

DOMINIQUE MEUNIER

**CARACTÉRISATION DU PHÉNOTYPE DE LA GLANDE THYROÏDE
CHEZ LES SOURIS MUTANTES POUR LA FONCTION *Hoxa5***

Mémoire
présenté
à la Faculté des études supérieures
de l'Université Laval
pour l'obtention
du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

Département de biologie médicale
FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL

NOVEMBRE 1999



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*

Our file *Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-44932-7

Canada

Résumé

Le gène *Hoxa5* fait partie de la famille des gènes *Hox*, qui codent pour des facteurs de transcription essentiels au développement normal de l'embryon. Il est connu que ce gène exerce un rôle crucial dans la spécification régionale du squelette et dans l'organogenèse des systèmes respiratoire et digestif chez la souris. La présente étude a permis de montrer que le gène *Hoxa5* est également nécessaire à la morphogenèse de la glande thyroïde. Son absence entraîne en effet, chez les souris homozygotes mutantes, différents phénotypes post-nataux caractéristiques de l'hypothyroïdie. De plus, l'organisation structurale de la glande thyroïde et l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la régulation et la fonction thyroïdiennes sont perturbées à certains stades du développement chez les souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5*. Bien que les mécanismes moléculaires par lesquels le gène *Hoxa5* exerce son action sur la glande thyroïde restent à être élucidés, cette étude souligne l'importance de ce gène dans le développement des organes glandulaires.

Avant-propos

Je tiens tout d'abord à remercier le Docteur Lucie Jeannotte de m'avoir accueillie dans son laboratoire afin de réaliser mes études de maîtrise. Son dynamisme, son soutien scientifique et technique et ses encouragements m'ont permis de mener à bien mon projet de recherche malgré les difficultés.

Je tiens également à remercier les membres du laboratoire du Docteur Jeannotte ainsi que ceux du laboratoire du Docteur Jean Charron qui m'ont conseillée, appuyée et encouragée tout au long de ma maîtrise: Margot Lemieux, Jérôme Lapointe, Josée Aubin, Rhea Utley, Christian Larochelle, Michel Tremblay, Jean-François Cadrin-Girard, Nizar Chetoui et Marcelle Carter.

Un merci tout particulier au Docteur Jean Charron pour sa patience et sa disponibilité. Ses précieux conseils techniques m'ont permis de résoudre bien des problèmes d'ordre scientifique et informatique. Merci également à Michel Tremblay qui a contribué, grâce à ses talents artistiques, à la réalisation de la Figure 1.2.

Je remercie également ma famille et mes amis qui m'accompagnent depuis longtemps dans mes études et m'encouragent toujours à persévérer afin de réaliser les projets qui me tiennent à coeur. Merci à mon copain Dominique qui m'a soutenue dans les moments difficiles et qui a hérité, bien malgré lui, de la lourde tâche de relire les différentes sections de ce mémoire.

Enfin, je remercie le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) pour le soutien financier qu'il m'a apporté au cours de mes études de maîtrise.

Table des matières

Résumé	II
Avant-propos	III
Table des matières	IV
Liste des figures	VIII
Liste des tableaux	X
Liste des abréviations	XI
Chapitre 1 Introduction	1
1.1 Les gènes homéotiques de la drosophile	2
1.1.1 Caractéristiques	2
1.1.2 Fonction	3
1.2 Les gènes <i>Hox</i> de mammifères	7
1.2.1 Caractéristiques	7
1.2.2 Fonction	8
1.2.2.1 Spécification du squelette	9
1.2.2.2 Organogenèse	11
1.3 La glande thyroïde	13
1.3.1 Anatomie	13
1.3.2 Origine embryonnaire	15
1.4 Les hormones thyroïdiennes	18
1.4.1 Biosynthèse et sécrétion des hormones thyroïdiennes	18
1.4.1.1 Biosynthèse et iodation de la thyroglobuline	21
1.4.1.2 Sécrétion des hormones thyroïdiennes	22
1.4.2 Mécanisme d'action des hormones thyroïdiennes	22
1.4.3 Principaux effets des hormones thyroïdiennes	24
1.5 Dérèglements de la fonction thyroïdienne	25
1.5.1 Hyperthyroïdie	25
1.5.2 Hypothyroïdie	26
1.5.3 Syndrome de résistance aux hormones thyroïdiennes	27

1.6 Aspects moléculaires du développement et de la fonction de la glande thyroïde	28
1.6.1 Expression des gènes régulateurs de la fonction thyroïdienne	28
1.6.1.1 Le gène <i>TTF-1</i>	28
1.6.1.2 Le gène <i>TTF-2</i>	29
1.6.1.3 Le gène <i>Pax-8</i>	29
1.6.2 Expression des gènes spécifiques à la fonction thyroïdienne	30
1.6.2.1 Le gène <i>Tg</i> codant pour la thyroglobuline	30
1.6.2.2 Le gène <i>TPO</i> codant pour la thyroperoxydase	31
1.6.2.3 Le gène <i>TSHr</i> codant pour le récepteur de TSH	31
1.6.2.4 Le gène <i>NIS</i> codant pour le symporteur Na ⁺ /I ⁻	32
1.6.3 Interactions moléculaires impliquées dans le développement et la fonction de la glande thyroïde	32
1.7 Le gène <i>Hoxa5</i>	37
1.7.1 Caractéristiques	37
1.7.2 Profil d'expression	37
1.7.3 Régulation	38
1.7.4 Fonction	39
1.8 Objectifs du projet de recherche	44
Chapitre 2 Matériel et Méthodes	45
2.1 Croisements, prélèvements et génotypes des souris	45
2.1.1 Croisements	45
2.1.2 Prélèvements et préparation des tissus	46
2.1.3 Génotypes	46
2.2 Quantification des phénotypes post-natals	47
2.2.1 Courbes de croissance	47
2.2.2 Ouverture des yeux et élévation des oreilles	48
2.2.3 Réflexes neuromoteurs	48
2.3 Dosage des niveaux sériques des hormones T ₄ et TSH	48
2.3.1 Niveaux sériques de l'hormone T ₄	48
2.3.2 Niveaux sériques de l'hormone TSH	49

2.4 Analyses histologiques et immunohistochimiques	49
2.4.1 Analyses histologiques	49
2.4.1.1 Coloration à l'hématoxyline de Mayer et à l'éosine	50
2.4.1.2 Coloration à l'acide périodique de Schiff	50
2.4.1.3 Dénombrement des follicules thyroïdiens ne contenant pas de colloïde	51
2.4.1.4 Mesure du diamètre des follicules thyroïdiens	51
2.4.2 Analyses immunohistochimiques	51
2.5 Hybridation <i>in situ</i>	52
2.5.1 Synthèse des sondes d'ARN	52
2.5.2 Hybridation <i>in situ</i>	55
2.5.3 Dénombrement des grains d'argent par cellule	56
2.6 Analyses statistiques	56
Chapitre 3 Résultats	58
3.1 Quantification des phénotypes post-natals	58
3.1.1 Courbes de croissance	59
3.1.2 Ouverture des yeux et élévation des oreilles	63
3.1.3 Réflexes neuromoteurs	69
3.2 Dosage des niveaux sériques des hormones T ₄ et TSH	70
3.3 Analyse du profil d'expression du gène <i>Hoxa5</i> au niveau des yeux et des oreilles au cours du développement embryonnaire	74
3.4 Analyses histologiques et immunohistochimiques de la glande thyroïde	77
3.4.1 Analyses histologiques	78
3.4.2 Analyses immunohistochimiques	87
3.4.2.1 Production de thyroglobuline	87
3.4.2.2 Production de calcitonine et de thyroxine	91
3.5 Analyse du profil d'expression de divers gènes impliqués dans le développement et la fonction de la glande thyroïde	95
3.5.1 Analyse du profil d'expression des gènes <i>Hoxa5</i> , <i>Hoxa3</i> , <i>TTF-1</i> , <i>TTF-2</i> et <i>Pax-8</i> au niveau de la glande thyroïde en développement	95

3.5.2 Analyse du profil et du niveau d'expression des gènes régulateurs de la fonction thyroïdienne <i>TTF-1</i> , <i>TTF-2</i> et <i>Pax-8</i> à différents stades du développement embryonnaire	100
3.5.3 Analyse du profil et du niveau d'expression des gènes spécifiques à la fonction thyroïdienne <i>Tg</i> , <i>TPO</i> et <i>TSHr</i> à différents stades du développement embryonnaire	110
Chapitre 4 Discussion et Conclusion	119
4.1 Les souris homozygotes mutantes pour la fonction <i>Hoxa5</i> et l'hypothyroïdie	120
4.2 La morphogenèse de la glande thyroïde est perturbée par l'absence de la fonction <i>Hoxa5</i>	125
4.3 Le gène <i>Hoxa5</i> s'exprime dans la région de la glande thyroïde au cours du développement embryonnaire de la souris	127
4.4 Les niveaux d'expression de certains gènes impliqués dans le développement et la fonction thyroïdiennes sont affectés par l'absence du gène <i>Hoxa5</i>	128
4.5 Conclusion	134
Bibliographie	136

Liste des figures

Figure 1.1	Organisation du complexe <i>HOM-C</i> de la drosophile et des quatre complexes <i>Hox</i> de la souris	6
Figure 1.2	Anatomie macroscopique et microscopique de la glande thyroïde	17
Figure 1.3	Boucle de rétroaction négative contrôlant les niveaux d'hormones thyroïdiennes en circulation	20
Figure 1.4	Interactions moléculaires impliquées dans le développement et la fonction de la glande thyroïde	36
Figure 1.5	Organisation du gène <i>Hoxa5</i> de la souris	43
Figure 3.1	Courbes de croissance des souris de type sauvage (+/+), hétérozygotes (+/-) et homozygotes mutantes (-/-) pour la fonction <i>Hoxa5</i>	62
Figure 3.2	Âge d'ouverture des yeux des souris de type sauvage (+/+), hétérozygotes (+/-) et homozygotes mutantes (-/-) pour la fonction <i>Hoxa5</i>	66
Figure 3.3	Âge d'élévation des oreilles des souris de type sauvage (+/+), hétérozygotes (+/-) et homozygotes mutantes (-/-) pour la fonction <i>Hoxa5</i>	68
Figure 3.4	Expression du gène <i>Hoxa5</i> au niveau des yeux et des oreilles chez un embryon de type sauvage à 14.5 jours de gestation	76
Figure 3.5	Analyse histologique de la glande thyroïde d'embryons et de souris de type sauvage (+/+) et homozygotes mutants (-/-) pour la fonction <i>Hoxa5</i>	81/82
Figure 3.6	Analyse immunohistochimique de la production de thyroglobuline par la glande thyroïde chez des embryons et des souris de type sauvage (+/+) et homozygotes mutants (-/-) pour la fonction <i>Hoxa5</i>	90
Figure 3.7	Analyse immunohistochimique de la production de calcitonine et de thyroxine par la glande thyroïde chez des embryons et des souris de type sauvage (+/+) et homozygotes mutants (-/-) pour la fonction <i>Hoxa5</i>	94
Figure 3.8	Expression des gènes <i>Hoxa5</i> , <i>Hoxa3</i> , <i>TTF-1</i> , <i>TTF-2</i> et <i>Pax-8</i> au niveau de la glande thyroïde chez des embryons de type sauvage (+/+) et homozygotes mutants (-/-) pour la fonction <i>Hoxa5</i> à 12.5 jours de gestation	99

- Figure 3.9 Expression des gènes *TTF-1*, *TTF-2* et *Pax-8* au niveau de la glande thyroïde chez des embryons de type sauvage (+/+) et homozygotes mutants (-/-) pour la fonction *Hoxa5* 104/105
- Figure 3.10 Expression des gènes *Tg*, *TPO* et *TSHr* au niveau de la glande thyroïde chez des embryons de type sauvage (+/+) et homozygotes mutants (-/-) pour la fonction *Hoxa5* 113/114
- Figure 4.1 Interactions moléculaires entre le gène *Hoxa5* et les gènes *TTF-1*, *TTF-2* et *Pax-8* au cours du développement de la glande thyroïde 133

Liste des tableaux

Tableau 2.1	Description des fragments d'ADN servant à la synthèse des sondes d'ARN antisens utilisées lors des expériences d'hybridation <i>in situ</i>	54
Tableau 3.1	Niveaux sériques des hormones T ₄ et TSH chez des souris de type sauvage (+/+) et homozygotes mutantes (-/-) pour la fonction <i>Hoxa5</i>	73
Tableau 3.2	Proportion des follicules thyroïdiens remplis, partiellement remplis ou vides de colloïde chez des embryons de type sauvage (+/+) et homozygotes mutants (-/-) pour la fonction <i>Hoxa5</i>	84
Tableau 3.3	Diamètre des follicules thyroïdiens chez des embryons et des souris de type sauvage (+/+) et homozygotes mutants (-/-) pour la fonction <i>Hoxa5</i>	86
Tableau 3.4	Niveaux d'expression des gènes <i>TTF-1</i> , <i>TTF-2</i> et <i>Pax-8</i> au niveau de la glande thyroïde chez des embryons de type sauvage (+/+) et homozygotes mutants (-/-) pour la fonction <i>Hoxa5</i>	107/108/109
Tableau 3.5	Niveaux d'expression des gènes <i>Tg</i> , <i>TPO</i> et <i>TSHr</i> au niveau de la glande thyroïde chez des embryons de type sauvage (+/+) et homozygotes mutants (-/-) pour la fonction <i>Hoxa5</i>	116/117/118

Liste des abréviations

A: adénine

abd-A: abdominal-A

Abd-B: Abdominal-B

ADN: acide désoxyribonucléique

AMPc: adénosine monophosphate cyclique

Antp: Antennapedia

ARN: acide ribonucléique

BMP-4: bone morphogenetic protein-4

BX-C: complexe *bithorax*

C: cytosine

c: cristallin

C1: première vertèbre cervicale (atlas)

C2: deuxième vertèbre cervicale (axis)

C5: cinquième vertèbre cervicale

C6: sixième vertèbre cervicale

C7: septième vertèbre cervicale

°C: degré Celsius

cpm: coups par minute

DAB: diaminobenzidine

dCTP[³²P]: désoxycytidine triphosphate radiomarquée au phosphore 32

Dfd: Deformed

DIT: diiodotyrosine

DNase: désoxyribonucléase

dt: diverticulum thyroïdien

DTT: dithiothréitol

E: embryonnaire

EDTA: ethylene diamine tetraacetic acid (tétraacétate d'éthylène diamine)

EGF: epidermal growth factor (facteur de croissance épidermique)

Exd: Extradenticle

G: guanine

g: gramme

HOM-C: complexe homéotique de la drosophile
Hox: complexe homéotique ou gène homéotique des vertébrés
HSV-1: virus herpès simplex de type I
hv: humeur vitreuse
hyt: *hypothyroid*
i: isthme
¹²⁵I: iode 125
J: jour
kb: kilobase
kDa: kilodalton
lab: *labial*
M: molaire
µg/dL: microgramme par décilitre
µg/µL: microgramme par microlitre
µm: micromètre
mM: millimolaire
MIT: monoiodotyrosine
n: nombre
NaCl: chlorure de sodium
NaH₂PO₄: phosphate de sodium monobasique
Na₂HPO₄: phosphite de sodium dibasique
NaOH: hydroxyde de sodium
ng/mL: nanogramme par millilitre
NIS: symporteur Na⁺/I⁻
o: oreille
oe: oesophage
p: paupière
PAS: periodic acid Schiff (acide périodique de Schiff)
PAX-8: facteur de transcription contenant une boîte "paired"
pb: paire de bases
pb: *proboscipedia*
PBS: phosphate buffer saline
PPAR: peroxyosome proliferator-activated receptors
pr: pigments rétiens

r: rétine
 RER: réticulum endoplasmique rugueux
 RIA: radioimmunoassay (essai radio-immunologique)
 RMN: résonance magnétique nucléaire
 RNase A: ribonucléase A
Scr: Sex combs reduced
 SDS: sodium dodecyl sulfate (dodécylsulfate de sodium)
Shh: Sonic hedgehog
 sign.: significatif
 SSC: sodium salt citrate
 T: thymine
 t: glande thyroïde
 T1: première vertèbre thoracique
 T₃: 3,5,3'-triiodothyronine
 T₄: 3,5,3',5'-tétraiodothyronine ou thyroxine
 T13: treizième vertèbre thoracique
 TBG: thyroxine-binding globin (globine liant la thyroxine)
 TE: Tris-EDTA
 TESP: triéthoxysilane 3-propylamine (3-aminopropyl-triéthoxysilane)
 Tg: thyroglobuline
 TGF-β1: transforming growth factor β1
 TGF-β3: transforming growth factor β3
 TPO: thyroperoxydase
 tr: trachée
 TR: récepteur nucléaire d'hormones thyroïdiennes
 TRα1: récepteur nucléaire d'hormones thyroïdiennes α1
 TRβ1: récepteur nucléaire d'hormones thyroïdiennes β1
 TRβ2: récepteur nucléaire d'hormones thyroïdiennes β2
 TRH: thyroïdolibérine
 Tris-HCl: tris(hydroxyméthyl)aminométhane-acide chlorhydrique
 TSH: thyrotrophine
 TSHr: récepteur de thyrotrophine
 TTF-1: thyroid transcription factor-1
 TTF-2: thyroid transcription factor-2

U: uracile

Ubx: *Ultrabithorax*

UTP[³⁵S]: uridine triphosphate radiomarqué au soufre 35

Chapitre 1

Introduction

L'étude du développement embryonnaire s'est longtemps limitée à la description des modifications morphologiques se produisant de la fécondation à la naissance. Les embryologistes soupçonnaient cependant l'existence de mécanismes moléculaires complexes contrôlant le développement. En effet, dès 1894, W. Bateson avait observé la présence de transformations bien particulières chez diverses espèces végétales et animales. Ces transformations dites homéotiques modifiaient l'identité de certaines régions anatomiques, transformant une partie en une autre (Bateson, 1894). Les premières observations indiquant que le développement pouvait être contrôlé par des gènes spécifiques remontent à 1923, lors de la découverte par C.B. Bridges et T.H. Morgan de mutations homéotiques chez la mouche *Drosophila melanogaster* (Bridges et Morgan, 1923). Les travaux réalisés par E.B. Lewis à partir des années 50 ont par la suite mis en évidence l'existence de gènes homéotiques sélecteurs responsables de la formation de certaines régions de la mouche (Lewis, 1978). Ce n'est cependant qu'au début des années 80, avec l'avènement des techniques de la biologie moléculaire, que la caractérisation moléculaire de ces gènes homéotiques sélecteurs a pu être réalisée.

1.1 Les gènes homéotiques de la drosophile

1.1.1 Caractéristiques

Les premiers gènes homéotiques ont été clonés chez la mouche *Drosophila melanogaster* (drosophile) en 1983, grâce à l'utilisation des techniques de marche chromosomique et de microdissection de bandes sur des chromosomes polytènes géants (Bender et al., 1983; Garber et al., 1983; Scott et al., 1983). La caractérisation moléculaire de ces gènes, et plus particulièrement l'analyse du gène *Antennapedia*, a ensuite conduit à la découverte de la boîte homéo, une séquence d'ADN de 183 paires de bases commune à tous les gènes homéotiques et retrouvée également chez plusieurs autres gènes impliqués dans le développement de la drosophile (McGinnis et al., 1984a).

La boîte homéo code pour le domaine homéo, une séquence protéique de 61 acides aminés responsable de la liaison des protéines homéotiques à l'ADN. Les approches de cristallographie de diffraction des rayons X (Kissinger et al., 1990) et de spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN; Qian et al., 1989; Otting et al., 1990) ont permis de déterminer la structure tridimensionnelle du domaine homéo. Ces analyses ont montré que le domaine homéo est constitué de trois hélices α bien définies (I, II et III, correspondant respectivement aux résidus 10-21, 28-38 et 42-52) et d'une quatrième hélice plus flexible (IV, résidus 53-59). Les hélices α II et III forment un motif hélice-boucle-hélice similaire à celui retrouvé chez certaines protéines régulatrices procaryotes, notamment les protéines Cro et les répresseurs du bactériophage λ (Qian et al., 1989). Ce motif hélice-boucle-hélice est caractéristique des facteurs de transcription se liant à l'ADN au niveau du sillon majeur.

Dans le cas des protéines homéotiques, la reconnaissance de séquences spécifiques au niveau du sillon majeur de l'ADN s'effectue via les hélices III et IV, alors que les hélices I et II ont pour fonction de stabiliser l'interaction entre les protéines et l'ADN (Gehring et al., 1994). La séquence consensus reconnue par le domaine homéo est ATTA/TAAT (Hoey et Levine, 1988). Cette séquence de reconnaissance est cependant trop courte et beaucoup trop commune dans le génome pour assurer seule la spécificité biologique des différentes protéines homéotiques. De plus, certaines protéines homéotiques impliquées dans des processus développementaux totalement différents possèdent des sites préférentiels de liaison identiques (Wilson et Desplan, 1999). Une des explications possibles est que la

spécificité biologique des protéines homéotiques est assurée par les nucléotides adjacents à la séquence consensus au niveau des gènes cibles. Une autre possibilité est l'existence d'interactions protéine-protéine permettant d'augmenter la spécificité et la stabilité des liaisons entre les protéines homéotiques et leurs gènes cibles. Plusieurs études ont d'ailleurs confirmé l'existence de telles interactions protéine-protéine, notamment avec les facteurs de transcription Exd chez la drosophile et Pbx chez les mammifères (Mann et Chan, 1996; Wilson et Desplan, 1999).

Les huit gènes homéotiques de la drosophile sont regroupés en deux complexes situés sur le chromosome 3 (Figure 1.1). Le complexe *Antennapedia* (*Antp*) comprend les gènes *labial* (*lab*), *proboscipedia* (*pb*), *Deformed* (*Dfd*), *Sex combs reduced* (*Scr*) et *Antennapedia* (*Antp*). Le complexe *bithorax* (BX-C) comprend les gènes *Ultrabithorax* (*Ubx*), *abdominal-A* (*abd-A*) et *Abdominal-B* (*Abd-B*). Les complexes *Antennapedia* et *bithorax* constituent collectivement le complexe homéotique *HOM-C* de la drosophile. Une des caractéristiques du complexe *HOM-C* est la relation de colinéarité qui existe entre l'ordre des gènes le long du complexe et leur profil d'expression spatio-temporel. En effet, les gènes situés en 3' le long du chromosome s'expriment plus tôt au cours de l'embryogenèse et sont requis pour le développement des segments antérieurs du corps de l'embryon, alors que les gènes situés en 5' s'expriment plus tard et sont nécessaires au développement des segments postérieurs (revue par McGinnis et Krumlauf, 1992). De plus, l'expression de chaque gène homéotique chez la drosophile est restreinte à un domaine bien précis de l'axe antéro-postérieur (Gilbert, 1996).

1.1.2 Fonction

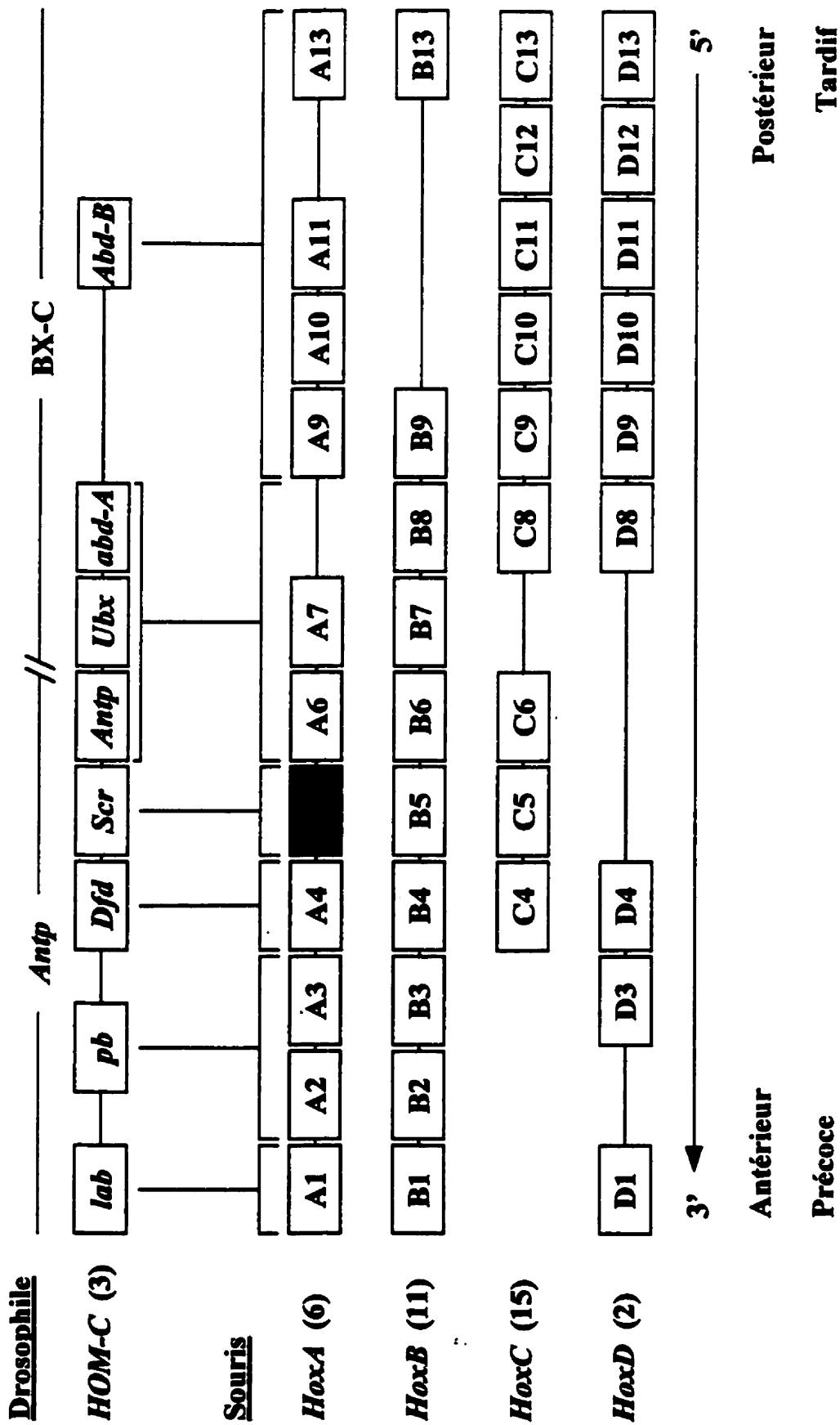
Chez la drosophile, les gènes homéotiques sont responsables du positionnement approprié des structures le long de l'axe antéro-postérieur de l'embryon en développement. Les mutations affectant ces gènes modifient l'identité de diverses régions anatomiques, causant ainsi certaines des transformations homéotiques décrites auparavant par Bateson (revue par McGinnis et Krumlauf, 1992). Les mutations *Ultrabithorax* et *Antennapedia* sont certainement les plus connues. La mutation *Ultrabithorax* provoque la transformation du troisième segment thoracique, normalement caractérisé par la présence d'haltères, en deuxième segment thoracique. Cette transformation entraîne l'apparition d'une paire d'ailes supplémentaire sur le dos de la mouche (Lewis, 1978). Dans le cas de la mutation

Antennapedia, les disques imaginaux de la tête acquièrent une identité thoracique, ce qui provoque l'apparition d'une paire de pattes à la place des antennes (Schneuwly et al., 1987).

Étant donné le rôle crucial joué par les gènes homéotiques au cours du développement embryonnaire et considérant le fait que la séquence de la boîte homéo se retrouve chez plusieurs autres gènes impliqués dans le développement de la drosophile (McGinnis et al., 1984a), il était possible d'envisager l'existence de gènes semblables chez d'autres espèces animales. En utilisant la boîte homéo de type *Antennapedia* de la drosophile comme sonde, d'autres gènes contenant cette séquence ont d'ailleurs été identifiés chez plusieurs espèces, notamment chez la grenouille, le poulet, la souris et l'homme (McGinnis et al., 1984b). La conservation de la séquence de la boîte homéo tant chez les invertébrés que chez les vertébrés suggère un rôle majeur pour les gènes homéotiques au cours de l'évolution.

Figure 1.1 Organisation du complexe *HOM-C* de la drosophile et des quatre complexes *Hox* de la souris.

Les huit gènes homéotiques de la drosophile font partie du complexe *HOM-C*, qui est constitué des complexes *Antennapedia* (*Antp*) et *bithorax* (*BX-C*). Les 39 gènes *Hox* de la souris sont regroupés en quatre complexes situés sur des chromosomes différents. Une relation de colinéarité existe entre l'ordre des gènes le long des complexes *HOM-C* et *Hox* et leur patron d'expression spatio-temporel. Les gènes situés en 3' des complexes s'expriment tôt au cours de l'embryogenèse et dans des domaines antérieurs du corps de l'embryon, alors que les gènes situés en 5' s'expriment plus tard et dans des domaines plus postérieurs. L'alignement vertical des gènes appartenant aux différents complexes définit les treize sous-familles de gènes *Hox* (groupes paralogues) et montre l'homologie qui existe entre ces sous-familles et les gènes homéotiques de la drosophile. Les chiffres entre parenthèses indiquent les chromosomes sur lesquels se retrouvent le complexe *HOM-C* de la drosophile et les complexes *Hox* de la souris. La flèche 5' → 3' indique le sens de la transcription des gènes.



1.2 Les gènes *Hox* de mammifères

1.2.1 Caractéristiques

Les gènes *Hox* de mammifères possèdent une boîte homéo de type *Antennapedia*. Ils sont au nombre de 39 et sont regroupés en quatre complexes (*HoxA*, *HoxB*, *HoxC* et *HoxD*) situés sur des chromosomes différents (Figure 1.1). Chez la souris, ces complexes se retrouvent sur les chromosome 6, 11, 15 et 2 respectivement. Tout comme les gènes homéotiques, les gènes *Hox* codent pour des facteurs de transcription se liant à l'ADN au niveau de la séquence consensus ATTA/TAAT (revue par McGinnis et Krumlauf, 1992).

Le complexe *HOM-C* de la drosophile et les quatre complexes *Hox* des mammifères sont très similaires, tant au niveau de leur séquence que de leur organisation. De plus, tel que mentionné à la section 1.1.2, des gènes homéotiques possédant une boîte homéo de type *Antennapedia* se retrouvent aussi chez plusieurs autres espèces d'invertébrés et de vertébrés (McGinnis et al., 1984b). Cependant, alors que chez les vertébrés les gènes *Hox* sont regroupés en plusieurs complexes, chez les invertébrés, ils se retrouvent sur le même complexe. Chez l'amphioxus, par exemple, il existe au moins dix gènes homéotiques regroupés en un seul complexe (Garcia-Fernandez et Holland, 1994), alors que chez les nématodes, tel *Caenorhabditis elegans*, l'unique complexe homéotique ne comporte que quatre gènes (Bürglin et Ruvkun, 1993; Salser et Kenyon, 1994). Il est intéressant de noter que le complexe homéotique retrouvé chez l'amphioxus, un petit animal marin primitif appartenant au sous-embranchement des céphalocordés, est très similaire aux complexes *Hox* des vertébrés; le groupe des céphalocordés est d'ailleurs très rapproché des vertébrés au plan phylogénétique (Garcia-Fernandez et Holland, 1994). Des analyses phylogénétiques réalisées par Zhang et Nei (1996) chez les nématodes, la drosophile, l'amphioxus, la souris et l'homme ont d'ailleurs permis de démontrer que tous les gènes homéotiques proviennent d'un gène ancestral unique qui se serait dupliqué pour la première fois il y a environ un milliard d'années. Les duplications subséquentes de gènes ont ensuite mené à la formation d'un complexe composé d'une dizaine de gènes; ce complexe ancestral existait avant que les amphioxus ne divergent des vertébrés. Enfin, les quatre complexes *Hox* sont apparus à la suite de deux événements de duplication de ce complexe ancestral qui se sont produits très tôt au cours de l'évolution des vertébrés. L'apparition de ces quatre complexes de gènes

Hox a certainement contribué à l'évolution des vertébrés en organismes complexes (Zhang et Nei, 1996; Holland et Garcia-Fernandez, 1996).

Puisque les gènes *Hox* sont apparus à la suite de duplications de gènes et de complexes ancestraux, il n'est pas surprenant de constater qu'il existe de nombreuses similitudes entre ces gènes tant au niveau de leur séquence que de leur fonction. Chez les mammifères, l'homologie des séquences protéiques permet de regrouper les gènes *Hox* codant pour des protéines similaires en treize sous-familles, les membres de chaque sous-famille étant appelés paralogues (Figure 1.1). Par exemple, les paralogues de la sous-famille 4 sont *Hoxa4*, *Hoxb4*, *Hoxc4* et *Hoxd4*. Il faut cependant noter que la plupart des sous-familles ne contiennent que deux ou trois paralogues. Une grande homologie est également observée entre les huit gènes homéotiques du complexe *HOM-C* et les sous-familles de gènes *Hox* (Figure 1.1). Le gène *labial*, par exemple, présente une forte homologie avec les gènes de la sous-famille 1, alors que le gène *Sex combs reduced* peut être associé à la sous-famille 5 (revue par Kessel et Gruss, 1990; revue par Krumlauf, 1994).

La relation de colinéarité existant entre l'organisation des gènes *Hox* le long des complexes et leur profil d'expression au cours du développement est semblable à celle observée au niveau du complexe *HOM-C* (section 1.1.1). Cependant, alors que chez la drosophile l'expression de chaque gène homéotique est restreinte à un domaine bien défini de l'axe antéro-postérieur, chez les mammifères l'expression des gènes *Hox* s'étend de la région postérieure de l'embryon jusqu'à une frontière antérieure très nette au niveau du système nerveux central, du squelette axial et de certains organes. Plus les gènes sont situés en 5' le long des complexes, plus leur limite antérieure d'expression se situe dans les régions postérieures de l'embryon. De plus, chez les mammifères, l'expression des gènes *Hox* se chevauche de telle sorte que certaines régions expriment une combinaison de gènes *Hox*. Cette observation a permis de proposer un code *Hox* qui définirait la position et l'identité de chaque cellule le long de l'axe antéro-postérieur en fonction de la combinaison des gènes *Hox* exprimés au niveau de ces cellules (Kessel et Gruss, 1991).

1.2.2 Fonction

Afin de déterminer le rôle des gènes *Hox* au cours du développement embryonnaire des mammifères, de nombreuses analyses génétiques de perte ou de gain de fonction ont été

réalisées chez la souris. Ces expériences ont permis de démontrer que les gènes *Hox*, tout comme les gènes homéotiques chez la drosophile, sont essentiels au développement normal de l'embryon. En effet, de nombreuses transformations homéotiques au niveau du squelette axial ainsi que des anomalies au niveau du squelette appendiculaire et de divers organes sont observées chez les souris homozygotes mutantes pour différents gènes *Hox* (revue par Stein et al., 1996). De plus, certaines maladies humaines sont associées à des mutations de gènes *Hox*. C'est le cas notamment de la mutation du gène humain *HOXD13* qui cause la synpolydactylie, une malformation des doigts (Muragaki et al., 1996). Les différents phénotypes causés par l'absence de divers gènes *Hox* chez l'humain et la souris indiquent donc que ces gènes sont nécessaires à la spécification du squelette et au développement des organes.

1.2.2.1 Spécification du squelette

Le squelette axial, formé des os de la tête, de la colonne vertébrale et du thorax, se développe à partir des cellules du mésoderme somitique qui apparaissent chez l'embryon au moment de la gastrulation (vers le huitième jour de gestation chez la souris). Le squelette appendiculaire, qui comprend les os des membres supérieurs et inférieurs, se développe quant à lui à partir du mésoderme des lames latérales. L'expression des gènes *Hox* a été détectée, par hybridation *in situ*, au niveau des somites et des structures embryonnaires intermédiaires (sclérotomes, prévertèbres) qui donneront naissance au squelette axial chez l'adulte (revue par Holland et Hogan, 1988). L'expression de ces gènes a également été détectée dans les membres en développement, d'abord au niveau des cellules du mésoderme des lames latérales, puis dans les cellules cartilagineuses en différenciation et finalement dans le périchondre entourant le cartilage (Izpisúa-Belmonte et Duboule, 1992). Le profil d'expression spatio-temporel des gènes *Hox* au niveau du squelette axial et du squelette appendiculaire respecte la règle de colinéarité décrite précédemment (sections 1.1.1 et 1.2.1). Il n'est donc pas étonnant de constater que les mutations des gènes *Hox* chez la souris entraînent souvent des transformations homéotiques le long de l'axe antéro-postérieur du squelette ainsi que diverses anomalies des membres (revue par Stein et al., 1996).

Les mutations des gènes *Hox* chez la souris peuvent conduire à la postériorisation et/ou à l'antériorisation de divers segments du squelette axial. Par exemple, chez les souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxd3*, l'antériorisation des vertèbres cervicales C1

(atlas) et C2 (axis) transforme l'atlas en extension de l'os baso-occipital du crâne, alors que l'axis acquiert certaines caractéristiques de l'atlas (Condie et Capecchi, 1993). De son côté, la mutation du gène *Hoxa5* provoque, entre autres, la transformation de la vertèbre cervicale C7 en vertèbre thoracique T1 (postériorisation) ainsi que la transformation de la vertèbre cervicale C6 en C5 (antériorisation; Jeannotte et al., 1993). Enfin, chez les souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa11*, la postériorisation de la vertèbre thoracique T13 et l'antériorisation de la région sacrée entraînent l'apparition de deux vertèbres lombaires supplémentaires (Small et Potter, 1993).

Les mutations des gènes *Hox* peuvent également entraîner l'apparition d'anomalies au niveau du squelette appendiculaire. C'est le cas notamment de la mutation du gène *Hoxd13* qui affecte le développement des membres antérieurs et postérieurs. Chez les souris homozygotes mutantes pour ce gène on observe, entre autres, un raccourcissement des doigts des membres antérieurs et postérieurs, des déformations des phalanges et des os métacarpiens et métatarsiens, une absence de phalanges au niveau des certains doigts, des fusions entre les os métacarpiens et phalangiens et l'apparition d'un doigt rudimentaire supplémentaire (Dollé et al., 1993). Chez les souris homozygotes mutantes pour le gène *Hoxa11*, on observe des malformations au niveau des os carpiens, notamment la fusion des os pisiforme et pyramidal, un élargissement des os des membres antérieurs (cubitus et radius) et postérieurs (tibia et péroné) et des malformations des malléoles à l'extrémité inférieure du tibia et du péroné (Small et Potter, 1993).

En résumé, les nombreuses transformations homéotiques et anomalies observées au niveau du squelette axial et appendiculaire chez les souris homozygotes mutantes confirment que les gènes *Hox* sont de véritables gènes homéotiques de mammifères (revue par Krumlauf, 1994). De plus, il est intéressant de noter qu'il existe une corrélation entre le profil d'expression spatio-temporel des gènes *Hox* et les régions qui sont affectées par l'absence de ces gènes. En effet, les transformations homéotiques et les anomalies observées dans les régions antérieures du squelette axial et des membres sont causées par les mutations de gènes situés en 3' des complexes, alors que les mutations de gènes situés en 5' des complexes affectent les régions postérieures du squelette axial et des membres.

1.2.2.2 Organogenèse

Bien que les gènes *Hox* soient principalement connus pour le rôle capital qu'ils exercent au cours du développement du squelette, leur implication dans la formation des organes est de plus en plus reconnue. L'expression de la plupart des gènes *Hox* a en effet été détectée, par hybridation *in situ*, au niveau de divers organes en développement. Le gène *Hoxa3*, par exemple, s'exprime au niveau de la glande thyroïde, des poumons, de l'estomac, des reins et de la rate (Gaunt, 1988); le gène *Hoxd4* s'exprime dans les poumons, l'estomac, les testicules, la glande thyroïde et le thymus (Gaunt et al, 1989); le gène *Hoxc6* s'exprime dans les poumons, l'estomac et les reins (Sharpe et al., 1988); enfin, le gène *Hoxa5* s'exprime au niveau des poumons, de la trachée, du larynx, du système digestif et des reins (Dony et Gruss, 1987; Gaunt et al., 1988; Aubin et al., 1997; 1998). De plus, l'analyse des souris mutantes pour différents gènes *Hox* confirme l'importance de ces gènes dans l'organogenèse.

Les mutations des gènes *Hox* situés en 3' des complexes entraînent généralement des anomalies au niveau de la tête, et plus particulièrement dans des structures dérivées des cellules de la crête neurale. Les souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa1*, par exemple, présentent des malformations de l'oreille interne et de la boîte crânienne, une absence de certains nerfs et ganglions crâniens dérivés des cellules de la crête neurale, des anomalies au niveau des rhombomères 4 à 7 et un retard dans la fermeture du tube neural (Lufkin et al., 1991; Chisaka et al., 1992). L'absence de la fonction *Hoxa2* entraîne, quant à elle, des anomalies au niveau des osselets de l'oreille moyenne dérivés des cellules de la crête neurale (Gendron-Maguire et al., 1993; Rijli et al., 1993). Finalement, chez les souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa3*, le thymus et les glandes parathyroïdes sont absents, et le développement de la glande thyroïde est affecté. Ces souris présentent également des anomalies craniofaciales et un dysfonctionnement du système cardiovasculaire. La plupart des organes affectés par l'absence de la fonction *Hoxa3* dérivent des poches et/ou des arcs pharyngiens (Chisaka et Capecchi, 1991; Manley et Capecchi, 1995).

Les phénotypes observés chez les souris homozygotes mutantes pour des gènes *Hox* situés en 5' des complexes sont généralement associés à des organes de la partie postérieure du corps. Chez les souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa10*, par exemple, la spermatogenèse est perturbée chez les mâles et des anomalies au niveau de l'utérus

empêchent la préimplantation des embryons chez les femelles (Satokata et al., 1995). L'absence de certains paralogues de la sous-famille 13 affecte quant à elle le développement du système urogénital. En effet, l'absence de la fonction *Hoxd13* entraîne des malformations au niveau du pénis (Dollé et al., 1993) alors que diverses anomalies au niveau génital sont observées chez les souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa13* (Mortlock et al., 1996).

Enfin, les mutations des gènes *Hox* situés au centre des complexes affectent principalement des organes situés au niveau du tronc. La mutation du gène *Hoxa5*, par exemple, perturbe grandement le développement du système respiratoire et la maturation du système digestif des souris homozygotes mutantes (Aubin et al., 1997; 1999).

Ces quelques exemples mettent en évidence, une fois de plus, la relation de colinéarité qui existe entre l'ordre des gènes *Hox* le long des complexes, leur profil d'expression spatio-temporel et les régions affectées par leur absence (voir la section 1.2.2.1). De plus, ils confirment l'importance des gènes *Hox* au cours de l'organogenèse.

L'expression de plusieurs gènes *Hox* situés en 3' des complexes au niveau des cellules de la crête neurale et des cellules épithéliales de l'ectoderme et de l'endoderme du pharynx présente un grand intérêt développemental puisque plusieurs organes glandulaires – thymus, glandes parathyroïdes, corps ultimobranchiaux et glande thyroïde – dérivent de ces cellules (Manley et Capecchi, 1995; 1998). Tel que mentionné précédemment, le thymus et les glandes parathyroïdes sont absents chez les souris homozygotes mutantes pour le gène *Hoxa3*, et le développement de la glande thyroïde est grandement perturbé. En effet, chez ces souris, la migration des corps ultimobranchiaux qui, avec le diverticulum thyroïdien formeront la glande thyroïde mature, est affectée. De plus, chez certains individus, la fusion des cellules du diverticulum thyroïdien et des corps ultimobranchiaux ne se produit pas. Une hypoplasie importante de la glande thyroïde et une désorganisation cellulaire sont également observées chez ces souris. En effet, il y a peu de thyrocytes et de cellules C dans la glande thyroïde mature et la structure des follicules est anormale (Manley et Capecchi, 1995). L'anatomie et le développement normal de la glande thyroïde font l'objet de la section 1.3.

Les phénotypes observés chez les souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa3* confirment donc l'importance des gènes *Hox* situés en 3' des complexes au cours du développement des organes glandulaires. Dans la suite de cette étude, nous nous intéresserons au rôle du gène *Hoxa5*, qui est situé un peu plus au centre du complexe *HoxA*, au cours du développement de la glande thyroïde.

1.3 La glande thyroïde

1.3.1 Anatomie

La glande thyroïde est un organe constitué de deux lobes de forme conique situés de chaque côté de la trachée (Figure 1.2A). Les lobes s'étendent de la base du larynx jusqu'aux cinquième et sixième anneaux de la trachée. Ils sont reliés par un isthme étroit situé à l'avant de la trachée, entre les deuxième et quatrième anneaux. Chez l'homme adulte, la glande thyroïde pèse entre 15 et 20 grammes (Norman et Litwack, 1987; Ekholm, 1989).

La glande thyroïde est fortement vascularisée. Son irrigation est assurée par les artères thyroïdiennes supérieure et inférieure. Ces artères se ramifient à la surface de la glande et forment un plexus qui envahit le tissu et donne naissance à un réseau très développé de capillaires entourant les follicules. On estime qu'environ la moitié de la surface des follicules est en contact avec des capillaires. Le sang est drainé à l'extérieur de la glande par les veines supérieure, médiane et inférieure. Des vaisseaux et capillaires lymphatiques sont également présents au niveau de la glande thyroïde, mais ils forment un réseau beaucoup moins développé que le réseau sanguin. L'innervation de la glande est assurée par des fibres sympathiques provenant des ganglions cervicaux ainsi que par des fibres parasympathiques dérivées des nerfs vagues (Ekholm, 1989).

La glande thyroïde est entourée de tissu conjonctif qui se prolonge dans le fascia (membrane de tissu conjonctif) qui enveloppe la trachée. Cette capsule externe est reliée à une couche plus profonde de tissu conjonctif qui forme la capsule interne. L'espace entre les deux capsules contient les vaisseaux sanguins et, habituellement, les glandes parathyroïdes (Ekholm, 1989).

À partir de la capsule interne, des cloisons s'étendent à l'intérieur de la glande thyroïde et la divisent en lobules de tailles et de formes variées. Chacun des lobules est composé de nombreux follicules thyroïdiens. Les follicules thyroïdiens sont les unités structurales et fonctionnelles majeures de la glande thyroïde. Ce sont de petites structures sphériques formées d'une couche simple de cellules épithéliales, appelées cellules folliculaires ou thyrocytes, bordant une cavité remplie de colloïde (Figure 1.2B). Les follicules sont entourés par une mince membrane basale, un délicat réseau de fibres réticulaires ainsi qu'un réseau de capillaires et de fibres nerveuses. Chez l'homme adulte, la glande thyroïde contient de 20 à 30 millions de follicules (Norman et Litwack, 1987; Ekholm, 1989).

Les thyrocytes constituent le principal type cellulaire de la glande thyroïde. Leur fonction première est de produire la thyroglobuline. Chez l'humain, la forme de ces cellules épithéliales varie de pavimenteuse à cubique, alors que chez la souris et le rat, ces cellules présentent une forme légèrement cubique ou cylindrique. Les thyrocytes possèdent un gros noyau sphérique situé au centre ou à la base de la cellule. Ce noyau est pauvre en hétérochromatine et contient un ou plusieurs nucléoles. Le cytoplasme des thyrocytes est basophile et sa texture est légèrement granuleuse. Il contient un réticulum endoplasmique rugueux (RER) volumineux occupant presque toute la partie basale et paranucléaire de la cellule. La plupart des citernes du RER servent à la synthèse de la thyroglobuline. L'appareil de Golgi des thyrocytes est semblable à celui que l'on retrouve chez plusieurs autres types de cellules de sécrétion et se situe normalement entre le noyau et la surface apicale de la cellule. On retrouve également dans le cytoplasme des thyrocytes de nombreuses vésicules de sécrétion contenant la thyroglobuline destinée au colloïde (Norman et Litwack, 1987; Ekholm, 1989).

Le colloïde contenu dans le lumen des follicules thyroïdiens est clair et homogène. Il se compose de granules contenant les produits de sécrétion des thyrocytes, en majorité des molécules de thyroglobuline iodée. Le colloïde constitue le site d'entreposage des hormones thyroïdiennes (Norman et Litwack, 1987; Ekholm, 1989).

En plus des thyrocytes, la glande thyroïde contient un second type cellulaire, les cellules parafolliculaires ou cellules C. Ces cellules sont beaucoup moins abondantes que les thyrocytes – chez l'humain, elles ne représentent que 0,1% de toutes les cellules de la glande – mais elles sont généralement plus grosses et possèdent un noyau volumineux. On

les retrouve dans la région centrale de chacun des lobes. Les cellules C sont responsables de la production de calcitonine, une hormone polypeptidique dont la principale fonction est d'abaisser le taux sanguin de calcium (Berne et Levy, 1988).

1.3.2 Origine embryonnaire

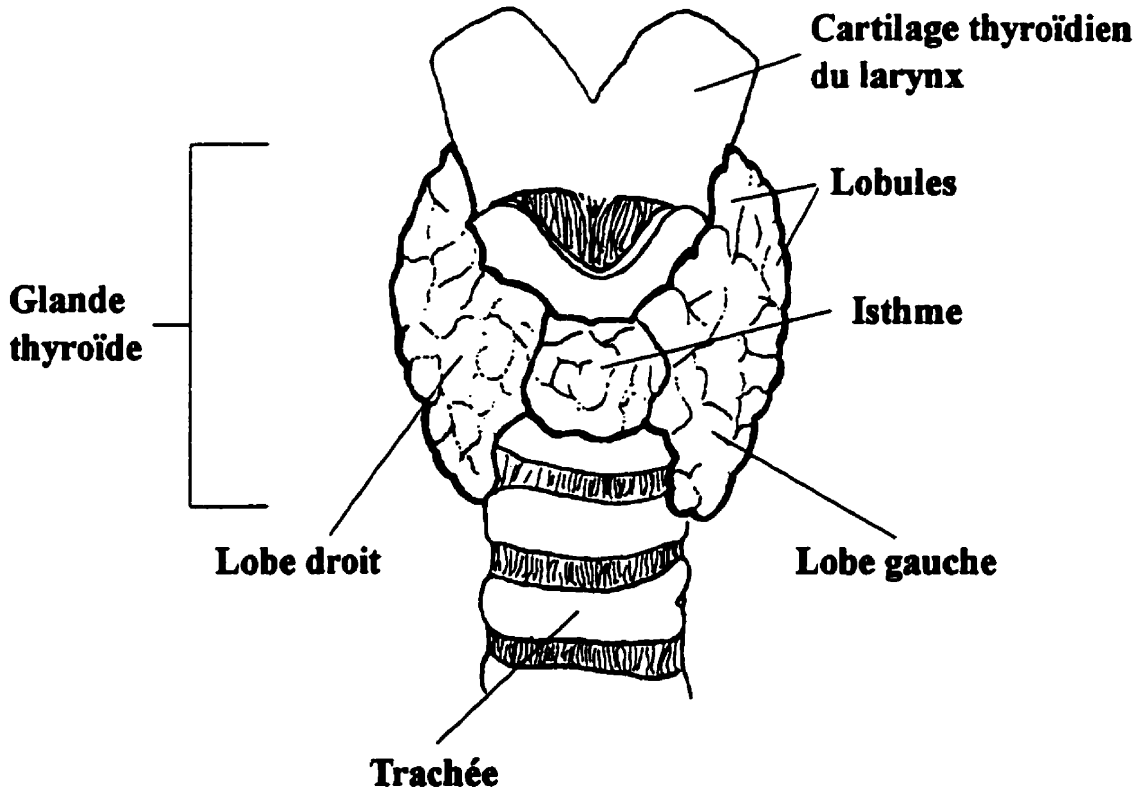
La glande thyroïde est formée par la fusion de deux structures possédant des origines embryonnaires distinctes. Le diverticulum thyroïdien provient de l'endoderme du plancher du pharynx et se forme vers le jour 9.5 de gestation chez la souris (Missero et al., 1998). Les cellules du diverticulum thyroïdien donneront naissance aux thyrocytes dans la glande thyroïde mature. Les deux corps ultimobranchiaux, quant à eux, proviennent du mésenchyme des quatrièmes poches brachiales et sont constitués initialement de cellules dérivées de la crête neurale; ils se forment vers le jour 11.5 de gestation chez la souris (Manley et Capecchi, 1998). Les corps ultimobranchiaux donneront naissance aux cellules C qui produisent la calcitonine (Fisher et Dussault, 1974).

À mesure que l'embryon se développe, les cellules du diverticulum thyroïdien se déplacent postérieurement de leur point d'origine vers leur position finale dans la partie inférieure du cou, où elles forment le tissu thyroïdien. Les cellules des deux corps ultimobranchiaux effectuent également une migration ventrale qui les amène à proximité du tissu thyroïdien vers le jour 14 de gestation chez la souris. À ce moment, les deux types cellulaires fusionnent de façon à ce que les thyrocytes et les cellules C soient bien entremêlés dans la glande thyroïde mature (Fisher et Dussault, 1974).

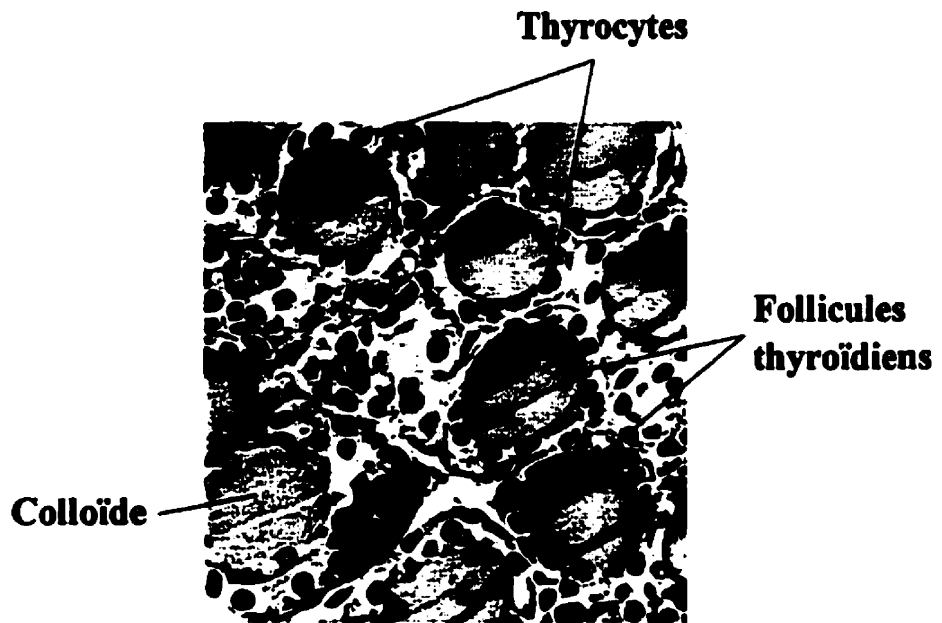
Figure 1.2 Anatomie macroscopique et microscopique de la glande thyroïde.

(A) Anatomie macroscopique de la glande thyroïde. La glande thyroïde est constituée de deux lobes de forme conique situés de chaque côté de la trachée et reliés par un isthme. Les lobes thyroïdiens s'étendent de la base du larynx jusqu'aux cinquième et sixième anneaux de la trachée. La glande thyroïde est divisée en lobules de tailles et de formes variées contenant de nombreux follicules thyroïdiens. (B) Anatomie microscopique de la glande thyroïde. Les follicules thyroïdiens sont de petites structures sphériques formées d'une couche simple de cellules épithéliales, appelées thyrocytes, bordant une cavité remplie de colloïde. Grossissement total: 400X.

A



B



1.4 Les hormones thyroïdiennes

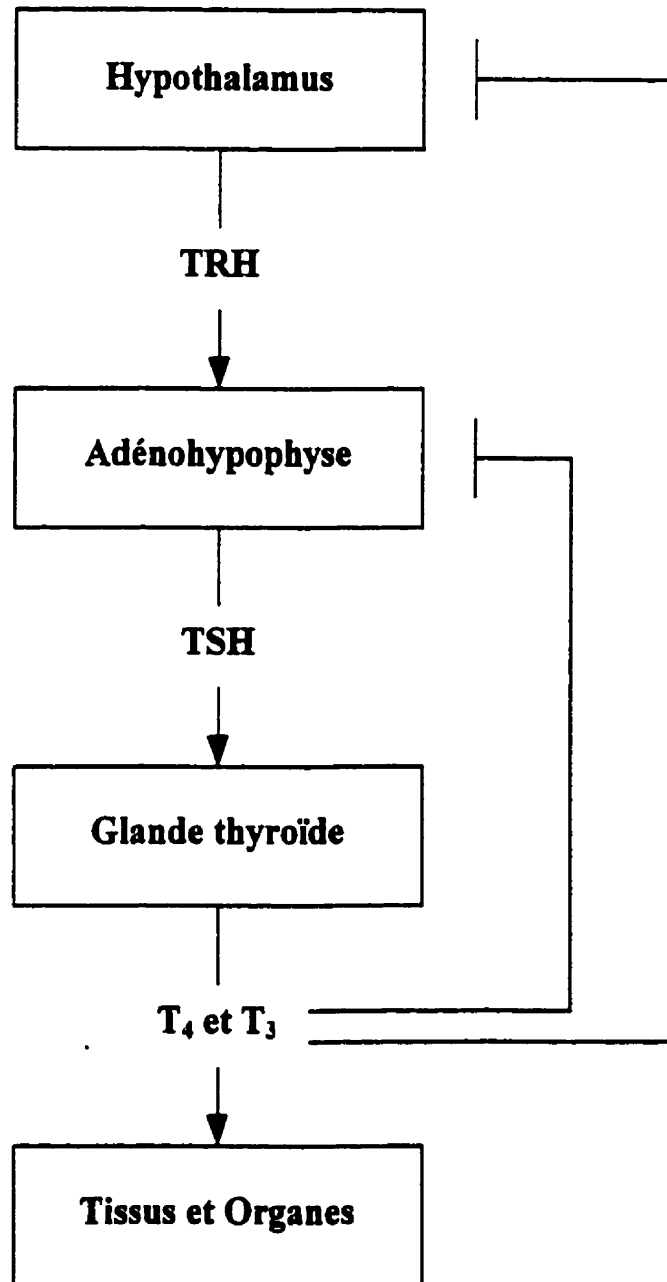
La thyroïde est une glande endocrine et, comme les autres glandes du système endocrinien – l'hypophyse, les parathyroïdes, les surrénales, le corps pinéal, le thymus, le pancréas et les gonades – elle a pour fonction générale d'influencer l'activité métabolique des cellules par l'intermédiaire d'hormones libérées dans la circulation sanguine et distribuées dans tout l'organisme. Les principales hormones produites, entreposées et sécrétées par la glande thyroïde sont la 3,5,3',5'-tétraiodothyronine ou thyroxine (T_4) et la 3,5,3'-triiodothyronine (T_3), qui contiennent respectivement quatre et trois atomes d'iode. La synthèse de ces hormones est dépendante de la production de thyroglobuline par les thyrocytes et d'un apport alimentaire adéquat en iode.

1.4.1 Biosynthèse et sécrétion des hormones thyroïdiennes

Les hormones thyroïdiennes sont produites et sécrétées par la glande thyroïde en réponse à la liaison de thyrotrophine (TSH) à des récepteurs spécifiques (TSHr) situés à la surface des thyrocytes. La TSH est une hormone sécrétée par les cellules thyrotropes de l'adénohypophyse sous l'effet de la thyroïdolibérine (TRH), une hormone d'origine hypothalamique. Comme le montre la Figure 1.3, les niveaux d'hormones thyroïdiennes en circulation sont étroitement contrôlés par une boucle de rétroaction négative impliquant l'hypothalamus et l'adénohypophyse (Norman et Litwack, 1987).

Figure 1.3 Boucle de rétroaction négative contrôlant les niveaux d'hormones thyroïdiennes en circulation.

Les hormones thyroïdiennes T_4 et T_3 sont produites et sécrétées par la glande thyroïde en réponse à la liaison de TSH à des récepteurs spécifiques à la surface des thyrocytes. La TSH est une hormone sécrétée par les cellules thyrotropes de l'adénohypophyse sous l'effet de la TRH, une hormone d'origine hypothalamique. Les niveaux d'hormones thyroïdiennes en circulation sont contrôlés par une boucle de rétroaction négative impliquant l'hypothalamus et l'adénohypophyse.



1.4.1.1 Biosynthèse et iodation de la thyroglobuline

La thyroglobuline (Tg) est la principale protéine produite par les thyrocytes et constitue le précurseur des hormones thyroïdiennes. C'est une glycoprotéine de 660 kDa constituée de deux sous-unités identiques; c'est l'une des plus grosses et des plus complexes glycoprotéines connues (Vassart et al., 1975; Alvino et al., 1982).

La thyroglobuline, comme toutes les protéines de sécrétion, est synthétisée par des polyribosomes attachés à la membrane du RER. Elle traverse ensuite le RER pour se rendre à l'appareil de Golgi où elle subit plusieurs modifications post-traductionnelles (glycosylation, sulfatation, phosphorylation; Spiro et Spiro, 1966; Herzog, 1985; Consiglio et al., 1987). La thyroglobuline se retrouve finalement dans des vésicules de sécrétion qui se déplacent vers la membrane apicale des thyrocytes afin de déverser leur contenu dans le lumen des follicules (revue par Ekholm, 1981).

La glande thyroïde possède la capacité de concentrer les ions iodures contenus dans le sang et de les utiliser pour synthétiser les hormones thyroïdiennes. L'entrée de ces ions dans les thyrocytes se fait au niveau de la membrane basale grâce à un symporteur Na^+/I^- (NIS) ancré dans la membrane (Carrasco, 1993). Les ions iodures sont ensuite transportés de la membrane basale vers la membrane apicale dans des vésicules de sécrétion. L'iodation de la thyroglobuline se produit au niveau de la membrane apicale des thyrocytes grâce à une enzyme membranaire, la thyroperoxydase (TPO). Cette enzyme est responsable de la conversion des ions iodures en atomes d'iode puis de leur incorporation dans la thyroglobuline au niveau de certains résidus tyrosines (Dunn, 1995). La liaison d'un atome d'iode sur un résidu tyrosine produit la monoiodotyrosine (MIT) tandis que la liaison de deux atomes d'iode produit la diiodotyrosine (DIT; De Nayer et Vassart, 1980).

La synthèse des hormones thyroïdiennes proprement dite implique également la thyroperoxydase, qui intervient dans la réaction de couplage entre les molécules de MIT et de DIT (Lamas et al., 1972). La T_4 est formée par l'association de deux molécules de DIT alors que la T_3 est produite par l'association d'une molécule de MIT et d'une molécule de DIT. Deux autres iodothyronines sont également présentes en très faible quantité dans le lumen des follicules. Ce sont la 3,3',5'-triiodothyronine (T_3 inverse), formée d'une molécule de MIT et d'une molécule de DIT, et la diiodothyronine, formée de deux molécules de MIT.

Seules les hormones T_4 et T_3 possèdent une activité biologique (De Nayer et Vassart, 1980; Nunez, 1980).

1.4.1.2 Sécrétion des hormones thyroïdiennes

La thyroïde possède une caractéristique unique parmi les glandes endocrines, soit la capacité d'entreposer les hormones qu'elle produit pour ensuite les libérer lentement dans la circulation sanguine en fonction des besoins de l'organisme. Tel que mentionné précédemment, les niveaux d'hormones thyroïdiennes en circulation sont étroitement contrôlés par une boucle de rétroaction négative impliquant l'hypothalamus et l'adénohypophyse (Figure 1.3; Norman et Litwack, 1987). Les hormones thyroïdiennes sont entreposées à l'intérieur des follicules thyroïdiens sous forme de thyroglobuline iodée (Salvatore et Edelhoeh, 1973).

La libération des hormones thyroïdiennes dans la circulation sanguine nécessite la dégradation préalable des molécules de thyroglobuline sur lesquelles elles sont fixées. La thyroglobuline iodée est d'abord recapturée par les thyrocytes par macro- ou micropinocytose, puis les vésicules ainsi formées s'associent à des lysosomes à l'intérieur des cellules. La thyroglobuline iodée est alors dégradée par des protéases lysosomiales, ce qui permet la libération de T_4 et T_3 (revue par Deshpande et Venkatesh, 1999). Les hormones thyroïdiennes circulent dans le sang sous forme d'acides aminés liés de façon réversible à des protéines plasmatiques. La plus importante de ces protéines est la globine liant la thyroxine (thyroxine-binding globin, TBG) qui se lie préférentiellement à T_4 mais peut aussi s'associer à T_3 . L'albumine, qui peut se lier à T_4 ou à T_3 , et la pré-albumine, qui se lie uniquement à T_4 , servent également au transport des hormones thyroïdiennes dans la circulation sanguine (Robbins et Edelhoeh, 1986; Woeber, 1986; Norman et Litwack, 1987).

1.4.2 Mécanisme d'action des hormones thyroïdiennes

La plupart des tissus de l'organisme possèdent des récepteurs membranaires permettant le transport actif des hormones thyroïdiennes du plasma vers l'intérieur des cellules (Gonçalves et al., 1990). Une fois à l'intérieur des cellules, la T_4 est convertie en T_3 grâce à la thyroxine 5'-déiodinase, une enzyme qui catalyse l'élimination d'un atome d'iode (Berry et Larsen, 1992; St-Germain et Galton, 1997). La T_3 , qui possède une activité biologique 3 à

5 fois plus importante que la T_4 (Norman et Litwack, 1987), se lie ensuite à des récepteurs nucléaires de haute affinité. Trois récepteurs nucléaires d'hormones thyroïdiennes (TR) différents, $TR\alpha_1$, $TR\beta_1$ et $TR\beta_2$, peuvent lier la T_3 afin de lui permettre d'exercer son action (Sap et al., 1986; Weinberger et al., 1986). Le récepteur $TR\alpha_1$ est produit par le gène *TR α* ; ce gène produit également, par épissage alternatif, trois protéines ne liant pas la T_3 ($TR\alpha_2$, $TR\Delta\alpha_1$ et $TR\Delta\alpha_2$). Les récepteurs $TR\beta_1$ et $TR\beta_2$ sont quant à eux générés par l'épissage alternatif du gène *TR β* (Gauthier et al., 1999). Les récepteurs d'hormones thyroïdiennes font partie de la superfamille des récepteurs nucléaires, qui inclut les récepteurs d'acide rétinoïque, les récepteurs d'acide 9-cis rétinoïque, les récepteurs de vitamine D3 et les récepteurs PPAR (peroxysome proliferator-activated receptors; Laudet et al., 1992). Bien que tous les tissus possèdent des récepteurs nucléaires d'hormones thyroïdiennes, le profil d'expression spatio-temporel de ces récepteurs varie d'un tissu à l'autre (Hsu et Brent, 1998). Chez le rat, par exemple, la forme prédominante de récepteurs nucléaires d'hormones thyroïdiennes dans le foie foetal est $TR\alpha$ alors que dans le foie adulte, on retrouve principalement les récepteurs $TR\beta_1$ et $TR\beta_2$ (Schwartz et al., 1992; Schwartz et al., 1994).

La présence de deux gènes encodant les récepteurs d'hormones thyroïdiennes suggère l'existence de fonctions distinctes pour chacun de ces récepteurs dans la réponse cellulaire aux hormones thyroïdiennes (Forrest, 1994). L'analyse des phénotypes observés chez les souris homozygotes mutantes pour les gènes *TR α* et *TR β* confirme cette hypothèse. En effet, les souris homozygotes mutantes pour le gène *TR α* présentent un retard de croissance, un délai dans la maturation des os et du petit intestin, une hypothyroïdie sévère à partir de la troisième semaine après la naissance (hypoplasie de la glande thyroïde, désorganisation des follicules, diminution des niveaux sériques de T_4 , T_3 et TSH) et une espérance de vie d'environ un mois (Fraichard et al., 1997; Gauthier et al., 1999). Les souris homozygotes mutantes pour le gène *TR β* présentent quant à elles une hyperplasie de la glande thyroïde, une augmentation importante des niveaux sériques de T_4 , T_3 et TSH et des troubles auditifs (Forrest et al., 1996; Gauthier et al., 1999). Enfin, la double mutation des gènes *TR α* et *TR β* entraîne un retard de croissance, un délai dans la maturation des os et des intestins, une hyperplasie de la glande thyroïde et une augmentation importante des niveaux sériques de T_4 , T_3 et TSH chez les souris homozygotes mutantes; l'espérance de vie de ces souris est de cinq semaines (Gauthier et al., 1999; Göthe et al., 1999). Ces résultats mettent en évidence le rôle des récepteurs $TR\beta_1$ et $TR\beta_2$ dans l'inhibition de la synthèse de TSH

par les cellules thyroïdiques de l'adénohypophyse (Gauthier et al., 1999) et suggèrent un rôle pour le récepteur TR α dans l'activation du gène codant pour la TSH (Fraichard et al, 1997).

1.4.3 Principaux effets des hormones thyroïdiennes

Bien que le rôle des hormones thyroïdiennes varie selon les espèces, une de leurs principales fonctions cellulaires est de contrôler le taux de respiration métabolique. En effet, la liaison de T₃ à ses récepteurs nucléaires permet l'initiation de la transcription de divers gènes. Cette activité transcriptionnelle accrue entraîne, entre autres, l'augmentation du nombre et de la taille des mitochondries, ce qui a pour effet de stimuler la consommation d'oxygène et l'activation de certaines enzymes impliquées dans le catabolisme du glucose, accélérant ainsi le métabolisme basal (Norman et Litwack, 1987; Berne et Levy, 1988).

De plus, chez tous les vertébrés, les hormones thyroïdiennes sont importantes pour la croissance et le développement de l'organisme en général et leurs effets au niveau des tissus sont nombreux. Elles favorisent, entre autres, le développement du système nerveux et son fonctionnement normal chez l'adulte; elles sont nécessaires au bon fonctionnement du coeur ainsi qu'au développement et au tonus musculaires; elles assurent le fonctionnement normal des organes génitaux et stimulent la lactation chez la femelle; elles contribuent à la motilité et au tonus du système gastro-intestinal et augmentent la sécrétion des sucs digestifs; elles stimulent la croissance des os, des poils, des cheveux et des dents; elles favorisent l'hydratation de la peau et l'activité sécrétrice du système tégumentaire. Les hormones thyroïdiennes peuvent également faciliter la synthèse et la sécrétion des hormones de croissance (Berne et Levy, 1988). De plus, elles sont importantes pour le développement et la maturation des systèmes respiratoire et digestif (Holt et al., 1993; Hodin et al., 1994).

1.5 Dérèglements de la fonction thyroïdienne

Les dérèglements de la fonction thyroïdienne sont nombreux et peuvent avoir plusieurs causes: insensibilité de la glande thyroïde à la TSH, synthèse anormale de la thyroglobuline, incapacité à transporter et accumuler les ions iodures, activité inadéquate de la thyroperoxydase, problème de transport des hormones thyroïdiennes dans la circulation sanguine, réponse inadéquate des récepteurs nucléaires de T_3 , etc. (Stanbury, 1986). Toutefois, les principaux dérèglements de la fonction thyroïdienne sont l'hyperthyroïdie, l'hypothyroïdie et le syndrome de résistance aux hormones thyroïdiennes.

1.5.1 Hyperthyroïdie

L'hyperthyroïdie est caractérisée par des niveaux sériques de T_4 et T_3 élevés et de faibles niveaux sériques de TSH. Les principaux symptômes observés chez les patients souffrant d'hyperthyroïdie sont une augmentation du métabolisme basal accompagnée d'une perte pondérale, d'une augmentation de la température corporelle, de fièvres fréquentes et d'une sudation excessive. Un rythme cardiaque rapide et irrégulier, une exophtalmie, c'est-à-dire une saillie anormale des globes oculaires, de même qu'un affaiblissement général de l'organisme dû à la diminution de la masse musculaire sont également caractéristiques d'un hyperfonctionnement de la glande thyroïde (Berne et Levy, 1988). Chez le rat, l'hyperthyroïdie induite par l'administration de doses excessives de T_4 ou de T_3 à la naissance entraîne un retard de croissance, accélère l'ouverture des yeux et l'élévation des oreilles, et affecte le développement du cerveau. De plus, les travaux réalisés par Legrand et al. (1976) montrent que l'excès d'hormones thyroïdiennes accélère d'abord la maturation des cellules germinales du cervelet, mais entraîne par la suite une diminution de la masse de cet organe. L'effet global de l'hyperthyroïdie sur le développement du cerveau est donc identique à celui de l'hypothyroïdie, qui entraîne un retard mental irréversible (Legrand et al., 1976; section 1.5.2).

L'hyperthyroïdie peut avoir plusieurs causes. La plus fréquente est l'hyperplasie de la glande thyroïde causée par le développement d'auto-anticorps qui se lient aux récepteurs de TSH et activent la synthèse et la sécrétion des hormones thyroïdiennes. Cette maladie auto-immune, connue sous le nom de maladie de Graves, est probablement due à un problème au niveau du thymus puisque l'une des fonctions de cet organe est justement d'empêcher le

développement des auto-anticorps (Berne et Levy, 1988). Au cours des dernières années, des modèles animaux de la maladie de Graves ont été développés en immunisant des souris avec des fibroblastes transfectés à la fois avec le récepteur de TSH et des molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité. Chez ces souris, l'expression aberrante des molécules de classe II est nécessaire à l'apparition des symptômes caractéristiques de la maladie de Graves (Shimojo et al., 1996; Kikuoka et al., 1998; Kita et al, 1999).

1.5.2 Hypothyroïdie

L'hypothyroïdie est généralement caractérisée par de faibles niveaux sériques de T_4 et T_3 et des niveaux sériques élevés de TSH. Les principaux symptômes observés chez les patients souffrant d'hypothyroïdie sont un ralentissement du métabolisme basal accompagné d'un gain de poids, d'une diminution de la température corporelle et d'un ralentissement général du mouvement, de la parole et de la pensée. L'assèchement de la peau, la perte des cheveux, l'affaissement des paupières, l'épaississement de la langue et des jointures, l'anémie et la léthargie sont également caractéristiques de l'hypothyroïdie. Dans les cas d'hypothyroïdie congénitale, les nouveaux-nés atteints doivent être traités le plus rapidement possible afin de prévenir le crétinisme, caractérisé entre autres par un retard mental irréversible (Berne et Levy, 1988).

L'hypothyroïdie résulte souvent d'une atrophie de la glande thyroïde, généralement précédée d'une réaction inflammatoire chronique. Cette réaction inflammatoire est causée par la présence d'anticorps dirigés contre certains antigènes cellulaires, dont la thyroglobuline. L'ablation chirurgicale de la glande thyroïde, l'exposition aux radiations, les goitres nodulaires, la destruction de l'hypothalamus ou de l'adénohypophyse et un apport alimentaire insuffisant en iode entraînent également l'hypothyroïdie (Berne et Levy, 1988).

Les souris *hyt/hyt* présentent un cas intéressant d'hypothyroïdie congénitale causée par une mutation ponctuelle dans le gène codant pour le récepteur de TSH (*TSHr*). Ces souris souffrent d'hypothyroïdie congénitale primaire caractérisée par une diminution importante des niveaux sériques de T_4 et T_3 et une augmentation conséquente des niveaux de TSH, une hypoplasie de la glande thyroïde, une diminution de la quantité de colloïde à l'intérieur des follicules thyroïdiens, un retard de croissance, un délai dans l'ouverture des yeux et l'élévation des oreilles et un ralentissement des réflexes neuromoteurs (Beamer et al., 1981;

Beamer et Cresswell, 1982; Adams et al., 1989; Stein et al., 1989; 1994). Des phénotypes similaires (retard de croissance, délai dans l'ouverture des yeux et l'élévation des oreilles, ralentissement des réflexes neuromoteurs) sont également observés chez les souris transgéniques TG66-19 (Wallace et al., 1995). Ces souris transgéniques portent une construction dans laquelle le promoteur de la thyroglobuline de boeuf dirige l'expression du gène codant pour la thymidine kinase du virus herpès simplex de type I (HSV-1) au niveau des thyrocytes. L'administration de Ganciclovir – un analogue de la guanine qui, lorsque phosphorylé par la thymidine kinase de HSV-I, inhibe l'ADN polymérase du virus (Smee et al., 1983) – aux souris transgéniques adultes entraîne par conséquent la destruction spécifique des thyrocytes, ce qui rend ces souris déficientes en hormones thyroïdiennes; les cellules C ne sont cependant pas touchées et la production de calcitonine demeure normale (Wallace et al., 1991). L'administration de Ganciclovir aux femelles gestantes permet également de rendre les embryons transgéniques déficients en hormones thyroïdiennes (Wallace et al., 1994).

1.5.3 Syndrome de résistance aux hormones thyroïdiennes

Le syndrome de résistance aux hormones thyroïdiennes est caractérisé par une diminution de la réponse des divers tissus de l'organisme aux hormones thyroïdiennes. Chez les patients souffrant de ce syndrome, les niveaux sériques de T_4 et T_3 sont élevés en permanence, ce qui n'empêche pas la sécrétion de TSH par l'adénohypophyse. Le syndrome de résistance aux hormones thyroïdiennes est causé par des anomalies au niveau des récepteurs nucléaires de T_3 (Refetoff et al., 1993).

Les souris homozygotes mutantes pour le gène $TR\beta$, qui code pour les récepteurs nucléaires $TR\beta_1$ et $TR\beta_2$, constituent un modèle intéressant pour l'étude du syndrome de résistance aux hormones thyroïdiennes. En effet, tel que mentionné précédemment (section 1.4.2), l'absence des récepteurs $TR\beta_1$ et $TR\beta_2$ entraîne chez ces souris une augmentation importante des niveaux sériques de T_4 , T_3 et TSH qui ne peut être compensée par la seule présence du récepteur $TR\alpha$ (Forrest et al., 1996; Gauthier et al., 1999).

1.6 Aspects moléculaires du développement et de la fonction de la glande thyroïde

1.6.1 Expression des gènes régulateurs de la fonction thyroïdienne

Jusqu'à présent, trois gènes impliqués dans le développement et la régulation de la fonction thyroïdienne ont été identifiés. Il s'agit des gènes *TTF-1*, *TTF-2* et *Pax-8*, qui codent pour des facteurs de transcription. Ces gènes s'expriment au niveau de la glande thyroïde dès le début de la formation de cet organe.

1.6.1.1 Le gène *TTF-1*

Le gène *TTF-1* (thyroid transcription factor-1) code pour un facteur de transcription contenant un domaine homéo de la classe NKX-2, une séquence protéique de 61 acides aminés formant le motif hélice-boucle-hélice caractéristique des protéines homéotiques et reconnaissant la séquence consensus (G/T)AAG (Guazzi et al. 1990; revue par Harvey, 1996). Ce gène s'exprime dans les cellules du diverticulum thyroïdien dès le jour 9.5 de gestation chez la souris, et son expression au niveau des thyrocytes se poursuit jusqu'à l'âge adulte. Le profil d'expression du gène *TTF-1* inclut également l'épithélium des bronches pulmonaires, certaines régions du cerveau antérieur, la neurohypophyse et le mésenchyme de la trachée (Guazzi et al., 1990; Lazzaro et al., 1991; Kimura et al., 1996; Aubin et al., 1997; Zannini et al., 1997). Une étude récente réalisée chez le rat a également démontré la présence du gène *TTF-1* dans les cellules C de la glande thyroïde ainsi que dans plusieurs autres tissus non reconnus pour exprimer ce gène: les glandes parathyroïdes, certaines cellules de l'épithélium squameux de la peau et de l'oesophage, l'adénohypophyse, le cervelet, l'hippocampe et certaines couches de la rétine (Suzuki et al., 1998a).

Les souris homozygotes mutantes pour le gène *TTF-1* meurent à la naissance. Chez ces souris, la glande thyroïde, l'hypophyse et le parenchyme pulmonaire sont absents, et de nombreuses anomalies sont observées dans la région ventrale du cerveau antérieur (Kimura et al., 1996). Ces résultats indiquent que le gène *TTF-1* joue un rôle essentiel dans le développement de la glande thyroïde, de l'hypophyse, des poumons et du cerveau. Au niveau des poumons, *TTF-1* est impliqué dans l'expression des protéines de surfactants (Bohinski et al., 1994; Kelly et al., 1996). L'absence de glande thyroïde observée chez les

mutants *TTF-1* ressemble à une condition pathologique entraînant l'hypothyroïdie chez l'homme (Missero et al., 1998). Aucune mutation au niveau du gène *TTF-1* humain n'a cependant été rapportée jusqu'à présent dans des cas d'hypothyroïdie, probablement parce que l'expression de ce gène est essentielle au développement de certaines fonctions vitales (Lapi et al., 1997).

1.6.1.2 Le gène *TTF-2*

Le gène *TTF-2* (thyroid transcription factor-2) code pour un facteur de transcription contenant un domaine forkhead, une séquence protéique de 100 acides aminés formant un motif "winged helix" permettant la liaison à l'ADN (Pierrou et al., 1994; Zannini et al., 1997). Ce gène s'exprime dans les cellules du diverticulum thyroïdien dès le jour 9.5 de gestation chez la souris. À ce stade, *TTF-2* s'exprime également dans l'endoderme du pharynx et dans l'hypophyse en développement. Les travaux réalisés par Zannini et al. (1997) indiquent que l'expression du gène *TTF-2* au niveau des thyrocytes s'éteint vers le jour 15 de gestation pour ne réapparaître dans la glande thyroïde qu'à l'âge adulte. Un profil d'expression temporel différent a cependant été obtenu au cours de la présente étude (section 3.5.2).

Les souris homozygotes mutantes pour le gène *TTF-2* meurent dans les 48 heures suivant la naissance. Ces souris ont le palais fendu et présentent des problèmes de migration du diverticulum thyroïdien résultant en une localisation incorrecte ou une absence complète de la glande thyroïde. La mutation du gène *TTF-2* chez la souris entraîne donc une hypothyroïdie néonatale qui ressemble à l'agénésie de la glande thyroïde observée chez l'homme (De Felice et al., 1998). Une mutation non-sens dans le domaine forkhead du gène *TTF-2* humain a d'ailleurs été identifiée chez deux patients présentant une agénésie de la glande thyroïde et un palais fendu (Clifton-Bligh et al., 1998). Cette mutation diminue la capacité de liaison du facteur TTF-2 à l'ADN.

1.6.1.3 Le gène *Pax-8*

Le gène *Pax-8*, comme tous les gènes *Pax*, code pour un facteur de transcription contenant une boîte "paired", un domaine de liaison à l'ADN de 128 acides aminés situé dans la partie N-terminale de la protéine (Plachov et al., 1990; Mansouri et al., 1996). Ce gène s'exprime

dans les cellules du diverticulum thyroïdien dès le jour 9.5 de gestation chez la souris et son expression au niveau des thyrocytes des lobes et de l'isthme de la glande thyroïde se poursuit jusqu'à l'âge adulte (Plachov et al., 1990; Zannini et al., 1997). Le profil d'expression du gène *Pax-8* au cours du développement de la souris inclut également la frontière entre les cerveaux moyen et postérieur et les reins (Plachov et al., 1990). Chez l'homme, l'expression de *Pax-8* a été détectée dans la glande thyroïde, les reins ainsi que dans cinq cas documentés de tumeurs de Wilms (Poleev et al., 1992).

Les souris homozygotes mutantes pour le gène *Pax-8* présentent un retard de croissance important une semaine après la naissance et meurent peu de temps après le sevrage. La glande thyroïde des mutants *Pax-8* est constituée uniquement de cellules C et ne contient ni thyrocytes ni follicules thyroïdiens; l'expression des gènes *Tg* et *TPO* n'est donc pas détectée chez ces souris. En fait, chez les souris homozygotes mutantes pour le gène *Pax8*, le diverticulum thyroïdien est présent aux jours 10.5 et 11.5 de gestation, mais son développement ne se poursuit pas dans les stades subséquents. Le gène *Pax-8* pourrait donc jouer un rôle dans la différenciation des cellules de l'endoderme en cellules épithéliales (Mansouri et al., 1998). Chez l'homme, des mutations ponctuelles dans le domaine "paired" du gène *Pax-8* ont été identifiées dans trois cas d'agénésie de la glande thyroïde (Macchia et al., 1998). Ces mutations diminuent l'activité de liaison du facteur PAX-8 à l'ADN.

1.6.2 Expression des gènes spécifiques à la fonction thyroïdienne

Il existe quatre gènes nécessaires à la fonction thyroïdienne et considérés comme de bons marqueurs de l'état de différenciation des thyrocytes. Il s'agit des gènes codant pour la thyroglobuline (*Tg*), la thyroperoxydase (*TPO*), le récepteur de TSH (*TSHr*) et le symporteur Na^+/I^- (*NIS*) (Sinclair et al., 1990). Ces gènes s'expriment au niveau des thyrocytes dans la glande thyroïde mature.

1.6.2.1 Le gène *Tg* codant pour la thyroglobuline

Tel que mentionné précédemment (section 1.4.1.1), la thyroglobuline est la principale protéine produite par les thyrocytes et constitue le précurseur des hormones thyroïdiennes. Cette glycoprotéine est codée par le gène *Tg* qui s'exprime uniquement au niveau des

thyrocytes (Lazzaro et al., 1991). L'expression de ce gène commence vers le jour 14.5 de gestation chez la souris et se poursuit jusqu'à l'âge adulte.

De nombreuses études réalisées chez l'homme et divers autres animaux ont montré un lien entre une synthèse incorrecte de la thyroglobuline et le goitre congénital (revue par Medeiros-Neto et al., 1993). Des problèmes de synthèse de la thyroglobuline sont également en cause dans certaines tumeurs thyroïdiennes (Monaco et Robbins, 1973; Yamamoto et al., 1984). Plusieurs mutations et délétions dans la séquence du gène *Tg* ont d'ailleurs été identifiées dans des cas de goitre congénital et d'hypothyroïdie (Ricketts et al., 1987; Tayler et Rowe, 1987; Adkison et al., 1990; Ieiri et al., 1991; Targovnik et al., 1995).

1.6.2.2 Le gène *TPO* codant pour la thyroperoxydase

Tel que mentionné à la section 1.4.1.1, la thyroperoxydase est une enzyme liée à la membrane plasmique apicale des thyrocytes et impliquée dans les diverses étapes de l'iodation de la thyroglobuline et de la biosynthèse des hormones thyroïdiennes. Cette enzyme est codée par le gène *TPO* qui s'exprime uniquement au niveau des thyrocytes (Lazzaro et al., 1991). L'expression de ce gène commence vers le jour 14.5 de gestation chez la souris et se poursuit jusqu'à l'âge adulte.

Des études ont montré un lien entre une activité inadéquate de la thyroperoxydase (incapacité à transformer les ions iodures en iode ou à ioder la thyroglobuline, localisation cellulaire anormale, absence totale d'activité) et le goitre congénital. Une mutation dans la séquence du gène *TPO* a d'ailleurs été identifiée dans un cas de goitre congénital chez l'homme (Abramowicz et al., 1992a).

1.6.2.3 Le gène *TSHr* codant pour le récepteur de TSH

Le récepteur de TSH est un récepteur couplé aux protéines G localisé au niveau de la membrane plasmique basale des thyrocytes (Nagayama et Rapoport, 1992; Vassart et Dumont, 1992). Ce récepteur est codé par le gène *TSHr* qui s'exprime au niveau des thyrocytes (Lazzaro et al., 1991). Cependant, l'expression du gène *TSHr* ne semble pas être spécifique à la glande thyroïde puisque son expression a également été rapportée dans des

fibroblastes et du tissu adipeux (Endo et al., 1993). L'expression de ce gène commence vers le jour 14.5 de gestation chez la souris et se poursuit jusqu'à l'âge adulte.

Plusieurs études réalisées chez l'homme et d'autres animaux ont permis d'identifier diverses mutations dans le gène *TSHr* causant des troubles de la glande thyroïde. Ces mutations peuvent entraîner un gain ou une perte de fonction conduisant respectivement à l'hyperthyroïdie ou à l'hypothyroïdie (revue par Duprez et al., 1998). Une mutation ponctuelle dans la séquence du gène *TSHr* a d'ailleurs été identifiée chez les souris *hyt/hyt* souffrant d'hypothyroïdie congénitale primaire (voir la section 1.5.2).

1.6.2.4 Le gène *NIS* codant pour le symporteur Na^+/I^-

Tel que mentionné précédemment (section 1.4.1.1), le symporteur Na^+/I^- est un transporteur protéique ancré dans la membrane plasmique basale des thyrocytes et nécessaire à l'entrée des ions iodures dans les cellules; il est codé par le gène *NIS* (Carrasco, 1993). Le dysfonctionnement de ce symporteur pourrait être impliqué dans les problèmes de transport et d'accumulation des ions iodures chez certains patients souffrant d'hypothyroïdie. Une mutation entraînant la substitution d'un résidu thréonine par un résidu proline au niveau du symporteur Na^+/I^- a d'ailleurs été identifiée chez deux patients présentant une incapacité à accumuler les ions iodures (Fujiwara et al., 1997; Matsuda et Kosugi, 1997; Levy et al., 1998).

1.6.3 Interactions moléculaires impliquées dans le développement et la fonction de la glande thyroïde

Les interactions moléculaires entre les facteurs de transcription TTF-1, TTF-2 et PAX-8 et les gènes *Tg*, *TPO*, *TSHr* et *NIS* sont nombreuses et complexes (Figure 1.4). De plus, l'expression de certains gènes *Hox* – *Hoxa3*, *Hoxa4*, *Hoxb4* et *Hoxd4* – au niveau de la glande thyroïde a déjà été rapportée (Gaunt, 1988; Gaunt et al., 1988; Gaunt et al., 1989). Il est donc possible que les protéines HOX interagissent aussi avec les gènes impliqués dans la régulation et la fonction thyroïdiennes au cours du développement de la glande thyroïde.

Plusieurs études utilisant des essais de protection à la DNase et de cotransfection dans des cellules FRTL-5, une lignée établie de thyrocytes de rat, ont démontré le rôle du facteur

TTF-1 dans l'activation de la transcription des gènes codant pour la thyroglobuline (Civitareale et al., 1989; Sinclair et al., 1990), la thyroperoxydase (Kikkawa et al., 1990; Mizuno et al., 1991; Abramowicz et al., 1992b; Francis-Lang et al., 1992), le récepteur de TSH (Civitareale et al., 1993; Shimura et al., 1994) et le symporteur Na^+/I^- (Endo et al., 1997). Les interactions possibles entre le gène *TTF-1* et les protéines HOX ont également été étudiées. Des essais de cotransfection dans des cellules HeLa et NIH3T3 réalisés par Guazzi et al. (1994) montrent une interaction spécifique entre le facteur HOXB3 et le gène *TTF-1*, alors qu'aucune interaction n'est détectée avec les autres protéines HOX analysées (HOXD3, HOXA4, HOXD4, HOXC5, HOXC6, HOXC8 et HOXD8). Ces résultats suggèrent un rôle pour HOXB3 dans l'activation du gène *TTF-1* et possiblement dans le développement de la glande thyroïde. L'analyse des souris homozygotes mutantes pour le gène *Hoxb3* ne révèle cependant aucune anomalie au niveau de cet organe (Manley et Capecchi, 1998). Aucune étude portant sur les interactions possibles entre la protéine HOXA3 et les gènes régulateurs de la fonction thyroïdienne *TTF-1*, *TTF-2* et *Pax-8* n'a été publiée jusqu'à maintenant, bien que le rôle crucial du gène *Hoxa3* au cours du développement de la glande thyroïde soit connu (voir la section 1.2.2.2). Enfin, des expériences d'hybridation *in situ* réalisées dans notre laboratoire ont permis de mettre en évidence une interaction indirecte entre les gènes *Hoxa5* et *TTF-1* au niveau des poumons (Aubin et al., 1997).

L'activation de la transcription des gènes codant pour la thyroglobuline et la thyroperoxydase nécessite également, du moins *in vitro*, la présence du facteur TTF-2. En effet, plusieurs études utilisant des essais de protection à la DNase et de cotransfection dans des cellules FRTL-5 ont mis en évidence des interactions entre le facteur TTF-2 et les gènes *Tg* et *TPO* (Civitareale et al., 1989; Sinclair et al., 1990; Francis-Lang et al., 1992; Ortiz et al., 1999). Les travaux de Ortiz et al. (1997 et 1999) indiquent que l'expression du facteur TTF-2 est placée sous le contrôle hormonal de la TSH, de l'AMP cyclique et de l'insuline. TTF-2 est d'ailleurs le principal médiateur de la régulation du gène *TPO* par ces hormones. L'analyse du profil d'expression de *TTF-2* montre cependant que ce gène n'est plus détecté au niveau de la glande thyroïde vers le jour 15 de gestation, au moment même où les gènes *Tg* et *TPO* commencent à s'exprimer. Ces observations suggèrent que le rôle du facteur TTF-2 serait de bloquer l'activation de ces gènes par les facteurs TTF-1 et PAX-8 jusqu'à ce que la glande thyroïde ait atteint sa position définitive dans la gorge, vers le jour 14 de gestation (Zannini et al. 1997). Des essais de cotransfection dans des cellules HeLa ont

d'ailleurs montré que TTF-2 pouvait interférer avec l'activation de la transcription des gènes *Tg* et *TPO* par les facteurs TTF-1 et PAX-8 (Zannini et al., 1997). Le rôle du facteur TTF-2 en tant que régulateur négatif de l'expression des gènes *Tg* et *TPO* est cependant remis en cause par les résultats obtenus au cours de la présente étude (section 3.5.2).

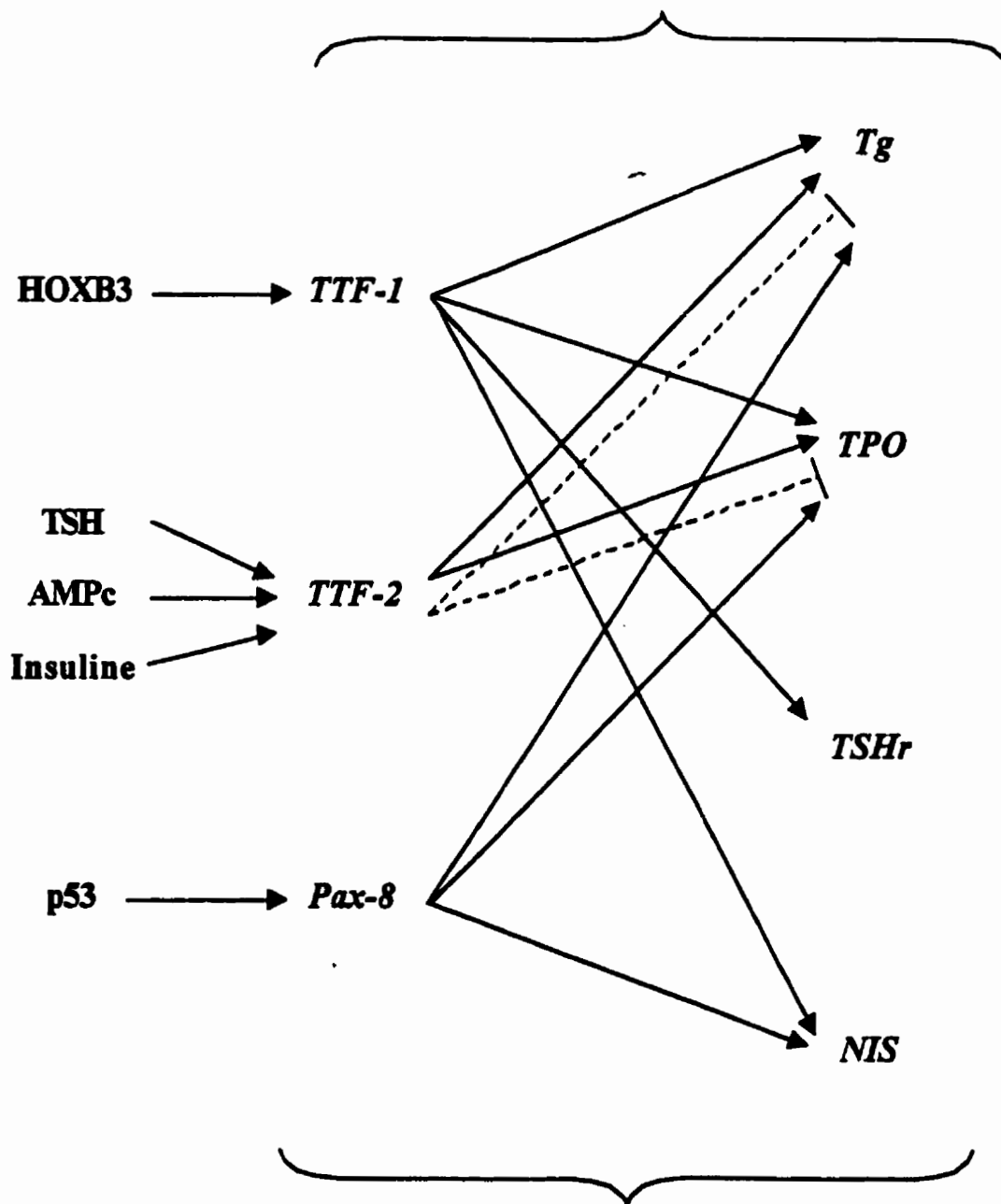
Enfin, d'autres études utilisant des essais de protection à la DNase et de cotransfection dans des cellules FRTL-5 ou HeLa ont démontré le rôle du facteur PAX-8 dans l'activation de la transcription des gènes codant pour la thyroglobuline, la thyroperoxydase et le symporteur Na^+/I^- (Zannini et al., 1992; Fabbro et al., 1998; Ohno et al., 1999). Le rôle de la protéine PAX-8 humaine dans l'activation du gène *TPO* a également été montré par des expériences de cotransfection dans des cellules Cos-7 (Esposito et al., 1998). La perte d'expression du gène *Pax-8* entraînée par la mutation du gène *p53* a été rapportée; l'expression des gènes *TTF-1* et *TTF-2* n'est toutefois pas affectée par cette mutation (Battista et al., 1995; Missero et al., 1998).

L'effet de la thyrotrophine (TSH) sur l'expression des divers gènes impliqués dans la fonction thyroïdienne a également été étudié. La liaison de cette hormone à son récepteur (TSHr) à la surface des thyrocytes active l'expression des gènes *Tg*, *TPO*, *TSHr* et *NIS*, augmentant ainsi la production des hormones thyroïdiennes. TSH exerce son action en modulant l'expression et l'activité des facteurs de transcription TTF-1, TTF-2 et PAX-8 (Suzuki et al., 1998b). Les travaux de Suzuki et al. (1998b) suggèrent cependant que l'accumulation de thyroglobuline dans le lumen des follicules thyroïdiens exercerait un effet rétro-inhibiteur sur la synthèse et la sécrétion des hormones thyroïdiennes. En effet, l'ajout de quantités physiologiques de thyroglobuline exogène à des cellules FRTL-5 entraîne une diminution des niveaux d'expression des gènes régulateurs *TTF-1*, *TTF-2* et *Pax-8* et des gènes fonctionnels *Tg*, *TPO*, *TSHr* et *NIS*. De plus, des expériences de mobilité électrophorétique montrent que l'ajout de thyroglobuline exogène aux cellules FRTL-5 empêche la liaison des facteurs TTF-1, TTF-2 et PAX-8 au promoteur du gène *Tg*. Enfin, des expériences de transfection transitoire dans des cellules FRTL-5 montrent que l'ajout de thyroglobuline exogène diminue l'activité des promoteurs des gènes *Tg*, *TPO* et *TSHr*. Ces résultats suggèrent que l'accumulation de thyroglobuline dans le lumen des follicules thyroïdiens exercerait un effet rétro-inhibiteur au niveau de la transcription des gènes impliqués dans la régulation et la fonction thyroïdiennes.

Figure 1.4 Interactions moléculaires impliquées dans le développement et la fonction de la glande thyroïde.

Un certain nombre de gènes régulateurs et fonctionnels sont connus pour s'exprimer au niveau de la glande thyroïde au cours du développement. Les gènes *TTF-1*, *TTF-2* et *Pax-8* codent pour des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la transcription des gènes *Tg*, *TPO*, *TSHr* et *NIS*. Les flèches représentent des interactions positives alors que les traits indiquent des interactions négatives. Les traits pleins indiquent les interactions moléculaires identifiées *in vitro*; les traits pointillés indiquent les interactions moléculaires démontrées *in vivo*.

Thyroglobuline : Effet rétro-inhibiteur global



TSH : Effet positif global

1.7 Le gène *Hoxa5*

1.7.1 Caractéristiques

Les recherches en cours dans le laboratoire portent sur la fonction et la régulation du gène *Hoxa5*, qui code pour un facteur de transcription essentiel à la régulation du développement normal de l'embryon. Ce gène fait partie du complexe *HoxA* situé sur le chromosome 6 de la souris (Figure 1.1). Comme le montre la Figure 1.5, il est constitué de deux exons séparés par un intron de 960 pb et la séquence de la boîte homéo se retrouve au début du deuxième exon du gène. Des travaux réalisés dans le laboratoire ont permis d'identifier quatre transcrits de 1.8, 4.9, 9.5 et 11 kb contenant les séquences du gène *Hoxa5* (Figure 1.5; Jeannotte et al., 1993). Le transcrit de 1.8 kb est le plus abondant et il correspond aux deux exons du gène (Zakany et al., 1988). Ce transcrit code pour la protéine HOXA5, une phosphoprotéine nucléaire de 270 acides aminés qui se lie à l'ADN au niveau de la séquence consensus TAAT (Odenwald et al., 1989; Pellerin et al., 1994). Les trois plus longs transcrits (4.9, 9.5 et 11 kb) contiennent aussi les séquences des deux exons du gène, mais ils s'étendent en amont du site d'initiation de la transcription du transcrit de 1.8 kb jusque dans les séquences codantes du gène *Hoxa6* (Zakany et al., 1988; C. Larochelle et L. Jeannotte, données non publiées). Ces données indiquent qu'il existe au moins deux promoteurs impliqués dans la transcription du gène *Hoxa5*. Aucun rôle protéique n'a cependant encore été attribué aux transcrits de 4.9, 9.5 et 11 kb.

1.7.2 Profil d'expression

L'expression du gène *Hoxa5* chez la souris commence au moment de la gastrulation, vers le huitième jour de gestation, et se poursuit jusqu'à l'âge adulte. Suivant la règle de colinéarité, l'expression de ce gène situé au centre du complexe *HoxA* est détectée principalement au niveau du tronc. En effet, le gène *Hoxa5* s'exprime, entre autres, dans le système nerveux central, avec une frontière antérieure au niveau du plancher du myélocéphale, dans la colonne prévertébrale jusqu'à la prévertèbre 3 qui donnera naissance à la troisième vertèbre cervicale chez l'adulte, dans la ceinture scapulaire, dans les bourgeons de membres et dans le mésenchyme de divers organes dont les poumons, la trachée, le larynx, l'estomac, les intestins et les reins (Dony et Gruss, 1987; Gaunt et al, 1988; Aubin et al., 1997; 1998; 1999).

Bien que le profil d'expression du gène *Hoxa5* ait été obtenu à l'aide de sondes reconnaissant les quatre transcrits du gène, il est en grande partie spécifique au transcrit de 1.8 kb. Des expériences d'hybridation *in situ* réalisées dans le laboratoire ont en effet montré que le profil d'expression des trois longs transcrits du gène *Hoxa5* est plus restreint que celui du court transcrit (Aubin et al., 1998). La première sonde utilisée lors de ces expériences correspond aux séquences 3'-non traduites du deuxième exon du gène *Hoxa5* et reconnaît les quatre transcrits (sonde pLJ34; Figure 1.5), alors que la seconde sonde correspond à des séquences situées entre les gènes *Hoxa5* et *Hoxa6* et reconnaît uniquement les trois longs transcrits (sonde pLJ36; Figure 1.5). À 12.5 jours de gestation, alors que le profil d'expression obtenu avec la sonde pLJ34 est identique à celui décrit précédemment, aucun signal n'est détecté avec la sonde pLJ36 dans la colonne prévertébrale au-delà de la dixième prévertèbre qui donnera naissance à la troisième vertèbre thoracique chez l'adulte, et dans le mésenchyme des poumons, de la trachée et du larynx. Ces résultats indiquent que seul le transcrit de 1.8 kb codant pour la protéine HOXA5 s'exprime dans la colonne prévertébrale entre les prévertèbres 3 et 10 ainsi que dans le mésenchyme des poumons, de la trachée et du larynx, ce qui suggère un rôle unique pour ce transcrit au cours du développement embryonnaire de la souris (Aubin et al., 1998).

1.7.3 Régulation

L'expression différentielle des transcrits du gène *Hoxa5* suggère l'existence de plusieurs éléments régulateurs permettant l'expression appropriée de ce gène au cours du développement embryonnaire de la souris. Des analyses de transgénèse utilisant le gène rapporteur *lacZ* réalisées chez la souris ont d'ailleurs permis d'identifier certaines régions d'ADN essentielles à l'expression spatio-temporelle spécifique du gène *Hoxa5* (Zakany et al., 1988; Tuggle et al., 1990; Larochelle et al., 1999; Nowling et al., 1999). Les travaux effectués par Zakany et al. (1988) ont montré qu'un fragment d'ADN génomique de 4.3 kb s'étendant 1.5 kb en amont et 2.9 kb en aval du site d'initiation de la transcription du transcrit de 1.8 kb pouvait diriger spécifiquement l'expression du gène *Hoxa5* dans la région brachiale du système nerveux central entre les jours 11 et 13 de gestation chez les embryons transgéniques (Zakany et al., 1988). L'analyse plus détaillée de ce fragment de 4.3 kb a ensuite permis d'identifier une séquence activatrice (*enhancer*) de 604 pb située 235 pb en amont du premier exon du gène *Hoxa5* et responsable de l'expression spécifique de ce gène dans la région brachiale du système nerveux central (Tuggle et al., 1990). Cette séquence

activatrice contient plusieurs sous-éléments nécessaires à l'expression spatiale spécifique du gène *Hoxa5* au niveau du système nerveux central (Nowling et al., 1999).

L'expression du gène *Hoxa5* au cours du développement ne se limite cependant pas à la région brachiale du système nerveux central (voir la section 1.7.2); il doit donc exister d'autres éléments régulateurs permettant l'expression spatio-temporelle appropriée de ce gène au cours du développement embryonnaire de la souris. Des analyses de transgénèse réalisées dans le laboratoire (Larochelle et al., 1999) ont permis d'identifier un fragment génomique de 11.1 kb capable de reproduire le profil d'expression temporel et de reconstituer en grande partie le profil d'expression spatial du transcrit de 1.8 kb. Ce fragment s'étend 3.8 kb en amont et 7.3 kb en aval du site d'initiation de la transcription du transcrit de 1.8 kb et englobe donc les quatre transcrits du gène *Hoxa5*. De plus, un fragment génomique de 2.1 kb permettant l'expression du gène *Hoxa5* dans les dérivés mésodermiques de la région cervicale a été identifié en aval des séquences codantes du gène (de +2.9 à +5.0 kb). Ces résultats indiquent que différents éléments de régulation du gène *Hoxa5* agissant en *cis* se retrouvent en amont et en aval des séquences codantes du gène (Larochelle et al., 1999).

1.7.4 Fonction

Afin de mieux comprendre le rôle joué par le gène *Hoxa5* au cours du développement embryonnaire, une lignée de souris ne possédant pas la fonction *Hoxa5* a été générée en inactivant ce gène par recombinaison homologue dans des cellules embryonnaires souches (Jeannotte et al., 1991; 1993). L'analyse des souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5* montre que la viabilité de ces souris est grandement réduite et varie selon l'environnement génétique. En effet, le taux de mortalité à la naissance est de 50% chez les souris provenant d'un environnement génétique mixte ainsi que chez les souris de la souche 129/SvEv, et de plus de 90% chez les souris de la souche C57BL/6 (Jeannotte et al., 1993; Aubin et al., 1998). Ces résultats suggèrent la présence de gènes modificateurs influençant la pénétrance des phénotypes observés chez les souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5*.

En plus de réduire la viabilité des souris homozygotes mutantes, l'absence de la fonction *Hoxa5* entraîne l'apparition de plusieurs phénotypes dans les régions ou les structures

exprimant ce gène au cours du développement. En effet, tel que mentionné à la section 1.2.2.1, des transformations homéotiques importantes sont observées dans la région cervicothoracique du squelette chez les souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5* (Jeannotte et al., 1993; Aubin et al., 1998). Au niveau du squelette axial on note, entre autres, la postériorisation de la vertèbre cervicale C7 en vertèbre thoracique T1 et l'antériorisation de la vertèbre cervicale C6 en C5. La pénétrance de ces deux phénotypes est très forte peu importe l'environnement génétique. Il est intéressant de noter que la région couverte par les différentes transformations homéotiques observées chez les souris homozygotes mutantes (C3 à T2) correspond au domaine antérieur d'expression du transcrit de 1.8 kb au niveau du squelette axial, ce qui suggère un rôle particulier pour ce transcrit dans la spécification du squelette axial. L'absence de la fonction *Hoxa5* affecte également le développement de l'acromion au niveau du squelette appendiculaire.

Plusieurs études réalisées dans le laboratoire ont également mis en évidence le rôle du gène *Hoxa5* au cours de l'organogénèse des systèmes respiratoire et digestif (Aubin et al., 1997; J. Aubin et L. Jeannotte, données non publiées). Des malformations importantes au niveau des voies respiratoires sont en effet observées chez les souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5* (Aubin et al., 1997). On note, entre autres, une désorganisation de la trachée, une morphogénèse anormale des poumons et une diminution de l'expression des protéines de surfactants. Ces anomalies entraînent une obstruction de la trachée ainsi qu'une détresse respiratoire et sont donc responsables du taux de mortalité périnatale élevé observé chez les souris homozygotes mutantes. De plus, l'absence de la fonction *Hoxa5* affecte l'expression des gènes *TTF-1*, *HNF-3 β* et *N-myc*, qui sont importants pour le développement et la fonction pulmonaires, au niveau de l'épithélium des poumons. Puisque le gène *Hoxa5* s'exprime au niveau du mésenchyme de la trachée et des poumons, il exerce probablement son action sur l'expression des gènes *TTF-1*, *HNF-3 β* et *N-myc* via des interactions mésenchyme-épithélium (Aubin et al., 1997).

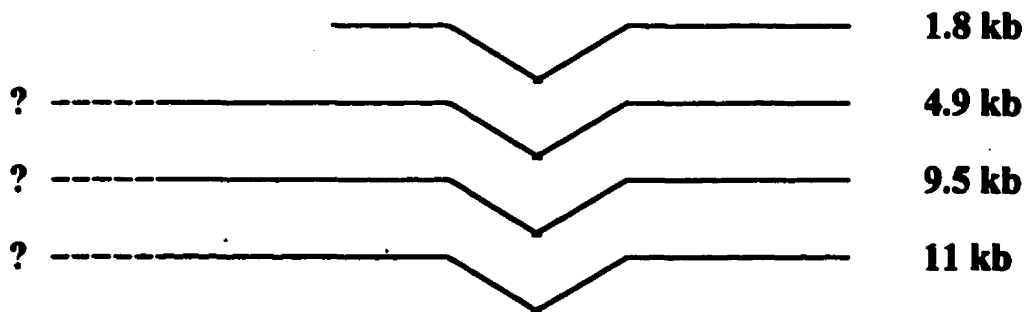
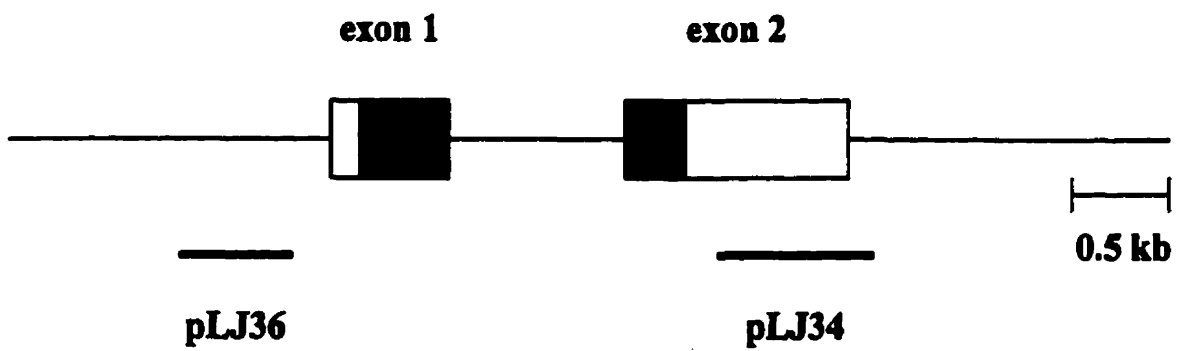
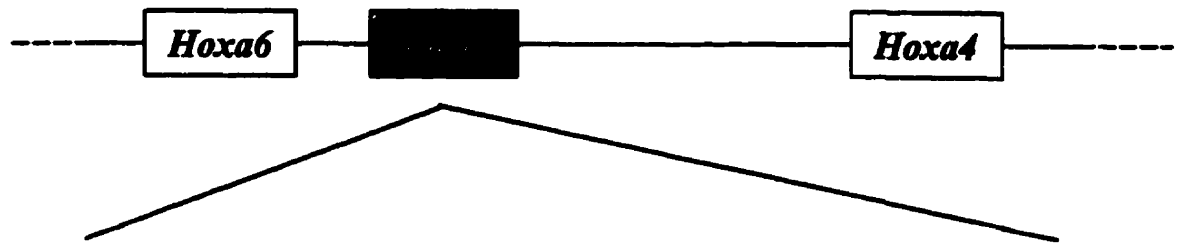
L'absence de la fonction *Hoxa5* perturbe également la maturation morphologique et fonctionnelle du système digestif. Le développement de l'estomac et du petit intestin est en effet perturbé chez les souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5* (Aubin et al., 1999; J. Aubin et L. Jeannotte, données non publiées). Au niveau de l'estomac on note, entre autres, un amincissement important de la muqueuse épithéliale et une hypertrophie de la sous-muqueuse, une augmentation du nombre de cellules productrices de mucus et une

diminution de l'apoptose et de la prolifération. On remarque également, au moment du sevrage (jour 15) et chez les souris adultes, une diminution du nombre de cellules zymogéniques produisant les enzymes digestives et de faibles niveaux de pepsine dans l'estomac. De plus, l'absence de la fonction *Hoxa5* affecte, au niveau de l'estomac, l'expression des gènes *sonic hedgehog (Shh)*, *BMP-4*, *TGF- β 1* et *TGF- β 3*, qui codent tous pour des molécules de signalisation (J. Aubin et L. Jeannotte, données non publiés). Parallèlement, bien que la morphogenèse du petit intestin ne soit pas affectée chez les souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5*, l'acquisition du mode de nutrition adulte au moment du sevrage est retardée. En effet, de faibles niveaux de sucrase, de tréhalase et de maltase sont mesurés chez ces souris quinze jours après la naissance, alors que les niveaux de lactase demeurent élevés, une situation à l'opposé de ce qui est observé chez les souris de type sauvage au même stade (Aubin et al., 1999). Compte tenu du profil d'expression mésenchymal du gène *Hoxa5* au niveau du système digestif et de l'altération de la spécification des cellules épithéliales de l'estomac et du petit intestin observée chez les souris homozygotes mutantes, il est possible que le gène *Hoxa5* exerce son action sur le développement de l'estomac et du petit intestin via des interactions mésenchyme-épithélium.

L'analyse détaillée des phénotypes observés chez les souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5* a donc permis de montrer que ce gène est essentiel à la spécification du squelette et à l'organogenèse. De plus, des observations qualitatives faites dans le laboratoire ont mis en évidence que, dans les environnements génétiques purs 129/SvEv et C57BL/6, les souris homozygotes mutantes qui survivent présentent un retard dans l'ouverture des yeux et sont plus petites que les souris de type sauvage au cours des premières semaines après la naissance.

Figure 1.5 Organisation du gène *Hoxa5* de la souris.

Le gène *Hoxa5* est constitué de deux exons séparés par un intron de 960 pb. La séquence de la boîte homéo se retrouve au début du deuxième exon du gène (boîte noire). Quatre transcrits de 1.8, 4.9, 9.5 et 11 kb sont issus de la transcription du gène *Hoxa5*. Le transcrit de 1.8 kb est le plus abondant et il correspond aux deux exons du gène. Les transcrits de 4.9, 9.5 et 11 kb contiennent aussi les séquences des deux exons du gène *Hoxa5*, mais ils s'étendent en amont du site d'initiation de la transcription du transcrit de 1.8 kb, jusque dans les séquences codantes du gène *Hoxa6* (C. Larochelle et L. Jeannotte, données non publiées). Les sondes pLJ34 et pLJ36 utilisées lors des hybridations *in situ* sont représentées par des traits. La sonde pLJ34, qui correspond aux séquences 3'-non traduites du deuxième exon du gène *Hoxa5*, reconnaît les quatre transcrits. La sonde pLJ36, qui correspond à des séquences situées entre les gènes *Hoxa5* et *Hoxa6*, reconnaît uniquement les trois longs transcrits. Les boîtes blanches représentent les séquences transcrites des deux exons déjà caractérisés, alors que les boîtes grises correspondent aux séquences traduites encodant la protéine HOXA5. La flèche 5' → 3' indique le sens de la transcription du gène *Hoxa5*.



1.8 Objectifs du projet de recherche

Les phénotypes post-natals de retard de croissance et de délai dans l'ouverture des yeux observés chez les souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5* sont caractéristiques d'un dysfonctionnement de la glande thyroïde. En effet, des phénotypes similaires sont observés chez les souris *hyt/hyt* souffrant d'hypothyroïdie congénitale ainsi que chez les souris TG66-19 présentant une déficience en T₄ (Beamer et al., 1981; Adams et al. 1989; Wallace et al., 1995).

L'objectif du projet de recherche était donc d'étudier les conséquences de l'absence du gène *Hoxa5* sur le développement et la fonction de la glande thyroïde chez les souris de la souche 129/SvEv. Dans un premier temps, les phénotypes post-natals ont été quantifiés afin de confirmer les observations qualitatives faites précédemment. Les niveaux sériques de T₄ et de TSH ont ensuite été analysés afin de déterminer si les souris homozygotes mutantes présentaient les symptômes les plus courants associés à l'hypothyroïdie, soit de faibles niveaux sériques de T₄ accompagnés de niveaux élevés de TSH. Par la suite, des analyses histologiques et immunohistochimiques ont permis de vérifier si l'organisation structurale et fonctionnelle de la glande thyroïde était affectée par l'absence de la fonction *Hoxa5*. Finalement, l'expression des divers gènes impliqués dans la régulation et la fonction thyroïdiennes a été étudiée par hybridation *in situ* à différents stades du développement embryonnaire. Cette analyse avait pour objectif de déterminer si le profil d'expression spatio-temporel et/ou le niveau d'expression de ces gènes étaient modifiés chez les souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5*.

Les résultats obtenus au cours de la présente étude montrent que le gène *Hoxa5* est nécessaire à la morphogenèse de la glande thyroïde, soulignant ainsi l'importance de ce gène dans le développement des organes glandulaires.

Chapitre 2

Matériel et Méthodes

2.1 Croisements, prélèvements et génotypes des souris

2.1.1 Croisements

Les souris utilisées pour les croisements sont de souche 129/SvEv, une lignée congénique pure obtenue à la suite de multiples rétrocroisements (au moins jusqu'à la douzième génération). L'établissement de la mutation *Hoxa5* dans l'environnement génétique 129/SvEv a été décrit par Aubin et al. (1998). Des croisements entre des souris hétérozygotes pour la fonction *Hoxa5* (+/- × +/-) sont effectués afin d'obtenir, au sein d'une même portée, des individus de type sauvage, hétérozygotes et homozygotes mutants, selon le modèle de transmission mendélienne (+/+, +/-, -/- : ratio 1, 2, 1). Compte tenu du taux de mortalité élevé observé chez les souris homozygotes mutantes à la naissance (voir la section 1.7.3), des croisements entre des souris hétérozygotes et homozygotes mutantes (+/- × -/-) sont également effectués afin d'obtenir un plus grand nombre de souris homozygotes mutantes (+/-, -/- : ratio 1, 1). Le jour 0.5 de gestation correspond au matin où le bouchon vaginal est détecté chez la femelle.

2.1.2 Prélèvements et préparation des tissus

Afin d'étudier le développement de la glande thyroïde, des spécimens de type sauvage et homozygotes mutants pour la fonction *Hoxa5* sont prélevés à différents stades embryonnaires (E9.5 à E18.5) et post-natals (J0, J6, J17 et J30). Les femelles gestantes sont sacrifiées par dislocation cervicale et disséquées afin de récupérer les embryons. Les animaux aux stades post-natals sont sacrifiés par dislocation cervicale ou par décapitation. Selon le stade du développement, l'embryon entier (E9.5 à E12.5), la région cervicale (E13.5 à E18.5) ou uniquement la glande thyroïde (J0, J6, J17 et J30) sont prélevés. Les dissections s'effectuent dans du PBS 1X froid à pH 7,4 (130 mM NaCl, 7 mM Na₂HPO₄, 3 mM NaH₂PO₄). Les spécimens sont ensuite fixés à 4°C pendant une nuit dans une solution de paraformaldéhyde 4% préparée dans du PBS 1X. Après la fixation, les spécimens sont lavés successivement dans du PBS 1X, de la saline 0,85% et un mélange saline:éthanol (1:1) à 4°C pendant 30 minutes. Ils sont ensuite déshydratés dans des solutions d'éthanol de concentrations croissantes (70%, 85%, 95%, 100%) pendant 30 minutes. Un passage dans une solution éthanol:toluène (1:1) suivi de deux passages dans du toluène pur sont effectués avant d'imprégner les spécimens dans quatre bains successifs de paraffine à 60°C en vue de l'enrobage final. Des coupes histologiques de quatre micromètres (4 µm) sont réalisées et les sections sont montées sur des lames préalablement traitées au TESPA (3-aminopropyl-triéthoxysilane) selon la méthode décrite par Jaffe et al. (1990).

2.1.3 Génotypes

Le génotype de chaque spécimen est déterminé par analyse de type Southern. Lors des dissections, le sac vitellin (E9.5 à E15.5) ou un bout de queue (E16.5 à E18.5 et stades post-natals) sont prélevés et conservés dans un tampon d'extraction (100 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0,2% SDS). L'ADN génomique est extrait des tissus par un traitement à la protéinase K (0,2 µg/µL) pendant une nuit à 55°C. L'ADN est ensuite précipité en présence de 300 mM d'acétate de sodium et de deux volumes d'éthanol 95%. Après centrifugation, le culot d'ADN est lavé à l'éthanol 70% puis resuspendu dans du TE à pH 8,0 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA). L'ADN génomique est digéré en présence de 40 unités de l'enzyme *EcoRI* pendant une nuit à 37°C. Après la digestion, l'ADN génomique est séparé par électrophorèse sur gel d'agarose 1% à 40 volts pendant 16 heures. Une fragmentation supplémentaire de l'ADN est ensuite effectuée en exposant le gel aux rayons

UV pendant cinq minutes; ce traitement facilite le transfert de l'ADN à la membrane. L'ADN contenu dans le gel est dénaturé dans une solution contenant 0,2 M NaOH et 1,5 M NaCl, puis est finalement transféré par capillarité sur une membrane de nylon (Hybond-NX, Amersham Life Science) pendant une nuit à l'aide d'une solution 10X SSC (1,5 M NaCl, 150 mM citrate de sodium). Après le transfert, l'ADN est fixé de façon covalente à la membrane par un traitement aux rayons UV (Stratalinker).

La préhybridation des membranes s'effectue à 65°C pendant au moins trois heures dans une solution contenant 5X SSC, 5X Denhardt's et 0,5% SDS. La sonde d'ADN marquée au dCTP[³²P] est ensuite ajoutée à la solution de préhybridation (0,5 à 2 x 10⁶ cpm de sonde par mL de solution) et l'hybridation s'effectue à 65°C pendant une nuit. La sonde d'ADN est synthétisée à partir d'un fragment *BglII-XhoI* de 603 pb correspondant aux séquences intergéniques séparant les gènes *Hoxa5* et *Hoxa6* de souris (sonde pLJ36). Le marquage au dCTP[³²P] est réalisé par la technique de multi-amorçage aléatoire en utilisant le kit de synthèse de la compagnie Pharmacia Biotech (No. cat. 27-9250-01). Après l'hybridation, deux lavages dans du 2X SSC pendant 5 minutes à la température de la pièce, suivis d'un lavage dans une solution contenant 2X SSC et 0,5% SDS pendant 30 minutes à 65°C, puis d'un rinçage dans du 2X SSC permettent d'éliminer l'excédent de sonde, évitant ainsi les signaux non spécifiques. La membrane est finalement exposée en présence d'un film à rayons X (X-OMAT AR, Kodak, No. cat. 165 1454) dans une cassette contenant deux écrans amplificateurs de 16 à 24 heures à -80°C. La taille des fragments attendus pour chaque allèle est de 3 kb pour l'allèle sauvage et de 4 kb pour l'allèle mutant.

2.2 Quantification des phénotypes post-natals

2.2.1 Courbes de croissance

Des souris de type sauvage, hétérozygotes et homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5* sont pesées quotidiennement à l'aide d'une balance digitale pendant les quatre premières semaines après la naissance (J0 à J28). Par la suite, les souris sont pesées de façon hebdomadaire jusqu'à la douzième semaine (J84).

2.2.2 Ouverture des yeux et élévation des oreilles

L'âge d'ouverture des yeux et l'âge d'élévation des oreilles des souris de type sauvage, hétérozygotes et homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5* sont déterminés par des observations quotidiennes.

2.2.3 Réflexes neuromoteurs

L'état des réflexes neuromoteurs des souris de type sauvage, hétérozygotes et homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5* est évalué à l'aide des tests décrits par Adams et al. (1989). Ces tests sont réalisés entre les jours 3 et 15 après la naissance. Dans le premier test, appelé *surface righting*, les souriceaux sont placés sur le dos et doivent se retourner sur leurs quatre pattes. Dans le second test, appelé *negative geotaxis*, les souriceaux sont placés tête vers le bas sur un plan incliné de 25° et doivent effectuer une rotation de 180° afin de se retrouver la tête vers le haut. Dans le troisième test, appelé *cliff avoidance*, les souriceaux sont placés sur une plate-forme surélevée avec la tête et les pattes avant dépassant l'extrémité de la plate-forme et doivent se rétracter complètement. Tous les tests sont effectués en triplicata et le temps requis pour réussir chacun des tests est noté.

2.3 Dosage des niveaux sériques des hormones T₄ et TSH

Des souris de type sauvage et homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5* sont décapitées à différents stades post-natals (J0, J6, J15, J17, J30 et adulte) et le sang est récolté à partir des artères carotides. Les échantillons sanguins ainsi prélevés sont laissés à la température de la pièce pendant 10 minutes afin de permettre au sang de coaguler, puis ils sont centrifugés afin de séparer le sérum des cellules sanguines. Le sérum est conservé à -80°C jusqu'au moment des essais.

2.3.1 Niveaux sériques de l'hormone T₄

Pour les stades post-natals J0, J6, J17 et J30, les niveaux sérique de T₄ sont mesurés par des essais radio-immunologiques à l'aide du kit ImmuChem T₄[¹²⁵I] RIA de la compagnie ICN Biomedicals (T₄[¹²⁵I], No. cat. 06B-263673; tubes recouverts d'anticorps anti-T₄, No.

cat. 07-290110; standards T₄, No. cat. 07-290130). Le protocole utilisé est celui décrit dans le manuel d'instructions fourni par la compagnie. En résumé, 10 µL de sérum et 1 mL de traceur T₄[¹²⁵I] sont incubés ensemble à 37°C pendant 60 minutes dans des tubes recouverts d'anticorps anti-T₄. Pendant l'incubation, la T₄ sérique et la T₄ radioactive compétitionnent pour se lier aux anticorps anti-T₄ fixés à la paroi des tubes. Après l'incubation, le liquide est enlevé par aspiration et la radioactivité fixée aux tubes est mesurée à l'aide d'un compteur gamma. La quantité de T₄ radioactive fixée aux tubes est inversement proportionnelle à la quantité de T₄ sérique. La concentration exacte de T₄ sérique est déterminée à l'aide d'une courbe standard. Les essais sont effectués en duplicata lorsqu'une quantité suffisante de sérum est disponible.

Les niveaux sériques de T₄ chez les souris adultes sont mesurés par des essais fluoro-immunologiques à l'aide du kit DELFIA[®] Neonatal Thyroxine (T₄) de la compagnie Wallac Oy (No. cat. A065-110). Ces dosages sont effectués au Département de Médecine Génétique du Centre Hospitalier de l'Université Laval (CHUL).

2.3.2 Niveaux sériques de l'hormone TSH

Les niveaux sériques de TSH sont mesurés aux stades post-natals J15 et J17. Ces dosages sont effectués par la compagnie Anilytics Inc. (Gaithersburg, Maryland).

2.4 Analyses histologiques et immunohistochimiques

2.4.1 Analyses histologiques

Des sections de la glande thyroïde d'embryons et de souris de type sauvage et homozygotes mutants pour la fonction *Hoxa5* sont colorées avec de l'hématoxyline de Mayer et de l'éosine ou avec de l'acide périodique de Schiff (PAS) afin de mettre en évidence les structures anatomiques.

2.4.1.1 Coloration à l'hématoxyline de Mayer et à l'éosine

L'hématoxyline de Mayer colore le noyau des cellules en bleu alors que l'éosine colore le cytoplasme en rose.

Les sections sont déparaffinées par deux passages de 10 minutes dans le xylène, hydratées dans des solutions d'éthanol de concentrations décroissantes puis colorées avec 0,2% d'hématoxyline de Mayer (10 minutes). Les sections sont rincées rapidement dans l'eau et l'éthanol 50% puis trempées dans une solution d'éthanol 70% contenant de l'hydroxyde d'ammonium (30 secondes). Les sections sont ensuite rincées rapidement dans l'éthanol 70% et 95%, colorées avec 0,3% d'éosine en solution dans l'éthanol 95%, puis rincées rapidement dans l'éthanol 95%. Les lames sont finalement trempées dans deux bains de xylène avant le montage final.

2.4.1.2 Coloration à l'acide périodique de Schiff

L'acide périodique de Schiff (PAS) colore les structures contenant des glycoprotéines en rose-mauve. La contre-coloration à l'hématoxyline de Mayer permet de colorer les noyaux en bleu. Au niveau de la glande thyroïde, le PAS réagit avec la thyroglobuline contenue dans les follicules thyroïdiens et colore donc le colloïde en rose-mauve.

Les sections sont déparaffinées par deux passages de 10 minutes dans le xylène, hydratées dans des solutions d'éthanol de concentrations décroissantes puis incubées à 37° pendant 30 minutes en présence de 0,5% de diastase de Malt dans un tampon à pH 6,0 (1,35 M NaCl, 20 mM Na₂HPO₄, 165 mM NaH₂PO₄). Les sections sont rincées à l'eau courante puis oxydées avec 0,5% d'acide périodique (5 minutes). Les sections sont ensuite rincées rapidement dans l'eau courante puis trempées dans le réactif de Schiff (15 minutes; Sigma, No. cat. S-5133). Après un rinçage dans l'eau courante (10 minutes), les sections sont colorées avec de l'hématoxyline de Mayer (4 minutes), puis rincées à l'eau courante (15 minutes). Les sections sont finalement déshydratées dans des solutions d'éthanol de concentrations croissantes et trempées dans deux bains de xylène avant le montage final.

2.4.1.3 Dénombrement des follicules thyroïdiens ne contenant pas de colloïde

Le dénombrement des follicules thyroïdiens remplis, partiellement remplis ou vides de colloïde est effectué à partir des sections de la glande thyroïde colorées au PAS. Tous les follicules retrouvés dans les deux lobes thyroïdiens sont comptés au microscope à un grossissement de 200X.

2.4.1.4 Mesure du diamètre des follicules thyroïdiens

Le diamètre des follicules thyroïdiens est mesuré à partir des sections de la glande thyroïde colorées au PAS. Les mesures sont effectuées à l'aide du logiciel Bioquant System IV (R. & M Biometrics, Nashville, Tennessee).

2.4.2 Analyses immunohistochimiques

Des sections de la glande thyroïde d'embryons et de souris de type sauvage et homozygotes mutants pour la fonction *Hoxa5* sont hybridées avec différents anticorps afin de détecter la présence de certaines protéines associées à la glande thyroïde. Les anticorps utilisés sont les suivants: un anticorps polyclonal contre la thyroglobuline humaine (DAKO, No. cat. A0251), un anticorps polyclonal contre la calcitonine humaine (DAKO, No. cat. A576) et un anticorps polyclonal contre la thyroxine (*anti-thyroxine BSA serum*, ICN Biomedicals, No. cat. 65850). Tous ces anticorps sont produits chez le lapin.

Les sections sont déparaffinées par trois passages de 10 minutes dans le xylène, hydratées dans des solutions d'éthanol de concentrations décroissantes, lavées dans du PBS 1X à pH 7,0 (75 mM NaCl, 55 mM Na₂HPO₄, 12 mM NaH₂PO₄) et traitées avec 3% de peroxyde d'hydrogène afin d'inhiber l'activité endogène de la peroxydase (5 minutes). Les sections sont ensuite rincées dans du PBS 1X et bloquées avec 10% de sérum de chèvre dans du PBS 1X (20 minutes). Cette étape ainsi que les suivantes se font à la température de la pièce et en atmosphère humide. L'excès de sérum bloquant est enlevé et les sections sont incubées en présence de l'anticorps primaire dilué dans du PBS 1X contenant 2% de sérum de chèvre (60 minutes). Les dilutions des anticorps primaires sont les suivantes: 1/200 pour l'anticorps anti-calcitonine et 1/500 pour les anticorps anti-thyroglobuline et anti-thyroxine. Les

sections sont ensuite rincées dans du PBS 1X et incubées en présence de l'anticorps secondaire, un anticorps biotiné de chèvre dirigé contre les immunoglobulines G de lapin (*biotinylated goat anti-rabbit IgG*, Vector Laboratories, No. cat. BA-1000) dilué 1/200 dans du PBS 1X contenant 2% de sérum de chèvre (30 minutes). Les sections sont rincées dans du PBS 1X et incubées en présence d'un complexe avidine-péroxydase biotinée (45 minutes; *avidin DH-biotinylated horseradish peroxidase H complex*, Vector Laboratories, Vectastain Elite ABC). Les sections sont rincées dans du PBS 1X puis l'antigène est révélé grâce à une solution de diaminobenzidine (DAB; 0,2 mg/mL dans du PBS 1X) contenant 0,0075% de peroxyde d'hydrogène jusqu'à l'obtention de l'intensité désirée (habituellement 15 à 20 minutes). Les sections sont finalement rincées à l'eau, contre-colorées avec de l'hématoxyline de Mayer, trempées dans deux bains de xylène puis montées.

2.5 Hybridation *in situ*

Afin de déterminer les conséquences de l'absence de la fonction *Hoxa5* sur l'expression des divers gènes impliqués dans le développement et la fonction de la glande thyroïde, des expériences d'hybridation *in situ* sont réalisées sur des sections de la glande thyroïde d'embryons de type sauvage et homozygotes mutants pour la fonction *Hoxa5*. Cette technique permet de localiser l'ARN messager d'un gène dans les tissus où ce gène s'exprime grâce à l'utilisation d'une sonde d'ARN antisens radioactive. En effet, le duplex ainsi formé est détectable au microscope en champ noir grâce à la présence de points luminescents correspondant aux grains d'argent de l'émulsion photographique qui précipitent au contact de la radioactivité (voir la section 2.5.2 pour plus de détails).

2.5.1 Synthèse des sondes d'ARN

La synthèse des sondes d'ARN antisens marquées à l'UTP[³⁵S] est réalisée selon la méthode décrite par Sambrook, Fritsch et Maniatis (1989). Les fragments d'ADN utilisés pour la synthèse des sondes sont présentés au Tableau 2.1. Les sondes *TTF-1*, *TTF-2*, *Pax-8*, *Tg*, *TPO* et *TSHr* proviennent du laboratoire du Dr. Roberto Di Lauro; la sonde *Hoxa3* provient du laboratoire du Dr. Pascal Dollé.

Tableau 2.1 Description des fragments d'ADN servant à la synthèse des sondes d'ARN antisens utilisées lors des expériences d'hybridation *in situ*.

La sonde pLJ34 reconnaît les quatre transcrits du gène *Hoxa5* (1.8, 4.9, 9.5 et 11 kb) alors que la sonde pLJ36 reconnaît uniquement les trois plus longs transcrits de ce gène; ces deux sondes proviennent de notre laboratoire. Les sondes *TTF-1*, *TTF-2*, *Pax-8*, *Tg*, *TPO* et *TSHr* proviennent du laboratoire du Dr. Roberto Di Lauro; la sonde *Hoxa3* provient du laboratoire du Dr. Pascal Dollé.

Sonde	Description	Référence
pLJ34	Fragment <i>Bgl</i> III- <i>Hind</i> III de 850 pb contenant la région 3'-non traduite du deuxième exon du gène <i>Hoxa5</i> de souris	Jeannotte et al., 1993
pLJ36	Fragment <i>Bgl</i> III- <i>Xho</i> I de 603 pb correspondant à des séquences intergéniques séparant les gènes <i>Hoxa5</i> et <i>Hoxa6</i> de souris	Aubin et al., 1998
<i>TTF-1</i>	Fragment de 528 pb contenant la région 3'-non traduite du gène <i>TTF-1</i> de souris	Roberto Di Lauro
<i>TTF-2</i>	Fragment de 800 pb contenant la région 3'-non traduite du gène <i>TTF-2</i> de souris	Roberto Di Lauro
<i>Pax-8</i>	Fragment de 300 pb provenant d'une région en aval de la boîte "paired" du gène <i>Pax-8</i> de souris	Zannini et al., 1992
<i>Tg</i>	Fragment de 689 pb issu de l'extrémité 3' du gène <i>Tg</i> de rat	Lazzaro et al., 1991
<i>TPO</i>	Fragment de 490 pb provenant de l'extrémité 5' codante du gène <i>TPO</i> de rat	Lazzaro et al., 1991
<i>TSHr</i>	Fragment de 278 pb provenant de la région codante du gène <i>TSHr</i> de rat	Lazzaro et al., 1991
<i>Hoxa3</i>	Fragment de 600 pb contenant le premier exon et la boîte homéo du gène <i>Hoxa3</i> de souris	Gaunt et al., 1986

2.5.2 Hybridation *in situ*

Le protocole utilisé pour les hybridations *in situ* est basé essentiellement sur celui décrit par Jaffe et al. (1990). En résumé, les sections sont déparaffinées dans le xylène, hydratées dans des solutions d'éthanol de concentrations décroissantes, lavées dans des solutions de saline 0,85% et de PBS 1X (130 mM NaCl, 7 mM Na₂HPO₄, 3 mM NaH₂PO₄) puis fixées dans une solution de paraformaldéhyde 4%. Un traitement à la protéinase K (20 µg/mL) permet de rendre les structures plus accessibles à la sonde d'ARN. Après une seconde fixation dans la paraformaldéhyde 4%, les sections sont trempées dans une solution fraîche de triéthanolamine 0,1 M contenant de l'acétique anhydre. Cette étape permet d'éliminer les groupements aminés chargés positivement qui pourraient réagir de façon non spécifique avec la sonde. Les sections sont finalement rincées dans du PBS 1X et de la saline 0,85% puis déshydratées dans des solutions d'éthanol de concentrations croissantes.

La préhybridation s'effectue en présence de 50% de formamide à la température de la pièce pendant deux à quatre heures. La sonde d'ARN est ensuite ajoutée sur les lames (environ 7,5 x 10⁶ cpm de sonde par lame) et l'hybridation s'effectue à 53°C pendant une nuit en présence de 50% de formamide. Après l'hybridation, différents lavages sont réalisés afin d'éliminer l'excédent de sonde: un lavage dans une solution 5X SSC/10 mM DTT (60 minutes à 53°C), un lavage dans une solution 50% formamide/2X SSC/20 mM DTT (45 minutes à 65°C) et trois lavages dans une solution 0,5 M NaCl/10 mM Tris-HCl/5mM EDTA (10 minutes à 37°C). Un traitement à la RNase A (20 µg/mL dans la solution NaCl/Tris-HCl/EDTA) est ensuite effectué (30 minutes à 37°C). Les sections sont rincées dans la solution NaCl/Tris-HCl/EDTA (15 minutes à 37°C), dans la solution formamide/SSC/DTT (30 minutes à 65°C) puis dans des solutions de 2X SSC et de 0,1X SSC (15 minutes à la température de la pièce). Les sections sont finalement déshydratées dans des solutions d'éthanol de concentrations croissantes contenant 300 mM d'acétate de sodium, puis exposées en présence d'un film à rayons X (X-OMAT AR, Kodak, No. cat. 165 1454) pendant une nuit afin d'estimer l'intensité du signal d'hybridation. Les lames sont ensuite enduites d'émulsion photographique (NTB-2, Kodak, No.cat. 165 4433) et conservées à 4°C jusqu'au moment du développement. Le temps d'exposition est déterminé en fonction de l'intensité du signal détecté sur l'autoradiogramme; selon les sondes, il peut varier de quelques heures à quelques semaines.

Afin de révéler le signal, les lames sont développées dans une solution de D19 (Kodak, No. cat. 146 4593) et fixées dans une solution contenant un durcisseur (Kodak, No.cat. 146 4106). Les coupes sont ensuite colorées avec une solution de toluidine 0,02% afin de mettre en évidence les structures anatomiques. Le signal d'hybridation est détecté grâce aux points luminescents formés par les grains d'argent de l'émulsion photographique qui précipitent au contact de la radioactivité. Ces points luminescents sont facilement observables au microscope en champ noir. Toutes les observations sont faites avec un microscope Eclipse E800 (Nikon). Les photographies sont prises à l'aide d'une caméra digitale 3CCD MTI.

2.5.3 Dénombrement des grains d'argent par cellule

Afin de déterminer si l'absence de la fonction *Hoxa5* affecte les niveaux d'expression des divers gènes impliqués dans le développement et la fonction de la glande thyroïde, un dénombrement des grains d'argent par cellule est effectué. Différentes aires des deux lobes de la glande thyroïde sont analysées au microscope à un grossissement de 600X.

2.6 Analyses statistiques

Une analyse de variance (ANOVA) en mesures répétées avec deux critères de classification (génotype et sexe) est utilisée pour comparer les courbes de croissance des souris de type sauvage, hétérozygotes et homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5* (section 3.1.1). Cette analyse tient compte de la dépendance temporelle qui existe entre les données provenant d'une même souris (analyse auto-régressive d'ordre 1). Une analyse utilisant la distribution de Poisson permet de comparer l'âge d'ouverture des yeux et d'élévation des oreilles des souris en fonction du génotype (section 3.1.2). Ces analyses sont réalisées par le Service de Consultation Statistique de l'Université Laval à l'aide du logiciel SAS. Toutes les autres analyses statistiques sont effectuées à l'aide du logiciel InStat (GraphPad) et impliquent des tests de Student et des analyses ANOVA standard. Les tests de Student sont utilisés pour comparer, en fonction du génotype, les niveaux sériques des hormones T₄ et TSH (section 3.2) ainsi que le diamètre des follicules thyroïdiens et la proportion des follicules thyroïdiens ne contenant pas de colloïde (section 3.4.1). Les analyses ANOVA sont utilisées afin de comparer les niveaux d'expression des gènes impliqués dans la

régulation et la fonction thyroïdienne (dénombrement des grains d'argent par cellule, sections 3.5.2 et 3.5.3).

Chapitre 3

Résultats

L'objectif du projet de recherche était d'étudier les conséquences de l'absence du gène *Hoxa5* sur le développement et la fonction de la glande thyroïde chez la souris. Dans cette optique, de nombreuses analyses phénotypiques, sérologiques, histologiques et immunohistochimiques ont été réalisées. De plus, l'expression des divers gènes impliqués dans la régulation et la fonction thyroïdiennes a été étudiée par hybridation *in situ* afin de déterminer si l'absence de la fonction *Hoxa5* affectait l'expression de ces gènes. Pour des fins de comparaison, toutes les analyses ont été effectuées à la fois chez des souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5* et chez des souris de type sauvage issues de l'environnement génétique pur 129/SvEv.

3.1 Quantification des phénotypes post-natals

Chez la souris, l'hypothyroïdie s'accompagne souvent d'un retard de croissance, d'un délai dans l'ouverture des yeux et l'élévation des oreilles et d'un ralentissement des réflexes neuromoteurs. Ces phénotypes post-natals se retrouvent notamment chez les souris *hyt/hyt*

souffrant d'hypothyroïdie congénitale (Beamer et al., 1981; Adams et al., 1989) ainsi que chez les souris transgéniques TG66-19 présentant une déficience en T_4 (Wallace et al., 1995). Le retard de croissance et le délai dans l'ouverture des yeux observés chez les souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5* sont donc des phénotypes associés à l'hypothyroïdie chez la souris. Afin de mettre en lumière l'effet de l'absence de la fonction *Hoxa5* sur le développement post-natal des souris homozygotes mutantes, la caractérisation de ces différents phénotypes a été entreprise.

3.1.1 Courbes de croissance

Afin de quantifier le retard de croissance observé chez les souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5*, les souriceaux issus de croisements entre des souris hétérozygotes (+/- × +/-) et entre des souris hétérozygotes et homozygotes mutantes (+/- × -/-) pour la fonction *Hoxa5* ont été pesés quotidiennement pendant les quatre premières semaines après la naissance (J0 à J28) puis de façon hebdomadaire jusqu'à la douzième semaine (J84). Les données recueillies ont servi à tracer les courbes de croissance des souris de type sauvage, hétérozygotes et homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5* (Figure 3.1). Les croisements +/- × -/- réalisés afin d'obtenir un plus grand nombre de souris homozygotes mutantes augmentent aussi le nombre de souris hétérozygotes (Figure 3.1, 3.2 et 3.3).

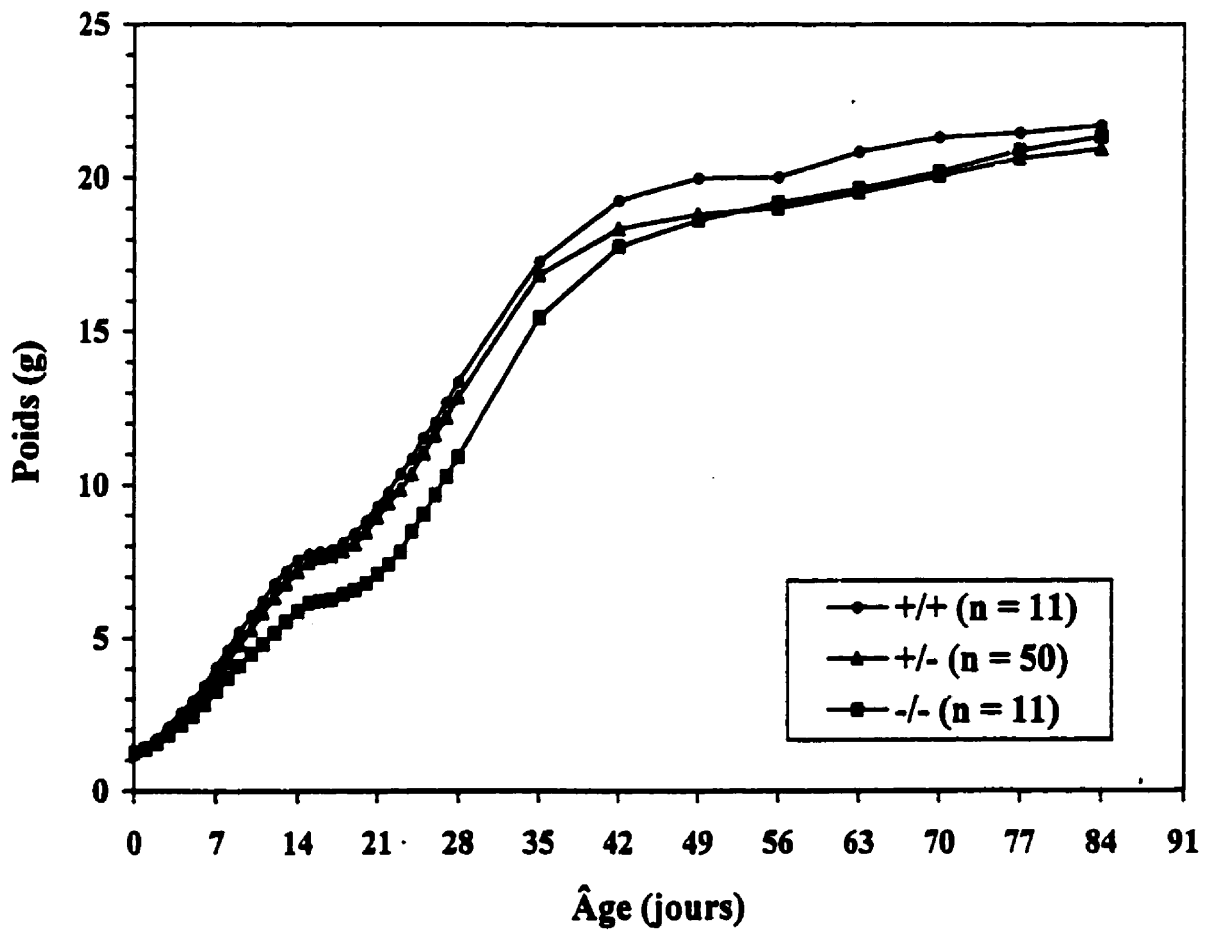
La Figure 3.1 montre clairement que les souris homozygotes mutantes souffrent d'un retard de croissance comparativement aux souris de type sauvage et hétérozygotes pour la fonction *Hoxa5*. Ce retard est particulièrement évident pendant les troisième, quatrième et cinquième semaines après la naissance (de J14 à J35). L'analyse réalisée par le Service de Consultation Statistique de l'Université Laval confirme d'ailleurs que la croissance des souris homozygotes mutantes est retardée de façon significative entre les jours 13 et 35 après la naissance ($p < 0,05$). Au jour 13, le poids des souris homozygotes mutantes est de 23% inférieur à celui des souris de type sauvage et de 18% inférieur à celui des souris hétérozygotes. Au jour 35, le retard de croissance est de 11% par rapport aux souris de type sauvage et de 8% par rapport aux souris hétérozygotes. Par la suite, les souris homozygotes mutantes retrouvent graduellement un poids moyen équivalent à celui des souris hétérozygotes et de type sauvage. Les différences de poids entre les souris des différents génotypes sont d'ailleurs de moins de 2% à la fin de l'étude (J84).

La Figure 3.1 permet également de constater que les courbes de croissance des souris hétérozygotes et de type sauvage se chevauchent de la naissance à la cinquième semaine (J35). L'écart qui apparaît par la suite n'est pas statistiquement significatif. En effet, l'analyse réalisée par le Service de Consultation Statistique révèle que la croissance des souris hétérozygotes n'est pas significativement différente de celle des souris de type sauvage au cours des douze premières semaines après la naissance ($p > 0,05$).

L'analyse statistique a également révélé que le sexe des souris n'influait pas les résultats de l'étude ($p > 0,05$). En effet, la différence de poids entre les souris mâles et femelles, tous génotypes confondus, est significative seulement à partir de la cinquième semaine après la naissance (J35) (résultats non présentés). Ceci coïncide avec le moment où l'écart entre les souris homozygotes mutantes et les souris hétérozygotes et de type sauvage devient non significatif. Les résultats présentés à la Figure 3.1 sont donc une compilation des données des souris mâles et femelles.

Figure 3.1 Courbes de croissance des souris de type sauvage (+/+), hétérozygotes (+/-) et homozygotes mutantes (-/-) pour la fonction *Hoxa5*.

Les souris ont été pesées quotidiennement pendant les quatre premières semaines après la naissance (J0 à J28), puis de façon hebdomadaire jusqu'à la douzième semaine (J84). Les données recueillies à la fois chez les mâles et les femelles ont été compilées afin de tracer les courbes de croissance présentées ici. La croissance des souris homozygotes mutantes est retardée de façon significative comparativement à celle des souris de type sauvage et hétérozygotes entre les jours 13 et 35 après la naissance ($p < 0,05$). Le nombre de souris analysées pour chacun des génotypes est indiqué entre parenthèses. g: grammes.



3.1.2 Ouverture des yeux et élévation des oreilles

L'âge d'ouverture des yeux et d'élévation des oreilles des souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5* a été déterminé par l'observation quotidienne de souriceaux issus de croisements entre des souris hétérozygotes (+/- × +/-) et entre des souris hétérozygotes et homozygotes mutantes (+/- × -/-) pour la fonction *Hoxa5*.

La Figure 3.2 permet de constater que l'ouverture des yeux des souris homozygotes mutantes est grandement retardée comparativement à celle des souris de type sauvage et hétérozygotes pour la fonction *Hoxa5*. En effet, alors que 80% des souris de type sauvage et 50% des souris hétérozygotes ont les yeux ouverts 12 jours après la naissance, il faut attendre au jour 16 avant que les premières souris homozygotes mutantes n'ouvrent les yeux. À ce stade, toutes les souris de type sauvage et 90% des souris hétérozygotes ont les yeux ouverts.

Comme le montre la Figure 3.2, toutes les souris de type sauvage ouvrent les yeux entre les jours 12 et 16 après la naissance; l'âge moyen d'ouverture des yeux chez ces souris est de $12,45 \pm 1,10$ jours. L'ouverture des yeux des souris hétérozygotes se produit entre les jours 11 et 20, l'âge moyen étant de $13,17 \pm 1,97$ jours. Enfin, les souris homozygotes mutantes ouvrent les yeux entre les jours 16 et 24 et l'âge moyen d'ouverture des yeux chez ces souris est de $19,00 \pm 2,29$ jours. L'ouverture des yeux des souris homozygotes mutantes est donc retardée de près de 7 jours comparativement à celle des souris de type sauvage et de près de 6 jours comparativement à celle des souris hétérozygotes. L'analyse effectuée par le Service de Consultation Statistique indique que ces différences sont extrêmement significatives ($p < 0,0001$). L'analyse statistique indique également qu'il n'y a pas de différence significative entre l'âge moyen d'ouverture des yeux des souris hétérozygotes et de type sauvage ($p > 0,05$).

La Figure 3.3 montre que l'élévation des oreilles des souris homozygotes mutantes est également retardée comparativement à celle des souris de type sauvage et hétérozygotes pour la fonction *Hoxa5*. En effet, alors que 95% des souris de type sauvage et 83% des souris hétérozygotes ont les oreilles élevées 16 jours après la naissance, seulement 24% des souris homozygotes mutantes sont dans cette situation. L'âge moyen d'élévation des oreilles est de $15,25 \pm 0,79$ jours pour les souris de type sauvage, de $15,80 \pm 0,91$ jours pour les

souris hétérozygotes et de $16,76 \pm 0,94$ jours pour les souris homozygotes mutantes. L'élévation des oreilles des souris homozygotes mutantes est donc retardée d'environ un jour et demi comparativement à celle des souris de type sauvage et d'un jour comparativement à celle des souris hétérozygotes. L'analyse statistique indique que ces différences sont extrêmement significatives ($p < 0,0001$). De plus, l'analyse statistique montre qu'il y a une différence significative entre l'âge moyen d'élévation des oreilles des souris hétérozygotes et de type sauvage ($p < 0,05$).

Figure 3.2 Âge d'ouverture des yeux des souris de type sauvage (+/+), hétérozygotes (+/-) et homozygotes mutantes (-/-) pour la fonction *Hoxa5*.

L'âge d'ouverture des yeux des souris a été déterminé par des observations quotidiennes. L'ouverture des yeux des souris homozygotes mutantes est retardée comparativement à celle des souris de type sauvage et hétérozygotes ($p < 0,0001$). Le nombre de souris analysées pour chacun des génotypes est indiqué entre parenthèses.

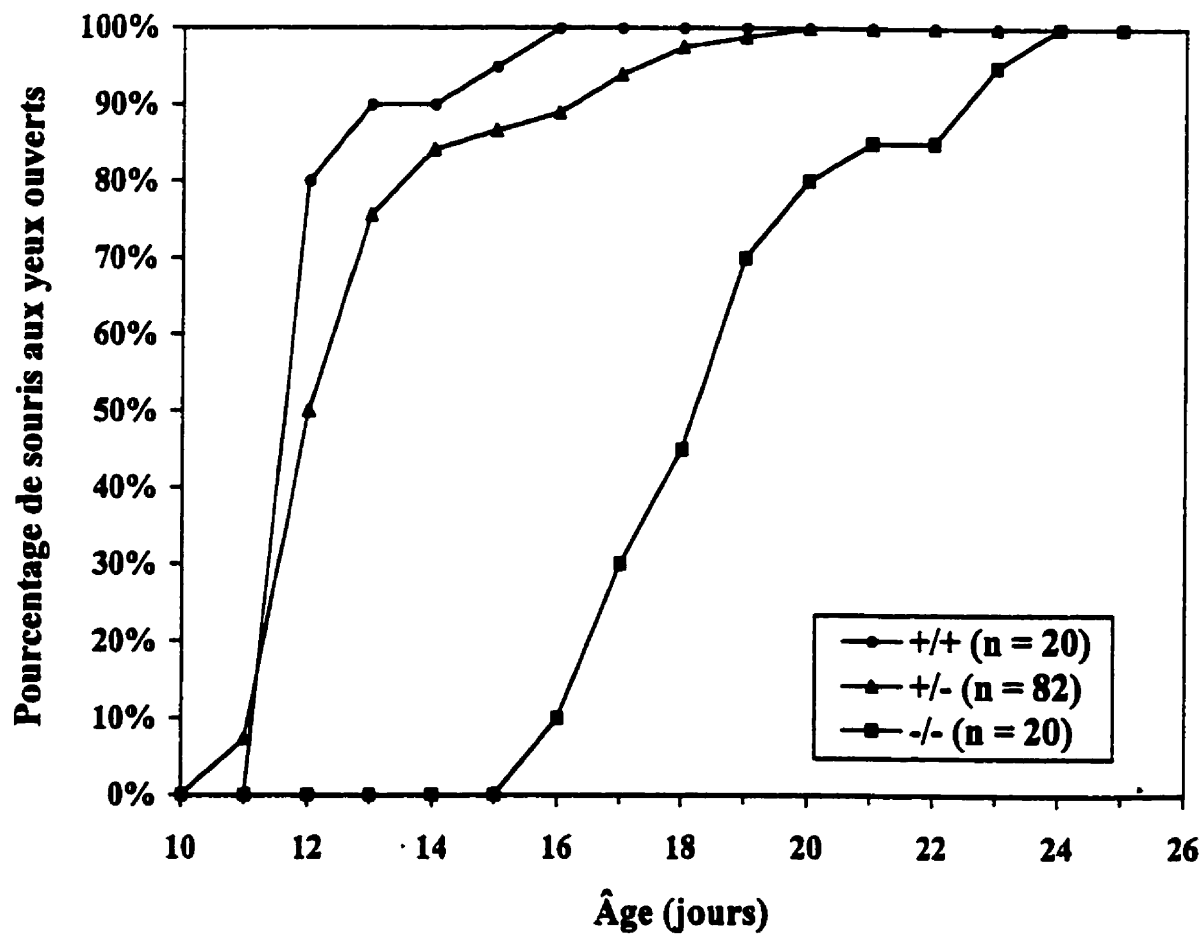
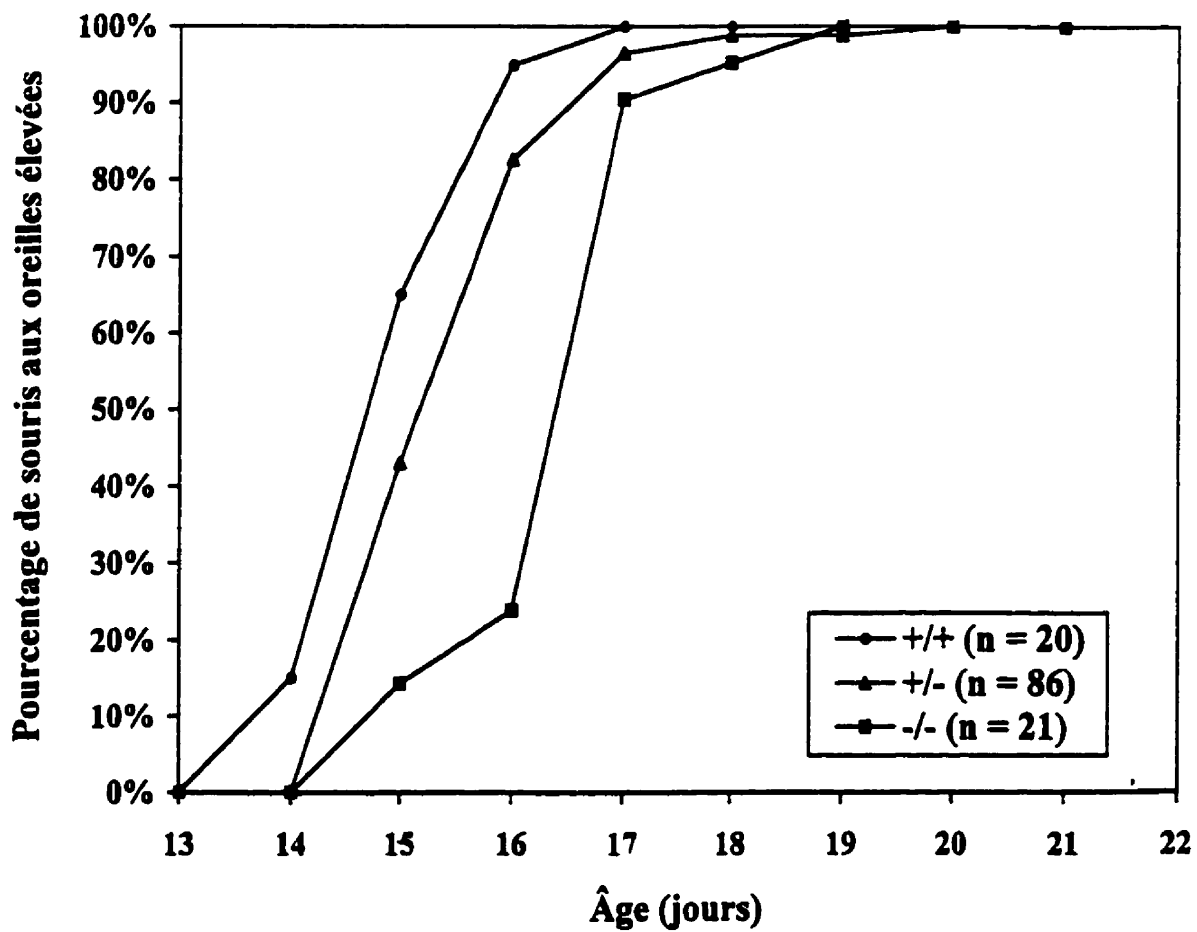


Figure 3.3 Âge d'élévation des oreilles des souris de type sauvage (+/+), hétérozygotes (+/-) et homozygotes mutantes (-/-) pour la fonction *Hoxa5*.

L'âge d'élévation des oreilles des souris a été déterminé par des observations quotidiennes. L'élévation des oreilles des souris homozygotes mutantes est retardée comparativement à celle des souris de type sauvage et hétérozygotes ($p < 0,0001$). L'élévation des oreilles des souris hétérozygotes est aussi retardée comparativement à celle des souris de type sauvage ($p < 0,05$). Le nombre de souris analysées pour chacun des génotypes est indiqué entre parenthèses.



3.1.3 Réflexes neuromoteurs

Tel que mentionné précédemment (section 1.4.3), les hormones thyroïdiennes sont essentielles au développement des systèmes nerveux et musculaire. Une déficience en T_4 et T_3 peut donc entraîner de graves retards neuromoteurs chez l'enfant. Un ralentissement des réflexes neuromoteurs est également observé chez les souris présentant une déficience en hormones thyroïdiennes (Adams et al., 1989; Wallace et al., 1995).

Il existe plusieurs tests permettant d'évaluer l'état des réflexes chez la souris. Certains de ces tests (*surface righting*, *negative geotaxis* et *cliff avoidance*) ont été utilisés par Adams et al. (1989) et Wallace et al. (1995) afin d'analyser les souris *hyt/hyt* et TG66-19. Les souris *hyt/hyt* mettent beaucoup plus de temps que les souris de type sauvage à réussir les tests *negative geotaxis* et *cliff avoidance*, mais elles réussissent très bien le test *surface righting* (Adams et al., 1989). Les souris transgéniques TG66-19, quant à elles, développent rapidement les réflexes nécessaires à la réalisation du test *cliff avoidance* mais pas ceux requis pour le test *surface righting* (Wallace et al., 1995); le test *negative geotaxis* n'a pas été utilisé chez ces souris.

Les tests *surface righting*, *negative geotaxis* et *cliff avoidance* ont aussi été utilisés pour évaluer les réflexes neuromoteurs des souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5*. Ces tests doivent normalement être réalisés dans un environnement contrôlé (température, éclairage, bruit, etc.) et dans des conditions très strictes afin d'obtenir des résultats reproductibles. Malheureusement, toutes ces conditions ne pouvaient être réunies lors des tests effectués chez les souris de type sauvage, hétérozygotes et homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5*. Les résultats obtenus sont donc extrêmement variables et non reproductibles. Il est par conséquent impossible de les analyser en termes statistiques afin d'effectuer des comparaisons entre les souris des différents génotypes. Les observations qualitatives faites au cours des tests montrent cependant que les souris homozygotes mutantes sont plus léthargiques que les souris hétérozygotes et de type sauvage pendant les premiers jours suivant la naissance.

L'absence de la fonction *Hoxa5* entraîne donc chez les souris homozygotes mutantes un retard de croissance ainsi qu'un délai dans l'ouverture des yeux et l'élévation des oreilles qui sont statistiquement significatifs. Ces phénotypes sont associés à une déficience en

hormones thyroïdiennes chez les souris *hyt/hyt* et TG66-19 (Beamer et al., 1981; Adams et al., 1989; Wallace et al., 1995), ce qui nous a amenés à supposer que les souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5* souffraient elles aussi d'hypothyroïdie. Afin de vérifier cette hypothèse, les niveaux sériques des hormones T₄ et TSH ont été mesurés chez les souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5*.

3.2 Dosage des niveaux sériques des hormones T₄ et TSH

Les dérèglements de la fonction thyroïdienne s'accompagnent généralement de niveaux anormaux d'hormones thyroïdiennes et de TSH. L'hyperthyroïdie est caractérisée par des niveaux sériques de T₄ et T₃ élevés et des niveaux sériques de TSH faibles, alors que l'hypothyroïdie est caractérisée par les symptômes inverses (Berne et Levy, 1988). Le syndrome de résistance aux hormones thyroïdiennes entraîne quant à lui une augmentation des niveaux sériques de T₄, T₃ et TSH (Retetoff et al., 1993). Chez les souris *hyt/hyt* qui souffrent d'hypothyroïdie congénitale, par exemple, les niveaux sérique de T₄ et T₃ comptent pour à peine un dixième des niveaux mesurés chez les souris de type sauvage et les niveaux sériques de TSH sont 30 fois plus élevés que chez les souris de type sauvage (Adams et al., 1989; Stein et al., 1989). Chez les souris homozygotes mutantes pour le gène *TRβ*, qui code pour les récepteurs nucléaires d'hormones thyroïdiennes TRβ1 et TRβ2, les niveaux sériques de T₄, T₃ et TSH sont trois à six fois plus élevés que chez les souris de type sauvage (Forrest et al., 1996; Gauthier et al., 1999). Afin de déterminer si l'absence du gène *Hoxa5* affectait la fonction thyroïdienne, les niveaux sériques des hormones T₄ et TSH ont été mesurés à différents stades post-natals chez des souris de type sauvage et homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5*.

Le Tableau 3.1A montre que les niveaux sériques de l'hormone T₄ sont normaux chez les souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5* aux jours 6, 17 et 30 après la naissance ainsi que chez les adultes. En effet, à ces stades les niveaux sériques de T₄ des souris homozygotes mutantes sont relativement comparables à ceux des souris de type sauvage; les tests de Student réalisés à l'aide du logiciel d'analyse statistique InStat confirment d'ailleurs ces résultats ($p > 0,05$ pour J6, J17, J30 et adultes). Les faibles niveaux sériques de T₄ mesurés chez les souris naissantes (J0) n'ont pas pu être analysés car ils se

situaient en dehors de la courbe standard utilisée pour déterminer la concentration exacte de T₄ sérique.

Le Tableau 3.1B présente les résultats obtenus lors des dosages de l'hormone TSH chez les souris de type sauvage et homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5*. Au jour 15 après la naissance, les niveaux sériques de TSH des souris homozygotes mutantes sont environ une fois et demie (43%) plus élevés que ceux des souris de type sauvage. Le test de Student réalisé à l'aide du logiciel InStat confirme que cette différence est statistiquement significative ($p < 0,05$). Deux jours plus tard (J17), les niveaux sériques de TSH des souris homozygotes mutantes sont légèrement plus faibles que ceux des souris de type sauvage. Cette diminution de 17% n'est cependant pas statistiquement significative ($p > 0,05$). Les résultats des dosages de l'hormone TSH chez les souris de 15 et 17 jours et de l'hormone T₄ chez les souris adultes ont été obtenus de Josée Aubin, une étudiante au doctorat dans le laboratoire.

Les niveaux sériques de l'hormone thyroïdienne T₄ sont donc normaux chez les souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5*, ce qui ne correspond pas à la définition de l'hypothyroïdie. Cependant, l'augmentation transitoire des niveaux de TSH observée au jour 15 après la naissance n'élimine pas la possibilité que les souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5* souffrent d'un dysfonctionnement temporaire de la glande thyroïde, qui serait suffisant pour induire les phénotypes post-natals de retard de croissance et de délai dans l'ouverture des yeux et l'élévation des oreilles observés chez ces souris. Il aurait toutefois été nécessaire de mesurer les niveaux sériques de TSH chez les souris homozygotes mutantes au jour 16 après la naissance afin de valider cette hypothèse. Il est également possible que ces phénotypes post-natals ne soient pas causés par un dysfonctionnement de la glande thyroïde, mais plutôt par la perte d'expression du gène *Hoxa5* au niveau des structures affectées chez les souris homozygotes mutantes (yeux, oreilles). Afin de vérifier cette hypothèse, le profil d'expression du gène *Hoxa5* au niveau des yeux et des oreilles a été analysé par hybridation *in situ*.

Tableau 3.1 Niveaux sériques des hormones T₄ et TSH chez des souris de type sauvage (+/+) et homozygotes mutantes (-/-) pour la fonction *Hoxa5*.

(A) Niveaux sériques de l'hormone T₄. Les niveaux sériques de T₄ sont normaux chez les souris homozygotes mutantes à tous les stades analysés ($p > 0,05$). (B) Niveaux sériques de l'hormone TSH. Les niveaux sériques de TSH sont légèrement augmentés chez les souris homozygotes mutantes 15 jours après la naissance ($p < 0,05$) et sont normaux 17 jours après la naissance ($p > 0,05$). Les valeurs présentées correspondent à la moyenne \pm l'écart-type. Le nombre de souris analysées pour chacun des génotypes est indiqué entre parenthèses. J: jour; sign.: significatif.

A

Niveaux sériques de T₄ (µg/dL)			
	+/+	-/-	Valeur p
J0	Entre 0 et 1 (n = 11)	Entre 0 et 1 (n = 11)	-----
J6	1,6 ± 0,2 (n = 11)	1,7 ± 0,2 (n = 8)	p = 0,36 (non sign.)
J17	3,1 ± 0,5 (n = 4)	4,6 ± 2,1 (n = 4)	p = 0,52 (non sign.)
J30	3,9 ± 0,9 (n = 4)	3,2 ± 0,6 (n = 4)	p = 0,23 (non sign.)
Adultes	4,0 ± 0,6 (n = 5)	3,9 ± 0,6 (n = 7)	p = 0,78 (non sign.)

B

Niveaux sériques de TSH (ng/mL)			
	+/+	-/-	Valeur p
J15	30 ± 7 (n = 5)	43 ± 6 (n = 3)	p = 0,03 (sign.)
J17	46 ± 9 (n = 5)	38 ± 13 (n = 4)	p = 0,27 (non sign.)

3.3 Analyse du profil d'expression du gène *Hoxa5* au niveau des yeux et des oreilles au cours du développement embryonnaire

Les retards d'ouverture des yeux et d'élévation des oreilles observés chez les souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5* sont caractéristiques d'un dysfonctionnement de la glande thyroïde, et plus particulièrement d'une déficience en hormones thyroïdiennes (Beamer et al., 1981; Adams et al., 1989; Wallace et al., 1995). Il est cependant possible que ces phénotypes soient liés de façon plus directe à l'absence de la fonction *Hoxa5*. En effet, si le gène *Hoxa5* s'exprime au niveau des yeux et des oreilles (ce qui n'a jamais été rapporté), son absence pourrait affecter le développement de ces organes chez les souris homozygotes mutantes. Afin de vérifier cette possibilité, le profil d'expression du gène *Hoxa5* au niveau des yeux et des oreilles a été analysé par hybridation *in situ* à l'aide de la sonde pLJ34, qui reconnaît les quatre transcrits du gène *Hoxa5* (voir les sections 1.7.2, 2.5.1 et 3.5.1).

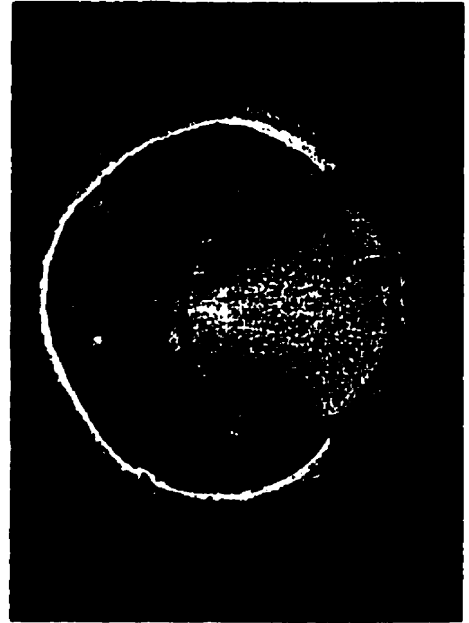
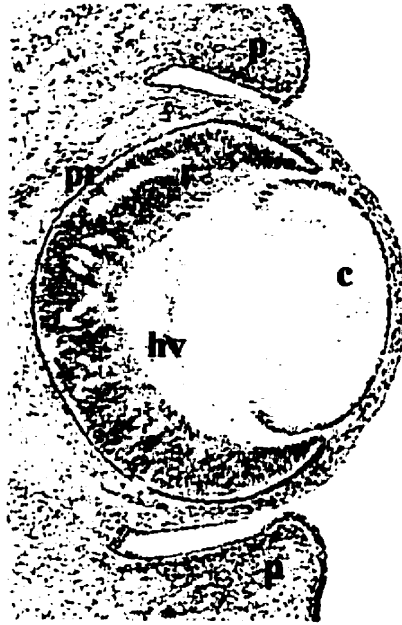
La Figure 3.4 montre que le gène *Hoxa5* ne s'exprime pas au niveau des yeux et des oreilles chez les embryons de type sauvage à 14.5 jours de gestation. Des résultats similaires sont obtenus aux stades E12.5 et E18.5 (résultats non présentés). L'expression du gène *Hoxa5* au niveau de ces structures n'est pas détectée non plus chez les embryons homozygotes mutants à 12.5 jours de gestation (résultats non présentés). Ces résultats éliminent donc la possibilité que les phénotypes de délai dans l'ouverture des yeux et l'élévation des oreilles observés chez les souris homozygotes mutantes soient causés directement par la perte d'expression du gène *Hoxa5* au niveau de ces structures. L'hypothèse la plus plausible permettant d'expliquer ces phénotypes post-natals demeure donc un dysfonctionnement temporaire de la glande thyroïde dû à l'absence de la fonction *Hoxa5*. Afin de déterminer les conséquences de l'absence du gène *Hoxa5* sur le développement et la fonction de la glande thyroïde, des analyses histologiques et immunohistochimiques de cet organe ont donc été entreprises.

Figure 3.4 Expression du gène *Hoxa5* au niveau des yeux et des oreilles chez un embryon de type sauvage à 14.5 jours de gestation.

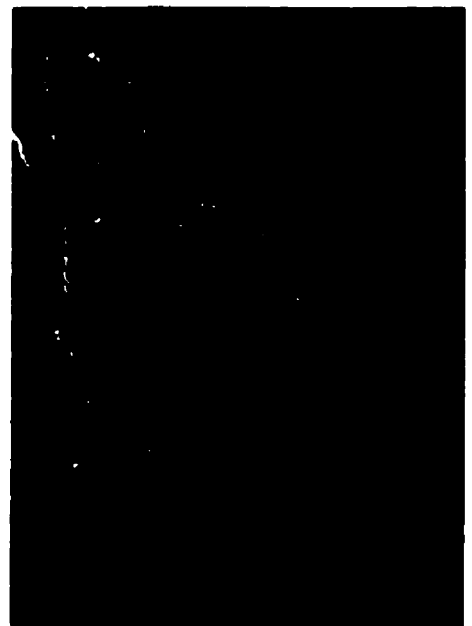
Des sections transverses des yeux et des oreilles d'un embryon de type sauvage de 14.5 jours de gestation ont été hybridées avec la sonde pLJ34 reconnaissant les quatre transcrits du gène *Hoxa5*. Le gène *Hoxa5* ne s'exprime pas au niveau des yeux et des oreilles à ce stade du développement embryonnaire. Le signal détecté au niveau de la couche pigmentaire de la rétine (pr) en champ noir est un artéfact dû à la réfringence des pigments. p: paupière; c: cristallin; hv: humeur vitreuse; pr: pigments rétiniens; r: rétine; o: oreille. Grossissement total: 100X.

Hoxa5
(pLJ34)

Oeil



Oreille



3.4 Analyses histologiques et immunohistochimiques de la glande thyroïde

Tel que mentionné à la section 1.3.2, la glande thyroïde est formée par la fusion de deux structures ayant des origines embryonnaires distinctes. Le diverticulum thyroïdien, qui donnera naissance aux thyrocytes, se forme vers le jour 9.5 de gestation chez la souris alors que les deux corps ultimobranchiaux, qui donneront naissance aux cellules C, se forment vers le jour 11.5 (Manley et Capecchi, 1998; Missero et al., 1998). Vers le jour 14 de gestation, ces deux types cellulaires fusionnent de façon à être entremêlés dans la glande thyroïde mature. Les premiers follicules thyroïdiens contenant du colloïde apparaissent vers le seizième jour de gestation, ce qui coïncide avec le début de la fonction thyroïdienne chez l'embryon, c'est-à-dire la production de thyroglobuline, de calcitonine et d'hormones thyroïdiennes (Fisher et Dussault, 1974).

Chez les souris *hyt/hyt*, le développement de la glande thyroïde est grandement affecté. En effet, une hypoplasie importante est observée au cours des derniers stades du développement embryonnaire ainsi que chez l'adulte. Plusieurs régions de la glande ne sont pas organisées en follicules et les follicules présents sont plus petits que ceux observés chez les souris de type sauvage (Beamer et al., 1981; Beamer et al., 1982; Stein et al., 1989). Un phénotype similaire est observé chez les souris homozygotes mutantes pour le gène *TR α* trois semaines après la naissance (Fraichard et al., 1997; Gauthier et al., 1999). La mutation du gène *TR β* et la double mutation des gènes *TR α* et *TR β* entraînent quant à elles une hyperplasie de la glande thyroïde chez les souris homozygotes mutantes (Forrest et al., 1996; Gauthier et al., 1999; Göthe et al., 1999). Enfin, chez les souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa3*, la migration des corps ultimobranchiaux est affectée et, chez certains individus, la fusion des cellules du diverticulum thyroïdien et des corps ultimobranchiaux ne se produit pas. De plus, chez ces souris, il y a peu de thyrocytes et de cellules C dans la glande thyroïde mature et les follicules sont désorganisés (Manley et Capecchi, 1995).

Afin de déterminer si l'absence de la fonction *Hoxa5* affectait la morphogenèse de la glande thyroïde, des analyses histologiques et immunohistochimiques ont été réalisées chez des embryons et des souris de type sauvage et homozygotes mutants pour la fonction *Hoxa5*.

3.4.1 Analyses histologiques

La Figure 3.5 montre l'organisation structurale de la glande thyroïde à différents stades du développement embryonnaire (Figure 3.5A) et post-natal (Figure 3.5B) chez des individus de type sauvage et homozygotes mutants pour la fonction *Hoxa5*. Les cellules formant le diverticulum thyroïdien sont présentes au niveau du plancher du pharynx dès le jour 9.5 de gestation, tant chez les embryons de type sauvage que chez les embryons homozygotes mutants; ces résultats sont présentés à la Figure 3.9 (section 3.5.2; hybridation *in situ* avec les sondes *TTF-1*, *TTF-2* et *Pax-8*). La Figure 3.5A permet de constater qu'au stade E12.5, la glande thyroïde est formée de deux petits lobes ressemblant à des rosettes et contenant uniquement des thyrocytes. À ce stade ainsi qu'à 14.5 jours de gestation (résultats non présentés), l'aspect de la glande thyroïde des embryons homozygotes mutants est comparable à celui des embryons de type sauvage.

Comme le montre la Figure 3.5A, les premiers follicules thyroïdiens apparaissent au jour 16.5 de gestation; ils sont détectés grâce à la coloration au PAS qui réagit avec la thyroglobuline contenue à l'intérieur des follicules et donne une coloration rose-mauve au colloïde (section 2.4.1.2). Bien que des petits follicules thyroïdiens remplis de colloïde soient présents tant chez les embryons de type sauvage que chez les embryons homozygotes mutants au stade E16.5, une légère désorganisation cellulaire est observée chez certains embryons homozygotes mutants. En effet, chez ces embryons, les thyrocytes entourant les follicules thyroïdiens ne sont pas disposés de façon aussi structurée que chez les embryons de type sauvage, et le colloïde semble plus diffus (Figure 3.5A).

Les anomalies les plus importantes sont cependant observées aux stades E17.5 et E18.5, alors qu'on constate la présence de plusieurs follicules ne contenant pas ou très peu de colloïde chez les embryons homozygotes mutants, une situation qui n'est observée que rarement chez les embryons de type sauvage (Figure 3.5A). De façon surprenante, on ne retrouve plus de follicules vides chez les nouveaux-nés homozygotes mutants un jour plus tard (J0, Figure 3.5B). La Figure 3.5B montre d'ailleurs que l'organisation structurale de la glande thyroïde des souris homozygotes mutantes est comparable à celle des souris de type sauvage tout au long du développement post-natal (J0, J6, J17 et J30).

Les résultats présentés au Tableau 3.2 indiquent qu'aux stades E16.5 et E17.5, bien que la proportion de follicules ne contenant pas ou très peu de colloïde chez les embryons homozygotes mutants soit plus faible que celle des embryons de type sauvage, les différences observées ne sont pas statistiquement significatives ($p > 0,05$). Cependant, à 17.5 jours de gestation, 5 des 10 embryons homozygotes mutants analysés possèdent de deux à trois fois plus de follicules vides ou partiellement remplis de colloïde que les embryons de type sauvage (E17.5, Figure 3.5A et résultats non présentés). Le Tableau 3.2 permet également de constater qu'au stade E18.5, la proportion de follicules ne contenant pas ou très peu de colloïde est environ trois fois plus élevée chez les embryons homozygotes mutants que chez les embryons de type sauvage; cette augmentation est statistiquement significative ($p < 0,05$).

Bien que plusieurs anomalies soient observées au niveau de la glande thyroïde chez les embryons homozygotes mutants aux stades E16.5, E17.5 et E18.5, le diamètre des follicules n'est pas affecté par l'absence de la fonction *Hoxa5* à ces stades. Le Tableau 3.3 montre en effet que, bien que le diamètre des follicules thyroïdiens présents chez les individus homozygotes mutants à ces stades embryonnaires ainsi qu'aux stades post-natals J0, J6 et J17 soit toujours inférieur à celui des follicules thyroïdiens retrouvés chez les embryons de type sauvage, les différences observées ne sont pas statistiquement significatives ($p > 0,05$). Une diminution significative du diamètre des follicules thyroïdiens est cependant observée 30 jours après la naissance chez les souris homozygotes mutantes (diminution de 15%, $p < 0,05$), bien que l'organisation structurale de la glande thyroïde ne semble pas affectée (Figure 3.5B).

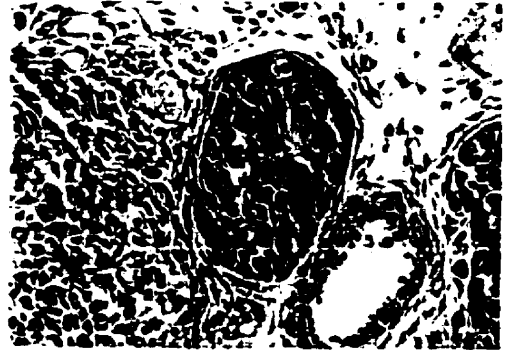
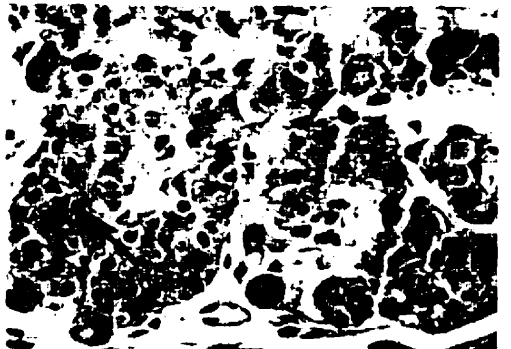
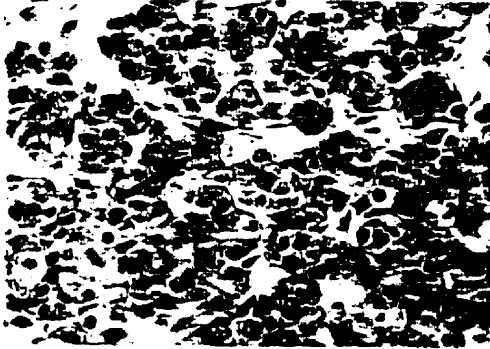
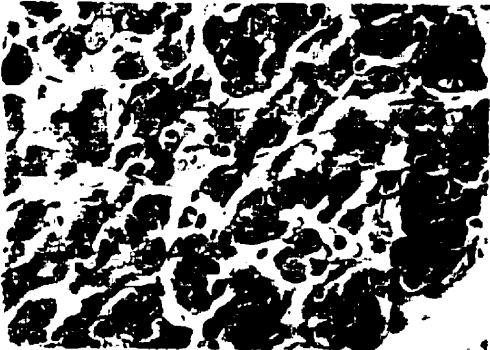
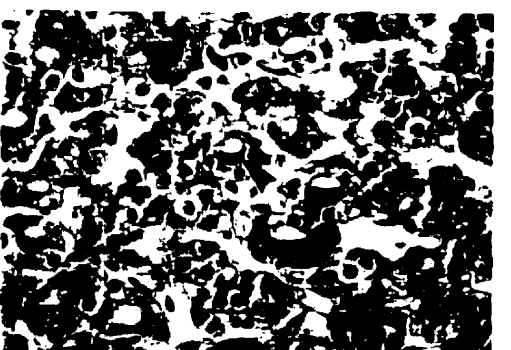
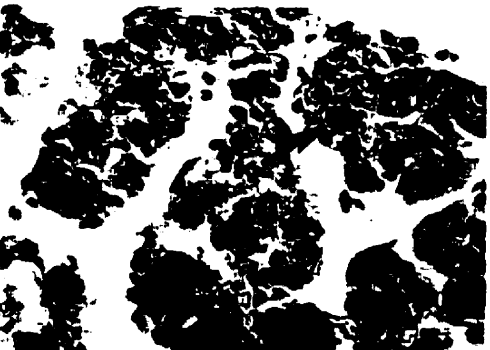
Figure 3.5 Analyse histologique de la glande thyroïde d'embryons et de souris de type sauvage (+/+) et homozygotes mutants (-/-) pour la fonction *Hoxa5*.

(A) Analyse histologique de la glande thyroïde au cours du développement embryonnaire de la souris (E12.5, E16.5, E17.5 et E18.5). Les premiers follicules thyroïdiens contenant du colloïde apparaissent au stade E16.5 chez les embryons de type sauvage et homozygotes mutants (flèches). Des zones de désorganisation cellulaire sont notées chez les embryons homozygotes mutants au stade E16.5 (tête de flèche) et des follicules ne contenant pas de colloïde sont observés chez ces embryons aux stades E17.5 et E18.5 (têtes de flèches). Aucune anomalie n'est détectée avant le stade E16.5. (B) Analyse histologique de la glande thyroïde au cours du développement post-natal de la souris (J0, J6, J17 et J30). L'organisation structurale de la glande thyroïde des souris homozygotes mutantes est normale tout au long du développement post-natal (J0, J6, J17 et J30) et plusieurs follicules contenant du colloïde sont observés chez les souris de type sauvage et homozygotes mutantes à ces stades. Les sections ont été colorées avec de l'hématoxyline de Mayer et de l'éosine (E12.5) ou avec de l'acide périodique de Schiff (E16.5, E17.5, E18.5, J0, J6, J17 et J30) afin de mettre en évidence les structures anatomiques. Le PAS colore le colloïde contenu à l'intérieur des follicules thyroïdiens en rose-mauve. Le nombre de souris analysées pour chacun des génotypes aux différents stades présentés est: E12.5: 3 +/+, 2 -/-; E16.5: 3 +/+, 7 -/-; E17.5: 5 +/+, 9 -/-; E18.5: 6 +/+, 8 -/-; J0: 10 +/+, 11 -/-; J6: 10 +/+, 6 -/-; J17: 4 +/+, 4 -/-; J30: 2 +/+, 4 -/-. Les spécimens présentés sur la figure sont représentatifs de l'ensemble des embryons analysés. t: glande thyroïde; E: embryonnaire; J: jour. Grossissement total: 400X (E12.5) et 600X (tous les autres stades).

A

+/+

-/-

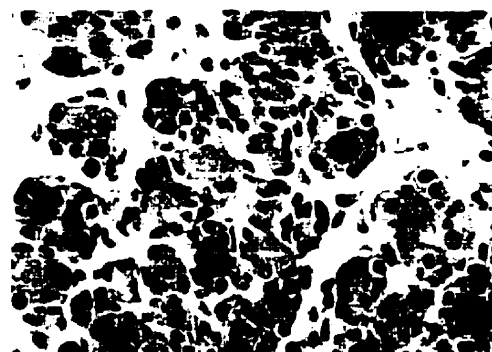
E12.5**E16.5****E17.5****E18.5**

B

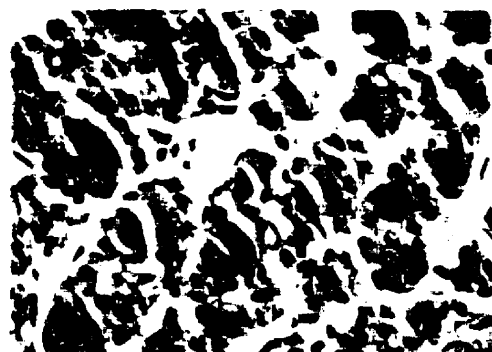
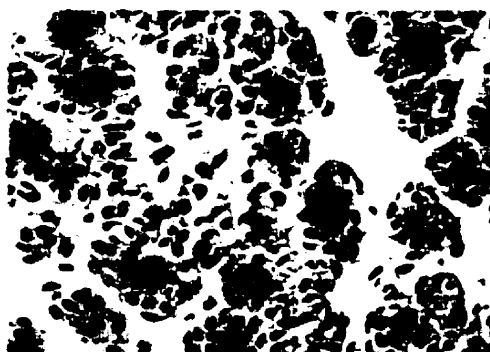
+/+

-/-

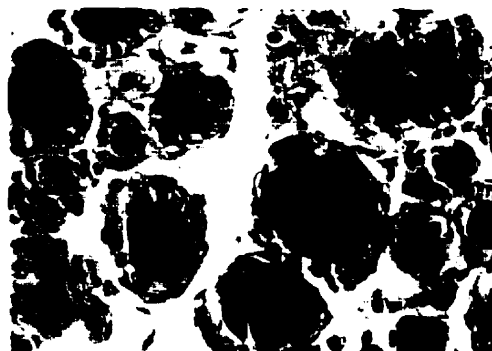
J0



J6



J17



J30

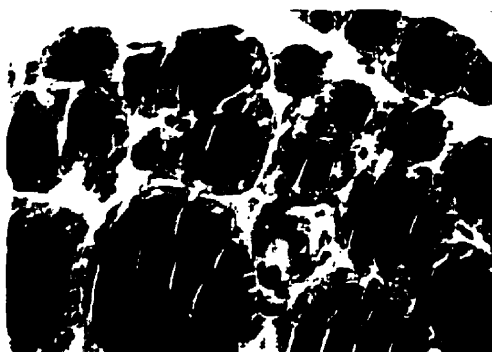


Tableau 3.2 Proportion des follicules thyroïdiens remplis, partiellement remplis ou vides de colloïde chez des embryons de type sauvage (+/+) et homozygotes mutants (-/-) pour la fonction *Hoxa5*.

La proportion des follicules thyroïdiens remplis, partiellement remplis ou vides de colloïde a été mesurée chez des embryons de 16.5, 17.5 et 18.5 jours de gestation. Aux stades E16.5 et E17.5, la proportion de follicules thyroïdiens ne contenant pas ou très peu de colloïde est comparable chez les embryons de type sauvage et homozygotes mutants ($p > 0,05$). Au stade E18.5, la proportion de follicules thyroïdiens ne contenant pas ou très peu de colloïde est plus élevée chez les embryons homozygotes mutants ($p < 0,05$). Le nombre de souris analysées pour chacun des génotypes est indiqué entre parenthèses; tous les follicules ont été comptés pour chacune des souris analysées. E: embryonnaire; sign.: significatif.

E16.5			
	+/+ (n = 3)	-/- (n = 7)	Valeur p
Follicules ne contenant pas de colloïde (%)	4,4%	5,3%	p = 0,38 (non sign.)
Follicules partiellement remplis de colloïde (%)	10,6%	19,9%	p = 0,15 (non sign.)
Follicules remplis de colloïde (%)	85,0%	74,8%	p = 0,14 (non sign.)

E17.5			
	+/+ (n = 5)	-/- (n = 9)	Valeur p
Follicules ne contenant pas de colloïde (%)	5,7%	11,3%	p = 0,48 (non sign.)
Follicules partiellement remplis de colloïde (%)	3,5%	7,4%	p = 0,18 (non sign.)
Follicules remplis de colloïde (%)	90,8%	81,3%	p = 0,23 (non sign.)

E18.5			
	+/+ (n = 6)	-/- (n = 8)	Valeur p
Follicules ne contenant pas de colloïde (%)	4,2%	14,5%	p = 0,02 (sign.)
Follicules partiellement remplis de colloïde (%)	6,0%	15,7%	p = 0,01 (sign.)
Follicules remplis de colloïde (%)	89,8%	69,8%	p = 0,005 (sign.)

Tableau 3.3 Diamètre des follicules thyroïdiens chez des embryons et des souris de type sauvage (+/+) et homozygotes mutants (-/-) pour la fonction *Hoxa5*.

Le diamètre des follicules thyroïdiens a été mesurée chez des embryons de 16.5, 17.5 et 18.5 jours de gestation et chez des souris de 0, 6, 17 et 30 jours. Aux stades E16.5, E17.5, E18.5, J0, J6 et J17, le diamètre des follicules thyroïdiens est comparable chez les embryons de type sauvage et homozygotes mutants ($p > 0,05$). Au jour 30 après la naissance, le diamètre des follicules thyroïdiens est plus faible chez les souris homozygotes mutantes ($p < 0,05$). Les valeurs présentées correspondent à la moyenne \pm l'écart-type. Le nombre de souris analysées pour chacun des génotypes est indiqué entre parenthèses. E: embryonnaire; J: jour; sign.: significatif.

Diamètre des follicules thyroïdiens (μm)			
	+/+	-/-	Valeur p
E16.5	4,2 \pm 0,5 (n = 3)	4,0 \pm 0,4 (n = 7)	p = 0,40 (non sign.)
E17.5	5,9 \pm 0,5 (n = 5)	5,3 \pm 1,1 (n = 9)	p = 0,29 (non sign.)
E18.5	8,3 \pm 1,1 (n = 4)	7,6 \pm 1,4 (n = 8)	p = 0,44 (non sign.)
J0	10,9 \pm 0,8 (n = 10)	10,5 \pm 0,9 (n = 11)	p = 0,26 (non sign.)
J6	16,6 \pm 2,1 (n = 10)	15,2 \pm 1,2 (n = 6)	p = 0,15 (non sign.)
J17	23,4 \pm 1,3 (n = 4)	20,3 \pm 2,3 (n = 4)	p = 0,06 (non sign.)
J30	27,8 \pm 0,8 (n = 2)	23,7 \pm 1,2 (n = 4)	p = 0,01 (sign.)

3.4.2 Analyses immunohistochimiques

Les protéines nécessaires à la fonction thyroïdienne proprement dite – thyroglobuline, calcitonine et hormones thyroïdiennes – commencent à être synthétisées par la glande thyroïde vers le seizième jour de gestation (Fisher et Dussault, 1974). L'utilisation d'anticorps spécifiques a permis de vérifier la présence de ces protéines à différents stades du développement de la glande thyroïde chez des embryons et des souris de type sauvage et homozygotes mutants pour la fonction *Hoxa5*.

3.4.2.1 Production de thyroglobuline

La Figure 3.6 montre que la thyroglobuline est produite par les thyrocytes dès le jour 15.5 de gestation, tant chez les embryons de type sauvage que chez les embryons homozygotes mutants pour la fonction *Hoxa5*. À ce stade, puisque la structure des follicules thyroïdiens n'est pas encore bien définie, la thyroglobuline se retrouve localisée à l'intérieur des thyrocytes ou légèrement dispersée à travers la glande. La quantité de thyroglobuline détectée chez les embryons homozygotes mutants aux stades E15.5 et E16.5 est comparable à celle détectée chez les embryons de type sauvage. Cependant, alors que les premiers follicules thyroïdiens contenant de la thyroglobuline apparaissent chez les embryons de type sauvage au jour 16.5 de gestation, très peu de follicules bien formés sont détectés chez les embryons homozygotes mutants au même stade. En fait, tel qu'observé lors de l'analyse histologique (Figure 3.5A), les thyrocytes ne sont pas disposés de façon très structurée chez les embryons homozygotes mutants au stade E16.5 et des zones de désorganisation cellulaire sont observées. La thyroglobuline se retrouve donc légèrement dispersée dans toute la glande thyroïde comme au stade E15.5.

En accord avec les observations faites lors de l'analyse histologique (Figure 3.5A), les anomalies les plus importantes sont détectées aux stades E17.5 et E18.5. La Figure 3.6 permet en effet de constater la présence d'un très grand nombre de follicules ne contenant pas de thyroglobuline chez les embryons homozygotes mutants à 17.5 et 18.5 jours de gestation. La thyroglobuline détectée à ces stades est localisée au niveau des thyrocytes et en périphérie du lumen des follicules, et ne semble pas s'accumuler à l'intérieur des follicules comme c'est le cas chez les embryons de type sauvage. Au moment de la naissance (J0, Figure 3.6) ainsi qu'aux stades post-natals subséquents (J17, Figure 3.6; J6 et J30, résultats

non présentés), on constate cependant que les follicules thyroïdiens des souris homozygotes mutantes sont remplis de thyroglobuline tout comme ceux des souris de type sauvage. L'organisation structurale de la glande thyroïde des souris homozygotes mutantes est d'ailleurs comparable à celle des souris de type sauvage de la naissance à l'âge adulte (Figure 3.6 et résultats non présentés), ce qui est en accord avec les observations faites lors de l'analyse histologique (Figure 3.5B).

Figure 3.6 Analyse immunohistochimique de la production de thyroglobuline par la glande thyroïde chez des embryons et des souris de type sauvage (+/+) et homozygotes mutants (-/-) pour la fonction *Hoxa5*.

Des sections de la glande thyroïde d'embryons (E15.5, E16.5, E17.5 et E18.5) et de souris (J0 et J17) ont été incubées en présence d'un anticorps polyclonal dirigé contre la thyroglobuline. Le DAB donne une coloration brune aux régions où se retrouve la thyroglobuline. Les sections sont contre-colorées avec de l'hématoxyline de Mayer. La thyroglobuline est détectée dès le stade E15.5 chez les embryons de type sauvage et homozygotes mutants (flèches). Des zones de désorganisation cellulaire sont notées chez les embryons homozygotes mutants au stade E16.5 (tête de flèche) et des follicules ne contenant pas de thyroglobuline sont observés chez ces embryons aux stades E17.5 et E18.5 (têtes de flèches). L'organisation structurale de la glande thyroïde des souris homozygotes mutantes semble normale au cours du développement post-natal (J0 et J17) et la majorité des follicules contiennent de la thyroglobuline chez les souris de type sauvage et homozygotes mutantes à ces stades (flèches). Le nombre de souris analysées pour chacun des génotypes aux différents stades présentés est: E15.5: 6 +/+, 8 -/-; E16.5: 3 +/+, 7 -/-; E17.5: 5 +/+, 9 -/-; E18.5: 5 +/+, 10 -/-; J0: 10 +/+, 11 -/-; J17: 4 +/+, 4 -/-. Les spécimens présentés sur la figure sont représentatifs de l'ensemble des embryons analysés. E: embryonnaire; J: jour. Grossissement total: 600X.

+/+

-/-

E15.5

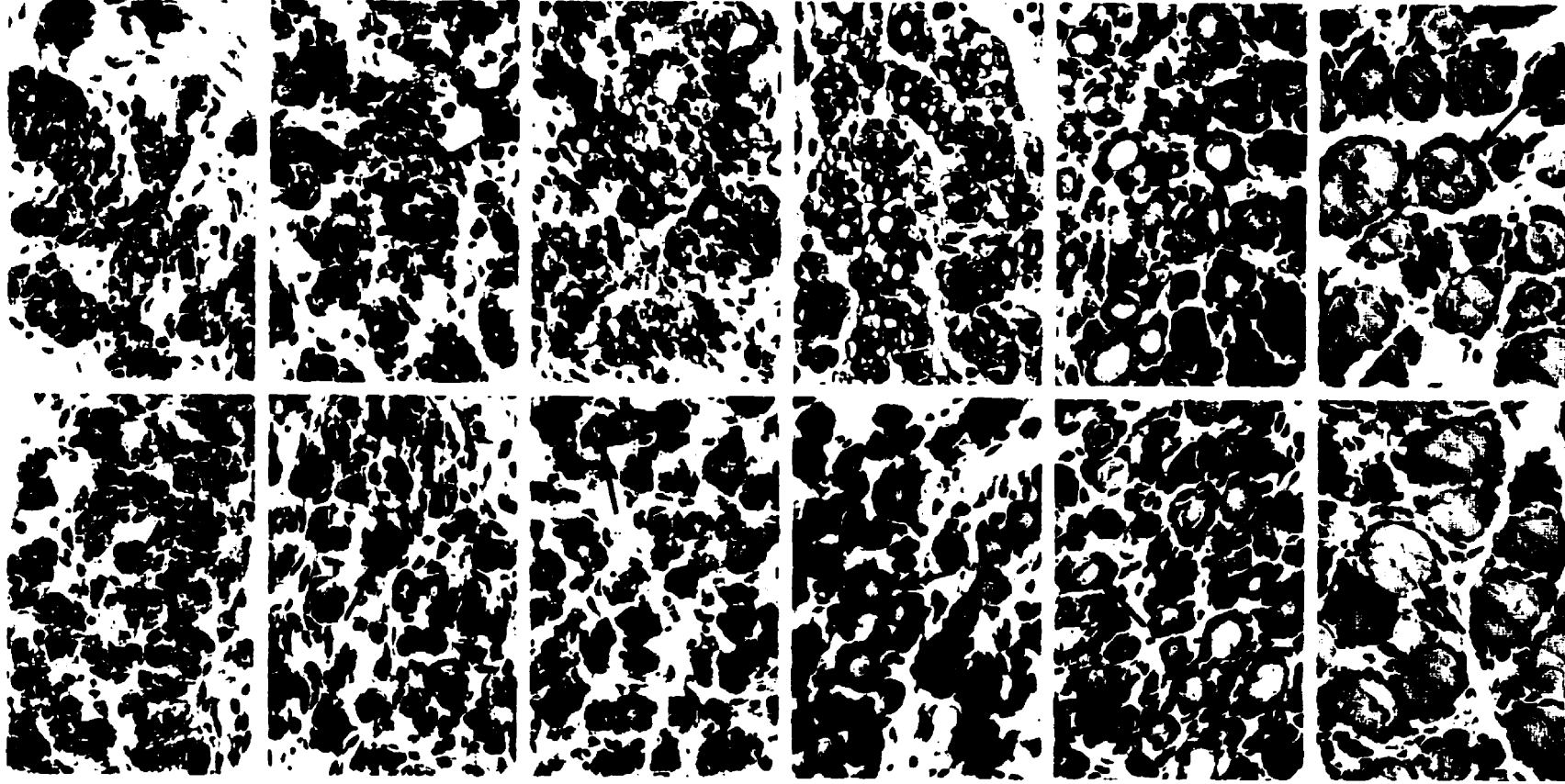
E16.5

E17.5

E18.5

J0

J17



3.4.2.2 Production de calcitonine et de thyroxine

La Figure 3.7 montre la production de calcitonine et de thyroxine à différents stades du développement embryonnaire et post-natal chez des individus de type sauvage et homozygotes mutants pour la fonction *Hoxa5*. Cette figure permet de constater que l'absence de la fonction *Hoxa5* n'affecte pas la production de ces deux hormones.

La calcitonine est produite par les cellules C à partir du jour 16.5 de gestation, tant chez les embryons de type sauvage que chez les embryons homozygotes mutants (Figure 3.7). À ce stade ainsi qu'aux stades E17.5 (résultats non présentés) et E18.5 (Figure 3.7), la quantité de calcitonine détectée chez les embryons de type sauvage et homozygotes mutants est faible et les cellules positives sont dispersées à travers la glande thyroïde. Cependant, au stade E18.5 ainsi qu'aux stades post-natals subséquents (J0 et J17, Figure 3.7; J6 et J30, résultats non présentés), les cellules positives sont principalement concentrées dans la région centrale des lobes thyroïdiens, tant chez les individus de type sauvage que chez les individus homozygotes mutants. Au moment de la naissance (J0, Figure 3.7), la quantité de calcitonine produite par les cellules C est plus importante qu'aux stades embryonnaires et augmente graduellement au cours du développement post-natal (J17, Figure 3.7; J6 et J30, résultats non présentés). À tous les stades analysés, la quantité de calcitonine détectée chez les individus homozygotes mutants et la disposition des cellules positives à travers la glande thyroïde sont comparables à ce qui est observé chez les individus de type sauvage.

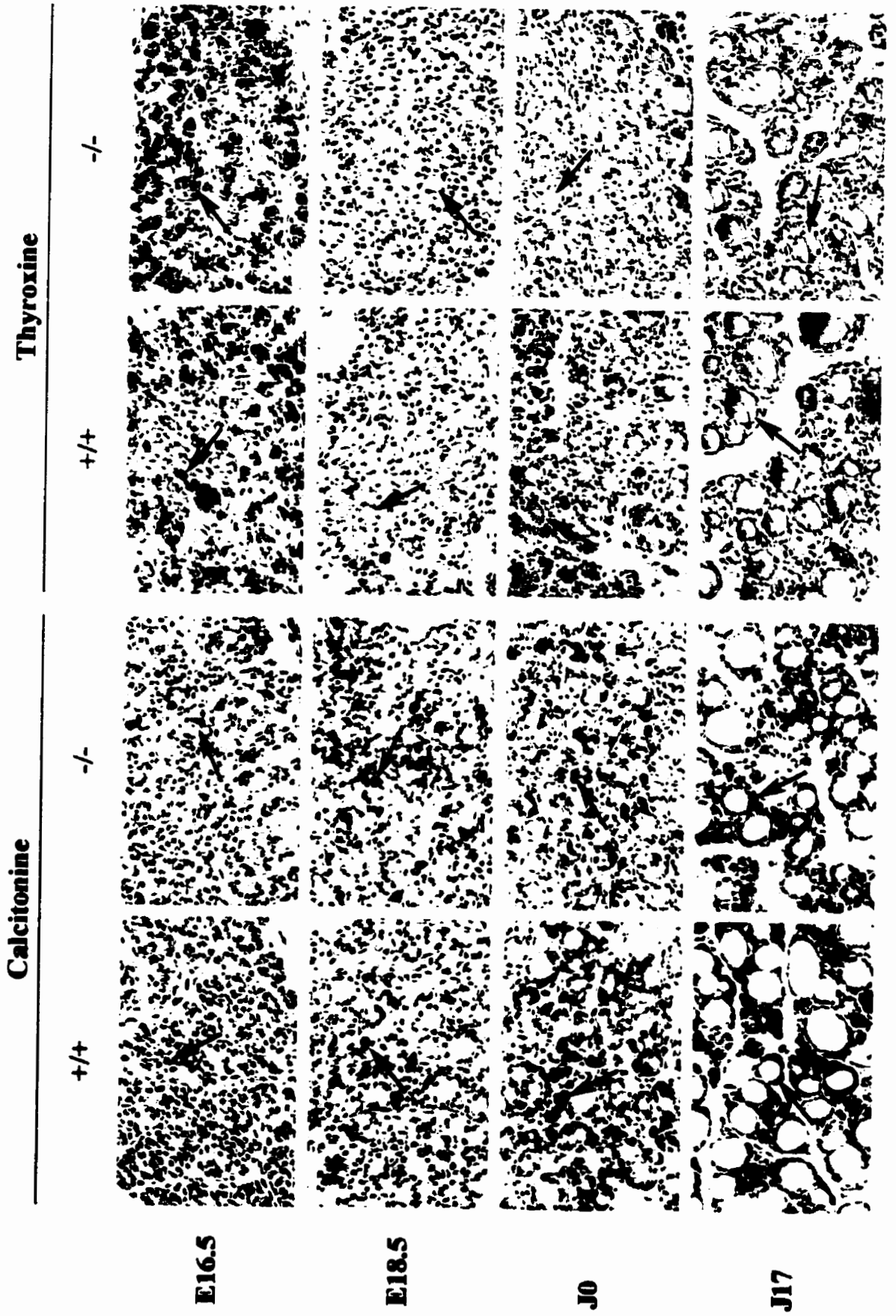
La Figure 3.7 montre également que la production de T_4 commence aussi au jour 16.5 de gestation. À ce stade, on détecte déjà de grandes quantités de T_4 à travers toute la glande thyroïde tant chez les embryons de type sauvage que chez les embryons homozygotes mutants. Au cours des stades embryonnaires et post-natals subséquents (E18.5, J0 et J17, Figure 3.7; E17.5, J6 et J30, résultats non présentés), la T_4 est détectée principalement à l'intérieur des follicules thyroïdiens. L'intensité du marquage est équivalente chez les individus de type sauvage et homozygotes mutants à tous les stades analysés, ce qui est en accord avec les résultats obtenus lors des dosages (section 3.2).

Les analyses histologiques et immunohistochimiques montrent donc que l'absence de la fonction *Hoxa5* affecte le développement et l'organisation structurale de la glande thyroïde ainsi que la production de thyroglobuline à des stades embryonnaires bien précis (E16.5 à

E18.5). Les calcitonine et la thyroxine semblent cependant être produites normalement chez les embryons homozygotes mutants pour la fonction *Hoxa5*.

Figure 3.7 Analyse immunohistochimique de la production de calcitonine et de thyroxine par la glande thyroïde chez des embryons et des souris de type sauvage (+/+) et homozygotes mutants (-/-) pour la fonction *Hoxa5*.

Des sections de la glande thyroïde d'embryons (E16.5 et E18.5) et de souris (J0 et J17) ont été incubées en présence d'anticorps polyclonaux dirigés contre la calcitonine ou la thyroxine. Le DAB donne une coloration brune aux cellules produisant la calcitonine (cellules C) et aux régions où se retrouve la thyroxine. Les sections sont contre-colorées avec de l'hématoxyline de Mayer. La calcitonine est détectée dès le stade E16.5 chez les embryons de type sauvage et homozygotes mutants (flèches); aucune différence qualitative ou quantitative n'est observée chez les embryons et les souris homozygotes mutants à tous les stades analysés. La thyroxine est aussi détectée dès le stade E16.5 chez les embryons de type sauvage et homozygotes mutants (flèches). Aucune différence qualitative ou quantitative n'est observée chez les embryons et les souris homozygotes mutants à tous les stades analysés, et des follicules contenant de la thyroxine sont observés chez les embryons et les souris de type sauvage et homozygotes mutants aux stades E18.5, J0 et J17 (flèches). Le nombre de souris analysées pour chacun des génotypes aux différents stades présentés est, pour la calcitonine: E16.5: 3 +/+, 7 -/-; E18.5: 7 +/+, 14 -/-; J0: 10 +/+, 11 -/-; J17: 4 +/+, 4 -/-. Le nombre de souris analysées pour chacun des génotypes aux différents stades présentés est, pour la thyroxine: E16.5: 3 +/+, 7 -/-; E18.5: 6 +/+, 13 -/-; J0: 10 +/+, 10 -/-; J17: 4 +/+, 4 -/-. Les spécimens présentés sur la figure sont représentatifs de l'ensemble des embryons analysés. E: embryonnaire; J: jour. Grossissement total: 400X.



3.5 Analyse du profil d'expression de divers gènes impliqués dans le développement et la fonction de la glande thyroïde

Comme tous les gènes *Hox*, le gène *Hoxa5* code pour un facteur de transcription essentiel au développement normal de l'embryon. En tant que facteur de transcription, la protéine HOXA5 peut donc agir sur l'expression de différents gènes régulateurs et effecteurs impliqués dans les processus développementaux. Des travaux réalisés dans le laboratoire ont d'ailleurs permis d'identifier certains gènes effecteurs du facteur HOXA5. En effet, l'absence de la fonction *Hoxa5* perturbe l'expression des gènes *TTF-1*, *HNF-3 β* et *N-myc* au niveau de l'épithélium pulmonaire chez les souris homozygotes mutantes (Aubin et al., 1997).

Afin de déterminer les conséquences de l'absence de la fonction *Hoxa5* sur l'expression des divers gènes impliqués dans le développement et la fonction de la glande thyroïde, des expériences d'hybridation *in situ* ont été réalisées sur des sections de la glande thyroïde d'embryons de type sauvage et homozygotes mutants pour la fonction *Hoxa5*. Le profil et le niveau d'expression des gènes *Hoxa5*, *Hoxa3*, *TTF-1*, *TTF-2*, *Pax-8*, *Tg*, *TPO* et *TSHr* ont été analysés lors de cette étude.

3.5.1 Analyse du profil d'expression des gènes *Hoxa5*, *Hoxa3*, *TTF-1*, *TTF-2* et *Pax-8* au niveau de la glande thyroïde en développement

Les analyses histologiques et immunohistochimiques ont montré que l'absence de la fonction *Hoxa5* perturbait la morphogenèse de la glande thyroïde chez les embryons homozygotes mutants. Afin d'évaluer si le gène *Hoxa5* exerce un contrôle direct ou indirect sur le développement de la glande thyroïde, le profil d'expression de ce gène au niveau de la glande thyroïde a été analysé par hybridation *in situ*.

La Figure 3.8 présente le profil d'expression des gènes *Hoxa5*, *Hoxa3*, *TTF-1*, *TTF-2* et *Pax-8* au niveau de la glande thyroïde chez des embryons au jour 12.5 de gestation. L'expression des gènes *Hoxa5* et *Hoxa3* a été analysée à la fois chez des embryons de type sauvage et homozygotes mutants pour la fonction *Hoxa5* (Figure 3.8B), alors que l'expression des gènes *TTF-1*, *TTF-2* et *Pax-8* a été analysée uniquement chez des embryons de type sauvage afin de mettre en évidence les structures thyroïdiennes (Figure 3.8A). En effet, il est connu que ces trois gènes s'expriment au niveau des lobes et/ou de l'isthme de la glande

thyroïde au cours du développement embryonnaire (Plachov et al., 1990; Lazzaro et al., 1991; Kimura et al., 1996; Zannini et al., 1997). Une analyse plus détaillée du profil d'expression de ces gènes chez des embryons de type sauvage et homozygotes mutants pour la fonction *Hoxa5* est présentée plus loin (Figure 3.9, section 3.5.2).

La Figure 3.8A permet de constater qu'au jour 12.5 de gestation, le gène *TTF-1* s'exprime au niveau des lobes et de l'isthme de la glande thyroïde ainsi que dans l'épithélium de la trachée. L'expression du gène *TTF-1* au niveau de ces structures a déjà été rapportée (Lazzaro et al., 1991; Kimura et al., 1996; Aubin et al., 1997; Zannini et al., 1997). Au même stade, l'expression du gène *TTF-2* est détectée dans l'isthme de la glande thyroïde, l'épithélium de l'oesophage et, très faiblement, au niveau des lobes thyroïdiens. Alors que le profil d'expression du gène *TTF-2* au niveau de la glande thyroïde est connu (Zannini et al., 1997), l'expression de ce gène au niveau de l'oesophage n'a jamais été rapportée. Finalement, le gène *Pax-8* s'exprime uniquement au niveau de l'isthme de la glande thyroïde à 12.5 jours de gestation. Cependant, à 14.5 jours de gestation, le profil d'expression des gènes *TTF-2* et *Pax-8* inclut également les lobes thyroïdiens (Figure 3.9, section 3.5.2).

Le profil d'expression du gène *Hoxa5* au niveau de la glande thyroïde a été analysé à l'aide de deux sondes différentes (Figure 1.5). La première sonde (pLJ34) correspond aux séquences 3'-non traduites du deuxième exon du gène *Hoxa5* et reconnaît les quatre transcrits du gène, incluant le transcrit de 1.8 kb codant pour la protéine HOXA5, alors que la seconde sonde (pLJ36) correspond à des séquences intergéniques séparant les gènes *Hoxa5* et *Hoxa6* et reconnaît uniquement les trois plus longs transcrits (4.9, 9.5 et 11 kb). La Figure 3.8B présente les résultats obtenus chez des embryons de type sauvage et homozygotes mutants pour la fonction *Hoxa5* à 12.5 jours de gestation. Chez les embryons de type sauvage, la sonde pLJ34 permet de détecter l'expression du gène *Hoxa5* dans les régions bordant les lobes et l'isthme de la glande thyroïde ainsi que dans le mésenchyme entourant la trachée. Ce profil d'expression est cependant spécifique à la sonde pLJ34 puisque aucun signal d'hybridation n'est obtenu avec la sonde pLJ36 dans la région de la glande thyroïde chez les embryons de type sauvage, indiquant ainsi que seul le transcrit de 1.8 kb s'exprime dans cette région. De plus, aucun signal d'hybridation n'est obtenu avec la sonde pLJ34 chez les embryons homozygotes mutants pour la fonction *Hoxa5* (Figure 3.8B). Des résultats similaires sont obtenus chez des embryons de type sauvage et homozygotes mutants à 14.5 jours de gestation (résultats non présentés).

L'expression du gène *Hoxa3* au niveau de la glande thyroïde en développement a déjà été rapportée (Gaunt et al., 1988). De plus, les souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa3* présentent des anomalies au niveau de la glande thyroïde: migration incomplète des corps ultimobranchiaux, hypoplasie, désorganisation des follicules (Manley et Capecchi, 1995). Puisque certains de ces phénotypes s'apparentent à ceux observés chez les embryons homozygotes mutants pour la fonction *Hoxa5* (voir la section 3.4), l'expression du gène *Hoxa3* a été analysée chez les embryons homozygotes mutants pour la fonction *Hoxa5* afin de détecter une possible interaction entre les deux gènes. La Figure 3.8B permet de constater que le gène *Hoxa3*, tout comme le gène *Hoxa5*, ne s'exprime pas directement dans la glande thyroïde mais plutôt faiblement autour des lobes à 12.5 jours de gestation. Ce profil d'expression se retrouve à la fois chez les embryons de type sauvage et homozygotes mutants pour la fonction *Hoxa5*. De plus, les niveaux d'expression du gène *Hoxa3* ne semblent pas être affectés par l'absence de la fonction *Hoxa5* chez les embryons homozygotes mutants à 12.5 jours de gestation (Figure 3.8B). Des résultats similaires sont obtenus chez des embryons de type sauvage et homozygotes mutants à 14.5 jours de gestation (résultats non présentés).

L'expression des gènes *TTF-1*, *TTF-2* et *Pax-8* a également été analysée à 9.5 jours de gestation, au moment où le diverticulum thyroïdien se forme au niveau du plancher du pharynx; les résultats obtenus sont présentés à la Figure 3.9 (section 3.5.2). Quant aux gènes *Hoxa5* et *Hoxa3*, leur expression n'a pas été détectée dans la région de la glande thyroïde à ce stade (résultats non présentés).

Figure 3.8 Expression des gènes *Hoxa5*, *Hoxa3*, *TTF-1*, *TTF-2* et *Pax-8* au niveau de la glande thyroïde chez des embryons de type sauvage (+/+) et homozygotes mutants (-/-) pour la fonction *Hoxa5* à 12.5 jours de gestation.

(A) Des sections transverses de la glande thyroïde d'embryons de type sauvage de 12.5 jours de gestation ont été hybridées avec les sondes *TTF-1*, *TTF-2* et *Pax-8*. À ce stade, le gène *TTF-1* s'exprime dans les lobes (flèches) et l'isthme de la glande thyroïde et dans l'épithélium de la trachée; le gène *TTF-2* s'exprime dans l'isthme de la glande thyroïde, dans l'épithélium de l'œsophage et, très faiblement, dans les lobes thyroïdiens (flèches); le gène *Pax-8* s'exprime uniquement dans l'isthme de la glande thyroïde. Les flèches pointent les lobes thyroïdiens. (B) Des sections transverses de la glande thyroïde d'embryons de type sauvage et homozygotes mutants pour la fonction *Hoxa5* de 12.5 jours de gestation ont été hybridées avec la sonde pLJ34, reconnaissant les quatre transcrits du gènes *Hoxa5*, et avec la sonde *Hoxa3*; l'hybridation avec la sonde pLJ36, reconnaissant uniquement les trois longs transcrits du gène *Hoxa5*, a été réalisée seulement chez des embryons de type sauvage. La sonde pLJ34 permet de détecter l'expression du gène *Hoxa5* dans le mésenchyme adjacent aux lobes (flèches) et à l'isthme de la glande thyroïde chez les embryons de type sauvage; aucun signal n'est détectée chez les embryons homozygotes mutants. Aucun signal n'est détecté avec la sonde pLJ36 dans la région de la glande thyroïde chez les embryons de type sauvage. Le gène *Hoxa3* s'exprime faiblement autour des lobes thyroïdiens (flèches) chez les embryons de type sauvage et homozygotes mutants pour la fonction *Hoxa5*. Les flèches pointent les lobes thyroïdiens. Le nombre de souris analysées pour chacun des génotypes est de 2 +/+, 2 -/- avec la sonde pLJ34 et de 3 +/+, 5 -/- avec la sonde *Hoxa3*. Les spécimens présentés sur la figure sont représentatifs de l'ensemble des embryons analysés. t: glande thyroïde; i: isthme; tr: trachée; oe: oesophage. Grossissement total: 100X.

3.5.2 Analyse du profil et du niveau d'expression des gènes régulateurs de la fonction thyroïdienne *TTF-1*, *TTF-2* et *Pax-8* à différents stades du développement embryonnaire

Les gènes régulateurs de la fonction thyroïdienne commencent à être exprimés dans les cellules du diverticulum thyroïdien dès le jour 9.5 de gestation chez la souris. Cependant, alors que les gènes *TTF-1* et *Pax-8* s'expriment de façon continue au niveau de la glande thyroïde jusqu'à l'âge adulte, les travaux réalisés par Zannini et al. (1997) indiquent que l'expression du gène *TTF-2* au niveau de cet organe s'éteint vers le jour 15.5 de gestation pour ne réapparaître qu'à l'âge adulte (Plachov et al., 1990; Lazzaro et al., 1991; Kimura et al., 1996; Zannini et al., 1997).

La Figure 3.9 présente le profil d'expression des gènes régulateurs *TTF-1*, *TTF-2* et *Pax-8* au niveau de la glande thyroïde chez des embryons de type sauvage et homozygotes mutants pour la fonction *Hoxa5* à différents stades du développement. Cette figure permet de constater que les gènes *TTF-1*, *TTF-2* et *Pax-8* s'expriment au niveau du diverticulum thyroïdien dès le jour 9.5 de gestation, tant chez les embryons de type sauvage que chez les embryons homozygotes mutants. Cependant, alors que l'expression des gènes *TTF-1* et *Pax-8* est restreinte aux cellules formant le diverticulum thyroïdien, l'expression du gène *TTF-2* s'étend à toute la région du pharynx (Figure 3.9). Au stade E14.5, les gènes *TTF-1*, *TTF-2* et *Pax-8* s'expriment dans les lobes et l'isthme de la glande thyroïde tant chez les embryons de type sauvage que chez les embryons homozygotes mutants; l'isthme n'est cependant pas visible sur les photographies présentées à la Figure 3.9. Tel qu'observé au stade E12.5 (Figure 3.8, section 3.5.1), le gène *TTF-1* s'exprime également dans l'épithélium de la trachée à 14.5 jours de gestation alors que le gène *TTF-2* s'exprime plus faiblement dans l'épithélium de l'oesophage (Figure 3.9). À 18.5 jours de gestation, les gènes *TTF-1*, *TTF-2* et *Pax-8* s'expriment toujours au niveau des lobes thyroïdiens chez les embryons de type sauvage et homozygotes mutants (Figure 3.9). L'expression du gène *TTF-2* à ce stade est cependant inattendue compte tenu des résultats rapportés par Zannini et al. (1997) indiquant que ce gène cesse de s'exprimer vers le jour 15.5 de gestation chez la souris pour ne réapparaître qu'à l'âge adulte. En fait, l'analyse détaillée du profil d'expression du gène *TTF-2* réalisée chez des embryons et des souris de type sauvage et homozygotes mutants pour la fonction *Hoxa5* montre que ce gène s'exprime de façon continue jusqu'à l'âge adulte. En effet, l'expression de ce gène est détectée au niveau de la glande thyroïde aux stades E9.5,

E12.5, E14.5, E15.5, E16.5, E18.5, J0 et J6 chez les embryons et les souris de type sauvage et homozygotes mutants (Figure 3.8, Figure 3.9, Tableau 3.4B et résultats non présentés). Le profil d'expression temporel obtenu pour le gène *TTF-2* ne correspond donc pas à celui décrit par Zannini et al. (1997).

Bien que, qualitativement, le profil d'expression des gènes régulateurs *TTF-1*, *TTF-2* et *Pax-8* ne soit pas perturbé par l'absence de la fonction *Hoxa5*, les niveaux d'expression de ces gènes sont affectés chez certains embryons homozygotes mutants à différents stades du développement. La Figure 3.9 permet en effet de constater une baisse des niveaux d'expression des gènes *TTF-1* et *TTF-2* chez les embryons homozygotes mutants aux stades E9.5 et E14.5. Au stade E14.5, l'absence de la fonction *Hoxa5* entraîne également une diminution des niveaux d'expression du gène *Pax-8*. Finalement, chez les embryons homozygotes mutants au stade E18.5, les niveaux d'expression du gène *TTF-1* semblent normaux, ceux du gène *TTF-2* sont augmentés et ceux du gène *Pax-8* sont diminués (Figure 3.9).

Afin de quantifier les différences de niveaux d'expression des gènes régulateurs de la fonction thyroïdienne observées chez les embryons homozygotes mutants pour la fonction *Hoxa5*, un dénombrement des grains d'argent par cellule a été effectué chez tous les embryons de type sauvage et homozygotes mutants analysés à différents stades du développement (Tableau 3.4).

Les résultats présentés au Tableau 3.4A confirment la diminution des niveaux d'expression du gène *TTF-1* observée chez les embryons homozygotes mutants au stade E9.5 (Figure 3.9). Cette diminution globale de 30% est statistiquement significative ($p < 0,05$). Aux stades subséquents (E12.5, E14.5, E15.5 et E18.5), la comparaison globale des niveaux d'expression du gène *TTF-1* chez les embryons de type sauvage et homozygotes mutants ne permet pas de détecter de différences statistiquement significatives ($p > 0,05$ dans tous les cas). Le Tableau 3.4A permet cependant de constater qu'à 12.5 jours de gestation, 1 des 4 embryons homozygotes mutants analysés présente une diminution significative des niveaux d'expression du gène *TTF-1* alors qu'à 14.5 jours de gestation, une diminution significative est observée chez 2 des 6 embryons homozygotes mutants analysés. Au stade E15.5, sur les trois embryons homozygotes mutants analysés, un présente une diminution significative, un autre présente une augmentation significative et le dernier ne présente

aucune différence dans les niveaux d'expression du gène *TTF-1*. Finalement, au stade E18.5, une augmentation significative des niveaux d'expression du gène *TTF-1* est observée chez 1 des 4 embryons homozygotes mutants analysés.

Les résultats présentés au Tableau 3.4B confirment la diminution des niveaux d'expression du gène *TTF-2* observée chez les embryons homozygotes mutants à 9.5 jours de gestation (Figure 3.9). Cette diminution globale de 32% est statistiquement significative ($p < 0,05$). Au stade E14.5, 2 des 6 embryons homozygotes mutants analysés présentent une diminution significative des niveaux d'expression du gène *TTF-2*. De plus, à ce stade, une diminution globale de 20% statistiquement significative est observée chez les embryons homozygotes mutants. À 15.5 jours de gestation, 2 des 3 embryons homozygotes mutants analysés présentent une augmentation importante des niveaux d'expression du gène *TTF-2*. En fait, une augmentation globale et significative de 46% est observée à ce stade. Au stade E16.5, 1 des 4 embryons analysés présente une augmentation significative des niveaux d'expression du gène *TTF-2*. Finalement, au stade E18.5, tous les embryons homozygotes mutants analysés présentent une augmentation significative et très importante (augmentation globale de 92%) des niveaux d'expression du gène *TTF-2*.

Les résultats présentés au Tableau 3.4C indiquent qu'il n'y a pas de différence significative globale entre les niveaux d'expression du gène *Pax-8* chez les embryons de type sauvage et homozygotes mutants à 9.5 et 14.5 jours de gestation ($p > 0,05$). Cependant, une diminution significative des niveaux d'expression du gène *Pax-8* est observée chez 2 des 6 embryons analysés au stade E14.5. Finalement, une diminution globale de 16% des niveaux d'expression du gène *Pax-8* est observée chez les embryons homozygotes mutants au stade E18.5; cette diminution est statistiquement significative ($p < 0,05$).

En résumé, les résultats obtenus indiquent que l'absence de la fonction *Hoxa5* n'affecte pas le profil d'expression spatio-temporel des gènes régulateurs de la fonction thyroïdienne. Les niveaux d'expression des gènes *TTF-1* et *TTF-2* sont cependant diminués aux stades E9.5 et E14.5 et sont augmentés à partir du stade E15.5 chez certains embryons homozygotes mutants, les niveaux d'expression du gène *Pax-8* diminuent à partir du stade E14.5 chez certains embryons homozygotes mutants et une augmentation importante des niveaux d'expression du gène *TTF-2* est notée chez tous les embryons homozygotes mutants analysés au stade E18.5.

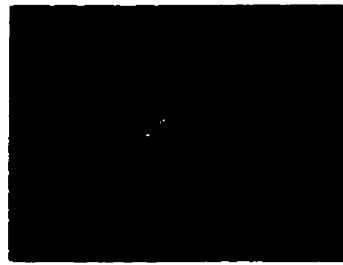
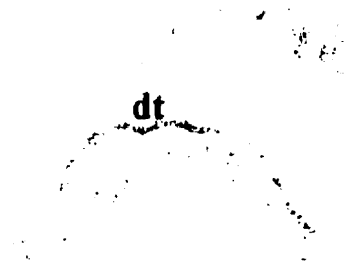
Figure 3.9 Expression des gènes *TTF-1*, *TTF-2* et *Pax-8* au niveau de la glande thyroïde chez des embryons de type sauvage (+/+) et homozygotes mutants (-/-) pour la fonction *Hoxa5*.

Des sections de la glande thyroïde d'embryons de 9.5, 14.5 et 18.5 jours de gestation ont été hybridées avec les sondes *TTF-1*, *TTF-2* et *Pax-8*. Au stade E9.5, les gènes *TTF-1*, *TTF-2* et *Pax-8* s'expriment dans le diverticulum thyroïdien chez les embryons de type sauvage et homozygotes mutants; l'expression du gène *TTF-2* s'étend également dans toute la région du pharynx. Au stade E14.5, les gènes *TTF-1*, *TTF-2* et *Pax-8* s'expriment dans les lobes thyroïdiens chez les embryons de type sauvage et homozygotes mutants; le gène *TTF-1* s'exprime également dans l'épithélium de la trachée et le gène *TTF-2* s'exprime faiblement dans l'épithélium de l'oesophage. Au stade E18.5, les gènes *TTF-1*, *TTF-2* et *Pax-8* sont encore détectés dans les lobes thyroïdiens chez les embryons de type sauvage et homozygotes mutants. Le nombre de souris analysées pour chacun des génotypes aux différents stades présentés est: E9.5: 2 +/+, 5 -/-; E14.5: 3 +/+, 6 -/-; E18.5: 2 +/+, 4 -/- avec la sonde *TTF-1*; E9.5: 4 +/+, 5 -/-; E14.5: 3 +/+, 6 -/-; E18.5: 3 +/+, 3 -/- avec la sonde *TTF-2*; E9.5: 3 +/+, 5 -/-; E14.5: 3 +/+, 6 -/-; E18.5: 2 +/+, 3 -/- avec la sonde *Pax-8*. Les spécimens présentés sur la figure sont représentatifs de l'ensemble des embryons analysés. dt: diverticulum thyroïdien; t: glande thyroïde; i: isthme; tr: trachée; oe: oesophage. Grossissement total: 100X (E14.5) et 200X (E9.5 et E18.5).

E9.5

+/+

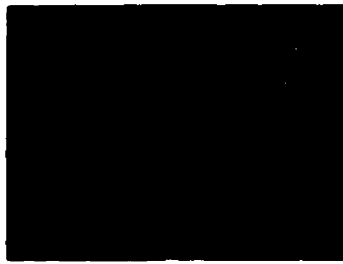
-/-



TTF-1



TTF-2

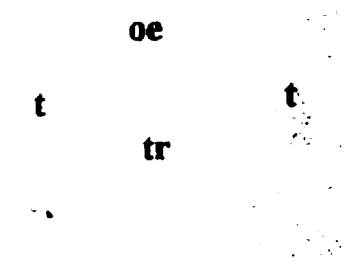


Pax-8

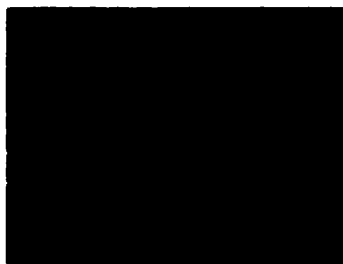
E14.5

+/+

-/-



TTF-1



TTF-2

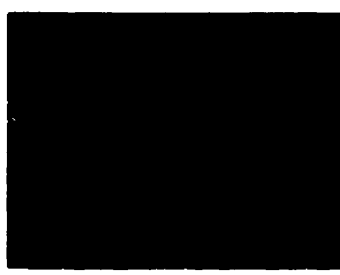
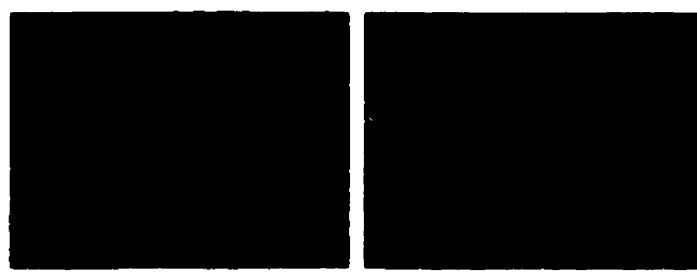
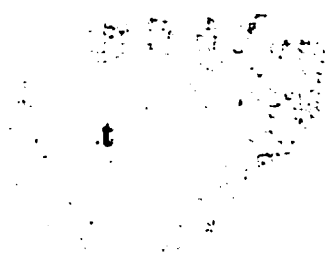


Pax-8

E18.5

+/+

-/-



TTF-1



TTF-2



Pax-8

Tableau 3.4 Niveaux d'expression des gènes *TTF-1*, *TTF-2* et *Pax-8* au niveau de la glande thyroïde chez des embryons de type sauvage (+/+) et homozygotes mutants (-/-) pour la fonction *Hoxa5*.

Un dénombrement des grains d'argent par cellule a été réalisé afin de quantifier les niveaux d'expression des gènes *TTF-1*, *TTF-2* et *Pax-8* au niveau de la glande thyroïde chez des embryons de type sauvage et homozygotes mutants. (A) Niveaux d'expression du gène *TTF-1* chez des embryons de 9.5, 12.5, 14.5, 15.5 et 18.5 jours de gestation. Les niveaux d'expression du gène *TTF-1* sont diminués chez les embryons homozygotes mutants au stade E9.5 ($p < 0,05$). (B) Niveaux d'expression du gène *TTF-2* chez des embryons de 9.5, 14.5, 15.5, 16.5 et 18.5 jours de gestation. Les niveaux d'expression du gène *TTF-2* sont diminués chez les embryons homozygotes mutants aux stades E9.5 et E14.5 et sont augmentés aux stades E15.5 et E18.5 ($p < 0,05$). (C) Niveaux d'expression du gène *Pax-8* chez des embryons de 9.5, 14.5 et 18.5 jours de gestation. Les niveaux d'expression du gène *Pax-8* sont diminués chez les embryons homozygotes mutants au stade E18.5 ($p < 0,05$). Les valeurs présentées dans les zones grises correspondent à la moyenne \pm l'écart-type pour l'ensemble des embryons de type sauvage et homozygotes mutants analysés; les valeurs présentées dans les zones blanches correspondent à la moyenne \pm l'écart-type pour chacun des embryons homozygotes mutants analysés. Le nombre de souris analysées pour chacun des génotypes est indiqué entre parenthèses. E: embryonnaire; sign.: significatif.

A

<i>TTF-1</i>				
Grains d'argent par cellule				
	+/+	-/-	% Changement	Valeur p
E9.5	9,2 ± 1,5 (n = 2)	6,4 ± 1,5 (n = 5)	↓ 30%	p = 0,01 (sign.)
E12.5	8,1 ± 0,8 (n = 3)	7,7 ± 2,7 (n = 4)	↓ 5%	p = 0,66 (non sign.)
		4,1 ± 1,0	↓ 49%	p < 0,01
		7,1 ± 0,7	↓ 12%	p > 0,05
		9,1 ± 1,7	↑ 12%	p > 0,05
		10,4 ± 1,3	↑ 28%	p > 0,05
E14.5	6,0 ± 1,4 (n = 3)	5,0 ± 1,8 (n = 6)	↓ 17%	p = 0,10 (non sign.)
		3,4 ± 0,3	↓ 43%	p < 0,01
		3,4 ± 1,1	↓ 43%	p < 0,01
		4,7 ± 0,7	↓ 22%	p > 0,05
		4,9 ± 0,4	↓ 18%	p > 0,05
		6,0 ± 1,0	0%	p > 0,05
		7,7 ± 2,0	↑ 28%	p > 0,05
E15.5	4,4 ± 1,3 (n = 3)	5,0 ± 3,0 (n = 3)	↑ 14%	p = 0,46 (non sign.)
		1,5 ± 0,3	↓ 66%	p < 0,01
		5,6 ± 1,4	↑ 27%	p > 0,05
		7,5 ± 2,2	↑ 70%	p < 0,01
E18.5	5,8 ± 1,0 (n = 2)	6,2 ± 1,1 (n = 4)	↑ 7%	p = 0,39 (non sign.)
		4,7 ± 0,3	↓ 19%	p > 0,05
		6,1 ± 0,8	↑ 5%	p > 0,05
		6,9 ± 0,6	↑ 19%	p > 0,05
		7,3 ± 0,2	↑ 26%	p < 0,05

B

<i>TTF-2</i>				
Grains d'argent par cellule				
	+/+	-/-	% Changement	Valeur p
E9.5	18,9 ± 3,5 (n = 4)	12,9 ± 4,5 (n = 5)	↓ 32%	p = 0,01 (sign.)
E14.5	7,4 ± 1,5 (n = 3)	5,9 ± 2,0 (n = 6)	↓ 20%	p = 0,03 (sign.)
		2,8 ± 1,1	↓ 62%	p < 0,01
		4,4 ± 0,8	↓ 41%	p < 0,01
		6,4 ± 0,9	↓ 14%	p > 0,05
		7,4 ± 0,8	0%	p > 0,05
		7,5 ± 0,7	↑ 1%	p > 0,05
		7,6 ± 1,0	↑ 3%	p > 0,05
E15.5	6,5 ± 2,2 (n = 3)	9,5 ± 3,8 (n = 3)	↑ 46%	p = 0,05 (sign.)
		6,0 ± 0,9	↓ 8%	p > 0,05
		10,2 ± 1,9	↑ 57%	p < 0,05
		15,0 ± 2,5	↑ 131%	p < 0,01
E16.5	7,7 ± 1,5 (n = 2)	9,4 ± 3,0 (n = 4)	↑ 22%	p = 0,10 (non sign.)
		6,5 ± 2,2	↓ 16%	p > 0,05
		8,9 ± 2,2	↑ 16%	p > 0,05
		9,7 ± 1,8	↑ 26%	p > 0,05
		13,4 ± 0,8	↑ 74%	p < 0,01
E18.5	6,4 ± 1,4 (n = 3)	12,3 ± 1,9 (n = 3)	↑ 92%	p < 0,001 (sign.)
		11,2 ± 2,0	↑ 75%	p < 0,01
		12,6 ± 1,0	↑ 97%	p < 0,01
		13,0 ± 2,5	↑ 103%	p < 0,01

C

<i>Pax-8</i>				
Grains d'argent par cellule				
	+/+	-/-	% Changement	Valeur p
E9.5	5,7 ± 1,6 (n = 3)	5,9 ± 1,2 (n = 5)	↑ 4%	p = 0,75 (non sign.)
E14.5	4,9 ± 1,0 (n = 3)	4,3 ± 2,0 (n = 6)	↓ 12%	p = 0,31 (non sign.)
		2,6 ± 0,9	↓ 47%	p < 0,05
		2,7 ± 0,5	↓ 45%	p < 0,05
		3,6 ± 1,7	↓ 27%	p > 0,05
		4,7 ± 2,3	↓ 4%	p > 0,05
		6,0 ± 1,4	↑ 22%	p > 0,05
		6,4 ± 0,6	↑ 31%	p > 0,05
E18.5	10,2 ± 1,9 (n = 2)	8,6 ± 1,8 (n = 3)	↓ 16%	p = 0,04 (sign.)
		6,6 ± 0,9	↓ 35%	p < 0,01
		8,7 ± 1,7	↓ 15%	p > 0,05
		9,8 ± 1,0	↓ 4%	p > 0,05

3.5.3 Analyse du profil et du niveau d'expression des gènes spécifiques à la fonction thyroïdienne *Tg*, *TPO* et *TSHr* à différents stades du développement embryonnaire

Les gènes spécifiques à la fonction thyroïdienne commencent à s'exprimer au niveau des thyrocytes vers le jour 14.5 de gestation chez la souris et leur expression se poursuit jusqu'à l'âge adulte (Lazzaro et al., 1991).

La Figure 3.10 présente le profil d'expression des gènes *Tg*, *TPO* et *TSHr* au niveau de la glande thyroïde chez des embryons de type sauvage et homozygotes mutants pour la fonction *Hoxa5* à différents stades du développement. Cette figure permet de constater que les gènes *Tg* et *TPO* commencent à s'exprimer dans les lobes thyroïdiens au stade E14.5 alors que l'expression du gène *TSHr* n'est détectée au niveau des lobes qu'à partir du jour 15.5 de gestation, tant chez les embryons de type sauvage que chez les embryons homozygotes mutants. Comme le montre la Figure 3.10, les gènes *Tg*, *TPO* et *TSHr* s'expriment au niveau des lobes thyroïdiens à tous les stades analysés (E14.5, E15.5 et E18.5 pour *Tg* et *TPO*; E15.5 et E18.5 pour *TSHr*).

Bien que, qualitativement, le profil d'expression des gènes spécifiques à la fonction thyroïdienne *Tg*, *TPO* et *TSHr* ne soit pas affecté par l'absence de la fonction *Hoxa5*, les niveaux d'expression des gènes *Tg* et *TPO* sont modifiés chez certains embryons homozygotes mutants à différents stades du développement. La Figure 3.10 permet en effet de constater que les niveaux d'expression du gène *Tg* sont augmentés chez les embryons homozygotes mutants aux stades E14.5 et E15.5, alors que les niveaux d'expression du gène *TPO* sont légèrement diminués chez ces embryons au stade E18.5. Les niveaux d'expression du gène *TSHr* ne semblent pas être affectés par l'absence de la fonction *Hoxa5* (Figure 3.10).

Afin de quantifier les différences de niveaux d'expression des gènes spécifiques à la fonction thyroïdienne observées chez les embryons homozygotes mutants pour la fonction *Hoxa5*, un dénombrement des grains d'argent par cellule a été effectué chez les embryons de type sauvage et homozygotes mutants à différents stades du développement (Tableau 3.5).

Les résultats présentés au Tableau 3.5A confirment l'augmentation des niveaux d'expression du gène *Tg* observée chez les embryons homozygotes mutants aux stades E14.5 et E15.5 (Figure 3.10). En effet, une augmentation globale et significative de 43% est observée chez les embryons homozygotes mutants à 14.5 jours de gestation; au stade E15.5, l'augmentation des niveaux d'expression du gène *Tg* est de 97%. Aucune différence significative n'est observée chez les embryons homozygotes mutants à 18.5 jours de gestation.

Les résultats présentés au Tableau 3.5B confirment la diminution des niveaux d'expression du gène *TPO* observée chez les embryons homozygotes mutants au stade E18.5 (Figure 3.10). En effet, une diminution globale et significative de 37% est observée chez les embryons homozygotes mutants à 18.5 jours de gestation. Aucune différence significative n'est observée chez les embryons homozygotes mutants à 15.5 jours de gestation.

Finalement, les résultats présentés au Tableau 3.5C confirment qu'il n'y a aucune différence significative entre les niveaux d'expression du gène *TSHr* chez les embryons de type sauvage et homozygotes mutants aux stades analysés.

En résumé, les résultats obtenus indiquent que l'absence de la fonction *Hoxa5* n'affecte pas le profil d'expression spatio-temporel des gènes spécifiques à la fonction thyroïdienne. Les niveaux d'expression du gène *Tg* sont cependant augmentés de façon importante aux stades E14.5 et E15.5 chez les embryons homozygotes mutants et une diminution des niveaux d'expression du gène *TPO* est notée chez les embryons homozygotes mutants au stade E18.5.

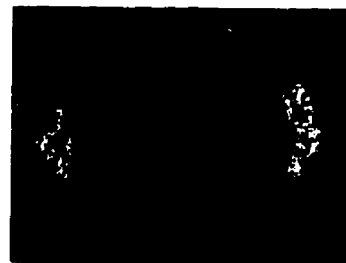
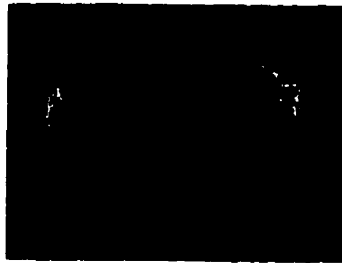
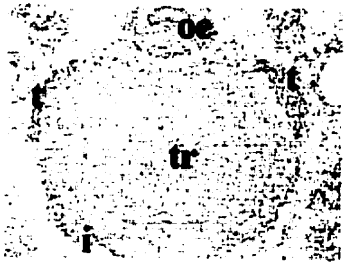
Figure 3.10 Expression des gènes *Tg*, *TPO* et *TSHr* au niveau de la glande thyroïde chez des embryons de type sauvage (+/+) et homozygotes mutants (-/-) pour la fonction *Hoxa5*.

Des sections de la glande thyroïde d'embryons de 14.5, 15.5 et 18.5 jours de gestation ont été hybridées avec les sondes *Tg*, *TPO* et *TSHr*. Les gènes *Tg* et *TPO* s'expriment dans les lobes thyroïdiens dès le stade E14.5, alors que l'expression du gène *TSHr* au niveau des lobes commence au stade E15.5 chez les embryons de type sauvage et homozygotes mutants. Les gènes *Tg*, *TPO* et *TSHr* s'expriment tous dans les lobes thyroïdiens aux stades E14.5 (excepté *TSHr*), E15.5 et E18.5 chez les embryons de type sauvage et homozygotes mutants. Le nombre de souris analysées pour chacun des génotypes aux différents stades présentés est: E14.5: 3 +/+, 6 -/-; E15.5: 2 +/+, 2 -/-; E18.5: 4 +/+, 6 -/- avec la sonde *Tg*; E14.5: 2 +/+, 3 -/-; E15.5: 4 +/+, 5 -/-; E18.5: 4 +/+, 4 -/- avec la sonde *TPO*; E14.5: 4 +/+, 5 -/-; E15.5: 3 +/+, 4 -/-; E18.5: 4 +/+, 5 -/- avec la sonde *TSHr*. Les spécimens présentés sur la figure sont représentatifs de l'ensemble des embryons analysés. t: glande thyroïde; i: isthme; tr: trachée; oe: oesophage. Grossissement total: 100X (E14.5) et 200X (E15.5 et E18.5).

E14.5

+/+

-/-



Tg



TPO

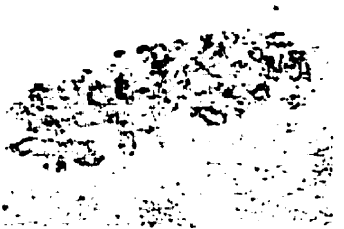


TSHr

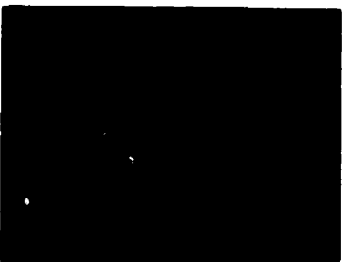
E15.5

+/+

-/-



Tg



TPO

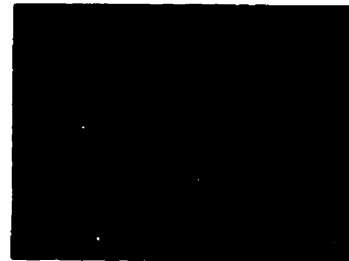
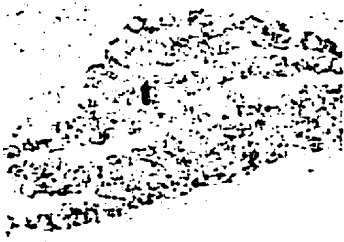


TSHr

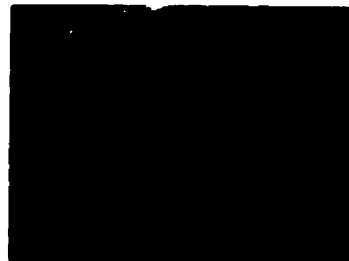
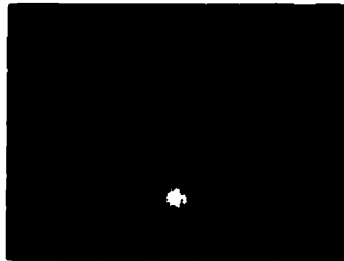
E18.5

+/+

-/-



Tg



TPO



TSHr

Tableau 3.5 Niveaux d'expression des gènes *Tg*, *TPO* et *TSHr* au niveau de la glande thyroïde chez des embryons de type sauvage (+/+) et homozygotes mutants (-/-) pour la fonction *Hoxa5*.

Un dénombrement des grains d'argent par cellule a été réalisé afin de quantifier les niveaux d'expression des gènes *Tg*, *TPO* et *TSHr* au niveau de la glande thyroïde chez des embryons de type sauvage et homozygotes mutants. (A) Niveaux d'expression du gène *Tg* chez des embryons de 14.5, 15.5 et 18.5 jours de gestation. Les niveaux d'expression du gène *Tg* sont augmentés chez les embryons homozygotes mutants aux stades E14.5 et E15.5 ($p < 0,05$). (B) Niveaux d'expression du gène *TPO* chez des embryons de 15.5 et 18.5 jours de gestation. Les niveaux d'expression du gène *TPO* sont diminués chez les embryons homozygotes mutants au stade E18.5 ($p < 0,05$). (C) Niveaux d'expression du gène *TSHr* chez des embryons de 15.5 et 18.5 jours de gestation. Les niveaux d'expression du gène *TSHr* sont normaux chez les embryons homozygotes mutants aux stades E15.5 et E18.5 ($p > 0,05$). Les valeurs présentées dans les zones grises correspondent à la moyenne \pm l'écart-type pour l'ensemble des embryons de type sauvage et homozygotes mutants analysés; les valeurs présentées dans les zones blanches correspondent à la moyenne \pm l'écart-type pour chacun des embryons homozygotes mutants analysés. Le nombre de souris analysées pour chacun des génotypes est indiqué entre parenthèses. E: embryonnaire; sign.: significatif.

A

<i>Tg</i>				
Grains d'argent par cellule				
	+/+	-/-	% Changement	Valeur p
E14.5	3,7 ± 1,3	5,3 ± 3,2	↑ 43%	p = 0,04
	(n = 3)	(n = 6)		(sign.)
		1,4 ± 0,6	↓ 62%	p > 0,05
		3,9 ± 0,6	↑ 5%	p > 0,05
		3,9 ± 1,6	↑ 5%	p > 0,05
		5,3 ± 1,6	↑ 43%	p > 0,05
		7,3 ± 3,4	↑ 97%	p < 0,01
		10,0 ± 1,0	↑ 170%	p < 0,01
E15.5	3,6 ± 1,5	7,1 ± 3,5	↑ 97%	p = 0,03
	(n = 2)	(n = 2)		(sign.)
		4,1 ± 1,7	↑ 14%	p > 0,05
		10,1 ± 1,5	↑ 181%	p < 0,01
E18.5	11,5 ± 6,5	10,8 ± 5,2	↓ 6%	p = 0,69
	(n = 4)	(n = 6)		(non sign.)
		6,3 ± 1,1	↓ 45%	p > 0,05
		7,9 ± 2,1	↓ 31%	p > 0,05
		9,5 ± 3,5	↓ 17%	p > 0,05
		10,2 ± 5,3	↓ 11%	p > 0,05
		11,6 ± 4,7	↑ 1%	p > 0,05
		18,4 ± 4,3	↑ 60%	p > 0,05

B

<i>TPO</i>				
Grains d'argent par cellule				
	+/+	-/-	% Changement	Valeur p
E15.5	$8,8 \pm 6,2$	$5,6 \pm 3,1$	↓ 36%	p = 0,08
	(n = 4)	(n = 5)		(non sign.)
		$2,3 \pm 0,7$	↓ 74%	p > 0,05
		$4,9 \pm 3,2$	↓ 44%	p > 0,05
		$5,2 \pm 2,7$	↓ 41%	p > 0,05
		$7,6 \pm 3,4$	↓ 14%	p > 0,05
E18.5	$5,9 \pm 1,6$	$3,7 \pm 1,2$	↓ 37%	p = 0,0001
	(n = 4)	(n = 4)		(sign.)
		$2,3 \pm 0,6$	↓ 61%	p < 0,01
		$3,0 \pm 0,5$	↓ 49%	p < 0,01
		$4,3 \pm 0,8$	↓ 27%	p > 0,05
		$4,8 \pm 0,6$	↓ 19%	p > 0,05

C

<i>TSHr</i>				
Grains d'argent par cellule				
	+/+	-/-	% Changement	Valeur p
E15.5	5,8 ± 0,8	5,3 ± 2,5	↓ 9%	p = 51
	(n = 3)	(n = 4)		(non sign.)
		3,2 ± 1,1	↓ 45%	p > 0,05
		5,0 ± 0,6	↓ 14%	p > 0,05
		6,5 ± 3,7	↑ 12%	p > 0,05
		7,0 ± 2,2	↑ 21%	p > 0,05
E18.5	3,5 ± 1,6	2,9 ± 0,8	↓ 17%	p = 24
	(n = 4)	(n = 5)		(non sign.)
		2,2 ± 0,5	↓ 37%	p > 0,05
		2,7 ± 0,6	↓ 23%	p > 0,05
		3,2 ± 0,8	↓ 9%	p > 0,05
		3,3 ± 0,6	↓ 6%	p > 0,05
		3,3 ± 0,9	↓ 6%	p > 0,05

Chapitre 4

Discussion et Conclusion

Les gènes *Hox* des mammifères, tout comme les gènes homéotiques de la drosophile, sont essentiels au développement normal de l'embryon. Bien que ces gènes soient principalement connus pour le rôle capital qu'ils exercent dans la spécification du squelette (revue par Stein et al., 1996), leur implication dans la formation des organes est de plus en plus reconnue. On sait, entre autres, que le gène *Hoxa5* est nécessaire à l'organogenèse des systèmes respiratoire et digestif (Aubin et al., 1997; 1999; J. Aubin et L. Jeannotte, données non publiées) et que l'absence du gène *Hoxa3* perturbe le développement de différents organes glandulaires (Manley et Capecchi, 1995).

Les organes affectés par l'absence des gènes *Hox* sont généralement ceux au niveau desquels ces gènes s'expriment normalement. Les phénotypes observés au niveau des systèmes respiratoire et digestif chez les souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5*, par exemple, coïncident avec le profil d'expression de ce gène au cours du développement (Dony et Gruss, 1987; Gaunt et al., 1988; Aubin et al., 1997; 1999; J. Aubin et L. Jeannotte, données non publiées). Cependant, bien qu'un lien existe entre le profil d'expression spatial des gènes *Hox* et les organes affectés par leur absence, les mécanismes

moléculaires et cellulaires permettant à ces gènes d'exercer leur action sur le développement des organes ne sont pas encore bien compris. Des travaux réalisés dans notre laboratoire suggèrent toutefois que le gène *Hoxa5* agirait sur le développement des systèmes respiratoire et digestif via des interactions mésenchyme-épithélium (Aubin et al., 1997; 1999; J. Aubin et L. Jeannotte, données non publiées). Les travaux effectués par Manley et Capecchi (1995) suggèrent quant à eux que le gène *Hoxa3* agirait sur le développement des organes dérivés des cellules de la crête neurale en stimulant la différenciation de ces cellules et/ou en induisant la différenciation des tissus adjacents à ces cellules.

Au cours de la présente étude, les conséquences de l'absence de la fonction *Hoxa5* sur le développement de la glande thyroïde ont été analysées. Bien que l'expression du gène *Hoxa5* au niveau de la glande thyroïde n'ait jamais été rapportée, l'étude de cet organe présentait un grand intérêt puisque les phénotypes post-natals observés chez les souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5* sont caractéristiques de l'hypothyroïdie chez la souris (Beamer et al., 1981; Adams et al., 1989; Wallace et al., 1995).

4.1 Les souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5* et l'hypothyroïdie

Les phénotypes post-natals de retard de croissance et de délai dans l'ouverture des yeux et l'élévation des oreilles observés chez les souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5* sont similaires à ceux observés chez les souris *hyt/hyt* souffrant d'hypothyroïdie congénitale (Beamer et al., 1981; Adams et al., 1989) et chez les souris transgéniques TG66-19 présentant une déficience en T₄ (Wallace et al., 1995). Ces résultats suggèrent donc que l'absence de la fonction *Hoxa5* pourrait entraîner une hypothyroïdie chez les souris homozygotes mutantes.

Chez tous les vertébrés, les hormones thyroïdiennes sont essentielles à la croissance et au développement de l'organisme, et leur absence peut entraîner la stérilité chez l'adulte. Plusieurs études effectuées chez l'homme et d'autres espèces ont démontré que les hormones thyroïdiennes maternelles influencent le développement des embryons et des nouveaux-nés. Ces hormones peuvent en effet passer de la mère à l'embryon avant et après

le développement de la barrière placentaire (Morreale de Escobar et al., 1985; Morreale de Escobar et al., 1989; Vulsma et al., 1989; Costa et al., 1991) et on les retrouve aussi dans le lait maternel (Strbak et al, 1983). De plus, les travaux réalisés par Wallace et al. (1995) ont permis de montrer que le développement des souriceaux est contrôlé par les hormones thyroïdiennes de la mère au cours des dix premiers jours après la naissance, alors qu'il est dominé par les hormones thyroïdiennes des souriceaux à partir du onzième jour après la naissance, même si ces derniers se nourrissent encore principalement de lait maternel. Ces résultats expliquent pourquoi la croissance des souriceaux transgéniques TG66-19 issus de mères non déficientes en T_4 est retardée seulement à partir de la troisième semaine après la naissance (Wallace et al., 1995). Le retard de croissance observé chez les souriceaux homozygotes mutants pour la fonction *Hoxa5* apparaît aussi vers la troisième semaine après la naissance; les niveaux sériques de T_4 dosés chez ces souriceaux sont cependant normaux tout au long du développement post-natal. Toutefois, puisque les souriceaux se nourrissent encore de lait maternel au moment où le retard de croissance apparaît, il est possible que les niveaux sériques de T_4 mesurés dix-sept jours après la naissance soient masqués par la T_4 de la mère. Ainsi, de faibles diminutions des niveaux sériques de la T_4 produite par les souriceaux homozygotes mutants pour la fonction *Hoxa5* pourraient ne pas être détectées par la méthode de dosage utilisée, mais pourraient tout de même avoir des conséquences sur la physiologie de l'animal.

Puisque les hormones thyroïdiennes de la mère n'ont plus d'effet sur le développement des souriceaux à partir du onzième jour après la naissance, l'ouverture des yeux et l'élévation des oreilles, qui se produisent normalement pendant la troisième semaine après la naissance, sont uniquement influencées par les hormones thyroïdiennes des souriceaux (Wallace et al, 1995). Il est intéressant de noter que le délai dans l'ouverture des yeux observé chez les souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5* est plus important que celui observé chez les souris *hyt/hyt* et TG66-19. L'absence de la fonction *Hoxa5* entraîne en effet un délai de 7 jours dans l'ouverture des yeux des souris homozygotes mutantes alors que des délais de 3,2 et 5,2 jours sont notés chez les souris *hyt/hyt* et TG66-19 respectivement (Adams et al, 1989; Wallace et al., 1995). Le retard dans l'élévation des oreilles est cependant beaucoup moins prononcé chez les souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5* (1,5 jour) que chez les souris *hyt/hyt* (5,4 jours; Adams et al, 1989) et TG66-19 (plus de 3 jours; Wallace et al., 1995) Ces données suggèrent que d'autres gènes impliqués spécifiquement dans les processus d'ouverture des yeux et/ou d'élévation

des oreilles pourraient être affectés de façon différente par l'absence de la fonction *Hoxa5*, modulant ainsi l'expressivité de chaque phénotype.

En plus d'influencer la croissance globale de l'organisme, les hormones thyroïdiennes sont essentielles au développement des systèmes nerveux et musculaire. Une déficience en T_4 et T_3 peut donc entraîner de graves retards neuromoteurs chez l'enfant. Un ralentissement des réflexes neuromoteurs est également observé chez les souris *hyt/hyt* et chez les souris transgéniques TG66-19 (Adams et al., 1989; Wallace et al., 1995). Bien qu'au cours de la présente étude l'évaluation des réflexes neuromoteurs des souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5* n'ait pas donné de résultats concluants, les observations faites pendant les tests montrent que ces souris sont plus léthargiques que les souris hétérozygotes et de type sauvage. Ces observations, bien que qualitatives, laissent supposer que le développement neuromoteur des souris homozygotes mutantes est légèrement affecté par l'absence de la fonction *Hoxa5*. Une analyse effectuée dans des conditions plus adéquates serait cependant essentielle pour confirmer cette hypothèse.

Les dérèglements de la fonction thyroïdienne s'accompagnent généralement de niveaux anormaux d'hormones thyroïdiennes et de TSH. Tant chez l'homme que chez la souris, l'hypothyroïdie est caractérisée par de faibles niveaux sériques de T_4 et T_3 et une augmentation conséquente des niveaux sériques de TSH (Berne et Levy, 1988). Les résultats obtenus au cours de la présente étude indiquent que les niveaux sériques de T_4 sont normaux chez les souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5* au cours du développement post-natal et à l'âge adulte, ce qui ne correspond pas à la définition de l'hypothyroïdie. En fait, la présence de quantités normales d'hormones thyroïdiennes chez les souris homozygotes mutantes adultes n'est pas surprenante puisque ces souris sont fertiles. De plus, bien que l'augmentation transitoire des niveaux de TSH observée chez les souris homozygotes mutantes 15 jours après la naissance suggère un dysfonctionnement temporaire de la glande thyroïde, le petit nombre de souris analysées (5 souris de type sauvage et 3 souris homozygotes mutantes) et le faible taux d'augmentation mesuré (1,5 fois comparativement à 30 fois chez les souris *hyt/hyt*) nous obligent à remettre en question cette hypothèse. Cependant, si les souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5* ne souffrent pas d'hypothyroïdie, d'autres causes doivent être envisagées afin d'expliquer les phénotypes post-natals observés chez ces souris.

Il est connu que le facteur de croissance épidermique (EGF) accélère l'ouverture des yeux lorsqu'il est injecté à des souriceaux dès la naissance (Cohen, 1962). Ce facteur de croissance, que l'on retrouve entre autres dans la salive, le plasma et le lait, est produit principalement par les glandes submandibulaires, un type de glandes salivaires (Cohen, 1962). Chez les souris hétérozygotes et homozygotes mutantes pour le gène *Tabby*, un gène lié au chromosome X, le nombre de cellules productrices de EGF au niveau des glandes submandibulaires est réduit; plusieurs des phénotypes observés chez ces souris sont d'ailleurs associés à des organes cibles de EGF (Blecher et al., 1982; Blecher et al., 1983). De plus, les travaux réalisés par Kapalanga et Blecher (1990) montrent que l'absence du gène *Tabby* entraîne un délai dans l'ouverture des yeux des souris hétérozygotes et homozygotes mutantes. Ce délai peut être renversé par l'administration de EGF exogène, ce qui suggère que le gène *Tabby* exercerait son action en influençant la production ou le métabolisme de EGF (Kapalanga et Blecher, 1990). Une analyse histologique comparative des glandes salivaires d'embryons de type sauvage et homozygotes mutants pour la fonction *Hoxa5* à 14.5 et 18.5 jours de gestation n'a cependant montré aucune différence au niveau des glandes submandibulaires en développement (T. Jaskoll, J. Aubin et L. Jeannotte, données non publiés). Le gène *Tabby* et le facteur de croissance épidermique ne semblent donc pas être en cause dans le phénotype de retard d'ouverture des yeux observés chez les souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5*. Une analyse plus détaillée de la production de EGF par les glandes submandibulaires devrait cependant être réalisée afin de confirmer ces résultats préliminaires; la présence de EGF au niveau des yeux devrait aussi être vérifiée. Les résultats obtenus au cours des présents travaux ont également permis d'éliminer la possibilité d'un effet direct du gène *Hoxa5* sur l'ouverture des yeux et l'élévation des oreilles, puisque ce gène ne s'exprime pas au niveau de ces structures au cours du développement.

On sait que le gène *Hoxa5* s'exprime dans le mésenchyme de l'estomac et des intestins au cours du développement embryonnaire (Dony et Gruss, 1987; Aubin et al., 1999; J. Aubin et L. Jeannotte, données non publiées) et que son absence perturbe la maturation morphologique et fonctionnelle de ces organes (Aubin et al., 1999; J. Aubin et L. Jeannotte, données non publiées). Les travaux réalisés dans le laboratoire ont entre autres permis de mettre en évidence un délai de deux jours dans l'acquisition du mode de nutrition adulte au moment du sevrage (J15) chez les souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5* (Aubin et al., 1999). Il est donc possible que le retard de croissance observé chez les souris

homozygotes mutantes entre les jours 13 et 35 après la naissance soit en partie dû à des problèmes de maturation du système digestif. Des retards de croissance accompagnés de délais dans la maturation des intestins sont également observés chez les souris homozygotes mutantes pour le gène *TR α* (Fraichard et al., 1997; Gauthier et al., 1999) et chez les souris homozygotes mutantes pour les gènes *TR α* et *TR β* (Gauthier et al., 1999; Göthe et al., 1999). Les mutations de ces gènes codant pour les récepteurs nucléaires d'hormones thyroïdiennes s'accompagnent cependant de niveaux anormaux d'hormones thyroïdiennes et de TSH (Fraichard et al., 1997; Gauthier et al., 1999; Göthe et al., 1999). Il est donc peu probable que ces gènes soient totalement non fonctionnels chez les souris homozygotes pour la fonction *Hoxa5*. Il est cependant possible que leur expression soit légèrement affectée par l'absence du gène *Hoxa5*, ce qui pourrait expliquer en partie le retard de croissance et le délai dans la maturation des intestins observés chez les souris homozygotes mutantes. Des expériences d'hybridation *in situ* seront d'ailleurs réalisées prochainement dans le laboratoire afin de déterminer si le profil d'expression spatio-temporel et/ou le niveau d'expression des gènes codant pour les récepteurs nucléaires d'hormones thyroïdiennes sont modifiés chez les souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5*.

Ainsi, l'hypothyroïdie ne semble pas être la seule cause permettant d'expliquer le retard de croissance observé chez les souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5*. Toutefois, jusqu'à présent, une déficience en hormones thyroïdiennes demeure la seule explication possible pour les phénotypes de délai dans l'ouverture des yeux et l'élévation des oreilles observés chez ces souris. Puisque les niveaux sériques de T₄ et TSH sont relativement normaux chez les souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5* au cours du développement post-natal et à l'âge adulte, l'hypothèse la plus plausible est que ces souris souffrent d'une hypothyroïdie transitoire au cours du développement embryonnaire et/ou au moment de la naissance. Cette hypothèse ne peut cependant pas être vérifiée puisque les méthodes de dosage disponibles à l'heure actuelle ne sont pas assez sensibles pour détecter les très faibles niveaux sériques de T₄ et TSH présents chez les embryons et les nouveaux-nés. Les anomalies observées au niveau de la glande thyroïde des embryons homozygotes mutants pour la fonction *Hoxa5* dans les jours précédant la naissance appuient cependant l'hypothèse d'un dysfonctionnement temporaire de la glande thyroïde.

4.2 La morphogenèse de la glande thyroïde est perturbée par l'absence de la fonction *Hoxa5*

Les résultats obtenus au cours de la présente étude indiquent que l'absence de la fonction *Hoxa5* affecte le développement et l'organisation structurale de la glande thyroïde de façon transitoire au cours des derniers stades du développement embryonnaire. En effet, une désorganisation de la structure des follicules thyroïdiens est observée chez les embryons homozygotes mutants entre les jours 16.5 et 18.5 de gestation. De plus, plusieurs follicules ne contenant ni thyroglobuline ni colloïde sont détectés chez ces embryons aux stades E17.5 et E18.5. Des tests d'apoptose réalisés dans le laboratoire montrent également qu'il y a plus de cellules en apoptose dans la région de la glande thyroïde chez les embryons homozygotes mutants que chez les embryons de type sauvage à 18.5 jours de gestation (J. Aubin, données non publiées). Ces résultats sont très intéressants puisqu'ils appuient l'hypothèse d'un dysfonctionnement temporaire de la glande thyroïde causé par l'absence de la fonction *Hoxa5*.

Il est également intéressant de noter qu'une désorganisation des follicules est aussi observée chez les souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa3* à la naissance (Manley et Capecchi, 1995), chez les souris *hyt/hyt* dès les derniers stades du développement embryonnaire et à l'âge adulte (Beamer et al., 1981; Beamer et al., 1982; Stein et al., 1989) et chez les souris homozygotes mutantes pour le gène *TR α* trois semaines après la naissance (Fraichard et al., 1997; Gauthier et al., 1999). La désorganisation des follicules chez toutes ces souris s'accompagne cependant d'une hypoplasie importante de la glande thyroïde, une situation qui n'est pas observée chez les souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5*. De plus, les follicules thyroïdiens présents chez les souris *hyt/hyt* et chez les souris homozygotes mutantes pour le gène *TR α* sont plus petits que ceux retrouvés chez les souris de type sauvage, alors que chez les souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5*, la taille des follicules est relativement normale jusqu'au trentième jour après la naissance. Bien que la diminution du diamètre des follicules observée à ce stade soit significative, ces résultats doivent être considérés avec prudence compte tenu du petit nombre de souris analysées (2 souris de type sauvage et 4 souris homozygotes mutantes). Quoi qu'il en soit, il est clair que l'absence de la fonction *Hoxa5* perturbe la morphogenèse de la glande thyroïde au cours des derniers stades du développement embryonnaire et que certaines anomalies observées chez les embryons homozygotes mutants sont similaires à

celles observées chez d'autres souris souffrant d'hypothyroïdie. Il est donc possible que l'absence du gène *Hoxa5* perturbe la morphogenèse de la glande thyroïde via une cascade moléculaire commune aux gènes *Hoxa3*, *TSHr* (le gène muté chez les souris *hyt/hyt*) et/ou *TRα*.

Bien qu'une désorganisation temporaire de la glande thyroïde soit observée chez les embryons homozygotes mutants pour la fonction *Hoxa5* à la fin de la gestation, les premières phases du développement de la glande thyroïde se déroulent normalement chez ces embryons. Les résultats obtenus au cours de la présente étude montrent en effet que les cellules formant le diverticulum thyroïdien sont présentes au niveau du plancher du pharynx dès le jour 9.5 de gestation chez les embryons homozygotes mutants. De plus, la migration du diverticulum thyroïdien et des corps ultimobranchiaux ainsi que la fusion des thyrocytes et des cellules C se produisent normalement chez ces embryons. Il est donc peu probable que le gène *Hoxa3* soit en cause dans les phénotypes observés chez les souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5*. Les expériences d'hybridation *in situ* réalisées au cours de la présente étude indiquent d'ailleurs que le profil et les niveaux d'expression du gène *Hoxa3* dans la région de la glande thyroïde ne sont pas affectés par l'absence de la fonction *Hoxa5*.

La perte de la fonction *Hoxa5* ne semble pas non plus affecter la production des protéines nécessaires à la fonction thyroïdienne, c'est-à-dire la thyroglobuline, la calcitonine et la thyroxine. Ces protéines commencent en effet à être produites au même moment et en quantités équivalentes chez les embryons de type sauvage et homozygotes mutants pour la fonction *Hoxa5*. La localisation de la thyroglobuline est cependant incorrecte chez les embryons homozygotes mutants à 17.5 et 18.5 jours de gestation; la thyroglobuline produite à ces stades reste en effet localisée au niveau des thyrocytes et ne se retrouve pas à l'intérieur des follicules thyroïdiens. Ces résultats suggèrent que l'absence de la fonction *Hoxa5* perturbe temporairement le transport de la thyroglobuline de son site de synthèse vers son site d'entreposage. De façon surprenante, l'absence de thyroglobuline dans les follicules thyroïdiens aux stades E17.5 et E18.5 ne semble pas affecter la production de thyroxine, suggérant ainsi que la transformation de la thyroglobuline en thyroxine est normale chez les embryons homozygotes mutants pour la fonction *Hoxa5*. Une diminution des niveaux d'expression du gène *TPO* qui code pour la thyroperoxydase, une enzyme impliquée dans toutes les étapes de la synthèse des hormones thyroïdiennes (section

1.4.1.1), est pourtant observée chez les embryons homozygotes mutants à 18.5 jours de gestation. Cette diminution ne semble cependant pas suffisante pour perturber de façon détectable la production des hormones thyroïdiennes. Quoi qu'il en soit, la présence de thyroxine dans les follicules thyroïdiens chez les souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5* au cours du développement embryonnaire et post-natal est en accord avec les résultats obtenus lors des dosages.

En résumé, l'absence de la fonction *Hoxa5* perturbe transitoirement la morphogenèse de la glande thyroïde, appuyant ainsi l'hypothèse d'un dysfonctionnement temporaire de cet organe au cours des derniers stades du développement embryonnaire. L'expression de certains gènes nécessaires au développement et à la fonction thyroïdiennes est d'ailleurs affectée par l'absence de la fonction *Hoxa5* à des stades embryonnaires bien précis.

4.3 Le gène *Hoxa5* s'exprime dans la région de la glande thyroïde au cours du développement embryonnaire de la souris

Les expériences d'hybridation *in situ* réalisées au cours de la présente étude montrent que le gène *Hoxa5* ne s'exprime pas directement dans la glande thyroïde au cours du développement embryonnaire de la souris, mais plutôt dans le mésenchyme entourant les lobes et l'isthme thyroïdiens. Ces expériences révèlent également que l'expression de ce gène au niveau de la glande thyroïde est spécifique au transcrite de 1.8 kb codant pour la protéine HOXA5, puisque les trois longs transcrits du gène ne s'expriment pas dans cette région.

Ces résultats sont très intéressants pour plusieurs raisons. Tout d'abord, l'expression spécifique du transcrite de 1.8 kb dans la région antérieure de la colonne prévertébrale ainsi que dans le mésenchyme des poumons, de la trachée et du larynx a déjà été rapportée (Aubin et al., 1998). De plus, la plupart des phénotypes observés chez les souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5* – transformations homéotiques dans la région cervicothoracique du squelette axial, malformations des voies respiratoires – sont associés à des régions ou à des structures exprimant uniquement le transcrite de 1.8 kb (Aubin et al., 1998). Ces résultats ainsi que ceux obtenus au cours de la présente étude

appuient l'hypothèse d'un rôle unique pour le transcrit de 1.8 kb au cours du développement embryonnaire de la souris.

Différentes études réalisées dans le laboratoire suggèrent que le gène *Hoxa5* agirait sur le développement des systèmes respiratoire et digestif de façon indirecte, via des interactions mésenchyme-épithélium (Aubin et al., 1997; 1999; J. Aubin et L. Jeannotte, données non publiées). Il est donc très intéressant de constater que le gène *Hoxa5* ne s'exprime pas directement dans la glande thyroïde contrairement aux gènes *TTF-1*, *TTF-2*, *Pax-8*, *Tg*, *TPO* et *TSHr* (Plachov et al., 1990; Lazzaro et al., 1991; Zannini et al., 1997), mais plutôt dans le mésenchyme entourant les lobes et l'isthme thyroïdiens. Ces résultats suggèrent en effet que le développement de la glande thyroïde, tout comme celui des systèmes respiratoire et digestif, serait influencé de façon indirecte par le gène *Hoxa5*.

4.4 Les niveaux d'expression de certains gènes impliqués dans le développement et la fonction thyroïdiennes sont affectés par l'absence du gène *Hoxa5*

En tant que facteur de transcription, la protéine HOXA5 peut agir sur l'expression de différents gènes régulateurs et effecteurs impliqués dans les processus développementaux. Des travaux réalisés dans le laboratoire ont d'ailleurs permis d'identifier quelques gènes effecteurs potentiels du facteur HOXA5. L'absence de la fonction *Hoxa5* perturbe en effet l'expression des gènes *TTF-1*, *HNF-3 β* et *N-myc* au niveau de l'épithélium pulmonaire chez les embryons homozygotes mutants (Aubin et al., 1997). Les expériences d'hybridation *in situ* réalisées au cours de la présente étude indiquent que le profil d'expression spatio-temporel des gènes régulateurs *TTF-1*, *TTF-2* et *Pax-8* et des gènes spécifiques à la fonction thyroïdienne *Tg*, *TPO* et *TSHr* n'est pas affecté par l'absence de la fonction *Hoxa5*. Cependant, chez les embryons homozygotes mutants, les niveaux d'expression des gènes *TTF-1* et *TTF-2* sont diminués aux stades E9.5 et E14.5 et sont augmentés à partir du stade E15.5, alors que les niveaux d'expression du gène *Pax-8* diminuent à partir du stade E14.5. De plus, les niveaux d'expression du gène *Tg* sont augmentés de façon importante aux stades E14.5 et E15.5 et une diminution des niveaux d'expression du gène *TPO* est notée au stade E18.5. La Figure 4.1 présente les interactions moléculaires entre le gène *Hoxa5* et les gènes *TTF-1*, *TTF-2* et *Pax-8* qui peuvent être déduites des résultats obtenus au cours de la

présente étude; cette figure est basée sur les résultats obtenus à partir du jour 15.5 de gestation.

Les gènes régulateurs *TTF-1*, *TTF-2* et *Pax-8* sont essentiels au développement normal de la glande thyroïde et leur absence entraîne une localisation inappropriée ou une absence complète de la glande thyroïde chez les souris homozygotes mutantes (Kimura et al., 1996; De Felice et al., 1998; Mansouri et al., 1998). Bien qu'une diminution des niveaux d'expression des gènes *TTF-1* et *TTF-2* soit observée chez les embryons homozygotes mutants pour la fonction *Hoxa5* à 9.5 jours de gestation, celle-ci ne semble pas suffisante pour perturber les premiers stades du développement de la glande thyroïde. En effet, des phénotypes thyroïdiens aussi sévères que ceux observés chez les souris homozygotes mutantes pour les gènes *TTF-1*, *TTF-2* ou *Pax-8* ne sont jamais notés chez les souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5*. Il serait toutefois intéressant de générer des souris hétérozygotes à la fois pour les gènes *TTF-1* et *TTF-2* afin de comparer les phénotypes thyroïdiens entraînés par cette double mutation à ceux observés chez les souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5*. Les modifications des niveaux d'expression des gènes *TTF-1*, *TTF-2*, *Pax-8*, *Tg* et *TPO* notées aux stades E14.5, E15.5 et E18.5 pourraient cependant expliquer les anomalies morphologiques observées au niveau de la glande thyroïde au cours des derniers stades du développement chez les embryons homozygotes mutants pour la fonction *Hoxa5*. Il est particulièrement intéressant de noter la diminution des niveaux d'expression des gènes *Pax-8* et *TPO* et l'importante augmentation des niveaux d'expression du gène *TTF-2* chez les embryons homozygotes mutants à 18.5 jours de gestation, soit au moment où les anomalies les plus évidentes sont observées au niveau de la glande thyroïde. De plus, considérant que la mutation du gène *NIS* entraîne une incapacité de la glande thyroïde à accumuler les ions iodures, il serait également intéressant de vérifier l'expression de ce gène chez les embryons homozygotes mutants pour la fonction *Hoxa5*.

Les résultats obtenus au cours de la présente étude indiquent que les niveaux d'expression du gène *Tg* sont très élevés chez certains embryons homozygotes mutants pour la fonction *Hoxa5* à 14.5 jours de gestation. À première vue, ces résultats sont plutôt surprenants compte tenu de la diminution des niveaux d'expression des gènes *TTF-1*, *TTF-2* et *Pax-8* observée chez certains embryons homozygotes mutants au même stade. En effet, ces gènes régulateurs sont connus pour activer *in vitro* la transcription du gène *Tg* (Civitareale et al.,

1989; Sinclair et al., 1990; Zannini et al., 1992; Fabbro et al., 1998). Des travaux récents suggèrent cependant que l'accumulation de thyroglobuline dans le lumen des follicules thyroïdiens pourrait exercer un effet rétro-inhibiteur sur la transcription des gènes impliqués dans la régulation et la fonction thyroïdiennes (Suzuki et al., 1998b). La surexpression du gène *Tg* chez les embryons homozygotes mutants pour la fonction *Hoxa5* à 14.5 jours de gestation pourrait donc expliquer la diminution des niveaux d'expression des gènes *TTF-1*, *TTF-2* et *Pax-8* observée au même stade.

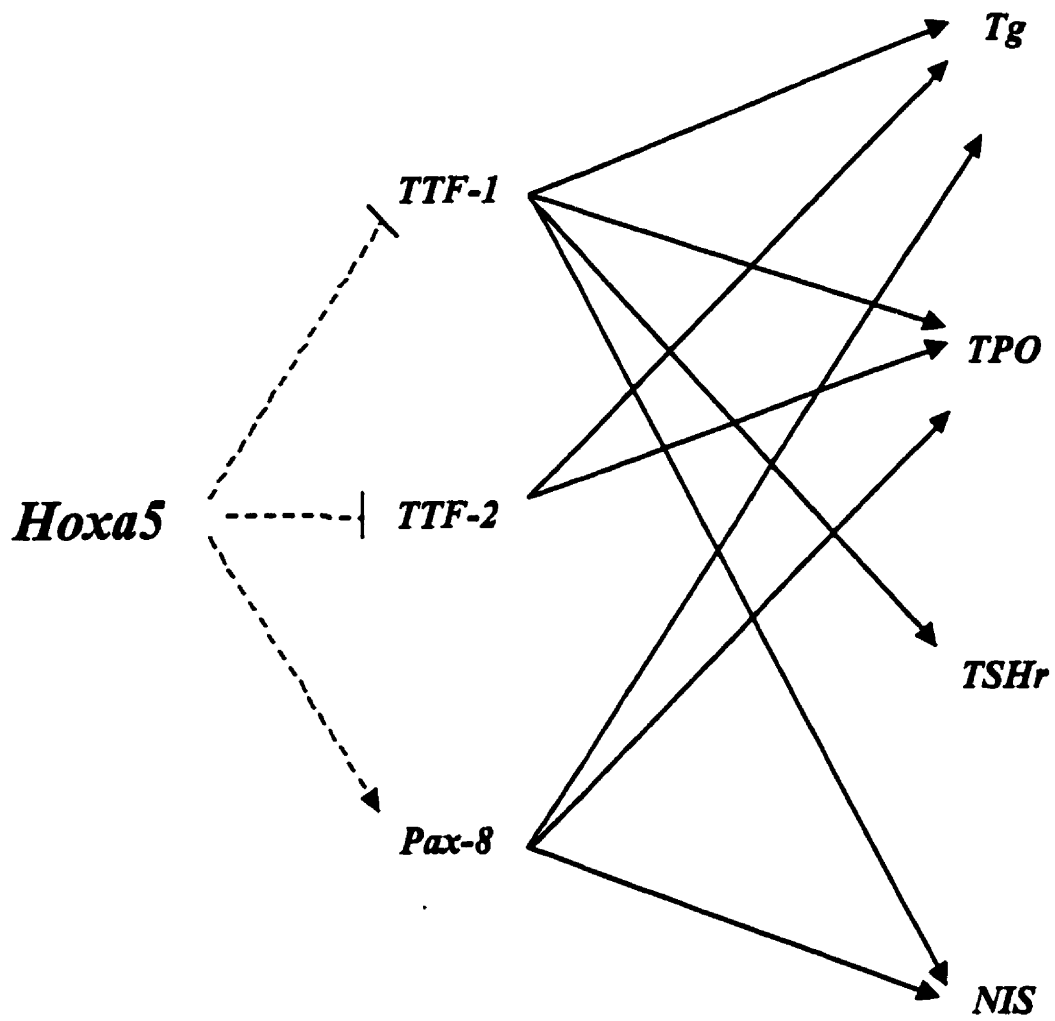
Le rôle du facteur TTF-2, en tant que régulateur négatif de l'expression des gènes *Tg* et *TPO* tel que proposé par Zannini et al. (1997; Figure 1.4), est remis en question par les résultats obtenus au cours de la présente étude. L'expression du gène *TTF-2* au niveau de la glande thyroïde est en effet détectée de façon continue tout au long du développement embryonnaire et post-natal chez les souris de type sauvage et homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5*. Ces résultats sont en accord avec les études réalisées *in vitro* indiquant que le facteur TTF-2 est nécessaire à l'activation de la transcription des gènes *Tg* et *TPO* (voir la section 1.6.3; Civitareale et al., 1989; Sinclair et al., 1990; Francis-Lang et al., 1992; Ortiz et al., 1999). Les interactions négatives entre le gène *TTF-2* et les gènes *Tg* et *TPO* (Figure 1.4) ont donc été supprimées sur la Figure 4.1. Considérant que la sonde *TTF-2* utilisée lors des expériences d'hybridation *in situ* réalisées dans notre laboratoire est différente de celle utilisée par Zannini et al. (1997) – elle contient en effet plus de séquences provenant de la région 3'-non traduite du gène *TTF-2* de souris – il est possible que les profils d'expression obtenus soient différents. En effet, les deux sondes reconnaissent peut-être différents transcrits du gène *TTF-2* comme c'est le cas pour les sondes pLJ34 et pLJ36. Cette hypothèse pourrait également expliquer pourquoi l'expression du gène *TTF-2* dans l'épithélium de l'oesophage n'avait pas été détectée par Zannini et al. (1997). Toutefois, l'existence de plusieurs transcrits du gène *TTF-2* n'a jamais été rapportée.

En résumé, plusieurs modifications des niveaux d'expression des différents gènes impliqués dans le développement et la fonction thyroïdiennes sont observées chez les embryons homozygotes mutants pour la fonction *Hoxa5* au cours du développement. L'effet du gène *Hoxa5* sur l'expression des gènes *TTF-1*, *TTF-2*, *Pax-8*, *Tg* et *TPO* varie toutefois en fonction du temps. L'effet combiné de toutes ces hausses et baisses de niveaux d'expression pourrait expliquer les anomalies observées au niveau de la glande thyroïde chez les

embryons homozygotes mutants pour la fonction *Hoxa5* au cours des derniers stades de la gestation.

Figure 4.1 Interactions moléculaires entre le gène *Hoxa5* et les gènes *TTF-1*, *TTF-2* et *Pax-8* au cours du développement de la glande thyroïde.

Les résultats obtenus au cours de la présente étude montrent que le gène *Hoxa5* peut agir sur l'expression des gènes *TTF-1*, *TTF-2* et *Pax-8* au niveau de la glande thyroïde au cours du développement embryonnaire de la souris. Les interactions moléculaires entre le gène *Hoxa5* et les gènes *TTF-1*, *TTF-2* et *Pax-8* présentées sur cette figure sont basées sur les résultats obtenus chez les souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5* à partir du jour 15.5 de gestation. Les interactions négatives entre le gène *TTF-2* et les gènes *Tg* et *TPO* ont été supprimées. Les flèches représentent des interactions positives alors que les traits indiquent des interactions négatives. Les traits pleins indiquent les interactions moléculaires identifiées *in vitro* par d'autres groupes (section 1.6.3 ; Figure 1.4); les traits pointillés indiquent les interactions moléculaires *in vivo* suggérées par les résultats obtenus au cours de la présente étude.



4.5 Conclusion

Les résultats obtenus au cours de la présente étude montrent que le gène *Hoxa5* est nécessaire à la morphogenèse de la glande thyroïde chez la souris. Son absence perturbe en effet de façon transitoire l'organisation structurale de cet organe et affecte l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la régulation et la fonction thyroïdiennes. Cependant, bien que ces résultats appuient l'hypothèse d'un dysfonctionnement temporaire de la glande thyroïde, plusieurs questions demeurent sans réponse. En effet, comment expliquer que toutes les souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5* présentent un retard de croissance et un délai dans l'ouverture des yeux et l'élévation des oreilles, alors que les niveaux d'expression des gènes *TTF-1*, *TTF-2*, *Pax-8*, *Tg* et *TPO* ne sont modifiés, dans la plupart des cas, que chez certains embryons homozygotes mutants? D'autre part, comment une hypothyroïdie transitoire au cours des derniers stades du développement embryonnaire pourrait-elle expliquer les phénotypes post-natals observés chez les souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5* trois semaines après la naissance? Bien sûr, il est possible que le retard de croissance observé chez ces souris soit dû en partie à des problèmes de maturation du système digestif. Toutefois, à la lumière des analyses effectuées au cours de la présente étude, un dysfonctionnement de la glande thyroïde demeure la seule explication possible pour les phénotypes de délai dans l'ouverture des yeux et l'élévation des oreilles observés chez les souris homozygotes mutantes. Ainsi, bien que la glande thyroïde soit un organe simple du point de vue anatomique et physiologique, les interactions moléculaires impliquées dans le développement et la fonction thyroïdiennes semblent très complexes. Ces résultats suggèrent donc que d'autres gènes nécessaires à la régulation et/ou à la fonction thyroïdiennes chez la souris restent à être identifiés, clonés et caractérisés.

De façon intéressante, les résultats obtenus au cours de la présente étude appuient l'hypothèse émise par Aubin et al. (1998) concernant le rôle unique du transcrit de 1.8 kb codant pour la protéine HOXA5 au cours du développement embryonnaire de la souris. De plus, le profil d'expression spatial du gène *Hoxa5* au niveau de la glande thyroïde suggère que le développement de cet organe, tout comme celui des systèmes respiratoire et digestif (Aubin et al., 1997; 1999; J. Aubin et L. Jeannotte, données non publiées) serait influencé de façon indirecte par le gène *Hoxa5*. Enfin, la variabilité des phénotypes thyroïdiens observés chez les embryons et les souris homozygotes mutants pour la fonction *Hoxa5* (âge d'ouverture des yeux et d'élévation des oreilles, présence de follicules ne contenant pas de

colloïde ni de thyroglobuline, niveaux d'expression des gènes impliqués dans la régulation et la fonction thyroïdiennes), reflète le fait que la pénétrance des phénotypes causés par l'absence du gène *Hoxa5* n'est jamais de 100% chez les souris de la souche 129Sv/Ev.

Tous ces résultats montrent donc que le gène *Hoxa5* est nécessaire à la morphogenèse de la glande thyroïde, soulignant ainsi l'importance de ce gène dans le développement des organes glandulaires. Les mécanismes moléculaires par lesquels ce gène exerce son action sur le développement de la glande thyroïde restent toutefois à être élucidés.

Bibliographie

Abramowicz, M.J., Targovnik, H.M., Varela, V., Cochaux, P., Krawiec, L., Pisarev, M.A., Propato, F.V.E., Juvenal, G., Chester, H.A. et Vassart, G. (1992a). Identification of a mutation in the coding sequence of the human thyroid peroxidase gene causing congenital goiter. *Journal of Clinical Investigation* 90, 1200-1204.

Abramowicz, M.J., Vassart, G. et Christophe, D. (1992b). Fonctionnel study of the human thyroid peroxidase gene promoter. *European Journal of Biochemistry* 203, 467-473.

Adams, P.M., Stein, S.A., Palnitkar, M., Anthony, A., Gerrity, L. et Shanklin, D.R. (1989). Evaluation and characterization of the hypothyroid *hyt/hyt* mouse. I: Somatic and behavioural studies. *Neuroendocrinology* 49, 138-143.

Adkison, L.R., Taylor, S. et Beamer, W.G. (1990). Mutant gene-induced disorders of structure, function and thyroglobulin synthesis in congenital goitre (*cog/cog*) in mice. *Journal of Endocrinology* 126, 51-58.

Alvino, C.G., Tassi, V., Paterson, B.M. et Di Lauro, R. (1982). In vitro synthesis of 300 000 M_r rat thyroglobulin subunit. *FEBS Letters* 137, 307-313.

Aubin, J., Lemieux, M., Tremblay, M., Bérard, J. et Jeannotte, L. (1997). Early postnatal lethality in *Hoxa-5* mutant mice is attributable to respiratory tract defects. *Developmental Biology* 192, 432-445.

Aubin, J., Lemieux, M., Tremblay, M., Behringer, R.R. et Jeannotte, L. (1998). Transcriptional interferences at the *Hoxa4/Hoxa5* locus: importance of correct *Hoxa5* expression for the proper specification of the axial skeleton. *Developmental Dynamics* 212 141-156.

Aubin, J. Chailier, P., Ménard, D. et Jeannotte, L. (1999). Loss of *Hoxa5* function in mice perturbs intestinal maturation.. *American Journal of Physiology* (sous presse).

Bateson, W. (1894). Materials for the study of variation, treated with especial regard to discontinuity in the origin of species. MacMillan and Co., Londre.

Battista, S., Martelli, M.L., Fedele, M., Chiappetta, G., Trapasso, F., De Vita, G., Battaglia, C., Santoro, M., Viglietto, G., Fagin, J.A. et Fusco, A. (1995). A mutated p53 gene alters thyroid cell differentiation. *Oncogene* 11, 2029-2037.

Beamer, W.G., Eicher, E.M., Maltais, L.J. et Southard, J.L. (1981). Inherited primary hypothyroidism in mice. *Science* 212, 61-63.

Beamer W.G. et Cresswell, L.A. (1982). Defective thyroid ontogenesis in fetal hypothyroid (*hyt/hyt*) mice. *Anatomical Record* 202, 387-393.

Bender, W., Akam, M., Karch, F., Beachy, P.A., Peifer, M., Spierer, P., Lewis, E.B. et Hogness, D.S. (1983). Molecular genetics of the Bithorax complex in *Drosophila melanogaster*. *Science* 221, 23-29.

Berne, R.M. et Levy, M.N. (1988). *Physiology*. 2^e édition, The C.V. Moby Company, Saint-Louis, Missouri, pp. 884-887 et 932-949.

Berry, M.J. et Larsen, P.R. (1992). The role of selenium in thyroid hormone action. *Endocrine Reviews* 13, 207-219.

Blecher, S.R., Arnold, K., Weeks, N., Debertin, M., Kroone, R. et Heller, N.H. (1982). Possible homology of ectodermal dysplasia and *Tabby*, and possible role of EGF. *Anatomical Records* 202, 17A.

Blecher, S.R., Debertin, M. et Murphy, J.S. (1983). Pleiotropic effect of tabby gene on epidermal growth factor-containing cells of mouse submandibular gland. *Anatomical Records* 207, 25-29.

Bohinski, R.J., Di Lauro, R. et Whitsett, J.A. (1994). The lung-specific surfactant protein B gene promoter is a target for thyroid transcription factor 1 and hepatocyte nuclear factor 3, indicating common factors for organ-specific gene expression along the foregut axis. *Molecular and Cellular Biology* 14, 5671-5681.

Bridges, C.B. et Morgan, T.H. (1923). The third-chromosome group of mutant characters of *Drosophila melanogaster*. Carnegie Institution of Washington 327, 137.

Bürglin, T.R. et Ruvkun, G. (1993). The *Caenorhabditis elegans* homeobox gene cluster. *Current Opinion in Genetics and Development* 3, 615-620.

Carrasco, N. (1993). Iodide transport in the thyroid gland. *Biochimica et Biophysica Acta* 1154, 65-82.

Chisaka, O. et Capecchi, M.R. (1991). Regionally restricted developmental defects resulting from targeted disruption of the mouse homeobox gene *hox-1.5*. *Nature* 350, 473-479.

Chisaka, O., Musci, T.S. et Capecchi, M.R. (1992). Developmental defects of the ear, cranial nerves and hindbrain resulting from targeted disruption of the mouse homeobox gene *Hox-1.6*. *Nature* 355, 516-520.

Civitareale, D., Lonigro, R., Sinclair, A.J. et Di Lauro, R. (1989). A thyroid-specific nuclear protein essential for tissue-specific expression of the thyroglobulin promoter. *EMBO Journal* 8, 2537-2542.

Civitareale, D., Castelli, M.P., Falasca, P. et Saiardi, A. (1993). Thyroid transcription factor 1 activates the promoter of the thyrotropin receptor gene. *Molecular Endocrinology* 7, 1589-1595.

Clifton-Bligh, R.J., Wentworth, J.M., Heinz, P., Crisp, M.S., John, R., Lazarus, J.H., Lugdate, M. et Chatterjee, V.K. (1998). Mutation of the gene encoding human TTF-2 associated with thyroid agenesis, cleft palate and choanal atresia. *Nature Genetics* 19, 399-401.

Cohen, S. (1962). Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal. *Journal of Biological Chemistry* 237, 1555-1562.

Condie, B.G. et Capecchi, M.R. (1993). Mice homozygous for a targeted disruption of *Hoxd-3* (*Hox-4.1*) exhibit anterior transformations of the first and second cervical vertebrae, the atlas and the axis. *Development* 119, 579-595.

Consiglio, E., Acquaviva, A.M., Formisano, S., Liguoro, D., Gallo, A., Vittorio, T., Santisteban, P., De Luca, M., Shifrin, S., Yeh, H.J.C. et Kohn, L.D. (1987). Characterization of phosphate residues on thyroglobulin. *Journal of Biological Chemistry* 262, 10304-10314.

Costa, A. Arisio, R., Benedetto, C., Bertino, E., Fabris, C., Giraudi, G., Marozio, L., Maulà, V., Pagliano, M., Testori, O. et Zoppetti, G. (1991). Thyroid hormones in tissues from human embryos and fetuses. *Journal of Endocrinological Investigation* 14, 559-568.

De Felice, M., Ovitt, C., Biffali, E., Rodriguez-Mallon, A., Arra, C., Anastassiadis, K., Macchia, P.E., Mattei, M.G., Mariano, A., Schöler, H., Macchia, V. et Di Lauro, R. (1998). A mouse model for hereditary thyroid dysgenesis and cleft palate. *Nature Genetics* 19, 395-398.

De Nayer, P. et Vassart, G. (1980). Structure and biosynthesis of thyroglobulin. Dans *The Thyroid Gland*, M. De Visscher, éditeur, Raven Press, New York, pp. 21-37.

Deshpande, V. et Venkatesh, S.G. (1999). Thyroglobulin, the prothyroid hormone: chemistry, synthesis and degradation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1430, 157-178.

Dollé, P., Dierich, A., LeMeur, M., Schimmang, T., Schuhbaur, B., Chambon, P. et Duboule, D. (1993). Disruption of the *Hoxd-13* gene induces localized heterochrony leading to mice with neotenic limbs. *Cell* 75, 431-441.

Dony, C. et Gruss, P. (1987). Specific expression of the *Hox 1.3* homeo box gene in murine embryonic structures originating from or induced by the mesoderm. *EMBO Journal* 6, 2965-2975.

Dunn, J.T. (1995). Thyroglobulin, hormone synthesis and thyroid disease. *European Journal of Endocrinology* 132, 603-604.

Duprez, L., Parma, J., Van Sande, J., Rodien, P., Dumont, J.E., Vassart, G. et Abramowicz, M. (1998). TSH receptor mutations and thyroid disease. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 9, 133-140.

Ekholm, R. (1981). Iodination of thyroglobulin: an intracellular or extracellular process? *Molecular and Cellular Endocrinology* 24, 141-163.

Ekholm, R. (1989). Anatomy and Development. Dans *Endocrinology*, L.J. DeGroot, éditeur, 2^e édition, W.B. Saunders Company, pp. 505-511.

Endo, T., Ohno, M., Kotani, S., Gunji, K. et Onaya, T. (1993). Thyrotropin receptor in non-thyroid tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 190, 774-779.

Endo, T., Kaneshige, M., Nakazato, M., Ohmori, M., Harii, N. et Onaya, T. (1997). Thyroid transcription factor-1 activates the promoter activity of rat thyroid Na⁺/I⁻ symporter gene. *Molecular Endocrinology* 11, 1747-1755.

Esposito, C., Miccadei, S., Saiardi, A. et Civitareale, D. (1998). Pax8 activates the enhancer of the human thyroperoxidase gene. *Biochemical Journal* 331, 37-40.

Fabbro, D., Pellizzari, L., Mercuri, F., Tell, G. et Damante, G. (1998). Pax-8 protein levels regulate thyroglobulin gene expression. *Journal of Molecular Endocrinology* 21, 347-354.

Fisher, D.A. et Dussault, J.H. (1974). Development of the mammalian thyroid gland. Dans *Handbook of Physiology, section 7 Endocrinology, volume III Thyroid*, American Physiological Society, Washington, D.C., pp. 21-38.

Forrest, D. (1994). The *erbA*/thyroid hormone receptor genes in development of the central nervous system. *Seminar in Cancer Biology* 5, 167-176.

Forrest, D., Hanebuth, E., Smeyne, R.J., Everds, N., Stewart, C.L., Wehner, J.M. et Curran, T. (1996). Recessive resistance to thyroid hormone in mice lacking thyroid hormone receptor β : evidence for tissue-specific modulation of receptor function. *EMBO Journal* 15, 3006-3015.

Fraichard, A., Chassande, O., Plateroti, M., Roux, J.P., Trouillas, J., Dehay, C., Legrand, C., Gauthier, K., Keding, M., Malaval, L., Rousset, B. et Samarut, J. (1997). The T3R α gene encoding a thyroid hormone receptor is essential for post-natal development and thyroid hormone production. *EMBO Journal* 16, 4412-4420.

Francis-Lang, H., Price, M., Polycarpou-Schwarz, M. et Di Lauro, R. (1992). Cell-type-specific expression of the rat thyroperoxidase promoter indicates common mechanisms for thyroid-specific gene expression. *Molecular and Cellular Biology* 12, 576-588.

Fujiwara, H., Tatsumi, K., Miki, K., Harada, T., Miyai, K., Takai, S. et Amino, N. (1997). Congenital hypothyroidism caused by a mutation in the Na⁺/I⁻ symporter. *Nature Genetics* 16, 124-125.

Garber, R.L., Kuroiwa, A. et Gehring, W.J. (1983). Genomic and cDNA clones of the homeotic locus *Antennapedia* in *Drosophila*. *EMBO Journal* 2, 2027-2036.

Garcia-Fernandez, J. et Holland, P.W.H. (1994). Archetypal organization of the amphioxus *Hox* gene cluster. *Nature* 370, 563-566.

Gaunt, S.J. (1988). Mouse homeobox gene transcripts occupy different but overlapping domains in embryonic germ layers and organs: a comparison of *Hox-3.1* and *Hox-1.5*. *Development* 103, 135-144.

Gaunt, S.J., Sharpe, P.T. et Duboule, D. (1988). Spatially restricted domains of homeo-gene transcripts in mouse embryos: relation to a segmented body plan. *Development (Supplément)* 104, 169-179.

Gaunt, S.J., Krumlauf, R. et Duboule, D. (1989). Mouse homeo-genes within a subfamily, *Hox-1.4*, *-2.6* and *-5.1*, display similar anteroposterior domains of expression in the embryo, but show stage- and tissue-dependent differences in their regulation. *Development* 107, 131-141.

Gauthier, K., Chassande, O., Plateroti, M., Roux, J.P., Legrand, C., Pain, B., Rousset, B., Weiss, R., Trouillas, J. et Samarut, J. (1999). Different functions for the thyroid hormone receptors TR α and TR β in the control of thyroid hormone production and post-natal development. *EMBO Journal* 18, 623-631.

Gehring, W.J., Qian, Y.Q., Billeter M., Furukubo-Tokunaga, K., Schier, A.F., Resendez-Perez, D., Affolter, M., Otting, G. et Wüthrich, K. (1994). Homeodomain-DNA recognition. *Cell* 78, 211-223.

Gendron-Maguire, M., Mallo, M., Zhang, M et Gridley, T. (1993) *Hoxa-2* mutant mice exhibit homeotic transformation of skeletal elements derived from cranial neural crest. *Cell* 75, 1317-1331.

Gilbert, S.F. (1996). *Biologie du développement*. 4^e édition, DeBoeck Université, Paris, 892 p.

Gonçalves, E., Lakshmanan, M., Cahnmann, H.J. et Robbins, J. (1990). High-affinity binding of thyroid hormones to neuroblastoma plasma membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1055, 151-156.

Göthe, S., Wang, Z., Ng, L., Kindblom, J.M., Barros, A.C., Ohlsson, C., Vennström, B. et Forrest, D. (1999). Mice devoid of all known thyroid hormone receptors are viable but exhibit disorders of the pituitary-thyroid axis, growth, and bone maturation. *Genes and Development* 13, 1329-1341.

Guazzi, S., Price, M., De Felice, M., Damante, G., Mattei, M. et Di Lauro, R. (1990). Thyroid nuclear factor 1 (TTF-1) contains a homeodomain and displays a novel DNA binding specificity. *EMBO Journal* 9, 3631-3639.

- Guazzi, S., Lonigro, R., Pintonello, L., Boncinelli, E., Di Lauro, R. et Mavilio, F. (1994). The thyroid transcription factor-1 gene is a candidate target for regulation by Hox proteins. *EMBO Journal* 13, 3339-3347.
- Harvey, R.P. (1996) *NK-2 Homeobox genes and heart development*. *Developmental Biology* 178, 203-216.
- Herzog, V. (1985). Secretion of sulfated thyroglobulin. *European Journal of Cell Biology* 39, 399-409.
- Hodin, R.A., Meng, S. et Chamberlain, S.M. (1994). Thyroid hormone responsiveness is developmentally regulated in the rat small intestine: a possible role for the α -2 receptor variant. *Endocrinology* 135, 564-568.
- Hoey, T. et Levine, M. (1988). Divergent homeo box proteins recognize similar DNA sequences in *Drosophila*. *Nature* 332, 858-861.
- Holland, P.W.H. et Garcia-Fernández, J. (1996). *Hox genes and chordate evolution*. *Developmental Biology* 173, 382-395.
- Holland, P.W.H. et Hogan, B.L.M. (1988). Expression of homeo box genes during mouse development: a review. *Genes and Development* 2, 773-782.
- Holt, J., Canavan, J.P. et Goldspink, D.F. (1993). The influence of thyroid hormones on the growth of the lungs in perinatal rats. *International Journal of Developmental Biology* 37, 467-472.
- Hsu, J.H. et Brent, G.A. (1998). Thyroid hormone receptor gene knockouts. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 9, 103-112.
- Ieiri, T., Cochaux, P., Targovnik, H.M., Suzuki, M., Shimoda, S., Perret, J. et Vassart, G. (1991). A 3' splice site mutation in the thyroglobulin gene responsible for congenital goiter with hypothyroidism. *Journal of Clinical Investigation* 88, 1901-1905.

Izpisua-Belmonte, J.-C. et Duboule, D. (1992). Homeobox genes and pattern formation in the vertebrate limb. *Developmental Biology* 152, 26-36.

Jaffe, L., Jeannotte, L., Bikoff, E.K. et Robertson, E.J. (1990). Analysis of $\beta 2$ -microglobulin gene expression in the developing mouse embryo and placenta. *Journal of Immunology* 145, 3474-3482.

Jeannotte, L., Ruiz, J.C. et Robertson, E.J. (1991). Low level of *Hox1.3* gene expression does not preclude the use of promoterless vectors to generate a targeted gene disruption. *Molecular and Cellular Biology* 11, 5578-5585.

Jeannotte, L., Lemieux, M., Charron, J., Poirier, F. et Robertson, E.J. (1993). Specification of axial identity in the mouse: role of the *Hoxa-5* (*Hox1.3*) gene. *Genes and Development* 7, 2085-2096.

Kapalanga, J. et Blecher, S.R. (1990). Effect of the X-linked gene *Tabby* (*Ta*) on eyelid opening and incisor eruption in neonatal mice is opposite to that of epidermal growth factor. *Development* 108, 349-355.

Kelly, S.E., Bachurski, C.J., Burhans, M.S. et Glasser, S.W. (1996). Transcription of the lung-specific surfactant protein C gene is mediated by thyroid transcription factor-1. *Journal of Biological Chemistry* 271, 6881-6888.

Kessel, M. et Gruss, P. (1990). Murine developmental control genes. *Science* 249, 374-379.

Kessel, M. et Gruss, P. (1991). Homeotic transformations of murine vertebrae and concomitant alteration of *Hox* codes induced by retinoic acid. *Cell* 67, 89-104.

Kikkawa, F., Gonzalez, F.J. et Kimura, S. (1990). Characterization of a thyroid-specific enhancer located 5.5 kilobase pairs upstream of the human thyroid peroxidase gene. *Molecular and Cellular Biology* 10, 6216-6224.

Kikuoka, S., Shimojo, N., Yamagushi, K.I., Watanabe, Y., Hoshioka, A., Hirai, A., Saito, Y., Tahara, K., Kohn, L.D., Maruyama, N., Kohno, Y. et Niimi, H. (1998). The formation of thyrotropin receptor (TSHR) antibodies in a Graves' animal model requires the N-terminal segment of the TSHR extracellular domain. *Endocrinology* 139, 1891-1898.

Kimura, S., Hara, Y., Pineau, T., Fernandez-Salguero, P., Fox, C.H., Ward, J.M. et Gonzalez, F.J. (1996). The *Tebp* null mouse: thyroid-specific enhancer-binding protein is essential for the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain, and pituitary. *Genes and Development* 10, 60-69.

Kissinger, C.R., Beishan, L., Martin-Blanco, E., Kornberg, T.B. et Pabo, C.O. (1990). Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8 Å resolution: a framework for understanding homeodomain-DNA interactions. *Cell* 63, 579-590.

Kita, M., Ahmad, L., Marians, R.C., Vlase, H., Unger, P., Graves, P.N. et Davies, T.F. (1999). Regulation and transfer of a murine model of thyrotropin receptor antibody mediated Graves' disease. *Endocrinology* 140, 1392-1398.

Krumlauf, R. (1994). *Hox* genes in vertebrate development. *Cell* 78,191-201.

Lamas, L., Dorris, M.L. et Taurog, A. (1972). Evidence for a catalytic role for thyroid peroxidase in the conversion of diiodotyrosine to thyroxine. *Endocrinology* 90, 1417-1426.

Lapi, P., Macchia, P.E., Chiovato, L., Biffali, E., Moschini, L., Larizza, D., Baserga, M., Pinchera, A., Fenzi, G. et Di Lauro, R. (1997). Mutations in the gene encoding thyroid transcription factor-1 (TTF-1) are not a frequent cause of congenital hypothyroidism (CH) with thyroid dysgenesis. *Thyroid* 7, 383-387.

Larochelle, C., Tremblay, M., Bernier, D., Aubin, J. et Jeannotte, L. (1999). Multiple *cis*-acting regulatory regions are required for restricted spatio-temporal *Hoxa5* gene expression. *Developmental Dynamics* 214, 127-140.

Laudet, V., Hänni, C., Coll, J., Catzeflis, F. et Stehelin, D. (1992). Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *EMBO Journal* 11, 1003-1013.

Lazzaro, D., Price, M., De Felice, M. et Di Lauro, R. (1991). The transcription factor TTF-1 is expressed at the onset of the thyroid and lung morphogenesis and in restricted regions of the foetal brain. *Development* 113, 1093-1104.

Legrand, J., Selme-Matrat, M., Rabié, A., Clos, J. et Legrand, C. (1976). Thyroid hormone and cell formation in the developing rat cerebellum. *Biology of Neonate* 29, 368-380.

Levy, O., Ginter, C.S., De la Vieja, A., Levy, D. et Carrasco, N. (1998). Identification of a structural requirement for the thyroid Na^+/I^- symporter (NIS) function from analysis of a mutation that causes human congenital hypothyroidism. *FEBS Letters* 429, 36-40.

Lewis, E.B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276, 565-570.

Lufkin, T., Dierich, A., LeMeur, M., Mark, M. et Chambon, P. (1991). Disruption of the *Hox-1.6* homeobox gene results in defects in a region corresponding to its rostral domain of expression. *Cell* 66, 1105-1119.

Macchia, P.E., Lapi, P., Krude, H., Pirro, M.T., Missero, C., Chiovato, L., Souabni, A., Baserga, M., Tassi, V., Pinchera, A., Fenzi, G., Grüters, A., Busslinger, M. et Di Lauro, R. (1998). *PAX8* mutations associated with congenital hypothyroidism caused by thyroid dysgenesis. *Nature Genetics* 19, 83-86.

Manley, N.R. et Capecchi, M.R. (1995). The role of *Hoxa-3* in mouse thymus and thyroid development. *Development* 121, 1989-2003.

Manley, N.R. et Capecchi, M.R. (1998). *Hox* group 3 paralogs regulate the development and migration of the thymus, thyroid and parathyroid glands. *Developmental Biology* 195, 1-15.

Mann, R.S. et Chan, S.-K. (1996). Extra specificity from *extradenticle*: the partnership between HOX and PBX/EXD homeodomain proteins. *Trends in Genetics* 12, 258-262.

Mansouri, A., Hallonet, M. et Gruss, P. (1996). *Pax* genes and their role in cell differentiation and development. *Current Opinion in Cell Biology* 8, 851-857.

Mansouri, A., Chowdhury, K. et Gruss, P. (1998). Follicular cells of the thyroid gland require *Pax8* gene function. *Nature Genetics* 19, 87-90.

Matsuda, A. et Kosugi, S. (1997). A homozygous missense mutation of the sodium/iodide symporter gene causing iodide transport defect. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 82, 3966-3971.

McGinnis, W., Levine, M.S., Hafen, E., Kuroiwa, A. et Gehring, W.J. (1984a). A conserved DNA sequence in homeotic genes of the *Drosophila Antennapedia* and *Bithorax* complexes. *Nature* 308, 428-433.

McGinnis, W., Garber, R.L., Wirz, J., Kuroiwa, A. et Gehring, W.J. (1984b). A homologous protein-coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoans. *Cell* 37, 403-408.

McGinnis, W. et Krumlauf, R. (1992). Homeobox genes and axial patterning. *Cell* 68, 283-302.

Medeiros-Neto, G., Targovnik, H.M. et Vassart, G. (1993). Defective thyroglobulin synthesis and secretion causing goiter and hypothyroidism. *Endocrine Reviews* 14, 165-183.

Missero, C., Cobellis, G., De Felice, M. et Di Lauro, R. (1998). Molecular events involved in differentiation of thyroid follicular cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 140, 37-43.

Mizuno, K., Gonzalez, F.J. et Kimura, S. (1991). Thyroid-specific enhancer-binding protein (T/EBP): cDNA cloning, functional characterization, and structural identity with thyroid transcription factor TTF-1. *Molecular and Cellular Biology* 11, 4927-4933.

- Monaco, F. et Robbins, J. (1973). Defective thyroglobulin synthesis in an experimental rat thyroid tumor. *Journal of Biological Chemistry* 218, 2328-2336.
- Morreale de Escobar, G., Pastor, R., Obregon, M.J. et Escobar del Rey, F. (1985). Effects of maternal hypothyroidism on the weight and thyroid hormone content of rat embryonic tissues, before and after onset of fetal thyroid function. *Endocrinology* 117, 1890-1900.
- Morreale de Escobar, G., Obregon, M.J., Ruiz de Ona, C. et Escobar del Rey, F. (1989). Comparison of maternal to fetal transfer of 3,5,3'-triiodothyronine versus thyroxine in rats, as assessed from 3,5,3'-triiodothyronine levels in fetal tissues. *Acta Endocrinologica* 120, 20-30.
- Mortlock, D.P., Post, L.C. et Innis, J.W. (1996). The molecular basis of hypodactyly (*Hd*): a deletion in *Hoxa13* leads to arrest of digital arch formation. *Nature Genetics* 13, 284-289.
- Muragaki, Y., Mundlos, S., Upton, J. et Olsen, B.R. (1996). Altered growth and branching patterns in synpolydactyly caused by mutations in HOXD13. *Science* 272, 548-551.
- Nagayama, Y. et Rapoport, B. (1992). The thyrotropin receptor 25 years after its discovery: new insight after its molecular cloning. *Molecular Endocrinology* 6, 145-156.
- Norman, A.W. et Litwack, G. (1987). Thyroid Hormones. Dans *Hormones*, Éditions AP Inc., New York, pp. 221-262.
- Nowling, T., Zhou, W., Krieger, K.E., Larochelle, C., Nguyen-Huu, M.C., Jeannotte, L. et Tuggle, C.K. (1999). *Hoxa5* gene regulation: a gradient of binding activity to a brachial spinal cord element. *Developmental Biology* 208, 134-146.
- Nunez, J. (1980). Iodination and thyroid hormone synthesis. Dans *The Thyroid Gland*, M. De Visscher, éditeur, Raven Press, New York, pp. 39-59.

Odenwald, W.F., Garbern, J., Arnheiter, H., Tournier-Lasserre, E. et Lazzarini, R.A. (1989). The *Hox-1.3* homeo box protein is a sequence-specific DNA-binding phosphoprotein. *Genes and Development* 3, 158-172.

Ohno, M., Zannini, M., Levy, O., Carrasco, N. et Di Lauro, R. (1999). The paired-domain transcription factor Pax8 binds to the upstream enhancer of the rat sodium/iodide symporter gene and participates in both thyroid-specific and cyclic-AMP-dependent transcription. *Molecular and Cellular Biology* 19, 2051-2060.

Ortiz, L., Zannini, M., Di Lauro, R. et Santisteban, P. (1997). Transcriptional control of the forkhead thyroid transcription factor TTF-2 by thyrotropin, insulin, and insulin-like growth factor I. *Journal of Biological Chemistry* 272, 23334-23339.

Ortiz, L., Aza-Blanc, P., Zannini, M., Cato, A.C.B. et Santisteban, P. (1999) The interaction between the forkhead thyroid transcription factor TTF-2 and the constitutive factor CTF/NF-1 is required for efficient hormonal regulation of the thyroperoxidase gene transcription. *Journal of Biological Chemistry* 274, 15213-15221.

Otting, G., Qian, Y.Q., Billeter M., Müller, M., Affolter, M., Gehring, W.J. et Wüthrich, K. (1990). Protein-DNA contacts in the structure of a homeodomain-DNA complex determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy in solution. *EMBO Journal* 9, 3085-3092.

Pellerin, I., Schnabel, C., Catron, K.M. et Abate, C. (1994). Hox proteins have different affinities for a consensus DNA site that correlate with the positions of their genes on the *hox* cluster. *Molecular and Cellular Biology* 14, 4532-4545.

Pierrou, S., Hellqvist, M., Samuelsson, L., Enerbäck, S. et Carlsson, P. (1994). Cloning and characterization of seven human forkhead proteins: binding site specificity and DNA bending. *EMBO Journal* 13, 5002-5012.

Plachov, D., Chowdhury, K., Walther, C., Simon, D., Guenet, J.L. et Gruss, P. (1990). *Pax-8*, a murine paired box gene expressed in the developing excretory system and thyroid gland. *Development* 110, 643-651.

Poleev, A., Fickenscher, H., Mundlos, S., Winterpacht, A., Zabel, B., Fidler, A., Gruss, P. et Plachov, D. (1992). *PAX8*, a human paired box gene: isolation and expression in developing thyroid, kidney and Wilms' tumors. *Development* 116, 611-623.

Qian, Y.Q., Billeter, M., Otting, G., Müller, M., Gehring, W.J. et Wüthrich, K. (1989). The structure of the *Antennapedia* homeodomain determined by NMR spectroscopy in solution: comparison with prokaryotic repressors. *Cell* 59, 573-580.

Refetoff, S., Weiss, R.E. et Usala, S.J. (1993). The syndromes of resistance to thyroid hormone. *Endocrine Reviews* 14, 348-399.

Ricketts, M.H., Simons, M.J., Parma, J., Mercken, L., Dong, Q. et Vassart, G. (1987). A nonsense mutation causes hereditary goitre in the Afrikaner cattle and unmasks alternative splicing of thyroglobulin transcripts. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 84, 3181-3184.

Rijli, F.M., Mark, M., Lakkaraju, S., Dierich, A., Dollé, P. et Chambon, P. (1993). A homeotic transformation is generated in the rostral branchial region of the head by disruption of *Hoxa-2*, which acts as a selector gene. *Cell* 75, 1333-1349.

Robbins, J et Edelhoach, H. (1986). Thyroid hormone transport proteins: their nature, biosynthesis and metabolism. Dans *The Thyroid*, S.H. Ingbar et L.E. Braverman, éditeurs, 5^e édition, J.B. Lippincott Company, Philadelphie, pp. 116-127.

Salser, S.J. et Kenyon, C. (1994). Patterning *C.elegans*: homeotic cluster genes, cell fates and cell migrations. *Trends in Genetics* 10, 159-164.

Salvatore, G. et Edelhoach, H. (1973). Chemistry and biosynthesis of thyroid iodoproteins. Dans *Hormonal proteins and peptides*, volume I, C.H. Li, éditeur, Academic Press Inc., pp. 201-241.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. et Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning, a laboratory manual*. 2^e édition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, I, 7.39-7.52; II, 10.27-10.37.

Sap, J., Munoz, A., Damm, K., Goldberg, Y., Ghysdael, J., Leutz, A., Beug, H. et Vennström, B. (1986). The *c-erbA* protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone. *Nature* 324, 635-640.

Satokata, I., Benson, G. et Maas, R. (1995). Sexually dimorphic sterility phenotypes in *Hoxa10*-deficient mice. *Nature* 374, 460-463.

Schneuwly, S., Klemenz, R. et Gehring, W.J. (1987). Redesigning the body plan of *Drosophila* by ectopic expression of the homeotic gene *Antennapedia*. *Nature* 325, 816-818.

Schwartz, H.L., Strait, K.A., Ling, N.C. et Oppenheimer, J.H. (1992). Quantification of rat tissue thyroid hormone binding receptor isoforms by immunoprecipitation of nuclear triiodothyronine binding capacity. *Journal of Biological Chemistry* 267, 11794-11799.

Schwartz, H.L., Lazar, M.A. et Oppenheimer, J.H. (1994). Widespread distribution of immunoreactive thyroid hormone beta 2 receptor (TRbeta2) in the nuclei of extrapituitary rat tissues. *Journal of Biological Chemistry* 269, 24777-24782.

Scott, M.P., Weiner, A.J., Hazelrigg, T.I., Polisky, B.A., Pirrotta, V., Scalenghe, F. et Kaufman, T.C. (1983). The molecular organization of the *Antennapedia* locus of *Drosophila*. *Cell* 35, 763-776.

Sharpe, P.T., Miller, J.R., Evans, E.P., Burtenshaw, M.D. et Gaunt, S.J. (1988). Isolation and expression of a new mouse homeobox gene. *Development* 102, 397-407.

Shimojo, N., Kohno, Y., Yamagushi, K., Kikuoka, S., Hoshioka, A., Niimi, H., Hirai, A., Tamura, Y., Saito, Y., Kohn, L.D. et Tahara, K. (1996). Induction of Graves-like disease in mice by immunization with fibroblast transfected with the thyrotropin receptor and class II molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93, 11074-11079.

- Shimura, H., Okajima, F., Ikuyama, S., Shimura, Y., Kimura, S., Saji, M. et Kohn, L.D. (1994). Thyroid-specific expression and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate autoregulation of the thyrotropin receptor gene involves thyroid transcription factor-1. *Molecular Endocrinology* 8, 1049-1069.
- Sinclair, A.J., Lonigro, R., Civitareale, D., Ghibelli, L. et Di Lauro, R. (1990). The tissue-specific expression of the thyroglobulin gene requires interaction between thyroid-specific and ubiquitous factors. *European Journal of Biochemistry* 193, 311-318.
- Small, K.M. et Potter, S.S. (1993). Homeotic transformations and limb defects in *Hox A11* mutant mice. *Genes and Development* 7, 2318-2328.
- Smee, D.F., Martin, J.C., Verheyden, J.P.H. et Matthews, T.R. (1983). Anti-herpesvirus activity of the acyclic nucleoside 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 23, 676-682.
- Spiro, R.G. et Spiro, M.J. (1966). Glycoprotein biosynthesis: studies on thyroglobulin. *Journal of Biological Chemistry* 241, 1271-1282.
- Stanbury, J.B. (1986). Inherited metabolic disorders of the thyroid system. Dans *The Thyroid*, S.H. Ingbar et L.E. Braverman, éditeurs, 5e édition, J.B. Lippincott Company, Philadelphie, pp. 687-695.
- St-Germain, D.L. et Galton, V.A. (1997). The deiodinase family of selenoproteins. *Thyroid* 7, 655-668.
- Stein, S., Fritsch, R. Lemaire, L., Kessel, M. (1996). Checklist: vertebrate homeobox genes. *Mechanisms of Development* 55, 91-108.
- Stein, S.A., Shanklin, D.R., Krulich, L., Roth, M.G., Chubb, C.M. et Adams, P.M. (1989). Evaluation and characterization of the *hyt/hyt* hypothyroid mouse. II. Abnormalities of TSH and the thyroid gland. *Neuroendocrinology* 49, 509-519.

Stein, S.A., Oates, E.L., Hall, C.R., Grumbles, R.M., Fernandez, L.M., Taylor, N.A., Puett, D. et Jin, S. (1994). Identification of a point mutation in the thyrotropin receptor of the *hyt/hyt* hypothyroid mouse. *Molecular Endocrinology* 8, 129-138.

Strbak, V., Macho, L., Skultetyova, M., Michalickova, J. et Pohlova, G. (1983). Thyroid hormones in milk: physiological approach – a review. *Endocrinologia Experimentalis* 17, 219-235.

Suzuki, K., Kobayashi, Y., Katoh, R., Kohn, L.D. et Kawaoi, A. (1998a). Identification of thyroid transcription factor-1 in C cells and parathyroid cells. *Endocrinology* 139, 3014-3017.

Suzuki, K., Lavaroni, S., Mori, A., Ohta, M., Saito, J., Pietrarelli, M., Singer, D.S., Kimura, S., Katoh, R., Kawaoi, A. et Kohn, L.D. (1998b). Autoregulation of thyroid-specific gene transcription by thyroglobulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95, 8251-8256.

Targovnik, H.M., Vono, J., Billerbeck, A.E.C., Cerrone, G.E., Varela, V., Mendives, F., Wajchenberg, B.L. et Medeiros-Neto, G. (1995). A 138-nucleotide deletion in the thyroglobulin ribonucleic acid messenger in a congenital goiter with defective thyroglobulin synthesis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 80, 3356-3360.

Taylor, B.A. et Rowe, L. (1987). The congenital goiter mutation is linked to the thyroglobulin gene in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 84, 1986-1990.

Tuggle, C.K., Zakany, J., Cianetti, L., Peschle, C. et Nguyen-Huu, M.C. (1990). Region-specific enhancers near the mammalian homeo box genes define adjacent rostrocaudal domains in the central nervous system. *Genes and Development* 4, 180-189.

Vassart, G., Refetoff, S., Brocas, H., Dinsart, C. et Dumont, J.E. (1975). Translation of thyroglobulin 33S messenger RNA as a means of determining thyroglobulin quaternary structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 72, 3839-3843.

Vassart, G. et Dumont, J.E. (1992). The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocyte function and growth. *Endocrine Reviews* 13, 596-611.

Vulsma, T., Gons, M.H. et De Vijlder, J.J.M. (1989). Maternal-fetal transfer of thyroxine in congenital hypothyroidism due to total organification or thyroid agenesis. *New England Journal of Medicine* 321, 13-16.

Wallace, H., Ledent, C., Vassart, G., Bishop, J.O. et Al-Shawi, R. (1991). Specific ablation of thyroid follicle cells in adult transgenic mice. *Endocrinology* 129, 3217-3226.

Wallace, H., McLaren, K., Al-Shawi, R. et Bishop, J.O. (1994). Consequences of thyroid hormone deficiency induced by the specific ablation of thyroid follicle cells in adult transgenic mice. *Journal of Endocrinology* 143, 107-120.

Wallace, H., Pate, A. et Bishop J.O. (1995). Effects of perinatal thyroid hormone deprivation on the growth and behaviour of newborn mice. *Journal of Endocrinology* 145, 251-262.

Weinberger, C., Thompson, C.C., Ong, E.S., Lebo, R., Gruol, D.J. et Evans, R.M. (1986). The *c-erb-A* gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature* 324, 641-646.

Wilson, D.S. et Desplan, C. (1999). Structural basis for Hox specificity. *Nature Structural Biology* 6, 297-300.

Woeber, K.A. (1986). Tests of thyroid hormone transport. Dans *The Thyroid*, S.H. Ingbar et L.E. Braverman, éditeurs, 5e édition, J.B. Lippincott Company, Philadelphie, pp. 502-510.

Yamamoto, K., Tsuji, T., Tarutani, O. et Osawa, T. (1984) Structural changes of carbohydrate chains of human thyroglobulin accompanying malignant transformations of thyroid glands. *European Journal of Biochemistry* 143, 133-144.

Zakany, J., Tuggle, C.K., Patel, M.D. et Nguyen-Huu, M.C. (1988). Spatial regulation of homeobox gene fusions in the embryonic central nervous system of transgenic mice. *Neuron* 1, 679-691.

Zannini, M., Francis-Lang, H., Plachov, D. et Di Lauro, R. (1992). Pax-8, a paired domain-containing protein, binds to a sequence overlapping the recognition site of a homeodomain and activates transcription from two thyroid-specific promoters. *Molecular and Cellular Biology* 12, 4230-4241.

Zannini, M., Avantaggiato, V., Biffali, E., Arnone, M.I., Sato, K., Pischetola, M., Taylor, B.A., Phillips, S.J., Simeone, A. et Di Lauro, R. (1997). TTF-2, a new forkhead protein, shows a temporal expression in the developing thyroid which is consistent with a role in controlling the onset of differentiation. *EMBO Journal* 16, 3185-3197.

Zhang, J. et Nei, M. (1996). Evolution of Antennapedia-class homeobox genes. *Genetics* 142, 295-303.