wEQQMORP2XkaqdpJdU4h4AgEQgIIBXUY9TjwoWJTKb2kWOcNpriLuVOE5DP3uusXTilx0ddqs0i (Accessed: 27 April 2018).

Mortz, E. *et al.* (1996) 'Sequence tag identification of intact proteins by matching tandem mass spectral data against sequence data bases.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*. National Academy of Sciences, 93(16), pp. 8264–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8710858> (Accessed: 8 June 2018).

Mueller, L. N. *et al.* (2008) 'An Assessment of Software Solutions for the Analysis of Mass Spectrometry Based Quantitative Proteomics Data', *Journal of Proteome Research*. American Chemical Society, 7(1), pp. 51–61. doi: 10.1021/pr700758r.

Nauman, J. and Wolff, J. (1993) 'Iodide prophylaxis in Poland after the chernobyl reactor accident: Benefits and risks', *The American Journal of Medicine*, 94(5), pp. 524–532. doi: 10.1016/0002-9343(93)90089-8.

Neil L. Kelleher *et al.* (1999) 'Top Down versus Bottom Up Protein Characterization by Tandem High-Resolution Mass Spectrometry'. American Chemical Society . doi: 10.1021/JA973655H.

Nesvizhskii, A. I. (2010) 'A survey of computational methods and error rate estimation procedures for peptide and protein identification in shotgun proteomics', *Journal of Proteomics*. Elsevier, 73(11), pp. 2092–2123. doi: 10.1016/J.JPROT.2010.08.009.

Nielsen, P. A. *et al.* (2005) 'Proteomic Mapping of Brain Plasma Membrane Proteins', *Molecular & Cellular Proteomics*, 4(4), pp. 402–408. doi: 10.1074/mcp.T500002-MCP200.

Nimmons, G. L. *et al.* (2013) 'Urinary Iodine Excretion After Contrast Computed Tomography Scan', *JAMA Otolaryngology–Head & Neck Surgery*. American Medical Association, 139(5), p. 479. doi: 10.1001/jamaoto.2013.2552.

Nunez, J. and Pommier, J. (1982) *Formation of Thyroid Hormones, Vitamins and Hormones*. doi: 10.1016/S0083-6729(08)61137-1.

Nygaard, B. *et al.* (1998) 'Iohexol: effects on uptake of radioactive iodine in the thyroid and on thyroid function.', *Academic radiology*. Elsevier, 5(6), pp. 409–14. doi: 10.1016/S1076-6332(98)80026-3.

Ohayon, R. *et al.* (1994) 'Inhibition of thyroid NADPH-oxidase by 2-iodohexadecanal in a cell-free system', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 99(1), pp. 133–141. doi: 10.1016/0303-7207(94)90156-2.

Oliver, S. G. *et al.* (1998) 'Systematic functional analysis of the yeast genome', *Trends in Biotechnology*. Elsevier Current Trends, 16(9), pp. 373–378. doi: 10.1016/S0167-7799(98)01214-1.

Olsen, J. V *et al.* (2007) 'Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis', *Nature Methods*. Nature Publishing Group, 4(9), pp. 709–712. doi: 10.1038/nmeth1060.

Olsen, J. V, Ong, S.-E. and Mann, M. (2004) 'Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues.', *Molecular & cellular proteomics : MCP*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 3(6), pp. 608–14. doi: 10.1074/mcp.T400003-MCP200.

Ong, S.-E. and Mann, M. (2005) 'Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative', *Nature Chemical Biology*. Nature Publishing Group, 1(5), pp. 252–262. doi: 10.1038/nchembio736.

Organisation mondiale de la Santé (2014) 'Détermination du bilan iodé des populations par la concentration d'iode urinaire', *Organisation mondiale de la Santé*. Available at: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/130835/WHO_NMH_NHD_EPG_14.3_fre.pdf?sequence=1 (Accessed: 27 April 2018).

Ori, A. *et al.* (2015) 'Integrated Transcriptome and Proteome Analyses Reveal Organ-Specific Proteome Deterioration in Old Rats', *Cell Systems*. The Authors, 1(3), pp. 224–237. doi:

10.1016/j.cels.2015.08.012.

Ozasa, K. *et al.* (2012) 'Studies of the Mortality of Atomic Bomb Survivors, Report 14, 1950–2003: An Overview of Cancer and Noncancer Diseases', *Radiation Research*. The Radiation Research Society, 177(3), pp. 229–243. doi: 10.1667/RR2629.1.

Ozkan, S. *et al.* (2013) 'Thyroid functions after contrast agent administration for coronary angiography: a prospective observational study in euthyroid patients', *Anadolu Kardiyoloji Dergisi/The Anatolian Journal of Cardiology*. doi: 10.5152/akd.2013.134.

Padovani, R. P. *et al.* (2012) 'One Month Is Sufficient for Urinary Iodine to Return to Its Baseline Value After the Use of Water-Soluble Iodinated Contrast Agents in Post-Thyroidectomy Patients Requiring Radioiodine Therapy', *Thyroid*. Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA, 22(9), pp. 926–930. doi: 10.1089/thy.2012.0099.

Palzs, B. and Suhal, S. (2005) 'Fragmentation pathways of protonated peptides', *Mass Spectrometry Reviews*, 24(4), pp. 508–548. doi: 10.1002/mas.20024.

Panneels, V. *et al.* (1994) 'Inhibition of H₂O₂ production by iodoaldehydes in cultured dog thyroid cells', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 102(1–2), pp. 167–176. doi: 10.1016/0303-7207(94)90110-4.

Park, J. Y. *et al.* (2007) 'Candidate tumor suppressor gene SLC5A8 is frequently down-regulated by promoter hypermethylation in prostate tumor.', *Cancer detection and prevention*. Elsevier, 31(5), pp. 359–65. doi: 10.1016/j.cdp.2007.09.002.

Park, J. Y. *et al.* (2008) 'Silencing of the Candidate Tumor Suppressor Gene Solute Carrier Family 5 Member 8 (SLC5A8) in Human Pancreatic Cancer', *Pancreas*, 36(4), pp. e32–e39. doi: 10.1097/MPA.0b013e3181630ffe.

Park, S. M. and Chatterjee, V. K. K. (2005) 'Genetics of congenital hypothyroidism', *Journal of Medical Genetics*, 42(5), pp. 379–389. doi: 10.1136/jmg.2004.024158.

Parkhomchuk, D. *et al.* (2009) 'Transcriptome analysis by strand-specific sequencing of complementary DNA', *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 37(18), pp. e123–e123. doi: 10.1093/nar/gkp596.

Paroder, V. *et al.* (2006) 'Na(+)/monocarboxylate transport (SMCT) protein expression correlates with survival in colon cancer: molecular characterization of SMCT.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(19), pp. 7270–5. doi: 10.1073/pnas.0602365103.

Patterson, S. D. and Aebersold, R. H. (2003) 'Proteomics: The first decade and beyond', *Nature Genetics*, 33(3S), pp. 311–323. doi: 10.1038/ng1106.

Pauling, L. *et al.* (1971) 'Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 68(10), pp. 2374–6. doi: 10.1073/PNAS.68.10.2374.

Pence, H. E. and Williams, A. (2010) 'ChemSpider: An Online Chemical Information Resource', *Journal of Chemical Education*. American Chemical Society and Division of

Chemical Education, Inc., 87(11), pp. 1123–1124. doi: 10.1021/ed100697w.

Peng, Z. *et al.* (2015) ‘Hypothesis: Artifacts, Including Spurious Chimeric RNAs with a Short Homologous Sequence, Caused by Consecutive Reverse Transcriptions and Endogenous Random Primers.’, *Journal of Cancer*. Ivyspring International Publisher, 6(6), pp. 555–67. doi: 10.7150/jca.11997.

Pereira, A. *et al.* (1990) ‘Identification of a major iodolipid from the horse thyroid gland as 2-iodohexadecanal’, *The journal of Biological chemistry*, 265(28), pp. 17018–17025.

Perkins, D. N. *et al.* (1999) ‘Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data’, *Electrophoresis*, 20(18), pp. 3551–3567. doi: 10.1002/(SICI)1522-2683(19991201)20:18<3551::AID-ELPS3551>3.0.CO;2-2.

Perron, B. *et al.* (2001) ‘Cloning of the mouse sodium iodide symporter and its expression in the mammary gland and other tissues’, *Journal of Endocrinology*, 170(1), pp. 185–196. doi: 10.1677/joe.0.1700185.

Pesavento, J. J., Mizzen, C. A. and Kelleher, N. L. (2006) ‘Quantitative Analysis of Modified Proteins and Their Positional Isomers by Tandem Mass Spectrometry: Human Histone H4’, *Analytical Chemistry*, 78(13), pp. 4271–4280. doi: 10.1021/ac0600050.

Phillippou, G. *et al.* (1992) ‘The effect of iodide on serum thyroid hormone levels in normal persons, in hyperthyroid patients, and in hypothyroid patients on thyroxine replacement’, *Clinical Endocrinology*. Wiley/Blackwell (10.1111), 36(6), pp. 573–578. doi: 10.1111/j.1365-2265.1992.tb02267.x.

Pitsiavas, V., Smerdely, P. and Boyages, S. C. (1999) ‘Amiodarone compared with iodine exhibits a potent and persistent inhibitory effect on TSH-stimulated cAMP production in vitro: A possible mechanism to explain amiodarone-induced hypothyroidism’, *European Journal of Endocrinology*, 140(3), pp. 241–249. doi: 10.1530/eje.0.1400241.

Pluskal, T. *et al.* (2010) ‘MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data’, *BMC Bioinformatics*. BioMed Central, 11(1), p. 395. doi: 10.1186/1471-2105-11-395.

Poncin, S. *et al.* (2008) ‘Oxidative stress in the thyroid gland: From harmlessness to hazard depending on the iodine content’, *Endocrinology*, 149(1), pp. 424–433. doi: 10.1210/en.2007-0951.

Poncin, S., Colin, I. M. and Gérard, A. C. (2009) ‘Minimal oxidative load: A prerequisite for thyroid cell function’, *Journal of Endocrinology*, 201(1), pp. 161–167. doi: 10.1677/JOE-08-0470.

Porra, V. *et al.* (2005) ‘Silencing of the tumor suppressor gene SLC5A8 is associated with BRAF mutations in classical papillary thyroid carcinomas’, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 90(5), pp. 3028–3035. doi: 10.1210/jc.2004-1394.

Portulano, C., Paroder-Belenitsky, M. and Carrasco, N. (2014) ‘The Na⁺/I⁻ Symporter (NIS): Mechanism and Medical Impact’, *Endocrine Reviews*, 35(1), pp. 106–149. doi: 10.1210/er.2012-1036.

Pramyothin, P. *et al.* (2011) 'A Hidden Solution', *New England Journal of Medicine*, 365(22), pp. 2123–2127. doi: 10.1056/NEJMcp1008908.

Preedy, V. R., Burrow, G. N. and Watson, R. (2009) *Comprehensive handbook of iodine : nutritional, biochemical, pathological, and therapeutic aspects*. Academic Press.

Psychogios, N. *et al.* (2011) 'The Human Serum Metabolome', *PLoS ONE*. Edited by D. Flower. Public Library of Science, 6(2), p. e16957. doi: 10.1371/journal.pone.0016957.

Rabilloud, T. (2002) 'Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Old, old fashioned, but it still climbs up the mountains', *PROTEOMICS*. Wiley-Blackwell, 2(1), pp. 3–10. doi: 10.1002/1615-9861(200201)2:1<3::AID-PROT3>3.0.CO;2-R.

Rabilloud, T. and Lelong, C. (2011) 'Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: A tutorial', *Journal of Proteomics*. Elsevier, 74(10), pp. 1829–1841. doi: 10.1016/J.JPROT.2011.05.040.

Reid, G. E. and McLuckey, S. A. (2002) 'Top down? protein characterization via tandem mass spectrometry', *Journal of Mass Spectrometry*, 37(7), pp. 663–675. doi: 10.1002/jms.346.

Reinhardt, W. *et al.* (1998) 'Effect of small doses of iodine on thyroid function in patients with Hashimoto's thyroiditis residing in an area of mild iodine deficiency.', *European journal of endocrinology*, 139(1), pp. 23–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9703374> (Accessed: 12 July 2018).

Rhee, C. M. *et al.* (2012) 'Association Between Iodinated Contrast Media Exposure and Incident Hyperthyroidism and Hypothyroidism', *Archives of Internal Medicine*. American Medical Association, 172(2), p. 153. doi: 10.1001/archinternmed.2011.677.

Ris-Stalpers C. (2006) 'Physiology and pathophysiology of the DUOXes', *Antioxid Redox Signal*, 8, p. 1563–1572. doi: 10.1089/ars.2007.1903.

Rodriguez (2002) 'Identification and characterization of a putative human iodide transporter located at the apical membrane of thyrocytes.', *BULLET Rapid Communications J Clin Endocrinol Metab*, 87(7), pp. 3500–3503. Available at: <https://academic.oup.com/jcem/article-abstract/87/7/3500/2847486> (Accessed: 26 April 2018).

Rodriguez, A. M., Perron, B., Lacroix, L., Caillou, B., Leblanc, G., Schlumberger, M., *et al.* (2002) 'Identification and characterization of a putative Human Iodide Transporter Located at the apical Membrane of thyrocytes', *The journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(7), pp. 3500–3503. doi: 10.1210/jc.2003-030570.

Rodriguez, A. M., Perron, B., Lacroix, L., Caillou, B., Leblanc, G., Schlumberger, J. M., *et al.* (2002) 'Identification and Characterization of a Putative Human Iodide Transporter Located at the Apical Membrane of Thyrocytes', *The journal of Clinical Endocrinology & Metabolism J Clin Endocrinol Metab*, 87(7), pp. 3500–3503. Available at: <https://academic.oup.com/jcem/article-abstract/87/7/3500/2847486> (Accessed: 11 May 2018).

Roman A. Zubarev, Neil L. Kelleher, and and McLafferty*, F. W. (1998) 'Electron Capture Dissociation of Multiply Charged Protein Cations. A Nonergodic Process'. American Chemical Society . doi: 10.1021/JA973478K.

- Ron, E. *et al.* (1995) 'Thyroid Cancer after Exposure to External Radiation: A Pooled Analysis of Seven Studies', *Radiation Research*, 141(3), p. 259. doi: 10.2307/3579003.
- Rosenberg, I. N. and Goswami, A. (1979) 'Purification and characterization of a flavoprotein from bovine thyroid with iodotyrosine deiodinase activity.', *Journal of Biological Chemistry*, 254(24), pp. 12318–12325.
- Roti, E. *et al.* (1991) 'Impaired Intrathyroidal Iodine Organification and Iodine-Induced Hypothyroidism in Euthyroid Women with a Previous Episode of Postpartum Thyroiditis*', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. Oxford University Press, 73(5), pp. 958–963. doi: 10.1210/jcem-73-5-958.
- Roti, E. *et al.* (1993) 'Effects of chronic iodine administration on thyroid status in euthyroid subjects previously treated with antithyroid drugs for Graves' hyperthyroidism.', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 76(4), pp. 928–932. doi: 10.1210/jcem.76.4.7682562.
- Roux, A. *et al.* (2011) 'Applications of liquid chromatography coupled to mass spectrometry-based metabolomics in clinical chemistry and toxicology: A review', *Clinical Biochemistry*. The Canadian Society of Clinical Chemists, 44(1), pp. 119–135. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2010.08.016.
- Royaux, I. E. *et al.* (2000) 'Pendrin, the Protein Encoded by the Pendred Syndrome Gene (*PDS*), Is an Apical Porter of Iodide in the Thyroid and Is Regulated by Thyroglobulin in FRTL-5 Cells', *Endocrinology*. Oxford University Press, 141(2), pp. 839–845. doi: 10.1210/endo.141.2.7303.
- Royce, T. E., Rozowsky, J. S. and Gerstein, M. B. (2007) 'Toward a universal microarray: prediction of gene expression through nearest-neighbor probe sequence identification', *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 35(15), pp. e99–e99. doi: 10.1093/nar/gkm549.
- Saber-Lichtenberg, Y. *et al.* (2000) 'Covalent cross-linking of secreted bovine thyroglobulin by transglutaminase', *Faseb J.*, 14(0892–6638 (Print)), pp. 1005–1014. Available at: <http://www.fasebj.org.gate2.inist.fr/doi/pdf/10.1096/fasebj.14.7.1005> (Accessed: 15 April 2018).
- Sanger, F. *et al.* (1977) 'Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA.', *Nature*, 265(5596), pp. 687–95. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/870828> (Accessed: 30 September 2018).
- Sawicki, M. P. *et al.* (1993) 'Human Genome Project', *The American Journal of Surgery*. Elsevier, 165(2), pp. 258–264. doi: 10.1016/S0002-9610(05)80522-7.
- Sayers, E. W. *et al.* (2009) 'Database resources of the National Center for Biotechnology Information.', *Nucleic acids research*. Oxford University Press, 37(Database issue), pp. D5–15. doi: 10.1093/nar/gkn741.
- Schagdarsurengin, U. *et al.* (2006) 'CpG Island Methylation of Tumor-Related Promoters Occurs Preferentially in Undifferentiated Carcinoma', *Thyroid*. Mary Ann Liebert, Inc. 2 Madison Avenue Larchmont, NY 10538 USA , 16(7), pp. 633–642. doi: 10.1089/thy.2006.16.633.

- Schmieder, R. *et al.* (2010) 'TagCleaner: Identification and removal of tag sequences from genomic and metagenomic datasets', *BMC Bioinformatics*. BioMed Central, 11(1), p. 341. doi: 10.1186/1471-2105-11-341.
- Scientific, T. (2014) 'TMT10plex mass tag labeling kits and reagents', *Thermo Scientific Instructions*, 0747(815), pp. 1–9.
- Scigelova, M. and Makarov, A. (2006) 'Orbitrap Mass Analyzer – Overview and Applications in Proteomics', *PROTEOMICS*. Wiley-Blackwell, 6(S2), pp. 16–21. doi: 10.1002/pmic.200600528.
- Serrano-Nascimento, C. *et al.* (2012) 'New insights about the posttranscriptional mechanisms triggered by iodide excess on sodium/iodide symporter (NIS) expression in PCC13 cells', *Molecular and Cellular Endocrinology*. Elsevier Ireland Ltd, 349(2), pp. 154–161. doi: 10.1016/j.mce.2011.09.036.
- Serrano-Nascimento, C. *et al.* (2014) 'The acute inhibitory effect of iodide excess on sodium/iodide symporter expression and activity involves the PI3K/Akt signaling pathway', *Endocrinology*, 155(3), pp. 1145–1156. doi: 10.1210/en.2013-1665.
- Serrano-Nascimento, C. *et al.* (2016) 'Excess iodide downregulates Na⁺/I⁻ symporter gene transcription through activation of PI3K/Akt pathway', *Molecular and Cellular Endocrinology*. Elsevier, 426, pp. 73–90. doi: 10.1016/J.MCE.2016.02.006.
- Serrano-Nascimento, C., Calil-Silveira, J. and Nunes, M. T. (2010) 'Posttranscriptional regulation of sodium-iodide symporter mRNA expression in the rat thyroid gland by acute iodide administration', *AJP: Cell Physiology*, 298(4), pp. C893–C899. doi: 10.1152/ajpcell.00224.2009.
- Sharma, S., Kelly, T. K. and Jones, P. A. (2010) 'Epigenetics in cancer', *Carcinogenesis*. Oxford University Press, 31(1), pp. 27–36. doi: 10.1093/carcin/bgp220.
- Simpson, J. T. and Durbin, R. (2010) 'Efficient construction of an assembly string graph using the FM-index', *Bioinformatics*. Oxford University Press, 26(12), pp. i367–i373. doi: 10.1093/bioinformatics/btq217.
- Sinnott, B., Ron, E. and Schneider, A. B. (2010) 'Exposing the Thyroid to Radiation: A Review of Its Current Extent, Risks, and Implications', *Endocrine Reviews*. Oxford University Press, 31(5), pp. 756–773. doi: 10.1210/er.2010-0003.
- Siuti, N. and Kelleher, N. L. (2007) 'Decoding protein modifications using top-down mass spectrometry', *Nature Methods*, 4(10), pp. 817–821. doi: 10.1038/nmeth1097.
- Smanik, P. A. *et al.* (1996) 'Cloning of the Human Sodium Iodide Symporter', 345, pp. 339–345.
- Smanik, P. A. *et al.* (1997) 'Expression, exon-intron organization, and chromosome mapping of the human sodium iodide symporter', *Endocrinology*, 138(8), pp. 3555–3558. doi: 10.1210/en.138.8.3555.
- Smith, C. A. *et al.* (2005) 'METLIN', *Therapeutic Drug Monitoring*, 27(6), pp. 747–751. doi: 10.1097/01.ftd.0000179845.53213.39.

- Smyth, P. P. A. *et al.* (1997) 'Maternal Iodine Status and Thyroid Volume during Pregnancy: Correlation with Neonatal Iodine Intake', *J Clin Endocrinol Metab*, 82, pp. 2840–2843.
- Solomon, R., Biguori, C. and Bettmann, M. (2006) 'Selection of contrast media', *Kidney International*. Elsevier, 69, pp. S39–S45. doi: 10.1038/sj.ki.5000373.
- Souza, E. C. L. de *et al.* (2010) 'mTOR downregulates iodide uptake in thyrocytes', *Journal of Endocrinology*, 206(1), pp. 113–120. doi: 10.1677/JOE-09-0436.
- Spitzweg, C. *et al.* (1999) 'Regulation of sodium iodide symporter gene expression in FRTL-5 rat thyroid cells', *Thyroid*, 9(8), pp. 821–830. doi: 10.1089/thy.1999.9.821.
- Stanbury JB, L. J. (1957) 'The metabolism of iodotyrosines. IV. Metabolism of L-diiiodotyrosine in patients with hypo-thyroidism.', *J Clin Endocrinol Metab*, (17), pp. 654–657. Available at: http://www.thyroid.org/wp-content/uploads/publications/clinthy/volume25/issue6/clinthy_v256_122_124.pdf.
- Sternthal, E. *et al.* (1980) 'Suppression of Thyroid Radioiodine Uptake by Various Doses of Stable Iodide', *The New England Journal of Medicine*, 303(19), pp. 1083–1088.
- Sultan, M. *et al.* (2014) 'Influence of RNA extraction methods and library selection schemes on RNA-seq data', *BMC Genomics*. BioMed Central, 15(1), p. 675. doi: 10.1186/1471-2164-15-675.
- Sumner, L. W., Mendes, P. and Dixon, R. A. (2003) 'Plant metabolomics: Large-scale phytochemistry in the functional genomics era', *Phytochemistry*, 62(6), pp. 817–836. doi: 10.1016/S0031-9422(02)00708-2.
- Syka, J. E. P. *et al.* (2004) 'Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 101(26), pp. 9528–33. doi: 10.1073/pnas.0402700101.
- Synnergren, J. and Sartipy, P. (2011) 'Microarray Analysis of Undifferentiated and Differentiated Human Pluripotent Stem Cells', in *Methodological Advances in the Culture, Manipulation and Utilization of Embryonic Stem Cells for Basic and Practical Applications*. InTech. doi: 10.5772/14354.
- Tabb, D. L., McDonald, W. H. and Yates, J. R. (2002) 'DTASelect and Contrast: Tools for Assembling and Comparing Protein Identifications from Shotgun Proteomics', *Journal of Proteome Research*. American Chemical Society, 1(1), pp. 21–26. doi: 10.1021/pr015504q.
- TAKEBE, K. *et al.* (2005) 'Histochemical demonstration of a Na⁺-coupled transporter for short-chain fatty acids (Slc5a8) in the intestine and kidney of the mouse', *Biomedical Research*, 26(5), pp. 213–221. doi: 10.2220/biomedres.26.213.
- Teng, W. *et al.* (2006) 'Effect of Iodine Intake on Thyroid Diseases in China', *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society, 354(26), pp. 2783–2793. doi: 10.1056/NEJMoa054022.
- Teng, X. *et al.* (2009) 'Experimental study on the effects of chronic iodine excess on thyroid function, structure, and autoimmunity in autoimmune-prone NOD.H-2h4 mice', *Clinical and*

Experimental Medicine. Springer Milan, 9(1), pp. 51–59. doi: 10.1007/s10238-008-0014-0.

Thakur, S. S. *et al.* (2011) ‘Deep and highly sensitive proteome coverage by LC-MS/MS without prefractionation.’, *Molecular & cellular proteomics: MCP*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 10(8), p. M110.003699. doi: 10.1074/mcp.M110.003699.

Thangaraju, M. *et al.* (2006) ‘SLC5A8 triggers tumor cell apoptosis through pyruvate-dependent inhibition of histone deacetylases’, *Cancer Research*, 66(24), pp. 11560–11564. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1950.

Thompson, A., Schäfer, J. J., *et al.* (2003) ‘Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS’, *Analytical chemistry*, 75(8), pp. 1895–1904. doi: 10.1021/ac0262560.

Thompson, A., Jürgen, S., *et al.* (2003) ‘Tandem Mass Tags: A Novel Quantification Strategy for Comparative Analysis of Complex Protein Mixtures by MS/MS’, *Analytical chemistry*. American Chemical Society. doi: 10.1021/AC0262560.

Thomsen, H. S. *et al.* (2004) ‘Effect of iodinated contrast media on thyroid function in adults’, *European Radiology*, 14(5), pp. 902–907. doi: 10.1007/s00330-004-2238-z.

Timothy J. Griffin, *,† *et al.* (2007) ‘iTRAQ Reagent-Based Quantitative Proteomic Analysis on a Linear Ion Trap Mass Spectrometer’. American Chemical Society . doi: 10.1021/PR070291B.

Trapnell, C., Pachter, L. and Salzberg, S. L. (2009) ‘TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq’, *Bioinformatics*. Oxford University Press, 25(9), pp. 1105–1111. doi: 10.1093/bioinformatics/btp120.

Tsao, D. *et al.* (1983) ‘Effect of sodium butyrate on carcinoembryonic antigen production by human colonic adenocarcinoma cells in culture.’, *Cancer research*. American Association for Cancer Research, 43(3), pp. 1217–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6825092> (Accessed: 6 June 2018).

Tweeddale, H., Notley-McRobb, L. and Ferenci, T. (1998) ‘Effect of slow growth on metabolism of *Escherichia coli*, as revealed by global metabolite pool ([ldquo]metabolome[rdquo]) analysis’, *Journal of bacteriology*, 180(19), p. 5109-5116 PB-. doi: 082/4.

Tyers, M. and Mann, M. (2003) ‘From genomics to proteomics’, *Nature*, 422(6928), pp. 193–197. doi: 10.1038/nature01510.

Tyler, D. D. *et al.* (1968) ‘Influence of mitochondrial inhibitors on the respiration and energy-dependent uptake of iodide by thyroid slices.’, *The Biochemical journal*. Portland Press Limited, 106(1), pp. 123–33. doi: 10.1042/BJ1060123.

Ueno, M. *et al.* (2004) ‘Aberrant methylation and histone deacetylation associated with silencing of SLC5A8 in gastric cancer.’, *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. Karger Publishers, 25(3), pp. 134–40. doi: 10.1159/000079145.

United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation (2011) *Report to the General Assembly with Scientific Annexes. Volume II. Annex D: Health Effects Due to Radiation from the Chernobyl Accident*. Available at: http://www.unscear.org/docs/publications/2008/UNSCEAR_2008_Annex-D-CORR.pdf.

Uyttersprot, N. *et al.* (1997) 'Moderate doses of iodide in vivo inhibit cell proliferation and the expression of thyroperoxidase and Na⁺/I-symporter mRNAs in dog thyroid', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 131(2), pp. 195–203. doi: 10.1016/S0303-7207(97)00108-1.

Vagenakis, A. G. *et al.* (1974) 'Hyperresponse to thyrotropin-releasing hormone accompanying small decreases in serum thyroid hormone concentrations.', *The Journal of clinical investigation*. American Society for Clinical Investigation, 54(4), pp. 913–8. doi: 10.1172/JCI107831.

Vassaux, G. *et al.* (2018) 'Iodinated Contrast Agents Perturb Iodide Uptake by the Thyroid Independently of Free Iodide.', *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. Society of Nuclear Medicine, 59(1), pp. 121–126. doi: 10.2967/jnumed.117.195685.

Vaudel, M., Sickmann, A. and Martens, L. (2010) 'Peptide and protein quantification: A map of the minefield', *PROTEOMICS*. Wiley-Blackwell, 10(4), pp. 650–670. doi: 10.1002/pmic.200900481.

Verger, P. *et al.* (2001) 'Iodine kinetics and effectiveness of stable iodine prophylaxis after intake of radioactive iodine: a review.', *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*, 11(4), pp. 353–360. doi: 10.1089/10507250152039082.

Verheesen, R. H. and Schweitzer, C. M. (2008) 'Iodine deficiency, more than cretinism and goiter', *Medical Hypotheses*. Elsevier Ltd, 71(5), pp. 645–648. doi: 10.1016/j.mehy.2008.06.020.

Verheggen, K. *et al.* (2016) 'Database Search Engines: Paradigms, Challenges and Solutions', in: Springer, Cham, pp. 147–156. doi: 10.1007/978-3-319-41448-5_6.

Villar, M. *et al.* (2015) 'Integrated Metabolomics, Transcriptomics and Proteomics Identifies Metabolic Pathways Affected by *Anaplasma phagocytophilum* Infection in Tick Cells', *Molecular & Cellular Proteomics*, 14(12), pp. 3154–3172. doi: 10.1074/mcp.M115.051938.

de Villiers, A. *et al.* (2006) 'Evaluation of ultra performance liquid chromatography: Part I. Possibilities and limitations', *Journal of Chromatography A*. Elsevier, 1127(1–2), pp. 60–69. doi: 10.1016/J.CHROMA.2006.05.071.

Vlad Zabrouskov, ‡,§ *et al.* (2005) 'Stepwise Deamidation of Ribonuclease A at Five Sites Determined by Top Down Mass Spectrometry†'. American Chemical Society . doi: 10.1021/BI0517584.

Vogel, C., Silva, G. M. and Marcotte, E. M. (2011) 'Protein expression regulation under oxidative stress.', *Molecular & cellular proteomics : MCP*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 10(12), p. M111.009217. doi: 10.1074/mcp.M111.009217.

Vuckovic, D. *et al.* (2009) 'In vitro evaluation of new biocompatible coatings for solid-phase microextraction: Implications for drug analysis and in vivo sampling applications', *Analytica*

Chimica Acta, 638(2), pp. 175–185. doi: 10.1016/j.aca.2009.02.049.

Vuckovic, D. *et al.* (2010) ‘Solid-phase microextraction in bioanalysis: New devices and directions’, *Journal of Chromatography A*, 1217(25), pp. 4041–4060. doi: 10.1016/j.chroma.2009.11.061.

Vuckovic, D. (2012) ‘Current trends and challenges in sample preparation for global metabolomics using liquid chromatography–mass spectrometry’, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Springer-Verlag, 403(6), pp. 1523–1548. doi: 10.1007/s00216-012-6039-y.

Waanders, L. F., Hanke, S. and Mann, M. (2007) ‘Top-Down Quantitation and Characterization of SILAC-Labeled Proteins’, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. No longer published by Elsevier, 18(11), pp. 2058–2064. doi: 10.1016/J.JASMS.2007.09.001.

Wagner, A. Ben (2006) ‘SciFinder Scholar 2006: An Empirical Analysis of Research Topic Query Processing’, *Journal of Chemical Information and Modeling*. American Chemical Society, 46(2), pp. 767–774. doi: 10.1021/CI050481B.

Waldbauer, J. R. *et al.* (2012) ‘Transcriptome and Proteome Dynamics of a Light-Dark Synchronized Bacterial Cell Cycle’, *PLoS ONE*. Edited by S. Lin. Public Library of Science, 7(8), p. e43432. doi: 10.1371/journal.pone.0043432.

Wang, L. *et al.* (2015) ‘Mitochondrial Respiratory Chain Inhibitors Involved in ROS Production Induced by Acute High Concentrations of Iodide and the Effects of SOD as a Protective Factor.’, *Oxidative medicine and cellular longevity*. Hindawi, 2015, p. 217670. doi: 10.1155/2015/217670.

Wang, P., Whiteaker, J. R. and Paulovich, A. G. (2009) ‘The evolving role of mass spectrometry in cancer biomarker discovery’, *Cancer Biology & Therapy*. Taylor & Francis, 8(12), pp. 1083–1094. doi: 10.4161/cbt.8.12.8634.

Wang, T. *et al.* (2017) ‘Activation of the Nrf2-Keap 1 Pathway in Short-Term Iodide Excess in Thyroid in Rats’, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017. doi: 10.1155/2017/4383652.

Wang, Z., Gerstein, M. and Snyder, M. (2009) ‘RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics’, *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group, 10(1), pp. 57–63. doi: 10.1038/nrg2484.

Ward, J. F. (1988) ‘DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability.’, *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, 35, pp. 95–125. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3065826> (Accessed: 3 October 2018).

Ward, J. F. (1994) ‘The Complexity of DNA Damage: Relevance to Biological Consequences’, *International Journal of Radiation Biology*. Taylor & Francis, 66(5), pp. 427–432. doi: 10.1080/09553009414551401.

Weiss, S. J., Philp, N. J. and Grollman, E. F. (1984) ‘Iodide transport in a continuous line of cultured cells from rat thyroid’, *Endocrinology*, 114(4), pp. 1090–1098. doi: 10.1210/endo-114-4-1090.

Werner, E. *et al.* (2008) 'Mass Spectrometry-Based Metabolomics: Accelerating the Characterization of Discriminating Signals by Combining Statistical Correlations and Ultrahigh Resolution', *Analytical Chemistry*. American Chemical Society, 80(13), pp. 4918–4932. doi: 10.1021/ac800094p.

Whitman, S. P. *et al.* (2008) 'DNA hypermethylation and epigenetic silencing of the tumor suppressor gene, SLC5A8, in acute myeloid leukemia with the MLL partial tandem duplication.', *Blood*. American Society of Hematology, 112(5), pp. 2013–6. doi: 10.1182/blood-2008-01-128595.

WHO (2014) 'GUIDELINE: Fortification of food-grade salt with iodine for the prevention and control of iodine deficiency disorders', *Who Guideline*, pp. 1–43. doi: /entity/nutrition/publications/guidelines/fortification_foodgrade_saltwithiodine/en/index.html.

Wiczling, P. *et al.* (2008) 'The application of gradient reversed-phase high-performance liquid chromatography to thfile:///C:/Users/MahaPC/Downloads/loo1989.pdf pKa and logkw determination of polyprotic analytes', *Journal of Chromatography A*. Elsevier, 1214(1–2), pp. 109–114. doi: 10.1016/J.CHROMA.2008.10.085.

Wilkins, M. R. *et al.* (1996) 'Protein identification with sequence tags.', *Current biology : CB*. Elsevier, 6(12), pp. 1543–4. doi: 10.1016/S0960-9822(02)70764-1.

Wilson, B. *et al.* (1968) 'TSH-like actions of Dibutyryl-cAMP on isolated Bovine Thyroid Cells', *Endocrinology*, 83, pp. 877–884.

Wishart, D. S. *et al.* (2007) 'HMDB: the Human Metabolome Database', *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 35(Database), pp. D521–D526. doi: 10.1093/nar/gkl923.

Wishart, D. S. *et al.* (2018) 'HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018', *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 46(D1), pp. D608–D617. doi: 10.1093/nar/gkx1089.

Wolff, J. (1998) 'Perchlorate and the Thyroid Gland', *Pharmacological reviews*, 50(1), pp. 89–105. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9549759>.

WOLFF, J. (1964) 'TRANSPORT OF IODIDE AND OTHER ANIONS IN THE THYROID GLAND.', *Physiological reviews*, 44, pp. 45–90. doi: 10.1152/physrev.1964.44.1.45.

Wolff, J. and Chaikoff, I. L. (1948) 'Plasma inorganic iodide as a homeostatic regulator of thyroid function', *Journal of Biological Chemistry*, (2), pp. 555–564.

Wolff, J. and Halmi, N. S. (1963) 'Iodide Transport', 238(2), pp. 847–852.

Wright, E. M. and Diamond, J. M. (1977) 'Anion selectivity in biological systems.', *Physiological reviews*. American Physiological Society Bethesda, MD , 57(1), pp. 109–56. doi: 10.1152/physrev.1977.57.1.109.

Wu, S.-Y. *et al.* (1978) 'Changes in Circulating Iodothyronines in Euthyroid and Hyperthyroid Subjects Given Iopodate (Oragrafin), an Agent for Oral Cholecystography*', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. Oxford University Press, 46(4), pp. 691–697. doi: 10.1210/jcem-46-4-691.

Xudong Yao *et al.* (2001) 'Proteolytic 18O Labeling for Comparative Proteomics: Model

Studies with Two Serotypes of Adenovirus'. American Chemical Society . doi: 10.1021/AC001404C.

Yanase, H. *et al.* (2008) 'Cellular expression of a sodium-dependent monocarboxylate transporter (Slc5a8) and the MCT family in the mouse kidney', *Histochemistry and Cell Biology*, 130(5), pp. 957–966. doi: 10.1007/s00418-008-0490-z.

Yang, X., Dorman, K. S. and Aluru, S. (2010) 'Reptile: representative tiling for short read error correction', *Bioinformatics*. Oxford University Press, 26(20), pp. 2526–2533. doi: 10.1093/bioinformatics/btq468.

Yao, X. *et al.* (2012) 'Effect of early acute high concentrations of iodide exposure on mitochondrial superoxide production in FRTL cells', *Free Radical Biology and Medicine*. Pergamon, 52(8), pp. 1343–1352. doi: 10.1016/J.FREERADBIOMED.2012.02.002.

Yates, J. R. (2004) 'Mass Spectral Analysis in Proteomics', *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. Annual Reviews, 33(1), pp. 297–316. doi: 10.1146/annurev.biophys.33.111502.082538.

Yi Du, † *et al.* (2005) 'Top-Down Approaches for Measuring Expression Ratios of Intact Yeast Proteins Using Fourier Transform Mass Spectrometry'. American Chemical Society . doi: 10.1021/AC050993P.

Yoshida, S. *et al.* (2014) 'Guidelines for iodine prophylaxis as a protective measure: information for physicians.', *Japan Medical Association journal: JMAJ*. Japan Medical Association, 57(3), pp. 113–23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25784824> (Accessed: 20 May 2018).

Young, B. (Pathologist), O'Dowd, G. and Woodford, P. (2006) *Wheater's functional histology: a text and colour atlas*. 5th edn. Philadelphia, Churchill livingstone.

Yu, M.-D. and Shaw, S. M. (2003) 'Potential interference of agents on radioiodide thyroid uptake in the euthyroid rat.', *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine*. Society of Nuclear Medicine, 44(5), pp. 832–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12732686> (Accessed: 21 May 2018).

Zamproni, I. *et al.* (2008) 'Biallelic inactivation of the dual oxidase maturation factor 2 (DUOXA2) gene as a novel cause of congenital hypothyroidism', *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93(2), pp. 605–610. doi: 10.1210/jc.2007-2020.

Zanivan, S., Krueger, M. and Mann, M. (2011) 'In Vivo Quantitative Proteomics: The SILAC Mouse', in. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 435–450. doi: 10.1007/978-1-61779-166-6_25.

Zanzonico, P. B. and Becker, D. V. (2000) 'Effects of time of administration and dietary iodine levels on potassium iodide (KI) blockade of thyroid irradiation by ¹³¹I from radioactive fallout', *Health Physics*, 78(6), pp. 660–667. doi: 10.1097/00004032-200006000-00008.

Zhang, F., Bartels, M. J. and Stott, W. T. (2004) 'Quantitation of human glutathione S-transferases in complex matrices by liquid chromatography/tandem mass spectrometry with signature peptides', *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. Wiley-Blackwell, 18(4), pp. 491–498. doi: 10.1002/rcm.1364.

- Zhao, J. *et al.* (2000) 'Endemic goiter associated with high iodine intake', *American Journal of Public Health*, 90(10), pp. 1633–1635. doi: 10.2105/AJPH.90.10.1633.
- Zhao, W. *et al.* (2014) 'Comparison of RNA-Seq by poly (A) capture, ribosomal RNA depletion, and DNA microarray for expression profiling', *BMC Genomics*. BioMed Central, 15(1), p. 419. doi: 10.1186/1471-2164-15-419.
- Zhou, G. and Xia, J. (2018) 'OmicsNet: a web-based tool for creation and visual analysis of biological networks in 3D space', *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 46(June), pp. 514–522. doi: 10.1093/nar/gky510.
- Zimmermann, M. B. and Boelaert, K. (2015) 'Iodine deficiency and thyroid disorders.', *Lancet Diabetes Endocrinol*, 3(4), pp. 286–295. doi: 10.1016/S2213-8587(14)70225-6.
- Zwarthoed, C. *et al.* (2016) 'Single-Photon Emission Computed Tomography for Preclinical Assessment of Thyroid Radioiodide Uptake Following Various Combinations of Preparative Measures', *Thyroid*, 26(11), pp. 1614–1622. doi: 10.1089/thy.2015.0652.
- Zweigenbaum, J. and Henion, J. (2000) 'Bioanalytical High-Throughput Selected Reaction Monitoring-LC/MS Determination of Selected Estrogen Receptor Modulators in Human Plasma: 2000 Samples/Day', *Analytical chemistry*. American Chemical Society, 72(11), pp. 2446–2454. doi: 10.1021/AC991413P.