

## Génétique moléculaire des affections thyroïdiennes

Catherine Ledent  
Jasmine Parma  
Jacqueline Van Sande  
Gilbert Vassart

On connaît aujourd'hui les gènes codant pour les trois protéines spécifiques de la thyroïde. Elles constituent, en outre, les principaux auto-antigènes thyroïdiens : la thyroglobuline, la thyroperoxydase et le récepteur de l'hormone thyrotrope. Leur étude a permis de mieux comprendre la pathogénie des maladies de la thyroïde et, en particulier, récemment, celle des adénomes toxiques et de l'hyperthyroïdie héréditaire. Par transgénèse, ont été établis des modèles murins reproduisant la plupart des maladies humaines de la glande thyroïde : hypothyroïdie, adénomes thyroïdiens hyperactifs et cancers thyroïdiens à cellules plus ou moins différenciées.

### Remerciements

Les travaux réalisés au cours des dix dernières années dans le laboratoire des auteurs l'ont été grâce à la participation directe ou indirecte d'un très grand nombre de collaborateurs parmi lesquels nous désirons remercier ici : J.É. Dumont et M. Abramowicz, H. Brocas, D. Christophe, P. Cochaux, C. Gervy, F. Libert, M. Ludgate, M. Parmentier, M. Ricketts, H. Targovnik. Ils ont bénéficié du soutien des organismes suivants : Ministère de la Politique Scientifique, Pôle d'Attraction Interuniversitaire, Université Libre de Bruxelles, Fonds National de la Recherche Scientifique (FNRS) et de la Recherche Scientifique Médicale (FRSM), Télévie, CGER; les auteurs en assument la responsabilité scientifique.

### ADRESSE

C. Ledent : docteur en biologie médicale appliquée. J. Parma : docteur ès sciences, service de génétique médicale. J. Van Sande : docteur ès sciences, chef de travaux à l'université libre de Bruxelles. G. Vassart : docteur en médecine, directeur du service de génétique médicale, hôpital Erasme. Institut de recherche interdisciplinaire et service de génétique médicale, campus Erasme, 808, route de Lennik, 1070 Bruxelles, Belgique.

### TIRÉS À PART

G. Vassart.

Le schéma général de biosynthèse des hormones thyroïdiennes est connu depuis les années 1960 de même que les phénomènes de base responsables de la majorité des maladies thyroïdiennes. Les informations rendues disponibles par le clonage moléculaire des gènes et ADNc des protéines spécifiques de la thyroïde ont principalement ajouté des mécanismes précis et une multitude de détails (dont certains d'un grand intérêt) à notre connaissance jusque-là essentiellement phénoménologique. La puissance de l'approche génétique réside dans le fait qu'elle traite de la racine même des fonctions cellulaires. En étudiant l'expression des gènes spécifiques de la thyroïde et leur régulation c'est, bien sûr, le thyrocyte et ses fonctions que l'on étudie mais, par la même occasion, on explore le phénomène général de l'expression génique chez les eucaryotes. La génétique moléculaire nous fournit également des outils

pour la recherche, le diagnostic et, bientôt, pour la thérapeutique. Le but de cet article est de présenter un résumé de l'impact qu'a eu la génétique moléculaire sur notre compréhension des maladies thyroïdiennes et, lorsque c'est possible, de mettre en avant les retombées de cette recherche dans d'autres domaines. Nous demandons au lecteur d'excuser le caractère nécessairement partiel (et quelquefois partial) de notre texte qui n'a pas la prétention d'être complet en ce qu'il reflète principalement les intérêts et les recherches des auteurs.

### L'hypothyroïdie

#### Hypothyroïdie congénitale sporadique

Peu de progrès ont été faits dans la compréhension des causes de la plus fréquente hypothyroïdie congénitale : l'agénésie ou la dysgénésie thyroïdienne. Étant donné que cette maladie

## RÉFÉRENCES

1. Civitareale D, Lonigro R, Sinclair AJ, Di Lauro R. A thyroid-specific nuclear protein essential for tissue-specific expression of the thyroglobulin promoter. *EMBO J* 1989; 8: 2537-42.
2. Zannini M, Francis Lang H, Plachov D, Di Lauro R. 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. *Mol Cell Biol* 1992; 12: 4230-41.
3. Dumont JE, Vassart G, Refetoff S. Thyroid disorders. In: Scriver CR BAL, ed. *The metabolic basis of inherited diseases*. New York: McGraw-Hill, 1989: 1843-79.
4. Veenboer GJ, de Vijlder JJ. Molecular basis of the thyroglobulin synthesis defect in Dutch goats. *Endocrinology* 1993; 132: 377-81.
5. Chelly J, Gilgenkrantz H, Lambert M, Hamard G, Chafey P, et al. Effect of dystrophin gene deletions on mRNA levels and processing in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Cell* 1990; 63: 1239-48.
6. Ieiri T, Cochaux P, Targovnik H, Suzuki M, Shimoda SI, et al. A 3' splice site mutation in the thyroglobulin gene responsible for congenital goitre with hypothyroidism. *J Clin Invest* 1991; 88: 1901-5.
7. Marriq C, Lejeune PJ, Venot N, Vinet L. Hormone synthesis in human thyroglobulin: possible cleavage of the polypeptide chain at the tyrosine donor site. *FEBS Lett* 1989; 242: 414-8.
8. Abramowicz MJ, Targovnik HM, Varela V, Cochaux P, Krawiec L, et al. Identification of a mutation in the coding sequence of the human thyroid peroxidase gene causing congenital goiter. *J Clin Invest* 1992; 90: 1200-4.
9. Wallace H, Ledent C, Vassart G, Bishop J, Shaw AL. Specific ablation of thyroid follicle cells in adult transgenic mice. *Endocrinology* 1991; 6: 3217-22.
10. Christophe D, Gerard C, Juvenal G, Bacolla A, Teugels E, et al. Identification of a cAMP-responsive region in thyroglobulin gene promoter. *Mol Cell Endocrinol* 1989; 64: 5-18.
11. Portmann L, Fitch FW, Havran W, Hamada N, Franklin WA, et al. Characterization of the thyroid microsomal antigen, and its relationship to thyroid peroxidase, using monoclonal antibodies. *J Clin Invest* 1988; 81: 17-224.
12. Czarnocka B, Ruf J, Ferrand M, Carayon P, Lissitzky S. Purification of the human thyroid peroxidase and its identification as the microsomal antigen involved in autoimmune thyroid diseases. *FEBS Lett* 1985; 190: 147-52.
13. Libert F, Ruel J, Ludgate M, Swillens S, Alexander N, et al. Thyroperoxidase, an auto-antigen with a mosaic structure made of nuclear and mitochondrial gene modules. *EMBO J* 1987; 6: 4193-6.

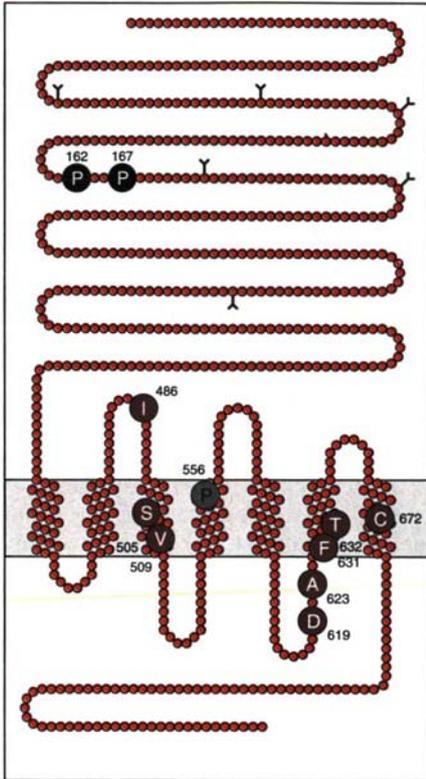
ne présente qu'exceptionnellement un caractère familial, elle est très vraisemblablement due à des facteurs d'environnement ou son apparition requiert la conjonction d'anomalies dans plusieurs gènes non liés. Néanmoins, il sera intéressant de comparer ce phénotype avec celui, lorsqu'elles seront disponibles, de souris homozygotes pour des mutations nulles des gènes *pax8* ou *TTF1*. Ces deux gènes pourraient, en effet, jouer un rôle dans l'embryogenèse normale de la thyroïde [1, 2].

### Hypothyroïdie congénitale héréditaire

Le clonage moléculaire de gènes impliqués dans la biosynthèse des hormones thyroïdiennes a conduit à l'identification de mutations responsables de certains cas de goitres congénitaux avec hypothyroïdie. Les premiers cas étudiés furent des modèles animaux de la maladie: le bœuf sud-africain et la chèvre hollandaise [3]. Les mutations sont, dans les deux cas, des mutations non-sens du gène de la thyroglobuline. Chez le bœuf sud-africain, la mutation affecte la position 697 dans l'exon 9 (Arg<sup>697</sup> → Stop); chez la chèvre, elle se trouve en position 296 dans l'exon 8 (Tyr<sup>296</sup> → Stop) [4]. Ces observations seraient d'un intérêt limité (des mutations non-sens dans le précurseur des hormones thyroïdiennes affectent la synthèse de celles-ci!), si les animaux ne présentaient pas des caractéristiques phénotypiques additionnelles intéressantes. Bien que le bœuf sud-africain soit affligé d'un énorme goitre (il peut interférer avec la mise bas), il est, de façon surprenante, euthyroïdien. Une analyse détaillée des transcrits de la thyroglobuline dans le goitre a révélé qu'un grand nombre d'entre eux était dépourvu de l'exon 9 (celui qui contient le codon muté). La thyroglobuline synthétisée au départ de ce messenger ayant subi un épissage différentiel qui enlève l'exon 9 est apparemment capable de stimuler la synthèse d'hormones thyroïdiennes. Cela représentait la première démonstration d'un mécanisme de «sauvetage» de mutations non-sens ou avec décalage du cadre de lecture (*frame-shift*), par épissage différentiel (dont on a montré qu'il intervient

également pour les transcrits non mutés). Des observations similaires ont été faites depuis dans une série de maladies génétiques humaines, dont la dystrophie musculaire de Duchenne où il permet d'expliquer certaines formes peu sévères [5]. De manière similaire, la chèvre goitreuse hollandaise est euthyroïdienne, pour autant qu'on lui administre une alimentation riche en iode. Comme ces animaux sont capables de synthétiser une thyroglobuline qui contient les 195 premiers résidus de la protéine normale, cette observation renforce la notion selon laquelle c'est le domaine aminoterminal de la thyroglobuline qui porte le domaine hormonogénique majeur. Elle illustre également comment l'expression d'un défaut génétique bien défini peut être influencée par l'environnement, dans le cas présent, l'iode alimentaire.

Les premières mutations responsables de défauts de l'hormonogénèse thyroïdienne chez l'homme ont été identifiées dans les gènes de la thyroglobuline et de la thyroperoxydase. Chez un patient congénitalement hypothyroïdien d'origine japonaise, la mutation du site accepteur d'épissage de l'intron 3 de la thyroglobuline entraîne l'élimination de l'exon 4 du transcrite mature. Le résultat est une thyroglobuline dont le matériel de l'exon 4 manque (le transcrite anormal conserve son cadre de lecture) [6]. L'hypothyroïdie présentée par le patient est compatible avec la présence dans l'exon 4 d'une tyrosine (Tyr<sup>130</sup>) qui avait été identifiée comme jouant un rôle probable dans l'hormonogénèse [7]. La seule mutation identifiée à ce jour dans le gène de la thyroperoxydase est une mutation avec décalage du cadre de lecture (duplication d'un tétranucléotide dans le huitième exon du gène) [8] qui détruit l'activité enzymatique de l'enzyme, et ce, malgré un mécanisme de «sauvetage» analogue à celui décrit chez le bœuf sud-africain pour la thyroglobuline. Cela démontre que, comme on pouvait s'y attendre, ce mécanisme opère de manière aveugle. Sa signification doit probablement être recherchée dans un contexte évolutif. Il permettrait essentiellement à des gènes ayant accumulé des mutations non-sens de se maintenir dans le *pool* de ceux qui



**Figure 1. Compilation des mutations identifiées à ce jour dans le gène du récepteur de la thyrotropine et capables de l'activer de manière constitutive ou de l'inactiver. Seules les mutations naturelles sont indiquées (par opposition à celles construites par mutagenèse dirigée). Chez l'homme, ont été trouvées deux mutations récessives, responsables de perte de fonction : Pro<sup>162</sup> → Ala et Ile<sup>167</sup> → Asn (cercles noirs) [38]. La mutation récessive avec perte de fonction chez la souris *hyt/hyt* est Pro<sup>556</sup> → Leu [39] (cercle gris). Les mutations retrouvées dans les adénomes toxiques ou responsables d'hyperthyroïdies héréditaires (indiquées par le nom de la ville dont sont originaires les familles) sont décrites dans [27, 40] ou correspondent à nos données encore non publiées. Il s'agit d'affections dominantes avec gain de fonction de la protéine anormale: Ile<sup>486</sup> → Met/Phe, Ser<sup>505</sup> → Arg « Lausanne », Val<sup>509</sup> → Ala « Nancy », Asp<sup>619</sup> → Gly, Ala<sup>623</sup> → Ile/Val, Phe<sup>631</sup> → Leu, Thr<sup>632</sup> → Ile, Cys<sup>672</sup> → Tyr « Reims » (cercles bistres).**

m/s n° 2, vol. 11, février 95

restent soumis à la sélection. On peut s'attendre à ce que ce mécanisme joue un rôle dans l'évolution de gènes initialement redondants, nés par duplication.

Des formes héréditaires d'hypothyroïdie causées par des mutations dans d'autres gènes existent certainement. Les premières mutations qui inactivent le récepteur de la TSH ont récemment été décrites (figure 1). Les mutations dans les gènes impliqués dans la captation ou l'intégration de l'iode à des composés organiques (dont les phénotypes sont connus depuis longtemps) devront attendre que les gènes correspondants aient été identifiés.

### Animaux transgéniques modèles

L'hypothyroïdie pure est une situation difficile à reproduire chez l'animal d'expérience. La chirurgie ou l'irradiation conduisent à la destruction ou à l'ablation simultanées des cellules C (et, souvent, des glandes parathyroïdes). L'hypothyroïdie médicamenteuse induite par les antithyroïdiens de synthèse est, par définition, une situation non « pure ». Un modèle de souris transgénique a été produit dans lequel les thyrocytes peuvent être détruits par administration à l'animal de ganciclovir [9]. L'astuce consiste à diriger vers la thyroïde l'expression du gène codant pour la thymidine kinase d'*Herpes simplex*, en le plaçant sous le contrôle du promoteur du gène de la thyroglobuline bovine. Cette portion du gène contient des éléments *cis* impliqués dans le contrôle hormonal et histo-spécifique du gène [10]. La thymidine kinase d'*Herpes simplex* transforme le ganciclovir en un métabolite toxique qui tue la cellule. De façon surprenante, cet effet qui n'avait été décrit que dans des cellules qui se divisent activement, se manifeste dans la thyroïde, dont l'activité mitotique est extrêmement faible. En permettant l'ablation sélective des cellules folliculaires thyroïdiennes, ce modèle expérimental ouvre la voie à l'étude des interactions entre les thyrocytes et les autres types cellulaires de la glande (fibroblastes, cellules endothéliales).

### Hypothyroïdies auto-immunitaires

**La thyroïdite d'Hashimoto.** La principale contribution de la génétique moléculaire à la compréhension de la thyroïdite d'Hashimoto a été la confirmation de l'identité entre « antigène microsomal » et thyroperoxydase [11-14]. Les épitopes de la thyroperoxydase qui sont la cible d'auto-anticorps ont été l'objet d'un long débat quant à leur nature séquentielle ou conformationnelle. On peut résumer la situation en disant que des épitopes discontinus et séquentiels sont impliqués et qu'un segment de la molécule qui s'étend des résidus 590 à 722 contient des épitopes séquentiels reconnus par les anticorps de patients présentant des titres élevés d'auto-anticorps [15, 16]. La portée clinique ou physiopathologique de cette controverse est limitée. Une des retombées de ces études est la possibilité de produire de la thyroperoxydase recombinante en tant que réactifs pour la mesure des auto-anticorps [17, 18].

**Le myxœdème idiopathique.** Dans certains cas de myxœdèmes idiopathiques, des anticorps capables de bloquer les effets de la thyrotropine (TSH) sur son récepteur ont été mis en évidence [19]. La cartographie précise des épitopes reconnus par ces auto-anticorps n'a pas été réalisée, mais le fait que des lignées cellulaires exprimant le récepteur TSH humain recombinant soient disponibles a rendu plus aisée leur mesure dans le plasma de malades. Lorsque les relations structure-fonction du récepteur TSH seront mieux connues, on peut espérer que ces anticorps contribueront à améliorer notre compréhension des mécanismes impliqués dans l'activation du récepteur.

## L'hyperthyroïdie

### Maladie de Graves-Basedow

Comme dans le cas du myxœdème idiopathique, le clonage moléculaire du récepteur de la TSH [20] a fourni de meilleurs outils pour mesurer les auto-anticorps responsables de l'activation inappropriée du récepteur, caractéristique de cette affection. En effet, l'utilisation de lignées cellulaires

## RÉFÉRENCES

14. Seto P, Hirayu H, Magnusson RP, Gestautas J, Portmann L, *et al.* Isolation of a complementary DNA clone for thyroid microsomal antigen. Homology with the gene for thyroid peroxidase. *J Clin Invest* 1987 ; 80 : 1205-8.
  15. Libert F, Ludgate M, Dinsart C, Vassart G. Thyroperoxidase, but not the thyrotropin receptor, contains sequential epitopes recognized by autoantibodies in recombinant peptides expressed in the pUEX vector. *J Clin Endocrinol Metab* 1991 ; 73 : 857-60.
  16. Finke R, Seto P, Ruf J, Carayon P, Rappoport B. Determination of the molecular level of a B-cell epitope on thyroid peroxidase likely to be associated with autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1991 ; 73 : 919-21.
  17. Ludgate M, Mariotti S, Libert F, Dinsart C, Piccolo P, *et al.* Antibodies to human thyroid peroxidase in autoimmune thyroid disease : studies with a cloned recombinant complementary deoxyribonucleic acid epitope. *J Clin Endocrinol Metab* 1989 ; 68 : 1091-6.
  18. Kaufman KD, Filetti S, Seto P, Rappoport B. Recombinant human thyroid peroxidase generated in eukaryotic cells : a source of specific antigen for the immunological assay of antimicrosomal antibodies in the sera of patients with autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1990 ; 70 : 724-8.
  19. Madec AM, Clavel S, Stefanutti A, Orziaggi J. Blocking anti-thyrotropin receptor antibodies desensitize cultured human thyroid cells. *Endocrinology* 1988 ; 123 : 2062-6.
  20. Vassart G, Dumont JE. The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocyte function and growth. *Endocrinol Rev* 1992 ; 13 : 596-611.
  21. Heufelder AE, Bahn RS. Evidence for the presence of a functional TSH-receptor in retro-ocular fibroblasts from patients with Graves' ophthalmopathy. *Exp Clin Endocrinol* 1992 ; 100 : 62-7.
  22. Paschke R, Elisei R, Vassart G, Ludgate M. Lack of evidence supporting the presence of mRNA for the TSH receptor in extra-ocular muscle. *J Endocrinol Invest* 1993 ; 16 : 329-32.
  23. Chelly J, Concordet JP, Kaplan JC, Kahn A. Illegitimate transcription : transcription of any gene in any cell type. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989 ; 86 : 2617-21.
  24. Dumont JE, Lamy F, Roger P, Maenhaut C. Physiological and pathological regulation of thyroid cell proliferation and differentiation by thyrotropin and other factors. *Physiological Rev* 1992 ; 72 : 667-97.
  25. Masters SB, Landis CA, Bourne HR. GTPase-inhibiting mutations in the alpha subunit of Gs. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 1990 ; 24 : 70-5.
  26. Kjelsberg MA, Cotecchia S, Ostrowski J, Caron MG, Lefkowitz RJ. Constitutive activation of the alpha 1B-adrenergic receptor by all amino acid substitutions at a single site. Evidence for a region which constrains receptor activation. *J Biol Chem* 1992 ; 267 : 1430-3.
- stables exprimant comme seule protéine thyroïdienne le récepteur humain cloné facilite grandement la mesure spécifique des anticorps dirigés contre cette protéine, que ce soit par compétition pour la liaison de TSH radiomarquée, ou par la stimulation de l'adénylyl cyclase.
- La structure modulaire du récepteur de la TSH (*figure 2*), avec son grand domaine aminoterminal extracellulaire responsable de la liaison de l'hormone, et sa partie carboxyterminale responsable de la transduction du signal vers la protéine G<sub>sa</sub>, semblait idéalement adaptée à la production séparée du domaine extracellulaire en tant que réactif pour le développement d'un test de mesure des auto-anticorps. Les difficultés rencontrées dans la production de grandes quantités de récepteurs, ou de son domaine extracellulaire seul, dans sa forme native (c'est-à-dire capable de lier la TSH), constituent un obstacle sérieux à la mise au point d'une nouvelle génération de trousse diagnostiques. L'identification des épitopes impliqués dans la reconnaissance ou l'activation du récepteur par les auto-anticorps est limitée par leur nature discontinue et par notre ignorance de la structure tertiaire de la protéine.
- L'implication directe du récepteur de la TSH dans l'ophtalmopathie de la maladie de Basedow reste un problème fort débattu. Le clonage du récepteur n'a pas modifié sensiblement cette situation. Le fait que des transcrits du récepteur soient mis en évidence par PCR dans l'orbite par certains groupes, et non par d'autres [21, 22], illustre les difficultés associées à l'interprétation de données engendrées par une méthode aussi sensible que la PCR quand on connaît l'existence du phénomène de transcription illégitime [23]. Le problème reste ouvert.

### Les adénomes thyroïdiens hyperactifs ou « toxiques »

La physiopathologie des nodules thyroïdiens hyperfonctionnels, qui sont responsables de 5 % à 30 % des hyperthyroïdies, selon l'abondance de l'iode dans l'alimentation, est bien définie : le tissu de l'adénome se comporte comme s'il était chroniquement activé quant à sa croissance

et sa fonction, en l'absence de TSH. C'est cette caractéristique qui définit l'« autonomie » de ces adénomes. Lorsqu'il devint clair que l'activation de la cascade de régulation de l'AMPc était capable de stimuler à la fois la croissance et la fonction du thyrocyte [24], il devint logique de rechercher la cause de l'expansion clonale de cellules thyroïdiennes, telle qu'on l'observe dans les adénomes toxiques, dans l'activation constitutive de cette cascade. Après la découverte initiale que des mutations somatiques affectant l'activité GTPase de la protéine G<sub>sa</sub> étaient responsables d'une fraction des adénomes hypophysaires somatotropes, des mutations similaires furent trouvées dans des adénomes thyroïdiens [25]. La possibilité que des mutations somatiques affectant le gène du récepteur de la TSH pourraient causer le même phénotype était suggérée par des observations faites sur les récepteurs adrénérgiques. Le groupe de R. Lefkowitz démontra par mutagenèse dirigée que le remplacement de résidus de la partie C-terminale de la troisième boucle cytoplasmique du récepteur  $\alpha 1b$  adrénérgique pouvait conduire à l'activation constitutive du récepteur [26]. L'homologie de séquence et l'origine évolutive commune des récepteurs adrénérgiques et de la portion effectrice du récepteur de la TSH suggèrent fortement que les mécanismes impliqués dans l'activation de ces récepteurs sont similaires. Sur ces bases, des mutations spontanées affectant le récepteur de la TSH ont été recherchées dans des adénomes thyroïdiens hyperfonctionnels. Sur onze adénomes étudiés, huit présentaient une mutation à l'état hétérozygote dans le récepteur. Ces mutations se répartissaient en cinq classes ([27] et données non publiées). Deux affectent la portion C-terminale de la troisième boucle cytoplasmique du récepteur, la troisième et la quatrième affectent des résidus conservés de la sixième hélice transmembranaire, et la cinquième est localisée dans la première boucle extracellulaire (*figure 1*). Le gène présent dans le tissu normal entourant les tumeurs est normal sur les deux allèles. En l'absence de TSH, les récepteurs mutés, exprimés par transfection dans des cellules COS, stimulent de façon nettement plus

importante que normalement l'accumulation d'AMPc. Ces résultats n'expliquent pas tous les cas d'adénomes toxiques, ce qui laisse place à la découverte de mutations dans d'autres gènes. Ils constituent, néanmoins, la première démonstration que les récepteurs couplés aux protéines G peuvent se comporter comme des proto-oncogènes dans les tissus pour lesquels la cascade de régulation qu'ils contrôlent est mitogénique. D'un point de vue plus fondamental, les mutations identifiées dans les tumeurs nous fournissent des informations précieuses sur les relations structure-fonction des récepteurs des hormones glycoprotéiques. Elles identifient des résidus clés impliqués dans le maintien du récepteur dans son état inactif (figure 1). Le fait que des mutations somatiques identiques soient retrouvées dans des tumeurs de patients différents démontre que, contrairement aux observations réalisées avec les récepteurs adrénergiques, toutes les substitutions d'acides aminés ne sont pas qualitativement équivalentes. Lorsque cette information sera traduite en termes de structure, dans des modèles tridimensionnels du récepteur, elle nous aidera sûrement à comprendre les mécanismes qui président à son activation.

### L'hyperthyroïdie héréditaire

Une forme d'hyperthyroïdie héréditaire à transmission autosomique dominante a été décrite par le groupe de J. Leclère [28]. Elle est caractérisée par la coexistence d'un goitre hyperplasique et d'une hyperthyroïdie avec TSH non détectable que n'accompagne aucun des signes d'auto-immunité caractéristiques de la maladie de Graves-Basedow. Cette entité clinique, qui a reçu le nom d'hyperplasie thyroïdienne toxique [28], correspond exactement au phénotype que l'on attendrait chez des patients porteurs de mutations germinales activatrices du récepteur de la TSH. Des mutations de ce type ont effectivement été trouvées dans deux familles du nord de la France, dont celle de la description *princeps* [28], ainsi que dans un cas d'hyperthyroïdie congénitale sporadique (figure 1 et [38]). Le parallèle est frappant avec la puberté précoce héréditaire

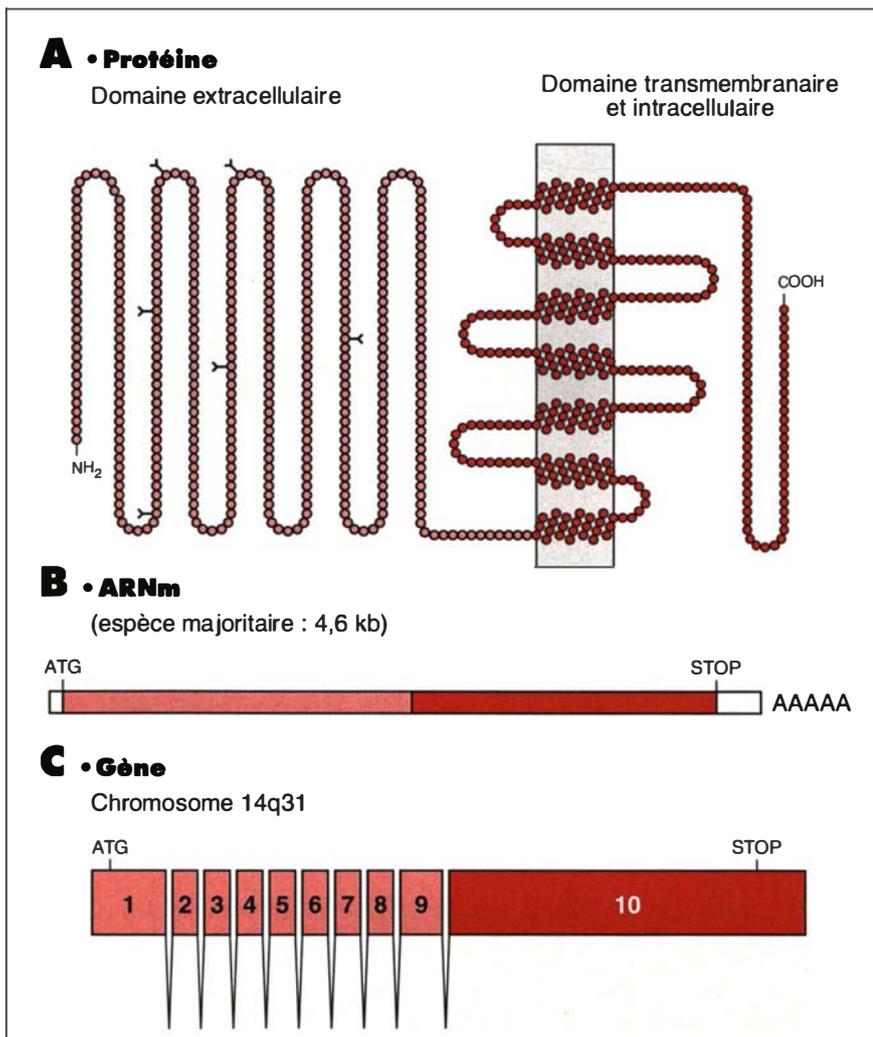


Figure 2. Relations entre la structure du récepteur de la thyrotropine et de son gène. A. Récepteur de la thyrotropine : le domaine extracellulaire, en rose, lie la TSH, TSAb et TBAb. Il est formé de 398 résidus, dont six constituent des sites de glycosylation, et présente 40 % d'identité avec les domaines correspondants des récepteurs de LH et FSH. Les domaines transmembranaire et intracellulaire sont représentés en rouge. Formés de 348 résidus, identiques pour 70 % à ceux qui composent les mêmes domaines des récepteurs LH et FSH. B. ARNm du gène codant pour la thyrotropine. L'espèce majoritaire est composée de 4,6 kb. Une phase de lecture ouverte de 2292 pb code pour 764 acides aminés, peptide signal inclus. C. Le gène de la thyrotropine s'étend sur plus de 60kb et comporte 10 exons.

## RÉFÉRENCES

27. Parma J, Duprez L, Van Sande J, Cochaux P, Gery C, *et al.* Somatic mutations in the thyrotropin receptor gene cause hyperfunctioning thyroid adenomas. *Nature* 1993 ; 365 : 649-51.

28. Thomas JS, Leclere J, Hartemann P, Duheille J, Orgiazzi J, *et al.* Familial hyperthyroidism without evidence of autoimmunity. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1982 ; 100 : 512-8.

29. Shenker A, Laue L, Kosugi S, Merendino JJ, Minegishi T, *et al.* A constitutively activating mutation of the luteinizing hormone receptor in familial male precocious puberty. *Nature* 1993 ; 365 : 652-4.

30. Cohen GB, Yang T, Robinson PR, Oprian DD. Constitutive activation of opsin : influence of charge at position 134 and size at position 296. *Biochemistry* 1993 ; 32 : 6111-5.

31. Ledent C, Dumont JE, Vassart G, Parmentier M. Thyroid expression of an A2 adenosine receptor transgene induces thyroid hyperplasia and hyperthyroidism. *EMBO J* 1992 ; 11 : 537-42.

32. Burns JS, Blaydes JP, Wright PA, Lemoine L, Bond JA, *et al.* Stepwise transformation of primary thyroid epithelial cells by a mutant Ha-ras oncogene : an *in vitro* model of tumor progression. *Mol Carcinog* 1992 ; 6 : 129-39.

33. Wynford Thomas D. Origine et progression des tumeurs épithéliales : vers les mécanismes cellulaires et moléculaires. *médecine/sciences* 1993 ; 9 : 66-75.

34. Wynford Thomas D. Molecular basis of epithelial tumorigenesis : the thyroid model. *Crit Rev Oncog* 1993 ; 4 : 1-23.

35. Ledent C, Dumont J, Vassart G, Parmentier M. Thyroid adenocarcinomas secondary to tissue-specific expression of simian virus-40 large T-antigen in transgenic mice. *Endocrinology* 1991 ; 129 : 1391-401.

36. Ludlow JW. Interactions between SV40 large-tumor antigen and the growth suppressor proteins pRB and p53. *FASEB J* 1993 ; 7 : 866-71.

37. Vousden K. Interactions of human papillomavirus transforming proteins with the products of tumor suppressor genes. *FASEB J* 1993 ; 7 : 972-9.

38. Sunthornthepvarakul T, Gottschalk ME, Hayashi Y, Refetoff S. Resistance to TSH : a new autosomal recessive syndrome caused by mutations in the TSH receptor gene on chromosome 14. *N Engl J Med* 1995 (sous presse).

39. Stein SA, Oates EL, Hall CR, Grumbles RM, Fernandez LM, Taylor NA, *et al.* Identification of a point mutation in the thyrotropin receptor of the *hyt/hyt* hypothyroid mouse. *Mol Endocrinol* 1994 ; 8 : 129.

40. Duprez L, Parma J, Van Sande J, Allegeier A, Leclère J, Schwartz C, *et al.* Germ-line mutations in the thyrotropin receptor gene cause non-autoimmune autosomal dominant hyperthyroidism. *Nature Genet* 1994 ; 7 : 396-401.

### Modèles de maladies thyroïdiennes chez la souris transgénique

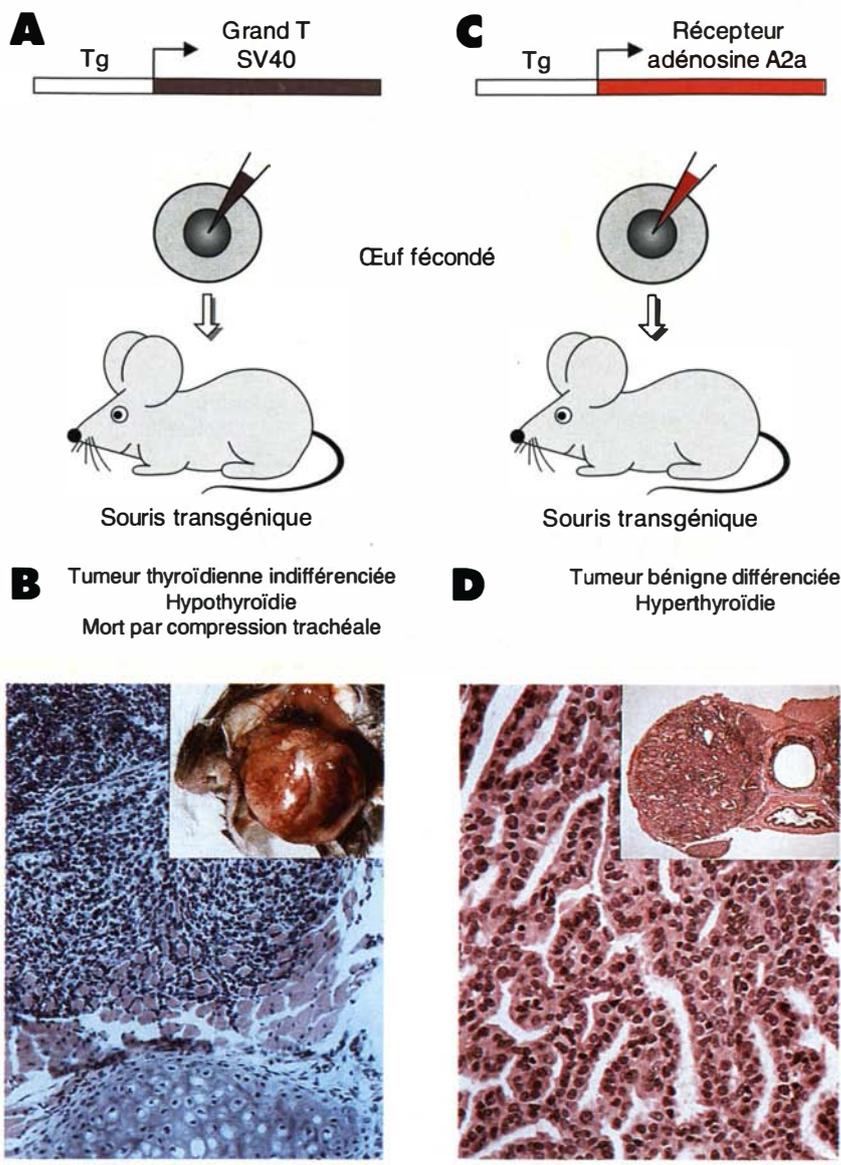


Figure 3. **Illustration des constructions utilisées pour réaliser deux modèles de tumeurs thyroïdiennes chez la souris transgénique, ainsi que des phénotypes résultants.** A. À gauche, le gène codant pour l'antigène grand T de SV40 a été placé sous le contrôle du promoteur du gène de la thyroglobuline bovine [35]. Les souris transgéniques résultantes présentent de volumineuses tumeurs très agressives (B) qui perdent rapidement leurs caractères de différenciation thyroïdienne et envahissent les structures voisines (les muscles sur l'illustration). Les souris meurent d'hypothyroïdie et d'étouffement par compression trachéale. À droite (C), c'est le gène codant pour le récepteur A2a de l'adénosine qui est placé sous le contrôle du promoteur de la thyroglobuline [31]. Les souris transgéniques exprimant ce gène dans leur thyroïde présentent une hyperthyroïdie accompagnée d'hyperplasie importante de la glande (D). Le phénotype s'explique par l'activation « constitutive » du récepteur par l'adénosine ambiante, ce qui entraîne une stimulation chronique de la cascade de l'AMPc responsable, à son tour, de la stimulation incontrôlée de la croissance et de la fonction des thyrocytes. Il en résulte un aspect typiquement papillaire illustré ici.

masculine où une mutation activatrice du récepteur de la LH/CG a été identifiée dans une famille [29]. De manière similaire, des mutations activant de façon constitutive la rhodopsine ont été rendues responsables de certaines formes de rétinite pigmentaire [30]. Étant donné la grande diversité des récepteurs couplés aux protéines G, on peut s'attendre à ce que le concept de récepteur constitutivement actif trouve l'occasion de se présenter comme une explication physiopathologique dans une série d'affections.

### Animaux transgéniques modèles

Avant que des mutations activatrices du récepteur de la TSH aient été identifiées, un modèle animal d'hyperthyroïdie héréditaire avait été « construit » sous la forme de souris transgéniques exprimant dans leur thyroïde le récepteur A2a de l'adénosine [31] (figure 3). Ce récepteur couplé exclusivement à  $G_{sa}$  se trouve continuellement stimulé par l'adénosine présente dans les fluides intercellulaires. Le résultat est la stimulation quasi constitutive de l'adénylyl cyclase qui peut être observée dans toute cellule exprimant de façon ectopique le récepteur. Dans les lignées de souris transgéniques produites, l'expression du récepteur de l'adénosine est dirigée vers la thyroïde par le promoteur de la thyroglobuline et le résultat est un goitre hyperplasique et hyperfonctionnel qui rappelle le tissu de l'adénome toxique. Ce modèle d'hyperthyroïdie héréditaire avec goitre offre la possibilité d'étudier les effets d'une hyperstimulation chronique de la cascade de l'AMPc sur la croissance du thyrocyte. Il constitue, à ce jour, la seule démonstration *in vivo* du pouvoir à la fois mitogène et activateur de fonction que possède la cascade de l'AMPc dans la thyroïde.

## Le cancer

### Proto-oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs

Hormis les mutations qui affectent la protéine  $G_{sa}$  et le récepteur de la TSH, et dont on sait qu'elles sont principalement retrouvées dans des proliférations bénignes de la glande,

trois autres oncogènes ont été impliqués dans les néoplasies thyroïdiennes. Des mutations qui diminuent l'activité GTPase des proto-oncogènes H-, K- ou N-RAS ont été trouvées dans des proliférations bénignes et malignes de la thyroïde [32], ce qui suggère qu'elles peuvent jouer un rôle dans l'initiation de la tumorigenèse. Des réarrangements géniques qui impliquent deux récepteurs appartenant à la famille des tyrosine kinases ont été retrouvés dans des cancers papillaires de la thyroïde [33]. L'anti-oncogène *p53* est probablement le gène que l'on retrouve le plus souvent muté dans les néoplasies humaines. A ce jour, il a été retrouvé muté dans certains cancers thyroïdiens peu différenciés [34]. Les inter-relations entre la cascade de l'AMPc et celles des tyrosine kinases dans le contrôle de la croissance et de la fonction du thyrocyte sont discutées plus en détail dans l'article de C. Maenhaut *et al.* (voir p. 204 de ce numéro).

### Souris transgéniques modèles

La souris transgénique offre un moyen élégant d'étudier le rôle respectif des différents proto-oncogènes ou cascades de régulation dans la tumorigenèse thyroïdienne. Un modèle très agressif de cancer thyroïdien a ainsi été construit en ciblant vers le thyrocyte l'expression de l'antigène grand T du virus SV40 [35] (figure 3). Après un stade initial d'hyperplasie, des tumeurs focales se développent et les souris meurent généralement de compression trachéale occasionnée par d'énormes tumeurs. Les thyrocytes perdent leur phénotype différencié et l'architecture folliculaire est détruite, ce qui explique l'hypothyroïdie que présentent ces animaux. Les tumeurs sont invasives et disséminent par métastase. Toutes ces caractéristiques font de cette lignée de souris un modèle proche du cancer thyroïdien anaplasique humain. Dans le but d'étudier l'importance relative de deux mécanismes qui ont été impliqués dans le mode d'action de l'antigène grand T (liaison aux anti-oncogènes  $p105^{Rb}$  et  $p53$  [36]), des lignées de souris sont actuellement à l'étude qui expriment dans leurs thyroïdes les oncogènes E6 ou E7 du virus du papillome humain (HPV). Ces

deux protéines exercent leurs propriétés d'oncogènes en se liant respectivement à  $p53$  et  $p105^{Rb}$  [37].

La puissance de la méthodologie des animaux transgéniques réside dans la possibilité d'étudier les effets de l'« ajout » d'un oncogène au complément des gènes exprimés normalement dans leur thyroïde. De plus, elle permet d'étudier la coopération de plusieurs oncogènes par le croisement de souris exprimant des oncogènes différents (E6 et E7 de HPV, par exemple). Le croisement de ces lignées avec celle de souris exprimant le récepteur A2a de l'adénosine dans leur thyroïde permettra en outre d'explorer les interactions entre la cascade de l'AMPc et les effets propres de ces oncogènes. Ces modèles animaux simples permettront, de plus, d'étudier les effets de facteurs d'environnement (iode, sélénium, goitrigènes dans l'alimentation, radiations ionisantes...) sur la pathogénie de diverses maladies thyroïdiennes ■

## Summary

### Molecular genetics of thyroid disorders

Over the past twenty years, the recombinant DNA technology has led to the cloning of the three major thyroid-specific protein genes (thyroglobulin, thyroperoxidase, TSH receptor), which happen to be also the main thyroid autoantigens implicated in thyroid diseases. In this frame, the impact of molecular genetics on the understanding of etiopathogeny and diagnosis of thyroid diseases is summarized with special emphasis on a recently discovered genetic mechanism responsible for toxic nodules and hereditary thyrotoxicosis. One fruitful fallout of the basic research on thyroid-specific gene expression has been the possibility to target the expression of a series of genes to the thyroid in transgenic mice. The result is the availability of mouse models mimicking human thyroid diseases: *e.g.* destructive hypothyroidism, hyperactive thyroid adenomas and thyroid cancers exhibiting varying levels of differentiation.