



Université de Montréal

# **Exploration génétique de l'hypothyroïdie congénitale par dysgénésie thyroïdienne**

par

Fabien Magne

Département des Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)  
en Sciences Biomédicales  
option Générale

Octobre, 2015

© Magne, 2015

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée:

Exploration génétique de l'hypothyroïdie congénitale par dysgénésie thyroïdienne

Présenté par :  
Fabien Magne

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr André Tremblay, président-rapporteur  
Dr Johnny Deladoëy, directeur de recherche  
Dr Mark E. Samuels, co-directeur  
Dre Zoha Kibar, membre du jury  
Dr Yves Giguère, examinateur externe  
Dre Carine Nyalendo, représentante du doyen de la FES

## Résumé

L'hypothyroïdie congénitale par dysgénésie thyroïdienne (HCDT, ectopie dans plus de 80 %) a une prévalence de 1 cas sur 4000 naissances vivantes. L'HCDT est la conséquence d'une défaillance de la thyroïde embryonnaire à se différencier, à se maintenir ou à migrer vers sa localisation anatomique (partie antérieure du cou), qui aboutit à une absence totale de la thyroïde (athyréose) ou à une ectopie thyroïdienne (linguale ou sublinguale). Les HCDT sont principalement non-syndromiques (soit 98% des cas sont non-familiale), ont un taux de discordance de 92% chez les jumeaux monozygotes, et ont une prédominance féminine et ethnique (i.e., Caucasienne). La majorité des cas d'HCDT n'a pas de cause connue, mais est associée à un déficit sévère en hormones thyroïdiennes (hypothyroïdie). Des mutations germinales dans les facteurs de transcription liés à la thyroïde (*NKX2.1*, *FOXE1*, *PAX8*, *NKX2.5*) ont été identifiées dans seulement 3% des patients atteints d'HCDT sporadiques et l'analyse de liaisons exclue ces gènes dans les rares familles multiplex avec HCDT. Nous supposons que le manque de transmission familiale claire d'HCDT peut résulter de la nécessité d'au moins deux « hits » génétiques différents dans des gènes importants pour le développement thyroïdien.

Pour répondre au mieux nos questions de recherche, nous avons utilisé deux approches différentes: 1) une approche gène candidat, *FOXE1*, seul gène impliqué dans l'ectopie dans le modèle murin et 2) une approche en utilisant les techniques de séquençage de nouvelle génération (NGS) afin de trouver des

variants génétiques pouvant expliquer cette pathologie au sein d'une cohorte de patients avec HCDT.

Pour la première approche, une étude cas-contrôles a été réalisée sur le promoteur de *FOXE1*. Il a récemment été découvert qu'une région du promoteur de *FOXE1* est différentiellement méthylée au niveau de deux dinucléotides CpG consécutifs, définissant une zone cruciale de contrôle de l'expression de *FOXE1*. L'analyse d'association basée sur les haplotypes a révélé qu'un haplotype (Hap1: ACCCCCCdel1C) est associé avec le HCDT chez les Caucasiens ( $p = 5 \times 10^{-03}$ ). Une réduction significative de l'activité luciférase est observée pour Hap1 (réduction de 68%,  $p < 0.001$ ) comparé au promoteur WT de *FOXE1*. Une réduction de 50% de l'expression de *FOXE1* dans une lignée de cellules thyroïdienne humaine est suffisante pour réduire significativement la migration cellulaire (réduction de 55%,  $p < 0.05$ ). Un autre haplotype (Hap2: ACCCCCCCC) est observé moins fréquemment chez les Afro-Américain comparés aux Caucasiens ( $p = 1.7 \times 10^{-03}$ ) et Hap2 diminue l'activité luciférase (réduction de 26%,  $p < 0.001$ ). Deux haplotypes distincts sont trouvés fréquemment dans les contrôles Africains (Black-African descents). Le premier haplotype (Hap3: GTCCCAAC) est fréquent (30.2%) chez les contrôles Afro-Américains comparés aux contrôles Caucasiens (6.3%;  $p = 2.59 \times 10^{-9}$ ) tandis que le second haplotype (Hap4: GTCCGCAC) est trouvé exclusivement chez les contrôles Afro-Américains (9.4%) et est absent chez les contrôles Caucasiens ( $P = 2.59 \times 10^{-6}$ ).

Pour la deuxième approche, le séquençage de l'exome de l'ADN leucocytaire entre les jumeaux MZ discordants n'a révélé aucune différence. D'où

l'intérêt du projet de séquençage de l'ADN et l'ARN de thyroïdes ectopiques et orthotopiques dans lesquelles de l'expression monoallélique aléatoire dans a été observée, ce qui pourrait expliquer comment une mutation monoallélique peut avoir des conséquences pathogéniques. Finalement, le séquençage de l'exome d'une cohorte de 36 cas atteints d'HCDT a permis d'identifier de nouveaux variants probablement pathogéniques dans les gènes récurrents *RYR3*, *SSPO*, *IKBKE* et *TNXB*. Ces quatre gènes sont impliqués dans l'adhésion focale (jouant un rôle dans la migration cellulaire), suggérant un rôle direct dans les défauts de migration de la thyroïde. Les essais de migration montrent une forte diminution (au moins 60% à 5h) de la migration des cellules thyroïdiennes infectées par shRNA comparés au shCtrl dans 2 de ces gènes. Des zebrafish KO (-/- et +/-) pour ces nouveaux gènes seront réalisés afin d'évaluer leur impact sur l'embryologie de la thyroïde.

**Mots-clés:** Hypothyroïdie congénitale, Thyroïde ectopique, Séquençage de nouvelle génération, Séquençage d'exome, Séquençage d'ARN, Migration, *FOXE1*

## **Abstract**

Congenital hypothyroidism by thyroid dysgenesis (CHTD) is a common disorder with prevalence at birth of 1 in 4000 live births. CHTD is the consequence of a failure of embryonic thyroid to differentiate or to migrate to its anatomical location (front of the neck), which leads to a total lack of thyroid (athyreosis) or an ectopic thyroid (lingual or sublingual). The most common category is ectopic thyroid diagnosis (up 85%). Most cases of CHTD have no known cause, but are associated with severe deficiency of thyroid hormones (hypothyroidism). The clinical diagnosis of hypothyroidism is usually possible only when permanent brain damage is already present. On the other hand, biochemical screening on the second day of life allows initiating replacement therapy from the second week of life, pre-empting severe intellectual deficit associated with the congenital hypothyroidism. Even with early treatment (an average of 9 days), loss of IQ, which is not exclusively due to the severity of hypothyroidism, can still be observed. Molecular markers may identify patients at risk for intellectual deficit (by e.g., genes involved in neuronal migration and the thyroid during development). These patients might benefit from early intervention to stimulate their neurocognitive development.

Cases of CHTD are mainly non-syndromic and sporadic (in 98% of cases, there is no other affected in the family), have a discordant rate of 92% in monozygotic twins, and a female and ethnic (Caucasian) dominance. Germline mutations in thyroid-related transcription factors have been identified in only 3%

of patients with sporadic CHTD, and linkage analysis has excluded these genes in rare multiplex families with CHTD. In addition, non-penetrating mutations among close relatives (for *Nkx2.5* gene) suggest that modifying genes as germline variants de novo copy number (CNV) and / or somatic mutations are associated with CHTD.

To respond to this research questions, we used two different approaches: 1) a candidate gene approach studying *FOXE1*, the only gene involved in ectopic thyroid in the mouse model and, 2) an approach using next generation sequencing techniques (NGS) to find genetic variants that could explain this pathology using a cohort of mostly sporadic CHTD. Variants and genes discovered by these two different approaches have been validated and their functional impact on the thyroid gland was evaluated by several experiments.

**Keywords :** Congenital hypothyroidism, Ectopic thyroid, Next generation sequencing, Exome sequencing, RNA sequencing, Migration, *FOXE1*

# Table des matières

Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des abréviations utilisées.....	xi
Chapitre I : Introduction.....	1
1. La glande thyroïde .....	1
1.1. Anatomie et embryogénèse de la glande thyroïde .....	1
1.1.1. Embryologie.....	1
1.2. Hormones thyroïdiennes .....	6
1.2.1. Structure des hormones thyroïdiennes .....	6
1.2.2. Synthèse des hormones thyroïdiennes .....	7
1.3. Contrôle de la fonction thyroïdienne .....	9
1.4. Les récepteurs nucléaires thyroïdiens .....	10
2. Pathologies de la thyroïde.....	12
2.1. Hypothyroïdie .....	12
2.1.1. Thyroïdite de Hashimoto .....	12
2.1.2. Thyroïdite de De Quervain .....	12
2.1.3. Hypothyroïdie congénitale.....	13
2.1.3.1. Définition et dépistage .....	13
2.1.3.2. Hypothyroïdie congénitale permanente .....	15
2.1.3.2.1. Diagnostic et traitement de l'hypothyroïdie primaire.....	15
2.1.3.2.2. Dysgénésie thyroïdienne.....	16
2.1.3.2.2.1. Mécanismes moléculaires et facteurs génétiques.....	17
2.1.3.2.2.2. <i>FOXE1</i> .....	20
2.1.3.2.2.3. <i>NKX2.1</i> .....	23
2.1.3.2.2.4. <i>PAX8</i> .....	25
2.1.3.2.2.5. <i>NKX2.5</i> .....	26
2.1.3.2.2.6. <i>HHEX</i> .....	28
2.1.3.2.2.7. Autres mécanismes moléculaires.....	29
2.1.3.2.3. Dyshormonogénèse.....	31



2.1.3.2.3.1. Défauts spécifiques .....	31
2.1.3.2.3.2. <i>TPO</i> .....	31
2.1.3.2.3.3. <i>TG</i> .....	32
2.1.3.2.3.4. <i>SLC26A4</i> .....	33
2.1.3.2.3.5. <i>DUOX</i> .....	33
2.1.3.3. Hypothyroïdie congénitale transitoire.....	34
2.2. Hyperthyroïdie .....	35
2.2.1. Maladie de Graves .....	35
3. Le séquençage exomique .....	36
3.1. Historique.....	36
3.2. Description de la technique.....	37
3.3. Analyse des données .....	41
Chapitre II : Hypothèses et approches expérimentales .....	44
Chapitre III : Résultats .....	46
1. Étude génétique de jumeaux monozygotes discordants pour la dysgénésie thyroïdienne .....	46
1.1. Situation du sujet.....	46
1.2. Article 1.....	47
1.3. Discussion et perspectives .....	73
2. Étude d'une région promotrice de <i>FOXE1</i> , gène impliqué dans l'embryologie de la glande thyroïde .....	74
2.1. Situation du sujet.....	74
2.2. Article 2.....	75
2.3. Discussion et perspectives .....	104
3. Les ectopies thyroïdiennes : des tissus soumis à une expression monoallélique? .....	107
3.1. Situation du sujet.....	107
3.2. Article 3.....	109
3.3. Discussion et perspectives .....	135
4. À la découverte de nouveaux gènes causant l'hypothyroïdie congénitale par dysgénésie thyroïdienne .....	136

4.1. Situation du sujet.....	136
4.2. Article 4.....	137
4.3. Résultats préliminaires et conclusions .....	138
Chapitre IV : Discussion .....	148
Chapitre V : Conclusion.....	153
Annexe I : Bioinactive ACTH Causing Glucocorticoid Deficiency .....	155
Annexe II : Conserved Telomere Length in Human Ectopic Thyroids: An Argument Against Premature Differentiation Causing Arrested Migration .....	163
Bibliographie.....	i

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Évènements morphogénétiques clés au cours du développement de la thyroïde chez les différentes espèces .....	3
Tableau 2 : Signes cliniques de l'hypothyroïdie congénitale .....	14
Tableau 3 : Modèles de souris transgéniques pour la dysgénésie thyroïdienne.....	18
Tableau 4 : Gènes humains et modèles animaux pour les dysgénésies thyroïdiennes .....	19
Tableau 5 : Résumé des mutations répertoriées du gène <i>FOXE1</i> .....	22
Tableau 6 : Résumé des mutations répertoriées du gène <i>NKX2.1</i> .....	24
Tableau 7 : Résumé des mutations répertoriées du gène <i>PAX8</i> .....	26
Tableau 8 : Résumé des mutations répertoriées du gène <i>NKX2.5</i> .....	27
Tableau 9 : Liste des variants rares validés dans la cohorte de 36 exomes .....	140
Tableau 10 : Analyse statistique « préliminaire » des 36 exomes HCDT avec variants validés dans les gènes sélectionnés .....	143
Tableau 11 : Résultats de l'effet des shRNA ciblant les gènes d'intérêts.....	144

## Liste des figures

Figure 1 : Expression des facteurs de transcription durant les étapes du développement de la glande thyroïde.....	2
Figure 2 : Anatomie de la thyroïde chez différentes espèces.....	4
Figure 3 : Embryologie de la glande thyroïde autour de la quatrième semaine.....	5
Figure 4 : Structure des hormones thyroïdiennes.....	7
Figure 5 : Schéma de synthèse des hormones thyroïdiennes.....	9
Figure 6 : Axe Hypothalamus-Hypophyse-Thyroïde.....	10
Figure 7 : Algorithme diagnostique de détection de l'hypothyroïdie congénitale primaire.....	16
Figure 8 : Étapes du séquençage de l'exome avec capture par hybridation.....	38
Figure 9 : Exemples de stratégies à utiliser pour le séquençage d'exome.....	40
Figure 10 : Protocole de filtration des données des exomes.....	43
Figure 11 : Effets du "knockdown" de FOXE1 sur le noyau et le cytosquelette des cellules Nthy-ori.....	105
Figure 12 : Exemple de pédigrées de cas HCDDT de cause polygénique.....	142
Figure 13 : Validation de l'expression dans les Nthy-ori des gènes d'intérêts.....	143
Figure 14 : Essais de migration cellulaire en temps réel des gènes d'intérêts.....	145

## Liste des abréviations utilisées

ADN/DNA : Acide Désoxyribonucléique

ARN/RNA : Acide Ribonucléique

ARNm : ARN messenger

cDNA : ADN complémentaire

Chr : Chromosome

HC : Hypothyroïdie congénitale

HCDT : Hypothyroïdie Congénitale par Dysgénésie Thyroïdienne

Hpf : Heures après fertilisation

MZ : Monozygote

NGS : Next Generation Sequencing (ou Séquençage de Nouvelle Génération)

PCR : Polymerase Chain Reaction (ou Réaction en Chaîne par Polymerase)

SNP : Single Nucleotide Polymorphism (ou Polymorphisme nucléotidique)

TG : Thyroglobuline

TPO : Thyroperoxydase

WES : Whole Exome Sequencing (ou Séquençage entier de l'exome)

WT : Wild Type (ou Type Sauvage)

TR : récepteurs nucléaires thyroïdiens

*À mes parents qui ont toujours cru  
en moi*

## Remerciements

Je voudrais dans un premier temps remercier très sincèrement mon Directeur, Dr Johnny Deladoëy, pour m'avoir fait confiance en m'offrant un poste afin que je puisse réaliser mon Ph.D. Ces années passées dans votre laboratoire furent très enrichissantes et très plaisantes. Je souhaiterais également vous remercier pour tous vos conseils au cours de ma formation, qui m'ont permis de me dépasser et de poursuivre dans les bonnes directions mes différents projets. Enfin, je suis très fier d'avoir pu vous aider à apporter de nouveaux éléments clés dans votre domaine de recherche, en espérant qu'ils auront des impacts positifs tant dans la compréhension de la physiopathologie que dans le dépistage des nouveau-nés.

Mes remerciements vont aussi à mon co-directeur, Dr Mark E. Samuels, pour ses conseils et son enseignement, qui m'ont permis de réaliser au mieux mes différents projets, et plus particulièrement les volets génétiques.

Je souhaiterais également remercier Dr Guy Van Vliet pour son encadrement, son soutien et son implication tout au long mon doctorat. Vous connaître et vous côtoyer pendant ces années fut un véritable plaisir.

J'aimerais remercier tout particulièrement mes parents pour leur soutien et leurs encouragements tout au long de mon doctorat. Vous avez été présents à chaque moment, dans les bons comme dans les plus difficiles. Si j'en suis arrivé ici aujourd'hui, c'est en grande partie grâce à vous deux. Je vous en serais toujours très reconnaissant. Merci énormément !

Enfin, mes remerciements vont à Mme Stéphanie Larrivée-Vanier pour son aide et ses conseils au cours de mes projets.

Encore une fois, merci à tous pour ces merveilleuses années passées au sein du centre de recherche et du département d'endocrinologie de l'hôpital Sainte-Justine.

# Chapitre I : Introduction

## 1. La glande thyroïde

### 1.1. Anatomie et embryogénèse de la glande thyroïde

La glande thyroïde est un organe endocrinien impair et médian, situé sur la partie inférieure du cou, suite à sa descente depuis la base de la langue, le long du canal du thyroglosse. La glande est constituée de deux parties latérales assez volumineuses, les lobes gauches et droits, reliés entre eux sur la ligne médiane par une partie mince et étroite appelé isthme, située sur l'antéro-externe du larynx et la trachée, au niveau des deuxième et troisième anneaux trachéaux. La glande thyroïde normale pèse environ 30 grammes, mesure environ 5 cm de large et 5 cm de haut. Cette glande est plus grosse chez les femmes, et augmente encore de volume pendant la grossesse [1, 2].

#### 1.1.1. Embryologie

Chez tous les vertébrés, la thyroïde en développement est d'abord visible comme un épaissement de l'épithélium endodermique émergent à la partie la plus antérieure de l'intestin antérieur, nommé « foramen caecum » chez l'humain. Cette ébauche de thyroïde médiane est visible à E8-8.5 jours chez les souris, à 24 hpf chez le poisson zèbre et à E20-22 jours chez l'humain (Tableau 1 et Figure 1). À ce moment, les cellules thyroïdiennes primitives ont déjà une signature moléculaire distincte, avec une co-expression des quatre facteurs de transcription



*HHEX*, *NKX2.1*, *PAX8* et *FOXE1* (facteurs de transcription qui seront discutés en détails plus bas). Par la suite, la thyroïde primitive se déplace progressivement pour atteindre sa position finale, à la septième semaine chez l'homme.

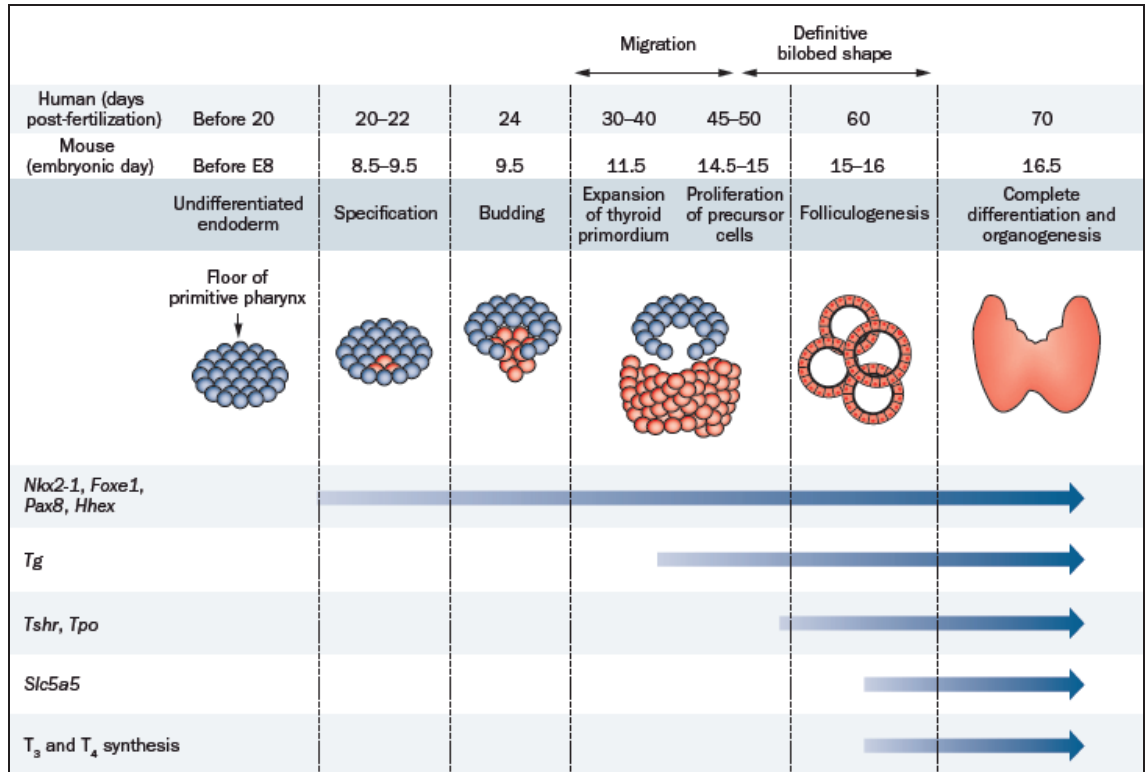


Figure 1 : Expression des facteurs de transcription durant les étapes du développement de la glande thyroïde [3]

Il est important de souligner que l'expression des quatre facteurs de transcription mentionnés précédemment se fait durant toutes les étapes de développement, à partir de l'étape de spécification (E20-22 pour l'humain et E8.5-9.5 chez la souris) [3]. Chez la souris, le bourgeon se détache à E10.5 et migre pour atteindre sa position finale à E13.5 [4, 5].

Tableau 1 : Évènements morphogénétiques clés au cours du développement de la thyroïde chez les différentes espèces [4]

<b>Espèces</b>	<b>Spécification<sup>*</sup></b>	<b>Bourgeonnement</b>	<b>Migration</b>	<b>Formation follicule</b>
<b>Humain</b>	E20-22	E24	E25-50	E70
<b>Souris</b>	E8.5	E10	E10.5-13.5	E15.5
<b>Poisson zèbre</b>	24 hpf	32 hpf	35-45 hpf	55 hpf

- : spécification de l'ébauche thyroïdienne

Selon les espèces, les glandes thyroïdes définitives ont une forme qui est différente, sans qu'il y ait un motif distinctif lié aux grands groupes de vertébrés. Chez l'homme ainsi que chez la plupart des mammifères, mais aussi chez quelques reptiles (exemple : crocodiles), la thyroïde a une structure bilobée en forme de papillon, avec les lobes reliés par un isthme mince situé en avant de la trachée proximale. Chez les oiseaux et la plupart des reptiles, la thyroïde est complètement séparée en deux organes distincts. Enfin chez les poissons, la thyroïde n'est pas encapsulée mais est plutôt constituée d'un nombre variable de structures folliculaires, qui sont plus ou moins reliées entre elles et sont distribuées sur la ligne médiane au milieu du mésenchyme subpharyngial (Figure 2) [6].

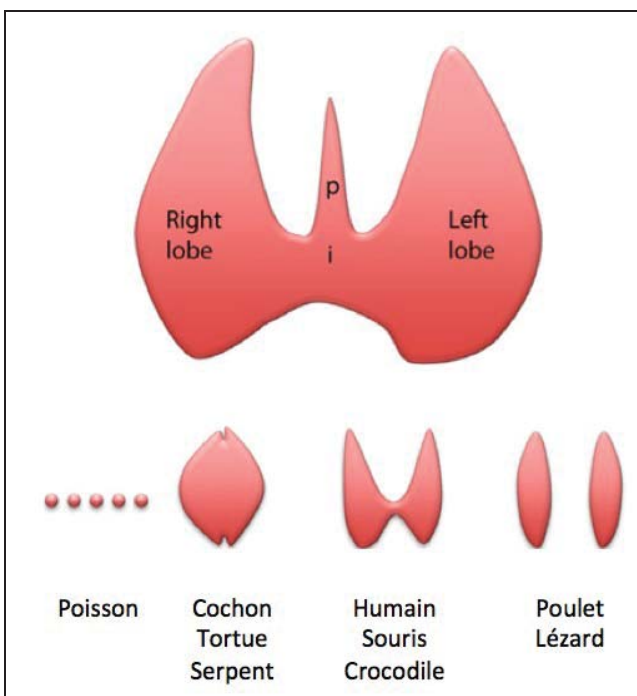


Figure 2 : Anatomie de la thyroïde chez différentes espèces (modifiée de [6])

La glande thyroïde mature provient de deux structures embryonnaires distinctes, qui sont d'une part un diverticule situé au niveau de la paroi ventrale médiane du pharynx, constitué des cellules folliculaires et de l'autre les corps ultimo-branchiaux [5, 7]. Au cours de la quatrième semaine, un épaissement endodermique apparaît dans la moitié inférieure du pharynx primitif, entre les première et deuxième poches pharyngées (Figure 3) [1].

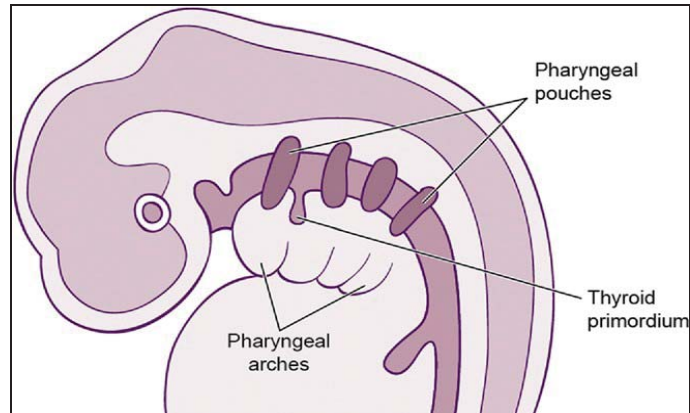


Figure 3 : Embryologie de la glande thyroïde autour de la quatrième semaine [1]

Au cours des trois semaines suivantes, le tissu thyroïdien primitif descend en avant de l'os hyoïde et des cartilages du larynx, pour arriver à la base du cou. Le canal thyroéoglosse, qui est attaché au niveau ventral du pharynx où il contribue à former la langue, se rétracte et se résorbera par la suite. La forme initiale de la glande thyroïde est plutôt sphérique et devient bilobée lors de son élargissement, prenant ainsi sa place définitive lorsque le cou de l'embryon s'allonge, à la fin de la septième semaine de grossesse [1, 2].

Pendant la septième semaine, les corps ultimo-branchiaux (formés par une partie centrale et deux parties latérales, desquelles la glande thyroïde provient), sont originaires des quatrième et cinquième poches pharyngées, fusionnent entre eux vers E60, se détachant du pharynx [1, 2]. Ces parties latérales sont issues de cellules de la crête neurale et apportent à la glande thyroïde les cellules parafolliculaires (ou cellules C), productrices de la calcitonine. La thyroïde est alors fonctionnelle, mais les cellules qui la constituent ne sont pas toutes différenciées (cellule précurseur de thyrocytes). La différenciation se termine

autour de la onzième semaine avec le fœtus produisant les premières hormones thyroïdiennes [2]. Cependant, il a été montré récemment que des cellules productrices de calcitonine sont présentes dans des thyroïdes ectopiques linguales, ce qui ne devrait pas être le cas. En effet, les corps ultimo-branchiaux étaient connus pour être la seule source de cellules C, ils font leur apparition après la migration, autrement dit après E50. Il en a été conclu que les corps ultimo-branchiaux ne sont pas la seule source de calcitonine [8, 9].

## **1.2. Hormones thyroïdiennes**

Les facteurs de transcription jouent un rôle très important dans l'organogénèse et l'histogénèse.

### 1.2.1. Structure des hormones thyroïdiennes

Les hormones produites par la glande thyroïde sont issues d'un acide aminé : la tyrosine. Elles contiennent une partie acide, caractérisée par un groupement COOH, une partie primaire caractérisée par un groupement NH<sub>2</sub>, deux groupements phénols sur lesquels sont fixés des atomes d'iode. L'hormone T3 (ou triiodothyronine, forme active à durée de vie courte) comprend 3 atomes d'iode, tandis que l'hormone T4 (ou thyroxine, forme inactive à durée de vie longue) en possède 4 (Figure 4) [2].

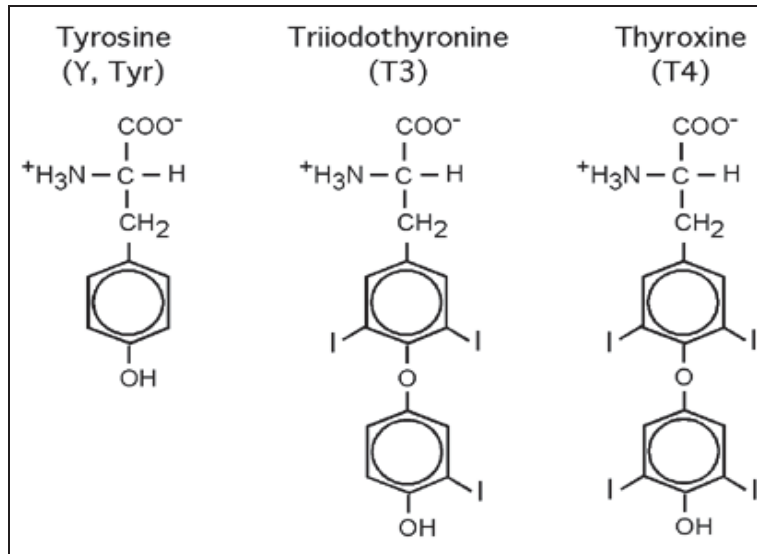


Figure 4 : Structure des hormones thyroïdiennes (basée à partir de [10])

### 1.2.2. Synthèse des hormones thyroïdiennes

La première étape de la synthèse des hormones thyroïdiennes consiste en la capture des ions iodures au niveau de la circulation sanguine par les cellules folliculaires thyroïdiennes (Figure 5). L'ion iodure ( $\text{I}^-$ ) sanguin est alors capté au niveau de la membrane basolatérale de la cellule folliculaire par un mécanisme de transport actif utilisant une pompe à iodure (symporteur  $\text{Na}^+/\text{I}^-$  ou Natrium Iodide Symporter (NIS)). Le captage de cet ion iodure est dépendant du gradient  $\text{Na}^+$  transmembranaire. Le gradient de  $\text{Na}^+$  établi entraîne l'entrée de  $\text{I}^-$  contre un gradient de  $\text{K}^+$  par l'action de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase. Ensuite, l'ion iodure franchit la membrane apicale par un canal anionique de façon passive et se retrouve dans la lumière folliculaire. Ce canal au niveau de la membrane apicale appartient à la famille des cotransporteurs de sodium/glucose SLC, appelé SCL26A4 ou pendrine (PDS).

La deuxième étape consiste en une réaction d'oxydation appelée « organification de l'iodure » par une enzyme spécifique : la thyroperoxydase ou TPO. Dans la lumière folliculaire, I<sup>-</sup> est oxydé en iode (I) par la TPO, une enzyme catalytique située au niveau de la membrane apicale de la cellule folliculaire. Cette étape d'oxydation se réalise sous l'action de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), qui est formé par l'oxydation de NADPH + O<sub>2</sub> par les protéines NADPH-oxydases (THOX1 et THOX2 pour THyroid OXYdase, ou « DUOX1 et DUOX2 » pour DUal OXYdase). Il s'ensuit une étape de fixation de l'iode au pôle apical, dans la substance colloïde. Cette fixation se réalise en position 3 ou 5 sur un radical tyrosine de la thyroglobuline (TG), via la TPO, formant ainsi des composés monoiodés (MIT ou 3-monoiodotyrosine) et diiodés (DIT ou 3-5-diiiodotyrosines), qui sont les précurseurs des hormones thyroïdiennes. Le couplage intramoléculaire de ces iodotyrosines dans la lumière folliculaire génère la formation puis le stockage des hormones T3 (MIT+DIT) et T4 (DIT+DIT) [2].

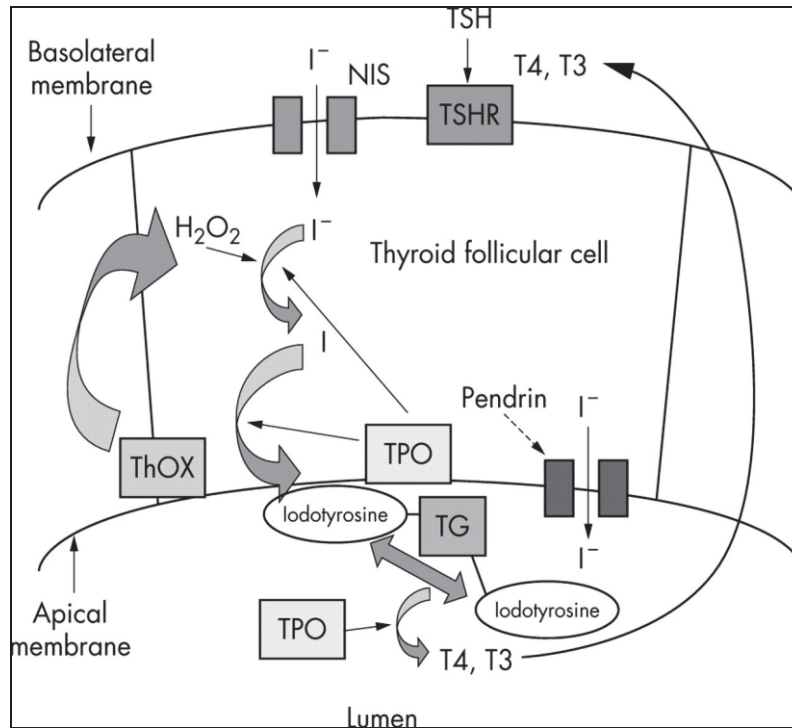


Figure 5 : Schéma de synthèse des hormones thyroïdiennes [11]

### 1.3. Contrôle de la fonction thyroïdienne

L'hormone protiréline (ou TRH pour thyrotropin-releasing hormone) est produite par l'hypothalamus et sa libération va stimuler la glande hypophyse (pituitaire), afin d'augmenter la production et la libération de l'hormone thyrotropine (TSH pour thyroid-stimulating hormone). La TSH se lie à ses récepteurs au niveau de la glande thyroïde pour stimuler la synthèse et la sécrétion des hormones thyroïdiennes (HT), la thyroxine (T4) et la triiodothyronine (T3). Les taux des hormones T3 et T4 circulantes sont maintenus par des mécanismes de contrôle rétroactifs en agissant sur l'hypothalamus et l'hypophyse, stoppant ainsi la sécrétion de TRH et de TSH, respectivement (Figure 6) [12]. Lorsque les niveaux des hormones T4 sont faibles, la production de la TSH au niveau de l'hypophyse



augmente, et inversement. Le rétro-contrôle s'effectue localement par la T3 (suite à la conversion de la T4 en T3), en agissant principalement par la régulation de l'expression des gènes avec la liaison des récepteurs nucléaires thyroïdiens (discutés à la section suivante) [13].

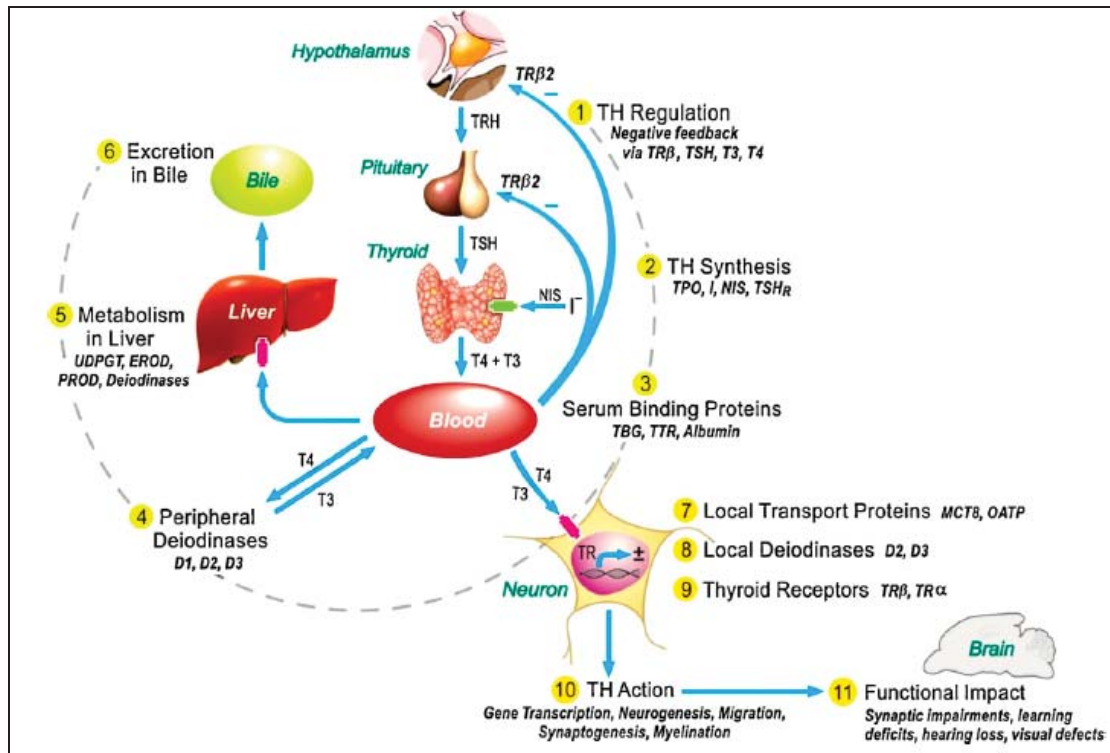


Figure 6 : Axe Hypothalamus-Hypophyse-Thyroïde [12]. Les rétro-contrôle et différents sites pouvant altérer la fonction thyroïdienne sont représentés par des cercles numérotés.

#### 1.4. Les récepteurs nucléaires thyroïdiens

Les récepteurs nucléaires thyroïdiens (RT) sont une classe de récepteurs nucléaires qui sont activés par liaison avec les hormones thyroïdiennes. L'action des hormones thyroïdiennes s'effectue par l'intermédiaire de ces TRs (TR $\alpha$ 1,

TR $\alpha$ 2 et TR $\beta$ 1, TR $\beta$ 2), qui sont respectivement encodés par 2 gènes *THRA* et *THRB* [12]. Les différents RTs ont un profil d'expression tissu-spécifique, comme par exemple le TR $\alpha$ 1 principalement dans le cerveau et le cœur [14]. Des études ont permis de mettre en évidence le rôle des divers récepteurs nucléaires thyroïdiens, particulièrement TR $\beta$ 2 qui est crucial dans le rétro-contrôle des hormones thyroïdiennes et TR $\beta$ 1 impliqué dans la régulation de la TSH sérique. Par contre, le rôle des TR $\alpha$ 1 sur le rétro-contrôle ne semble pas clair, tandis que TR $\alpha$ 2 ne lie pas la T3 [13].

Afin d'exercer leurs actions, les HT entrent dans les cellules par un mécanisme ATP-dépendant, via des transporteurs monocarboxylates spécifiques (MCT8 et MCT10) et des protéines organiques transporteur d'anions (OATPs) [15]. Une fois les HT thyroïdiennes dans les cellules, la T4 est convertie en T3 par des enzymes spécifiques, les déionidases (DIO1 et DIO2), permettant ainsi d'augmenter le niveau des hormones actives (T3) afin qu'elles activent les TRs tissu-spécifique. Au contraire, la DIO3 est responsable de l'inactivation des hormones thyroïdiennes en convertissant respectivement la T4 et la T3 en rT3 et T2. Finalement, les TRs régulent l'expression des gènes en se liant, sous forme d'hétérodimère avec les récepteurs X rétinoïdes (RXR), aux TREs (Thyroid Response Element) des gènes cibles [15].

## **2. Pathologies de la thyroïde**

### **2.1. Hypothyroïdie**

#### 2.1.1. Thyroïdite de Hashimoto

En 1912, Hakaru Hashimoto a décrit quatre patients avec un trouble chronique de la thyroïde qu'il a appelé «goitre lymphomateux». Plusieurs années plus tard, des anticorps anti-thyroïdiens ont été rapportés chez des patients atteints de cette maladie. Cette pathologie, la thyroïdite auto-immune, connue sous le nom de thyroïdite de Hashimoto, est caractérisée par une infiltration de la glande thyroïde par des cellules inflammatoires, souvent suivie d'une hypothyroïdie due à la destruction et au remplacement de la fibre de tissu parenchymateux [16-18]. Depuis plusieurs années, la thyroïdite de Hashimoto a été considérée comme une entité clinico-pathologique bien définie, et qui est caractérisée par la présence d'un goitre et d'auto-anticorps thyroïdiens sériques [17]. Des auto-anticorps contre les antigènes spécifiques à la thyroïde se développent, et les deux principaux antigènes dans cette pathologie sont la thyroglobuline (Tg) et la thyroperoxydase (TPO). La thyroïdite de Hashimoto affecte jusqu'à 2% de la population générale, sans prédilection ethnique importante [17, 19-21].

#### 2.1.2. Thyroïdite de De Quervain

La thyroïdite de De Quervain (aussi appelée thyroïdite subaigüe ou thyroïdite granulomateuse subaigüe) est une maladie inflammatoire de la glande thyroïde [22, 23]. En 1904, Fritz de Quervain a différencié cette maladie des autres formes de thyroïdite par sa pathologie. En effet, la présence de cellules géantes et

granulomateuses dans la thyroïde des individus atteints est pathognomonique. La thyroïdite de De Quervain est une maladie rare chez l'adulte et très rare chez les enfants, et semble avoir une prédominance chez les femmes [24, 25]. La pathogénie de cette maladie n'est pas bien comprise, mais il semblerait qu'elle soit induite par une infection virale.

Cette pathologie se caractérise par une destruction en plusieurs étapes de l'épithélium folliculaire et de la perte de l'intégrité folliculaire de la glande thyroïde. Enfin, la thyroïdite de De Quervain débute d'abord par une douleur au niveau de la glande thyroïde, accompagnée par une thyrotoxicose, suivie d'une hypothyroïdie transitoire, avant un retour à un état normal [22, 25, 26].

### 2.1.3. Hypothyroïdie congénitale

Comparativement à l'hypothyroïdie acquise chez l'adulte (paragraphes précédents), qui est essentiellement auto-immune et qui consiste en une destruction progressive de la glande thyroïde par leur système immunitaire, l'hypothyroïdie congénitale est une pathologie présente dès la naissance et permanente, ayant des origines différentes qui seront traitées dans les paragraphes suivants.

#### 2.1.3.1. Définition et dépistage

La première fois que le terme « hypothyroïdie congénitale » a été employé, ce fut à la fin des années 40 par Radwin et al., en décrivant le cas d'un enfant avec une hypothyroïdie associée à des caractéristiques de déficience intellectuelle sévère et de retard de croissance [27, 28]. Puisque le diagnostic se basait sur le

quotient intellectuel (QI), qui était bas, ainsi qu'un déficit d'apprentissage, il était malheureusement trop tard pour pouvoir restaurer le potentiel cognitif des enfants atteints [29].

De nos jours, un dépistage pré-symptomatique basé sur des méthodes biochimiques comme un dosage des taux de TSH et de la T4 dans les premiers jours après la naissance permet d'identifier les nouveau-nés atteints avant l'expression de la maladie. Cependant, même avec un traitement précoce (en moyenne à 9 jours), une certaine perte de QI, peut encore être observée [30]. De plus, il a été établi une « liste » de divers signes cliniques chez des patients atteints d'hypothyroïdie congénitale, qui ne sont pas toujours flagrants lors du dépistage prénatal (Tableau 2) [29].

Tableau 2 : Signes cliniques de l'hypothyroïdie congénitale [29]

---

Faciès particulier : ensellure nasale, macroglossie, chevelure abondante
Peau sèche, marbrée, ictère néonatal persistant
Cernes bleuâtres péri-narinales et péribuccales
Fontanelles très larges (en particulier la postérieure)
Distension abdominale, hernie ombilicale
Constipation, surtout si l'enfant est nourri au sein
Difficultés à la succion, pleurs rauques
Hypotonie, hypoactivité

---

---

## Hypothermie

---

### 2.1.3.2. Hypothyroïdie congénitale permanente

L'hypothyroïdie congénitale (HC) permanente peut se classer en trois grandes sous-catégories, qui sont l'HC primaire, l'HC centrale et l'HC périphérique [29].

L'HC primaire est constituée à son tour de deux différents sous-diagnostic, qui sont la dysgénésie thyroïdienne et les troubles de l'hormonosynthèse (ou dyshormonogénèse), qui vont être détaillés ci-après. L'HC centrale se caractérise par un problème au niveau de l'hypothalamus ou de l'hypophyse. Enfin, l'HC périphérique ne se définit pas par un problème au niveau de la circulation des hormones thyroïdiennes à travers l'organisme, mais plutôt par un problème de transport des hormones thyroïdiennes à travers la membrane cellulaire, une résistance à ces hormones au niveau des organes cibles ou à un catabolisme accru (« consumptive hypothyroidism »).

#### 2.1.3.2.1. Diagnostic et traitement de l'hypothyroïdie primaire

Le dépistage est réalisé à deux jours de vie, en collectant sur un papier buvard quelques gouttes de sang au talon au nourrisson, afin de doser les taux de TSH et d'hormones thyroïdiennes. En présence d'un résultat anormal, le dépistage est ensuite confirmé par prélèvement veineux et scintigraphie lors de la première visite médicale à environ 7-10 jours de vie. Cette visite permet de préciser le diagnostic (dysgénésie ou dyshormonogénèse) et d'instaurer le plus rapidement le traitement substitutif (Figure 7).

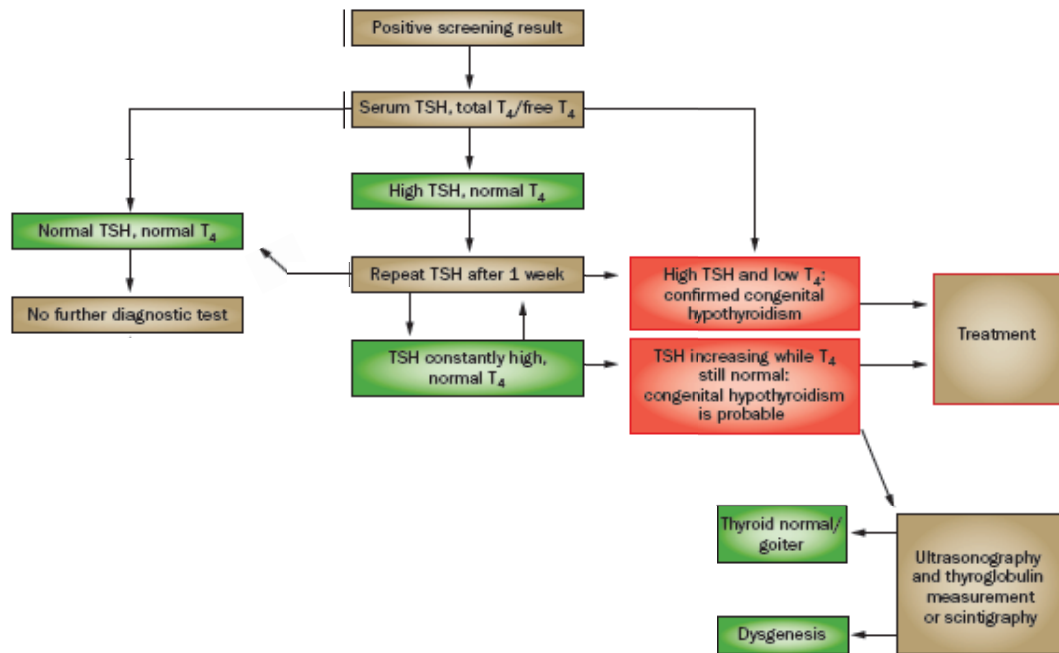


Figure 7 : Algorithme diagnostique de détection de l'hypothyroïdie congénitale primaire [28]. Suivant les valeurs de TSH et T4 mesurées chez les nouveau-nés et avec l'aide de scintigraphie, les cliniciens peuvent établir un diagnostic d'HC par dysgénésie ou dyshormonogénèse.

Il est en effet crucial de commencer le traitement le plus tôt possible afin d'éviter tout retard de développement, exprimé en perte de points de quotient intellectuel (Q.I.). Le traitement donné par les cliniciens consiste en l'administration de lévothyroxine (ou L-thyroxine), qui est une forme synthétique de la T4 ou thyroxine, qui remplacera le déficit hormonal et qui normalisera les taux de TSH et de T4 sériques [29].

#### 2.1.3.2.2. Dysgénésie thyroïdienne

La dysgénésie se définit par un problème survenu lors du développement embryologique de la glande thyroïde. Avec une incidence de 1 cas toutes les 4000

naissances environ, une fréquence plus élevée chez les femmes (ratio 3:1) et une fréquence moins élevée chez les descendants noirs africains (1:35,000), l'HCDT est une maladie hétérogène [31]. Plusieurs sous-catégories sont retrouvées, la plus fréquente (environ 75 %) est l'ectopie (soit la glande thyroïde qui n'a pas migrée complètement), l'agénésie (absence complète de tissu thyroïdien ou athyréose, environ 15 %) qui se caractérise par une absence totale de glande thyroïde, l'hypoplasie et enfin l'hémiagénésie [29]. La dysgénésie thyroïdienne représente, dans les pays n'ayant pas de carence en iode, le plus grand pourcentage des cas d'HC avec 65 à 85 % des enfants diagnostiqués, selon les seuils de détection appliqués [32-34].

Dans les cas d'ectopies, la glande se trouve généralement le long de la voie du canal thyrogllosse, qui est le chemin emprunté par la thyroïde en développement entre la base de la langue à l'emplacement définitif situé dans la partie antérieure du cou [5, 32, 34].

#### 2.1.3.2.2.1. Mécanismes moléculaires et facteurs génétiques

La dysgénésie thyroïdienne est généralement considérée comme sporadique, mais certaines données épidémiologiques suggèrent une composante génétique [32]. Certains gènes ont été impliqués comme cause de dysgénésie thyroïdienne, mais ne rendent compte que d'un petit nombre de cas (moins de 3 %) [35, 36]. Il s'agit notamment des gènes *PAX8* [37], *TTF-2* (ou *FOXE1*) [38], *NKX2.1* [39] et *NKX2.5* [40]. Ils codent pour des facteurs de transcription qui sont



exprimés à la fois lors de l'embryogénèse de la thyroïde et dans la glande « mature » [28, 32]. De plus, il semblerait que dans les quelques cas de dysgénésie familiale (environ 2 % des dysgénésies), des facteurs de prédisposition génétique dominants soient impliqués [41], cependant aucun cas familiaux à transmission dominante claire n'a été rapporté.

Ces avancées au niveau de la biologie développementale, réalisées grâce aux études menées chez la souris, ont permis l'identification des bases génétiques de certains cas de dysgénésies thyroïdiennes (Tableau 3). Les différents modèles de souris présentés dans les tableaux 3 sont des souris KO (-/-) pour les gènes en questions [42]. Il y est également rapporté si des patients atteints d'HCDDT ont déjà été montrés avec des mutations chez certains de ces gènes. Bien qu'un dépistage systématique des mutations pour certains gènes dans les formes monogéniques est observé (cas syndromiques), ce dernier n'est actuellement pas justifié en clinique, car leur occurrence est trop basse car plus de 95% des cas d'HCDDT n'ont pas de causes moléculaires connues, ce qui justifie les projets présentés dans cette thèse.

Tableau 3 : Modèles de souris transgéniques pour la dysgénésie thyroïdienne [42]

<b>Modèles de souris transgéniques</b>	<b>Maladie humaine extrathyroïdale</b>	<b>Étude cohorte HCDDT avec dépistage systématique</b>	<b>Patients avec HCDDT</b>	<b>Réf.</b>
<b>Eya1</b>	Syndrome branchio-oto-rénal	-	-	[43]
<b>Foxe1</b>	Syndrome de Bamforth	Oui	Oui	[38]
<b>Hes1</b>	-	-	-	
<b>Hhex</b>	-	Oui	Non	[44]
<b>Hoxa3</b>	-	-	-	
<b>Hoxb3</b>	-	-	-	
<b>Hoxd3</b>	-	-	-	

<b>Isl1</b>	-	Oui	Non	[45]
<b>Nkx2-1</b>	Syndrome cerveau-poumon-thyroïde	Oui	Oui	[46]
<b>Nkx2-5</b>	Malformations cardiaques	Oui	Oui	[40]
<b>Pax8</b>	Dysgénésie rénale	Oui	Oui	[37]

Après les études développementales réalisées chez la souris, permettant de conclure au rôle de certains gènes (autre que les facteurs de transcription spécifiques à la thyroïde) dans les HCDT, plusieurs études ont pu mettre en avant le fait que certains gènes seraient responsables de dysgénésies chez l'humain (Tableau 4).

Tableau 4 : Gènes humains et modèles animaux pour les dysgénésies thyroïdiennes [47]

<b>Gènes</b>	<b>Espèces</b>	<b>Phénotype thyroïdien</b>	<b>Référence</b>
<b>FOXE1</b>	Humain	Athyroïse	[48]
<b>GLIS3</b>	Humain	Hypoplasie	[49]
<b>NKX2.5</b>	Humain	Thyroïde in situ avec hypothyroïdie primaire	[40]
<b>PAX8</b>	Humain	Hypoplasie	[37]
<b>SALL1</b>	Humain	Thyroïde in situ avec hypothyroïdie primaire	[50]
<b>TBX1</b>	Humain	Thyroïde in situ avec hypothyroïdie primaire	[51]
<b>NKX2.1</b>	Humain	Thyroïde in situ avec hypothyroïdie primaire légère	[39]
<b>UBR1</b>	Humain	Thyroïde in situ avec hypothyroïdie primaire	[52]
<b>NTN1</b>	Humain	Ectopie	[53]
<b>Chordin</b>	Souris	Hypoplasie	[54]
<b>Edn1</b>	Souris	Hypoplasie, isthme absent	[55]
<b>Eya1</b>	Souris	Hypoplasie	[56]
<b>Fgf10</b>	Souris	Athyroïse	[57]
<b>Fibulin-1</b>	Souris	Hypoplasie	[58]
<b>Foxe1</b>	Souris	Ectopie ou athyroïse	[59]
<b>Frs2</b>	Souris	Hypoplasie, défaut de bilobation	[60]
<b>Hes1</b>	Souris	Hypoplasie	[61]
<b>Hhex</b>	Souris	Athyroïse	[62]
<b>Hoxa3</b>	Souris	Hypoplasie, défaut de bilobation	[63, 64]

<b>Hoxa5</b>	Souris	Follicule thyroïdien vide	[65]
<b>Hoxb3</b>	Souris	Ectopie dans Hoxa3 Hoxb3 double mutant	[64]
<b>Hoxd3</b>	Souris	Ectopie dans Hoxa3 Hoxd3 double mutant	[64]
<b>Isl1</b>	Souris	Hypoplasie de la placode thyroïdienne	[66]
<b>Nkx2.1/Titf1</b>	Souris	Athyréose	[67]
<b>Nkx2.5</b>	Souris	Hypoplasie	[40]
<b>Pax3</b>	Souris	Hypoplasie, défaut de bilobation	[68]
<b>Pax8</b>	Souris	Athyréose	[69]
<b>Shh</b>	Souris	Hémiagénésie	[70]
<b>Tbx1</b>	Souris	Hypoplasie, défaut de bilobation	[51]
<b>Twisted</b>	Souris	Perte de l'expression de Hhex à l'étape de bourgeon	[71]
<b>ace</b>	zebrafish	Hypoplasie	[72]
<b>bon</b>	zebrafish	Athyréose	[73]
<b>cas</b>	zebrafish	Athyréose	[74]
<b>cyc</b>	zebrafish	Hypoplasie	[74]
<b>fau</b>	zebrafish	Athyréose	[75]
<b>hand2</b>	zebrafish	Athyréose ou hypoplasie	[72]
<b>hhex</b>	zebrafish	Athyréose ou hypoplasie	[74]
<b>nkx2.1a</b>	zebrafish	Athyréose	[74]
<b>noi (pax2.1)</b>	zebrafish	Athyréose	[76]
<b>oep</b>	zebrafish	Athyréose	[74]
<b>ntn1a</b>	zebrafish	Ectopie	[53]

Parmi tous les facteurs de transcription mentionnés dans le tableau 4, certains jouent un rôle plus important que d'autres et seront décrits ci-dessous. Le fait qu'ils sont introduits par rapport aux autres s'explique parce qu'ils sont soit impliqués dans l'embryologie de la glande thyroïde chez l'humain (expliqué précédemment), soit impliqués dans des cas syndromiques d'HCdT.

#### 2.1.3.2.2.2. *FOXE1*

*FOXE1* (forkhead box E1), connu aussi comme « facteur de transcription thyroïdien 2 » (*TTF2*), ou aussi « forkhead drosophila homolog-like 15 » (*FKHL15*), est un membre de la famille des facteurs de transcription « winged

helix/forkhead », avec un domaine d'ADN conservé de liaison appelé fkh (pour forkhead), se situant sur le chromosome 9q22.3 [77, 78]. *FOXE1* est un gène constitué d'un seul exon, codant pour une protéine de 38-42 kDa, contenant une succession d'alanine de 11 à 19 résidus (« polyalanine stretch »). Ce facteur de transcription a été initialement identifié comme une protéine nucléaire spécifique à la thyroïde, capable de reconnaître et de se lier à une séquence d'ADN présente à la fois dans les promoteurs des gènes de la thyroglobuline (TG) et de la thyroperoxydase (TPO), sous stimulation hormonale [77-79]. *FOXE1* est exprimé au niveau de la thyroïde embryonnaire, mais aussi dans de nombreux tissus comme les testicules, l'épiderme (follicule pileux), le cœur et le placenta [80, 81].

Bien qu'exprimé dans la glande thyroïde, *FOXE1* l'est également au cours du développement dans d'autres tissus dérivés des arches pharyngées, comme la langue, l'œsophage ou l'hypophyse antérieure [3, 82]. Les études animales ont mis en évidence le rôle crucial de *FOXE1* dans la migration embryonnaire de la glande thyroïde. Les souris knock-out homozygotes *FOXE1* n'ont pas de glande thyroïde à la naissance. Cependant, au jour embryonnaire E11.5 la glande thyroïde est soit ectopique soit absente (athyréose) [59]. En outre, l'expression de *FOXE1*, induite par *PAX8*, est requise pour la migration des cellules thyroïdienne chez l'embryon de souris [83].

Chez l'humain, les mutations bialléliques de *FOXE1* sont associées à un syndrome particulier combinant athyréose, fente palatine et cheveux hérissés (syndrome de Bamforth-Lazarus, de transmission autosomique récessive). De plus, ces patients subissent des conséquences cognitives défavorables, malgré un

traitement, du fait que *FOXE1* joue un rôle dans le développement du système nerveux central [28, 48, 77]. Les mutations homozygotes rapportées de ce gène dans le syndrome de Bamforth-Lazarus sont au nombre de 3 (Tableau 5) : p.A65V chez deux frères atteints d'HC avec athyréose [48], p.S57N chez deux frères atteints d'HC avec athyréose transmis de parents consanguins [84] et p.R102C atteints d'HC avec une possible hypoplasie transmis de parents consanguins [85]. Ces trois mutations entraînent aussi une fente palatine. De plus, les patients porteurs de p.A65V et de p.R102C présentent une atrésie des choanes. Finalement, les porteurs de p.A65V présentent une épiglotte bifide [77]. Enfin, il est important de souligner qu'aucun cas d'ectopie n'a été rapporté chez l'humain, ayant une mutation bi-allélique de *FOXE1*, comparativement à ce qui a été montré chez la souris. Par contre, quelques cas d'ectopies ont été montrés avec des polymorphismes affectant la longueur du « polyalanine stretch » au sein de la protéine [86]. Une liste non-exhaustive des mutations ayant déjà été rapportées est présentée dans le tableau 5 (source : site OMIM, recherche du 26.03.2016).

Tableau 5 : Résumé des mutations répertoriées du gène *FOXE1*

Mutations	État	Nombre d'individus atteints d'HCdT	Atteinte thyroïdienne	Référence
p.A65V	Homozygote	2	Athyréose, fente palatine, atrésie des choanes et épiglotte bifide	[38]
p.S57N	Homozygote	2	Athyréose et fente palatine	[84]
p.R102C	Homozygote	1	Hypoplasie, fente palatine et	[85]

			atrésie des choanes	
--	--	--	---------------------	--

#### 2.1.3.2.2.3. *NKX2.1*

Le gène *NKX2.1* (TTF-1, TITF-1 ou T/ebp) codant pour un facteur de transcription à domaine homeobox de la famille NKX2, est situé sur le chromosome 14q13 et contient 3 exons. *NKX2.1* est exprimé au niveau de la thyroïde (en développement et mature), du cerveau en développement, de l'hypophyse postérieure, ainsi que du poumon. Il contrôle à la fois la morphogénèse, la différenciation cellulaire, ainsi que la transcription des gènes spécifiques à la thyroïde [80, 87]. Les études chez le modèle murin ont permis de montrer que les souris knockout homozygotes (*nkx2.1 -/-*) ne survivent pas après la naissance (au contraire des hétérozygotes, *nkx2.1 wt/-*), en raison d'une malformation sévère des poumons. De plus, elles présentent une absence de thyroïde et d'hypophyse [67]. De plus, *NKX2.1* joue un rôle dans la régulation de plusieurs gènes impliqués dans la thyroïde, comme la thyroglobuline (*TG*) en se liant sur son promoteur, mais aussi les gènes *TPO*, *HHEX*, *TSHR*, *PDS* (ou *SLC26A4*) et *NIS* (ou *SLC5A5*) [79, 88-90]. La majorité des patients atteints d'HC avec des mutations du gène *NKX2.1* présentent aussi des symptômes pulmonaires variables, ainsi que les troubles neurologiques, comme l'ataxie ou des troubles du mouvement par exemple [28]. Une liste non-exhaustive des mutations répertoriées avec phénotype thyroïdien est résumée dans le tableau 6 (source : site OMIM, recherche du 26.03.2016 et ajout de 2 études majeures).

Tableau 6 : Résumé des mutations répertoriées du gène *NKX2.1*

Mutations	État	Nombre de cas atteints d'HC	Symptômes cliniques	Référence
p.V45F	Hétérozygote	1	Athyréose apparente à la naissance (hypoplasie plus tard) et dysfonction pulmonaire	[39]
2bp INS - 2595GG	Hétérozygote	1	Thyroïde normale, infection pulmonaire modérée, choréoathétose sévère	
Délétion du gène	Hétérozygote	1	Hypoplasie, détresse respiratoire et infection pulmonaire sévère et choréoathétose sévère	
c.G2626T	Hétérozygote	1	Hypoplasie, détresse respiratoire modérée et infection pulmonaire sévère et choréoathétose sévère	
c.C2519A	Hétérozygote	1	Hypoplasie et choréoathétose sévère	
c.C1302A	Hétérozygote	1	Athyréose, détresse respiratoire sévère et hypotonie musculaire	
p.E175X	Hétérozygote	4	HC, dysfonction pulmonaire et choréoathétose	[91]
1bp INS - 255G	Hétérozygote	1	Thyroïde normale, infection pulmonaire nécessitant ventilation mécanique	[92]
IVS2AS, A-G, - 2 (épissage exon 2-3)	Hétérozygote	4	HC, détresse respiratoire néonatale et choréoathétose	[93]
c.I207F	Hétérozygote	1	Thyroïde normale, HC primaire modéré, détresse respiratoire sévère avec hypertension pulmonaire	[94]
376-2A>G	Hétérozygote	2 (jumeaux MZ)	P1: Athyréose, détresse respiratoire, infection pulmonaire, retard psychomoteur et hypotonie P2: Héliagénèse	[95]

c.L176V	Hétérozygote	1	Hypoplasie, retard psychomoteur et hypotonie	
c.Q210P	Hétérozygote	1		
17 mutations ponctuelles & 10 délétions		101	Divers selon les cas (dysfonction thyroïdienne, maladie pulmonaire, déficit neurologique)	[96]

#### 2.1.3.2.2.4. *PAX8*

Le gène *PAX8* (paired box) est un facteur de transcription de la famille des protéines Pax, composée de neuf membres, jouant un rôle important dans le développement des cellules thyroïdiennes lorsque le bourgeon thyroïdien descend à partir de la base du pharynx [97, 98]. Le gène codant pour *PAX8* se situe sur le chromosome 2q12-q14 et est constitué d'une séquence de 12 exons [11, 98]. Ce gène joue un rôle très important dans la thyroïde en développement, à partir des premiers jours embryonnaires et au moment de la spécification. De plus, il est exprimé dans les cellules folliculaires de la thyroïde au cours de toutes les étapes de développement, ainsi qu'à l'âge adulte, mais est aussi exprimé au niveau des reins. Des mutations dans ce gène sont donc associées non seulement à la dysgénésie thyroïdienne, mais aussi à des agénésies rénales unilatérales [5, 69, 80, 87, 98, 99]. Plusieurs mutations ont été rapportées chez des patients atteints d'HC, dont une liste non-exhaustive est représentée dans le Tableau 7 (source : site OMIM, recherche du 26.03.2016 et ajout de 1 étude majeure). Les premières mutations, toutes à l'état hétérozygotes, furent publiées par Macchia et al [37], avec p.A108X (ectopie) et p.A31H (hypoplasie) héritées de novo dans 2 familles respectivement et p.L62R (hypoplasie) dans une famille dont la mère et les 2 enfants sont porteurs. Des études sur le modèle murin ont permis de mettre en



évidence que le bourgeonnement de la thyroïde se déroule normalement au sein des souris knockout homozygotes. Par contre, la thyroïde primitive (E11.5) présente une taille plus petite que chez les souris « wild-type » et les cellules folliculaires de la thyroïde à E12 sont absentes chez les souris KO. Il en résulte que ces souris ont une athyréose ainsi qu'un retard de croissance [69].

Tableau 7 : Résumé des mutations répertoriées du gène *PAX8*

Mutations	État	Nombre d'individus atteints d'HCDT	Atteinte thyroïdienne	Référence
p.A108X	Hétérozygote	1	Ectopie	[37]
p.A31H	Hétérozygote	1	Hypoplasie	
p.L62R	Hétérozygote	3	Hypoplasie	
p.C57Y	Hétérozygote	2	Aplasia et Hypoplasie	[100]
p.S54G	Hétérozygote	3	Hypoplasie (et agénésie rénale pour le père)	[101]
p.Q40P	Hétérozygote	2	Hypoplasie (mère: thyroïde normale avec hypothyroïdie auto-immune)	[102]
p.S48F	Hétérozygote	7	Variable (thyroïde normale à athyréose)	[103]
p.L16P	Hétérozygote	3 (mère et 2 enfants)	Hypoplasie (enfants) et glande en place (mère)	[104]
p.F20S	Hétérozygote	2 (mère et fille)	Hypoplasie	
p.D46fs	Hétérozygote	2 (père et fils)	Hypoplasie	
p.R133Q	Hétérozygote	1	Hypoplasie	

#### 2.1.3.2.2.5. *NKX2.5*

Le gène *NKX2-5* (appelé aussi *CSX* ou *NKX2.5*), situé sur le chromosome 5q34, code pour un facteur de transcription à homéodomaine jouant un rôle crucial

dans la morphogenèse cardiaque. Il a été démontré dans plusieurs études que des mutations dans ce gène se retrouvaient chez les patients atteints de maladie cardiaque congénitale. Il est important de souligner que Dentice *et al.* ont montré la présence d'hypoplasie thyroïdienne chez des souris knockout homozygotes (*Nkx2.5* -/-) comparativement à la souris WT, laissant supposer une diminution de la survie des cellules folliculaires de la thyroïde et de ce fait que ce gène peut jouer un rôle au cours du développement de la thyroïde [40]. De plus, cette étude a rapporté des mutations dans le gène *NKX2.5* chez quatre patients (sur une cohorte de 241 patients) atteints d'hypothyroïdie congénitale, faisant en sorte que *NKX2.5* est un gène candidat pour certains cas d'HC avec malformation cardiaque [28, 32, 40]. Ces trois mutations (c.G355T, p.A119S ; c.G482C, p.R161P; c.C73T, p.R25C) montrent une altération fonctionnelle importante, caractérisée par une réduction de la transactivation (Tableau 8, liste non-exhaustive; source : site OMIM, recherche du 26.03.2016).

Tableau 8 : Résumé des mutations répertoriées du gène *NKX2.5*

Mutations	État	Nombre d'individus atteints d'HCDT	Atteinte thyroïdienne	Référence
p.A119S	Hétérozygote	1	Ectopie	[40]
p.R161P	Hétérozygote	1	Ectopie	
p.R25C	Hétérozygote	2	Ectopie et Athyréose	
p.S265R	Hétérozygote	1	Athyréose	[105]

À noter cependant, (i) bien que le modèle murin montre une hypoplasie, les quatre patients de l'étude de Dentice *et al.* ont une ectopie ou une athyréose et (ii) les parents porteurs de la mutation n'ont, semble-t-il, pas de phénotype thyroïdien. Par ailleurs, l'association entre mutation *NKX2.5* et HCDT est remise en doute par van Engelen *et al.* [106], qui ne retrouvent pas d'association significative entre mutations *NKX2.5* et anomalies cardiaques ou thyroïdiennes. Cependant, l'hypothèse d'une expression monoallélique au niveau du tissu pour les cas d'ectopies de l'étude de Dentice ne peut pas être exclue.

#### 2.1.3.2.2.6. *HHEX*

Le gène *HHEX* (haematopoietically-expressed homeobox protein) est un facteur de transcription membre de la famille à homeobox, tout comme *NKX2.1*. Il se situe sur le chromosome 10q23.33, est constitué d'une séquence de 4 exons et comprend un homeodomaine de liaison à l'ADN de 60 acides aminés conservé entre les espèces. Initialement, l'expression de cette protéine fut découverte dans les cellules hématopoïétiques, mais de fortes expressions furent également retrouvées dans le foie et la thyroïde. Grâce à des études chez le modèle murin, il a été montré que ce gène est exprimé durant l'organogénèse dans les cellules précurseurs de la thyroïde et qu'il l'est également dans les cellules de la thyroïde adulte [107, 108]. Les souris knockout homozygotes (*Hhex* *-/-*) ne survivent pas après le jour E15.5, tandis que les embryons les plus sévèrement touchés (malformations dans d'autres organes, tels que le foie et le cerveau) n'expriment pas *Foxe1* et *Nkx2-1* à E8.5 et présentent une athyréose dans les étapes tardives du développement [62]. Les embryons *Hhex* *+/-* ont un phénotype bien moins sévère,

avec présence de spécification thyroïdienne mais une thyroïde hypoplasique. Aucun problème d'expression des facteurs *Foxe1*, *Nkx2-1* ou *Pax8* n'est noté à E9, tandis que l'expression de *Foxe1* et *Pax8* est fortement diminuée à E10. Ces données permettent donc de conclure que *Hhex* ne joue pas un rôle dans la spécification ou le bourgeonnement de la thyroïde mais plutôt dans le maintien de l'expression des trois facteurs *Foxe1*, *Nkx2-1* ou *Pax8* [83].

#### 2.1.3.2.2.7. Autres mécanismes moléculaires

Comme le mentionne De Felice *et al.* suite à diverses études, il y a une hiérarchisation de certains facteurs de transcription lors du développement de la glande thyroïde [5]. Comme exemple, nous pouvons citer le rôle présumé du gène *Hhex*, qui pourrait être de maintenir l'expression de l'ARNm des facteurs de transcription *Nkx2.1*, *Foxe1* et *Pax8* dans l'ébauche thyroïdienne. De plus, il est également mentionné que dans les embryons (-/-) pour *Nkx2.1* et *Pax8*, l'ARNm de *Hhex* est indétectable dans la thyroïde, suggérant qu'ils sont requis pour maintenir l'expression de *Hhex* [5].

En prenant en considération les différents points énoncés précédemment, de nouveaux mécanismes s'éloignant d'un modèle de transmission mendélienne monogénique, une origine multigénique a été suggérée. Le groupe d'Amendola *et al.* a validé cette hypothèse par l'étude de souris double knockouts *Titfl* (+/-) et *Pax8* (+/-), qui présentent clairement des caractéristiques d'hypothyroïdie congénitale (TSH élevée, hormones thyroïdiennes diminuées, perte de poids et développement altéré de la thyroïde : hypoplasie) [109, 110]. Chez l'humain, la faible incidence d'HCdT chez les descendants noirs africains comparativement

aux Caucasiens, ainsi que l'accumulation connues de variants pathogéniques chez les Caucasiens, suggèrent un mécanisme oligogénique [31, 111]. Enfin, certains cas d'HCDT présentent une combinaison de mutations dans deux gènes différents [112, 113]. Hermanns *et al.* ont décrit une patiente atteinte d'athyréose qui présente de nouvelles mutations dans la séquence codante de *NKX2.5* (héritée du père, 1<sup>er</sup> hit) et dans la région promotrice de *PAX8* (héritée de la mère, 2<sup>ème</sup> hit). Le point intéressant à souligner dans cette étude est que le frère de la patiente, possédant également les mêmes mutations, est euthyroïdien avec une glande thyroïde en place [105], suggérant qu'un autre facteur est nécessaire afin d'être atteint d'HCDT (3<sup>e</sup> hit, facteur épigénétique ou une expression monoallélique aléatoire de ces gènes dans la thyroïde).

Ceci nous laisse supposer que plusieurs autres points concernant les causes probables des dysgénésies thyroïdiennes, et plus particulièrement des ectopies, sont à considérer. Seraient-elles dues à des gènes encore non identifiés, à des phénomènes épigénétiques, ou bien à l'expression monoallélique aléatoire au niveau du tissu? Plusieurs études devront être réalisées afin de répondre au mieux à ces hypothèses. Cependant, certains éléments de réponses seront apportés à ces questions par les différents travaux réalisés au cours de cette thèse.

Finalement, il est important de mentionner que l'environnement ne semble pas avoir d'effet sur les dysgénésies thyroïdiennes. En effet, il a été montré, grâce à une rétrospectives des cas d'ectopies et d'athyréoses (entre janvier 1990 et décembre 2005) qu'il n'y avait pratiquement pas de variation observée sur l'incidence des cas d'HCDT [114]. De ce fait, les infections virales pendant la

grossesse n'auraient très peu de rôle sur ces pathologies thyroïdiennes. De plus, il a été constaté que depuis la fortification en acide folique chez les femmes enceintes (utilisée pour éviter les anomalies du tube neural), il n'y a pas eu de modification sur la prévalence des thyroïdes ectopiques [115, 116].

#### 2.1.3.2.3. Dyshormonogénèse

Comme énoncé précédemment, la majorité des cas d'HC sont dus à une dysgénésie thyroïdienne, tandis que les cas causés par une dyshormonogénèse n'en représentent qu'environ 10-15% [32]. La dyshormonogénèse, ou trouble de l'hormonosynthèse à n'importe laquelle de ses étapes, est transmise selon le mode autosomique récessif et se définit clairement comme un problème fonctionnel comparativement aux dysgénésies. Ces patients développent un goitre, qui n'est pas toujours détecté à la naissance [28, 29, 117].

##### 2.1.3.2.3.1. Défauts spécifiques

Au niveau des troubles de l'hormonosynthèse, plusieurs cas ont été rapportés portant sur différents facteurs importants (traités ci-après) pour la fonction de la glande thyroïde et la sécrétion de ces hormones.

##### 2.1.3.2.3.2. *TPO*

Le gène *TPO* (connu aussi sous le nom thyroïde peroxydase) sur le chromosome 2p25, constitué de 17 exons pour 933 acides aminés, code pour une peroxydase à hème spécifique à la glande thyroïde dont le poids moléculaire est d'environ 103 kDa, se fixant à la surface membranaire des cellules folliculaires thyroïdiennes, grâce à son domaine transmembranaire C-terminal [118, 119]. La

thyroïde peroxydase catalyse l'iodation des résidus tyrosyles dans la thyroglobuline et ainsi la formation de liaisons éther entre des paires d'iodotyrosines pour générer des iodothyronines, dont les hormones T4 et T3 [117].

Le première description de mutations bialléliques inactivant la TPO date du début des années 1990 [28, 117, 120]. Depuis, plusieurs études ont démontré que des mutations de ce gène étaient la cause la plus fréquente de dysmorphogénèse congénitale et de pratiquement tous les défauts complets d'organification de l'iodure [117, 121, 122].

#### 2.1.3.2.3.3. *TG*

Le gène *TG*, appelé aussi thyroglobuline, est exclusivement synthétisé dans la glande thyroïde et représente une glycoprotéine homodimère hautement spécialisée pour la biosynthèse de l'hormone thyroïdienne. Le gène *TG* se situe sur le chromosome 8q24.2–8q24.3 chez l'humain et est constitué de 48 exons [123]. La protéine encodée par ce gène est la plus exprimée dans la glande thyroïde, dont le poids moléculaire est de 660 kDa [124]. Elle est sécrétée dans la lumière folliculaire où elle fonctionne comme une matrice pour la synthèse des hormones, en fournissant les groupes tyrosyles, la composante non-iodée de l'hormone thyroïdienne [117, 125].

La première mutation inactivatrice du gène *TG* a été rapportée dans le début des années 1990 chez trois cas d'une même famille [126]. Les mutations les plus fréquemment rencontrées dans ce gène sont p.R277X, p.C1058R, p.C1977S,

p.R1511X, p.A2215D et p.R2223H. Comme mentionné précédemment, les mutations au sein des gènes causant la dyshormonogénèse sont transmises de façon autosomique récessive et les personnes ayant des mutations dans le gène *TG* sont homozygotes ou hétérozygotes composés [125].

#### 2.1.3.2.3.4. *SLC26A4*

Le gène *SLC26A4*, un membre de la famille des transporteurs multifonctionnels SLC26, code pour un transporteur appelé pendrine, se situe sur la membrane apicale des thyrocytes, où son activité d'échangeur d'ion Cl<sup>-</sup>/I<sup>-</sup> facilite le transport passif d'iodure cellulaire vers la lumière folliculaire [117]. Les personnes porteuses de mutations dans ce gène sont atteintes du syndrome de Pendred, qui se définit cliniquement par une perte auditive congénitale bilatérale neurosensorielle, associé à un goitre diffus ou multinodulaire [127]. Ce syndrome, associé à des mutations bialléliques entraînant des pertes de fonction dans la protéine pendrine, nuit à la capacité de la glande thyroïde à accumuler l'iodure dans la lumière folliculaire, ce qui conduit à une synthèse insuffisante d'hormones thyroïdiennes. [128-130]. Une association entre un polymorphisme de *SLC26A4* et hypoplasie thyroïdienne a été suggérée [131], mais reste peu convaincante sans une étude sur un nombre de cas plus grand et avec un groupe contrôle approprié.

#### 2.1.3.2.3.5. *DUOX*

Dans la glande thyroïde, les protéines codées par les gènes *DUOX* (*DUOX1* et *DUOX2*) produisent du peroxyde d'hydrogène, qui est ensuite utilisé



dans l'oxydation d'iodure, liée à la thyroperoxydase. Ces deux gènes se situent sur le chromosome 15q15.3 et possèdent 83% d'homologie dans la séquence d'ADN.

La protéine codée par le gène *DUOX1* est une glycoprotéine de la famille des oxydases NADPH. La synthèse des hormones thyroïdiennes est catalysée par un complexe protéique, situé au niveau de la membrane apicale des cellules folliculaires de la thyroïde. Ce complexe contient un transporteur d'iodure, la thyroperoxydase, et un système fabriquant du peroxyde qui comprend des protéines codées par les gènes *DUOX1* et *DUOX2*. Cette protéine est connue comme une oxydase double, car elle comprend à la fois un domaine d'homologie peroxydase et un domaine gp91phox (phox pour « phagocyte oxidase »). Cette protéine génère du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), substrat de la peroxydase thyroïdienne [132, 133].

L'enzyme *DUOX2* semble jouer un rôle plus critique pour le maintien de la fonction thyroïdienne normale, puisque seules les mutations dans les gènes *DUOX2* et *DUOXA2* (activateur de la protéine *DUOX2*), mais pas *DUOX1* ou *DUOXA1* (activateur de la protéine *DUOX1*), ont été identifiées comme cause d'hypothyroïdie congénitale. Des mutations dans *DUOX2* mènent donc à une dyshormonogénèse causée par une déficience en  $H_2O_2$ . Initialement, les mutations bialléliques ont été associées à une HC permanente et les mutations monoalléliques à une HC transitoire mais il est désormais clair que même des mutations bialléliques peuvent n'entraîner qu'une HC transitoire [32, 117].

#### 2.1.3.3. Hypothyroïdie congénitale transitoire

L'hypothyroïdie congénitale transitoire est trouvée avec une incidence plus grande en Europe (1:100) comparativement aux Etats-Unis (1:50000) [32, 134]. Cette pathologie semble provenir de plusieurs causes, aussi bien environnementale comme la carence en iode (plus fréquente en Europe), qu'à l'exposition du fœtus à des médicaments antithyroïdiens [29, 32], ou bien génétique, comme les mutations bialléliques dans les gènes *DUOX2* et *DUOX2* [135, 136].

## **2.2. Hyperthyroïdie**

### 2.2.1. Maladie de Graves

Robert Graves a identifié l'association du goitre, des palpitations cardiaques et de l'exophtalmie (extrusion des yeux hors de leur orbite) en 1835, bien que Caleb Parry avait décrit les détails d'un cas similaire des années plus tôt. Il s'agit d'une forme de thyroïdite auto-immune caractérisée par la production d'anticorps IgG stimulant la thyroïde. Ces anticorps se lient au récepteur de la TSH et stimulent la production d'hormones thyroïdiennes (résultant en un taux élevé d'hormones T4 et T3 et un faible taux de TSH), l'hypertrophie de la thyroïde et l'hyperplasie des cellules thyroïdiennes. Ces anticorps agissent aussi sur d'autres tissus et produisent directement les manifestations extra-thyroïdiennes spécifiques à la maladie, au niveau des yeux (ophtalmie de Graves) et de la peau (myxœdème pré-tibial) [137, 138].

Enfin, il est intéressant de souligner qu'il existe de rares cas d'hyperthyroïdie génétique. Par exemple, une mutation somatique (postzygotique) activatrice de la sous-unité alpha de la protéine G (*GNAS*) stimule constitutivement les récepteurs liés aux protéines G, dont le récepteur TSH. Une mutation activatrice de *GNAS* est

la cause du syndrome de McCune-Albright, ce dernier se caractérisant par une dysplasie fibreuse des os, des taches « café au lait » cutanées, une puberté précoce et une hyperthyroïdie primaire dans 10% des cas (PMID 23006743). Dans de rares cas, des mutations activatrices de *TSHR* provoquent également une hyperthyroïdie primaire [139, 140].

### **3. Le séquençage exomique**

#### **3.1. Historique**

Les techniques de séquençage de l'ADN ont été inventées dans les années 1970 avec deux méthodes qui avaient été développées par des groupes différents. La première technique fut mise au point aux Etats-Unis par Maxam et Gilbert, alors que la deuxième fut mise au point par en Angleterre par Frédérick Sanger, toutes les 2 en 1977 [141, 142]. La méthode de Sanger est basée sur la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire au brin matrice, en présence de 2'-désoxynucléotides (dNTP), après quoi la séquence est lue directement sur gel d'électrophorèse. Cette méthode reste encore aujourd'hui la technique standard la plus couramment utilisée, aussi bien pour le séquençage « traditionnel » que pour le séquençage de nouvelle génération. Plus tard, au début des années 1980, Kary Mullis a élaboré et développé une technique d'amplification d'une séquence d'ADN spécifique : la Réaction en Chaîne par Polymerase (PCR). La première publication expliquant cette technique date de 1986 [143]. Au début des années 2000, avec les améliorations des technologies, la méthode de séquençage mise au

point par Sanger a permis de compléter le premier séquençage du génome humain, le « Human Genome Project », projet qui a duré 13 ans [144, 145].

### **3.2. Description de la technique**

Le génome est composé de séquences d'ADN, constituées en alternance de régions non codantes (les introns) et de régions codant pour des protéines (les exons). L'exome correspond à l'ensemble des régions codantes d'un gène, qui représente une toute petite partie du génome, soit environ 1% [146]. Il est clair que lorsque des changements se produisent dans les régions codantes pour des protéines (autres que les mutations silencieuses, i.e. ne modifiant pas la séquence en acides aminés), des conséquences différentes peuvent s'ensuivre, soit une protéine tronquée (codon stop prématuré ou insertion/délétion causant un changement de cadre de lecture) soit un changement d'acide aminé. Le séquençage exomique a donc un potentiel intéressant en terme de rendement, compte tenu qu'environ 85% des mutations causatives de pathologies se trouvent dans la partie codante du génome, l'exome. Pour réaliser ces expériences, différentes plateformes ont été développées par plusieurs compagnies, avec leurs caractéristiques propres. Le séquençage exomique utilise des bibliothèques d'oligonucléotides (ADN ou ARN) afin de pouvoir séquencer tous les exons codant pour des protéines (entre 180,000 et 200,000 exons différents selon la version de la plateforme utilisée) [147].

Afin de pouvoir réaliser le séquençage de nouvelle génération (NGS), plusieurs plateformes sont disponibles sur le marché (Agilent et Illumina par exemple), permettant de séquencer aussi bien l'ADN (exome ou génome) que l'ARN

(RNAseq). Afin de séquencer l'exome d'échantillons par la méthode d'hybridation, plusieurs étapes sont nécessaires (Figure 8).

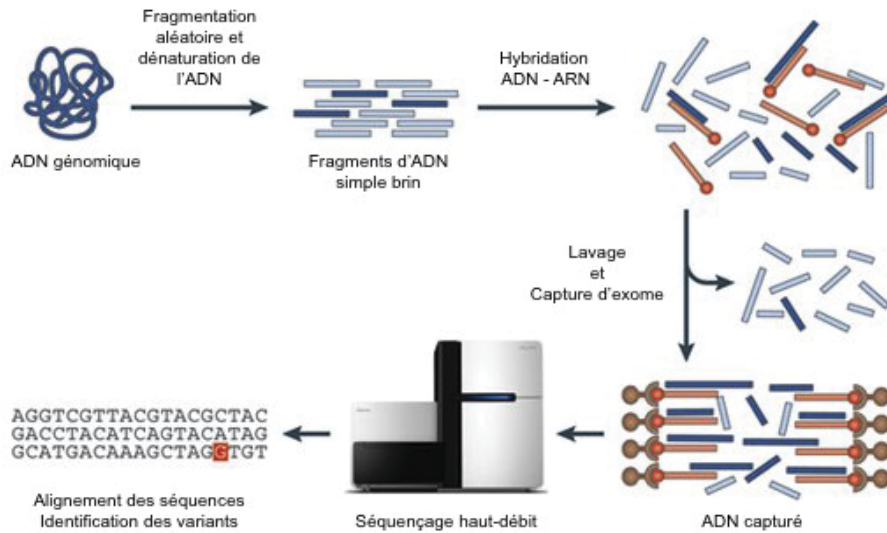


Figure 8 : Étapes du séquençage de l'exome avec capture par hybridation (modifié de [148])

L'ADN est dans un premier temps fragmenté aléatoirement, suivi d'une étape de dénaturation (séparation des doubles brins) afin que des adaptateurs se fixent facilitant le séquençage. L'ADN simple brin est ensuite isolé par hybridation à une librairie d'ARN marquée à la biotine, grâce à la capture sur des billes de streptavidine (liaison biotine-streptavidine). Finalement, le séquençage à haut débit peut être réalisé afin de pouvoir par la suite commencer les analyses des données.

L'objectif principal de l'utilisation du séquençage exomique est d'identifier des nouveaux gènes liés/causant les maladies pour les pathologies mendéliennes ou complexes. L'une des premières difficultés rencontrées est de savoir comment

identifier les allèles liés à la maladie parmi l'ensemble des polymorphismes non-pathogènes, les polymorphismes uniques à l'individu, mais aussi les erreurs de séquençage liées aux méthodes utilisées.

En moyenne, ce type de séquençage identifie environ 20,000 variants dans les échantillons d'origine américano-européens. Plus de 95% de ces variants sont déjà connus comme des polymorphismes dans la population générale [144]. Chaque individu comporte environ 200-400 variants qui lui sont spécifiques. Le recours à des bio-informaticiens et généticiens est à ce moment-là très utile. Afin de trouver les variants responsables de la pathologie à l'étude, plusieurs méthodes de filtration peuvent être considérées. En effet, le mode de transmission (dominant, récessif, autosomale, lié à l'X), le pedigree, etc. peuvent aider à orienter l'analyse. De plus, la taille de l'échantillon peut apporter une plus grande force à l'analyse afin de trouver les allèles en cause. Enfin, différentes études ont permis aussi d'obtenir des données servant de contrôle (Thousand Genomes Project, ExAc Database du Broad Institute), afin de pouvoir éliminer certains variants non spécifiques et ainsi filtrer les données propres à chaque projet [149].

Comme le rapporte Gilissen et al., plusieurs stratégies peuvent être utilisées suivant le type de pathologie que l'on tente d'élucider [150]. Ces stratégies varient selon le type de pathologie (mono ou polygénique), le type de transmission (autosomale, dominante ou récessive, lié au chromosome X ou *de novo*). De plus, il faut tenir compte également du nombre d'individus atteints ou encore du nombre d'échantillons à disposition, afin de choisir la bonne stratégie pour l'étude (Figure 9).

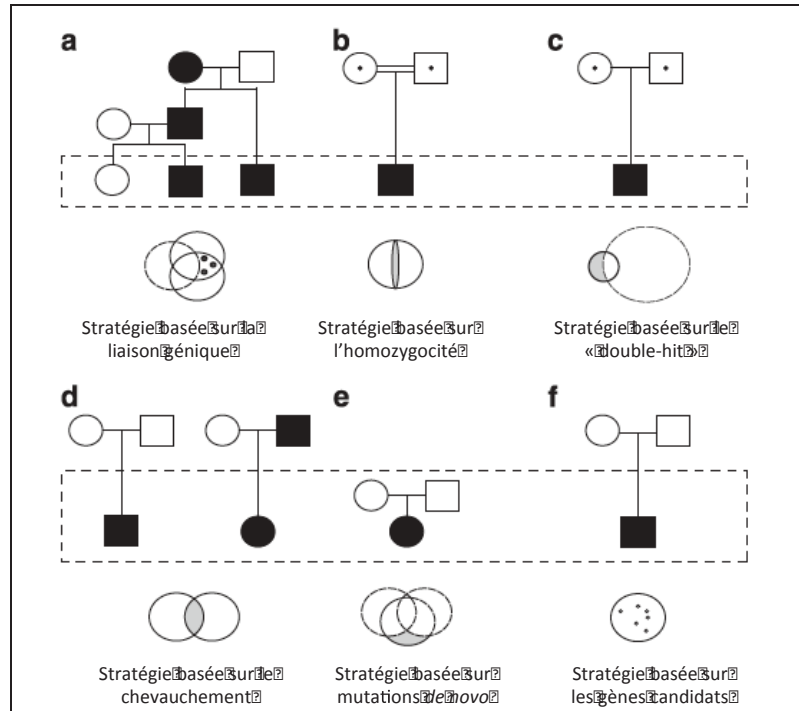


Figure 9 : Exemples de stratégies à utiliser pour le séquençage d'exome (modifié de [150])

Pour les pathologies telles que l'HCDT, qui dans la très grande majorité des cas est sporadique, plusieurs modèles d'études pourraient être utilisés tels que les stratégies « double-hit », « chevauchement » ou « gènes candidats » (figure 8). Étant donné que le nombre de cas familiaux d'HCDT est faible, le modèle basé sur la liaison génétique est peu adéquat. Sachant qu'un nombre restreint de facteurs de transcription (e.g. *NKX2.1*, *FOXE1* et *PAX8*) jouent un rôle dans l'embryologie de la thyroïde, mais qu'ils sont également retrouvés comme cause des HCDT, l'approche « gènes candidats » est alors justifiée. Pour ce qui est de l'approche « chevauchement », celle-ci s'explique par le fait que la majorité des cas sont essentiellement sporadiques. Le but par cette stratégie est de rechercher des gènes

communs en séquençant des cas ayant des traits cliniques les plus similaires possibles. Enfin, ces gènes peuvent également être impliqués dans le modèle « double-hits », soit comme variants hérités à l'état homozygote ou *de novo*.

### **3.3. Analyse des données**

Lorsque des échantillons d'ADN sont séquencés pour obtenir leur exome, des millions de courtes séquences sont obtenues, ce qui est appelé « des lectures » ou plus communément connu sous le nom « reads ». À noter que le pourcentage de ces lectures permettra de caractériser le type de mutation (> 80% de lectures avec un même nucléotide sera considéré comme une mutation homozygote) [150]. Une fois le séquençage terminé et les données obtenues, de nombreuses étapes doivent être franchies avant de pouvoir identifier des gènes (et plus particulièrement des variants) causant potentiellement la pathologie chez le patient dont le génome ou l'exome a été séquencé. À l'aide de logiciels bioinformatiques, ces lectures sont alignées à une séquence référence du génome humain. Ces alignements peuvent prendre plus ou moins de temps selon que l'on traite des données d'exome ou de génome. Pour notre part, nous parlerons que d'exome compte tenu qu'il s'agit de la technique principale utilisée au cours de cette thèse.

Une fois cette étape d'alignement terminée, des milliers de variants (provenant de la différence entre la séquence du patient et la séquence de référence) sont identifiés. À ce moment-là, l'analyse et l'interprétation des données peuvent enfin commencer, grâce à nouveau à des logiciels bioinformatiques. Le plus utilisé, et celui avec lequel nous avons travaillé au cours de nos différentes analyses, est GATK (Genome Analysis Toolkit). Ce type de logiciel permet de donner plusieurs



caractéristiques pour chaque variant, comme le nom du gène dans lequel est situé le variant, sa position chromosomique, le genre de variant (synonymes ou ne changeant pas l'acide aminé, non-synonymes, frame-shift ou changeant le cadre de lecture (insertion/délétion), etc.), le type de mutations (hétérozygotes ou homozygotes), la prédiction de la pathogénicité de la mutation (basée sur un score obtenu par des logiciels tels que Polyphen2 (Polymorphism Phenotyping v2) ou SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant) en utilisant des paramètres tels que la conservation du nucléotide/acide aminé à travers les espèces ou les effets sur la protéine (p. ex. : changement de charge) [151, 152], ou encore la qualité des lectures couvrant l'exome (appelé « quality score »), pour ne citer que ceux-là. Également, certaines bases de données publiques sont utilisées pour l'analyse des projets, telles que les variants déjà référencés dans dbSNP (pour « data base of Single Nucleotide Polymorphisms ») ou bien le 1000 Genomes Project [148]. De plus, l'utilisation d'une banque de données constituée de plusieurs milliers d'exomes d'origine Française-Canadienne (n'ayant aucune pathologie en lien avec celle de nos patients) a été utilisée afin d'écarter des variants communs à cette population et ne garder que des variants « spécifiques » à nos patients (données du Réseau de Médecine Génétique Appliqué, consortium québécois dirigé par Dr Guy Rouleau). Une fois que les données ont été triées, il ne reste qu'une liste « restreinte » de variants qui doivent être validés par séquençage Sanger. Suite à cela, les études plus « fondamentales » (autrement dit, fonctionnelles) portant sur les effets de ces mutations validées restent à être réalisées.

Pour ce qui est de l'analyse des données, plusieurs filtres bien définis pour notre type de projet ont été appliqués successivement à nos exomes (Figure 10) afin d'obtenir des variants rares. En appliquant ces filtres, il en résulte une liste relativement réduite d'environ 200-300 variants rares par exome séquencé.

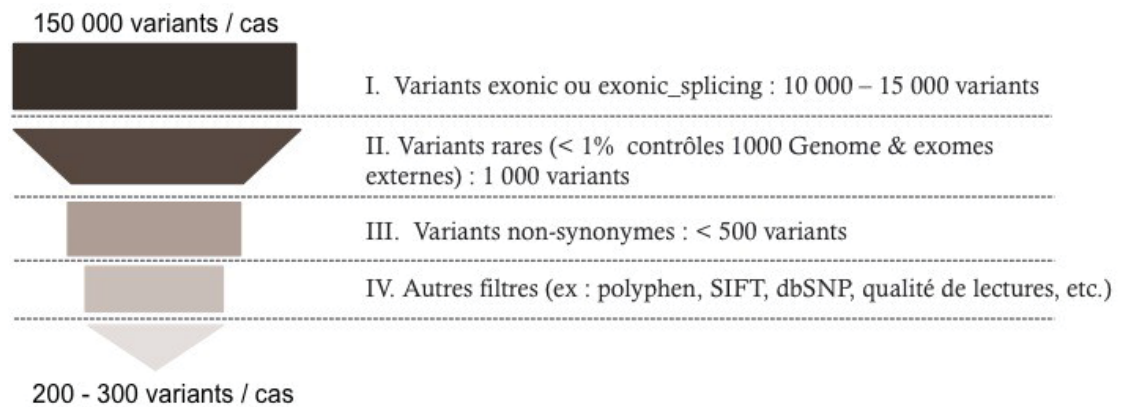


Figure 10 : Protocole de filtration des données des exomes

## Chapitre II : Hypothèses et approches expérimentales

La présence d'un autre cas dans 2 % des familles et une discordance de 92% des jumeaux MZ nous amène à émettre l'hypothèse que l'HCDT résulte d'au moins deux « hits » génétiques différents de gènes importants pour le développement thyroïdien. Le premier hit pourrait être une mutation héréditaire rare ou une mutation *de novo* chez le patient, alors que le second hit pourrait être une mutation germinale ou somatique dans un gène différent. Pour tester ces hypothèses et essayer d'y répondre au mieux, ce projet sera composé de **quatre** volets distincts.

Premièrement, le séquençage de l'exome entier dans l'ADN de 3 paires de jumeaux MZ pour déterminer si les événements génétiques post-zygotiques peuvent expliquer l'apparition généralement sporadique et la discordance observée entre les jumeaux MZ.

Dans un deuxième temps, une approche « gène-candidat » sera faite sur le promoteur d'un gène important pour l'embryologie de la glande thyroïde : *FOXE1*. Ceci permettra peut-être de mettre en évidence de nouvelles mutations impliquées dans les dysgénésies, puisqu'il est le seul gène impliqué dans des ectopies chez la souris.

Troisièmement, le séquençage de l'ADN couplé à celui de l'ARN de tissus sains et ectopiques sera réalisé afin d'identifier une expression monoallélique pouvant potentiellement expliquer un impact tissu-spécifique. Incidemment, cette étude permettra aussi de comparer des paires d'exomes de thyroïdes ectopiques et de leucocytes provenant de même patients.

Quatrièmement, un séquençage de l'exome sera réalisé sur une cohorte de 36 cas (34 cas sporadiques et 2 cas issus de la même famille, c.à.d. transmission directe mère-enfant) afin de chercher de nouvelles mutations ou des variants rares, si possible récurrents.

Finalement, une évaluation de l'impact des gènes et variants rares découverts dans les précédentes parties du projet, sera réalisée en utilisant une lignée de cellules thyroïdiennes humaines normales, soumise à des essais fonctionnels tels que des essais de rapporteur de gène ou des essais de migration cellulaire.

## **Chapitre III : Résultats**

### **1. Étude génétique de jumeaux monozygotes discordants pour la dysgénésie thyroïdienne**

#### **1.1. Situation du sujet**

L'hypothyroïdie congénitale primaire est un trouble fréquent avec une prévalence estimée à environ 1:2,500 naissances vivantes. Une dysgénésie thyroïdienne en est responsable dans 60% des cas (1:4,000) avec une thyroïde principalement ectopique, ce qui est dû à un défaut de migration pendant l'embryogénèse. Le taux de discordance chez les jumeaux monozygotes pour l'hypothyroïdie congénitale par dysgénésie thyroïdienne est de 92%. Nous avons réalisé le séquençage de l'exome de trois paires de jumeaux monozygotes discordants pour l'hypothyroïdie congénitale afin de découvrir les causes génétiques possibles de cette pathologie.

## 1.2. Article 1

Publié dans: *Horm. Res. Paediatr.* 2015;83(2):79-85.

Contributions :

J'ai participé à la planification du projet avec les Drs Guy Van Vliet, Mark E. Samuels et Johnny Deladoëy. J'ai réalisé l'analyse des données génétiques permettant de comparer chacune des paires de jumeaux MZ discordants. De plus, j'ai effectué le « design » des amorces, les réactions PCR ainsi que les interprétations des résultats de séquençage Sanger afin de valider les variants. Roman Serpa a permis de trier les données par méthode bio-informatique en proposant différentes combinaisons de filtres à appliquer aux données. Mark E. Samuels a supervisé les analyses génétiques de ce projet. Enfin, j'ai rédigé une première version de cet article, tandis que Drs Guy Van Vliet, Mark E. Samuels et Johnny Deladoëy ont également participé à la rédaction des versions subséquentes et finales.

**Somatic mutations are not observed by exome sequencing of lymphocyte DNA  
from monozygotic twins discordant for congenital hypothyroidism with  
thyroid dysgenesis**

Fabien Magne<sup>1,2</sup>, Roman Serpa<sup>3</sup>, Guy Van Vliet<sup>1</sup>, Mark E. Samuels<sup>1,4</sup>,  
Johnny Deladoëy<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Endocrinology Service and Research Center, Sainte-Justine University  
Hospital Center, Department of Pediatrics, University of Montreal, Montreal H3T  
1C5, Canada.

<sup>2</sup> Department of Biomedical Sciences, University of Montreal, Montreal  
H3C 3J7, Canada.

<sup>3</sup> Department of Biochemistry, University of Montreal, Montreal H3C 3J7,  
Canada

<sup>4</sup> Department of Medicine, University of Montreal, Montreal H3C 3J7,  
Canada

**Key terms:** congenital hypothyroidism, monozygotic twins, exome sequencing.

**Disclosure summary:** All authors have nothing to disclose.

**Address all correspondence and requests for reprints to:**

Johnny Deladoëy, M.D. Ph.D.

Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine

3175 Côte Sainte-Catherine, Montréal QC, H3T 1C5, Canada

## **Abstract**

**Background / Aims:** Congenital primary hypothyroidism (CH) is a rare pediatric disorder estimated to occur in about 1:2500 live births. Approximately half of these cases entail ectopic thyroid tissue, which is believed to result from a migration defect during embryogenesis. Approximately 3% of CH cases are explained by mutation(s) in known genes, most of which are transcription factors implicated in the embryology of the thyroid gland. Surprisingly monozygotic twins are usually discordant for CH with thyroid dysgenesis, suggesting that most cases are not caused by transmitted genetic variation. One possible explanation is somatic mutation in genes involved in thyroid migration occurring after zygotic twinning. Such mutations should be observed only in the affected twin.

**Methods:** To test the hypothesis of somatic mutation, we performed whole exome sequencing of DNA from three pairs of monozygotic twins discordant for CH with ectopic glands.

**Results:** We found no somatic mutations exclusive to any of the three affected twins, nor in any of the unaffected twins.

**Conclusion:** Either somatic mutations are not significant for the etiology of CH, or else such mutations lie outside regions of the genome accessible by exome sequencing technology.



## Introduction

Congenital primary hypothyroidism (CH) is a relatively rare disorder estimated to occur in about 1:2500 live births [1]. This pathology is classified principally into two groups: first, dysgenesis (85%) defined by an embryologic defect in tissue development; and second, dyshormonogenesis (15%) with anatomically normal tissue development. Congenital hypothyroidism due to thyroid dysgenesis (CHTD) occurs with an incidence of 1:4000 live births, either with an observed ectopic thyroid gland (75% of cases) or with complete athyreosis (25% of the cases) [2]. Thyroid gland ectopy results from a defect in the migration of precursor cells from their origin at the back of the tongue, to their final location at the base of neck, while athyreosis (total absence of the thyroid) results from a lack of differentiation of the thyroid during the embryogenesis. It is unclear whether these two groups are mechanistically related or result from different embryogenic mechanisms. CHTD is predominantly non-syndromic and sporadic (98% of cases are non-familial) [3], has a female and ethnic predominance [4]. Mutation(s) in transcription factors implicated in the morphogenesis of the thyroid gland (*NKX2.5*, *NKX2.1*, *PAX8* and *FOXE1*) have been found in only 3% of CHTD cases, mostly sporadic [1, 3-5]. Linkage studies have excluded these genes in the rare examples of multiplex families with CHTD [6]. All these points, together with the high discordance rate (92%) between monozygotic (MZ) twins [7], argues against inheritance of highly penetrant germline mutations as major causal factors. In contrast, somatic mutations of high penetrance arising during embryogenesis (after the stage of MZ twinning) are potential explanatory factors.

Whole exome sequencing (WES) is a new and powerful tool for identifying genetic causes of human diseases. This technique involves sequencing the annotated protein coding exons of the genome with nearby flanking intronic regions (or splicing sites, defining by intron-exon junctions) [8]. A major proportion of known mutations causing high penetrance genetic disorders are found in or adjacent to the coding regions, so WES is a good approach to explore potential genetic causes of CH. The observed rate of somatic mutation, as assayed by whole genome sequencing of DNA from multiple tissues from the same individual, is extremely low [9, 10]. Indeed, two recent studies have failed to detect genetic or epigenetic differences between MZ twins discordant for different pathologies [11, 12]. Nonetheless, somatic mutations remain of interest as possible causal factors for rare non-Mendelian disorders.

This study aims to identify potential genetics causes for CHTD, under the hypothesis that high penetrance somatic mutations in protein coding regions of the genome are responsible for the disorder. To test this hypothesis, we performed whole exome sequencing in three pairs of monozygotic twins discordant for CHTD.

## **Patients & Methods**

### *Patients*

Three MZ twin pairs (two females and one male, see Figure 1) discordant for congenital hypothyroidism with thyroid dysgenesis were ascertained.

Peripheral blood was obtained by venipuncture, and DNA was prepared from peripheral leukocytes using standard methods. This study was approved by the Ethics Committee of the CHU Sainte-Justine. All the parents and participants provided written informed consent.

### *Exome and Sanger Sequencing*

Whole exome sequencing (WES) was performed using the Agilent 50Mb SureSelect exon capture library, followed by 2x100nt paired-end sequencing on the Illumina HiSeq 2000 instrument. Sequencing was performed at the genomic platform of the McGill University and Genome Quebec Innovation Centre. Primary data in the form of fastq files of raw sequence plus quality scores were processed by the bioinformatics team of the Réseau de médecine génétique appliqué (RMGA). The analysis pipeline for short read alignment to the human consensus genome assembly (v19), variant calling and functional annotation included GATK (Genome Analysis Toolkit), SAMTools and ANNOVAR, using the Integrative Genome Viewer (IGV) to visualize results. Raw sequences were independently analysed using NextGene (SoftGenetics, Inc.).

The output from bioinformatics analysis provided data for more than 50 variables for each individual, including mutation location, read coverage of wild type and variant alleles in the exome samples, allele frequencies in public databases (1000 Genome, NHLBI Exome Variant Server), functional predictions of pathogenicity for amino acid missense variants, and the genotype quality (GQ) score generated by the GATK Unified Genotyper algorithm [13]. We sought to

define stringency levels for various quantitative metrics to optimize false positive versus false negative genotype calls, to control for both common variants (with high minor allele frequencies) and to exclude likely exome-generated technical artifacts. We reduced this complexity through hierarchization in order to generate a testable number (n) of variables (GQ, exonic+splicing annotation, 1000 Genome minor allele frequency, control exome minor allele frequency, variant zygosity in project exome samples, variant read coverage, variant read percentage, gene families known to be prone to exomic artefacts (mucins, HLAs, MAGEs, NBPFs, PRAMEs), etc.) A key component was anonymized access to results from more than 1000 local control exomes of individuals either healthy or with pathologies unrelated to thyroid function, generated using the same sequencing instrumentation technology and bioinformatics analysis pipeline. We generated all possible combinations of the reduced set of these n variables taken k at a time, with each variable combination yielding a set of a candidate variants and genes. Based on the reduction of number of variants and the overlapping results, we chose five variables that generated the best set of candidate rare variants in or near protein-coding regions: Genotype Quality score (GQ), exonic or adjacent intronic location, minor allele frequency less than or equal to 1% in 1000 Genome data, variant present in 5 or fewer local control exomes (maf 0.5%), and variant present in only one member of each twin pair (Figure 2). Only somatic variants specific to the affected twin were of biological relevance, but we looked for variants specific to the unaffected twin in each pair as well, to help define the total amount of somatic mutation.

Candidate variants were re-tested by PCR-based Sanger sequencing. PCR amplicon primers were designed with Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>). Sanger fluorescent sequencing with capillary electrophoresis was performed at the MUGQIC using standard procedures, and sequence chromatograms were analyzed using MutationSurveyor (Soft Genetics, Inc.)

## **Results**

### *Clinical characteristics of patients and twins*

The clinical characteristics of the 3 pairs of twins are reported in Table 1. Of note and consistent with previous reports [7]: (i) all affected twins have a relatively modest increase of TSH levels at screening when compared the confirmatory TSH values at diagnosis, evidence of fetal blood mixing between the healthy (T4 “donor”) and affected (T4 “receiver”) twins; (ii) on average, the birth weight of the affected twin is similar to that of their healthy sib, another argument against environmental fetal distress as a risk for CHTD [2].

### *WES analysis*

For whole exome sequencing, we typically obtain 100-120 fold median coverage of targeted exonic regions using the Agilent SureSelect plus Illumina HiSeq technologies. Following short read alignment, variant calling and gene annotation by our bioinformatics analysis pipeline, each exome typically yields more than 100,000 candidate variants, of which approximately 25,000 are either in or

immediately adjacent to coding exons. By direct comparison of exonic variants without additional filtering, our twin exomes contained approximately 400 candidate variants specific to one or the other twin. As this is far larger than reasonably expected based on known somatic mutation rates [9], it was clear that a substantial proportion of these represented technical artefacts, either due to the exome sequencing itself, or introduced during the multiple cycles of PCR during exome library prep, or due to incorrect read alignments to the genome consensus (for example in segmental duplicate regions or in genes with processed or unprocessed pseudogenes). Therefore we included additional restrictive filters to obtain a manageable number of candidate somatic variants for verification by PCR-based Sanger sequencing. Based on a comprehensive comparison of potential filters and quantitative metrics we required a minimum genotype quality score (GQ, generated by the GATK Unified Genotyper algorithm) metric of 90 for all genotype calls. This reduced the number of candidate variants different between twins to fewer than 50. We used our set of in-house control exomes to further eliminate arising recurrently through technical artefacts especially misalignments (and at the same time, to eliminate common variants potentially arising through recurrent mutation at hypermutable sites, such variants being of unlikely biological relevance). Restricting to variants occurring in fewer than 5 such control exomes, there were fewer than 10 potential somatic variants in each twin. The short read genomic alignments for these were each visually inspected with IGV, to remove additional likely artifacts, such as variants arising uniquely at the 3'-most position in all variant-containing reads, and variants seen in genomic neighbourhoods with

multiple nearby rare variants (indicative of problematic short read alignment). After applying all of these filters, each twin (both the affected and the unaffected) had typically fewer than 5 candidate somatic variants. These variants were re-tested by PCR-based Sanger sequencing. None of the tested variants in the three twins pairs were validated by this resequencing. All candidate variants were found to be artefacts, either false positive (no variant seen in either twin member) or false negative (variant seen in both twins) (Tables 2-3, Supplemental 1-3). False positives of high genotype quality were presumed due to PCR-induced mutations during the exome library prep; false negatives were presumed due to stochastic sampling bias in the twin exome lacking the variant.

## **Discussion**

To our knowledge, this study is the first analysis to search for genetic variants in monozygotic twins discordant for CHTD. However, our study shows no genetic difference between such discordant monozygotic twins. Our results are not unexpected given that no genetic differences were reported between MZ twins in other similar studies, either healthy or discordant for different medical conditions (i.e., multiple sclerosis, VACTERL association-type congenital malformations, renal agenesis) [10, 11, 14].

At least three possible explanations may account for our finding. First, WES covers only 1-2% of the genome, and does not assess variation in non-coding gene regulatory elements except when these are immediately adjacent to coding exons, nor in most of 5' or 3' non-translated mRNA sequences. Moreover a small

fraction of bona fide protein-coding exons are refractory to either hybrid capture or next-generation sequencing with current technologies. Somatic mutations discordant in our twins, and accounting for CHTD might be found in regions outside the accessible coding sequences of the genome. Second, epigenetic differences have been shown between MZ twins [15], which could account for CHTD [16]. Indeed, identical twins show differences in their patterns of DNA methylation and an increased acetylation of histones during their lives, while they are genetically identical [15, 16]. However, our previous studies did not reveal any epigenetic differences in CpG islands of promoter regions between normal eutopic and dysgenetic ectopic thyroid tissues [17, 18]. The next logical step is therefore to analyze the epigenetic profile outside promoter regions and CpG islands.

Finally, MZ twins might share the same variants in the heterozygous state, the difference lying in the possible random monoallelic expression of these variants in thyroid tissues of the affected twin [19]. Monoallelic expression of TPO gene has been reported in congenital hypothyroidism due to dysmorphogenesis [20]. This hypothesis is difficult to test because it requires normal and ectopic tissues from MZ twin pairs to look for biased allelic expression, whereas obtaining thyroid biopsies from healthy individuals is problematic.

In conclusion, we have shown that MZ twins discordant for CHTD have an identical protein-coding genome as assessed by whole exome sequencing. This implies that molecular causes of CHTD might be either due to genomic changes outside the accessible regions of the genome or might be due to yet unidentified



epigenetic differences. Consistent with our findings, it has been recently shown that the rate of mutation across the whole genome is very low between healthy monozygotic twins [21]. It raises also the possibility that biased somatic monoallelic expression of heterozygous variants might explain phenotypic discordance in otherwise genetically identical MZ twins. This latter hypothesis would also be consistent with the occurrence of familial cases in 2% of CHTD [3] and would imply that the rate of random monoallelic expression in thyroid tissue is also about 3 to 5%. Given that CHTD incidence is about 1:4,000 live births [2], it implies that rare heterozygous variants in gene involved in thyroid development occurs in 1:1,000 live births; then, if we postulate that each gene in our genome has equal chances to be mutated, it would suggest that a pool of at least 20 genes are susceptibility markers for CHTD. This new stochastic hypothesis of the cause of CHTD is consistent with the polygenic hypothesis derived from animal models [22] and is also in keeping with the mainly sporadic occurrence of CHTD and the discordance rate of 92% observed in MZ twins. Finally, given that Caucasians have concentrated lethal variants in their genome [23], the stochastic hypothesis might also account for the enrichment of CHTD cases in Caucasians population when compared to African populations [4]; however this hypothesis, as many others, does not provide any obvious explanation for the observed female predominance observed in CHTD. Nevertheless and even with its limitations, this stochastic monoallelic expression hypothesis provides a new model in which the load of heterozygous variants within a functional genomic module should be

considered as potentially disease-causing [24] as long as proper functional studies validate impact of these variants on thyroid morphogenesis.

### **Acknowledgements**

We thank the patients and their parents for their cooperation. We thank Dr. C. Deal (CHU Sainte-Justine, University of Montreal) for her continuous support during this project. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (MOP-130390 to J.D.) and by the Girafonds / Fondation du CHU Sainte-Justine (to J.D. and G.V.V.). M.E.S. is supported by the Centre de Recherche du CHU Ste-Justine and J.D. is a scholar of the Fonds de Recherche du Québec - Santé.

## References

1. Deladoey J, Ruel J, Giguere Y, Van Vliet G: Is the incidence of congenital hypothyroidism really increasing? A 20-year retrospective population-based study in Quebec. *J Clin Endocrinol Metab* 2011, 96(8):2422-2429.
2. Deladoey J, Belanger N, Van Vliet G: Random variability in congenital hypothyroidism from thyroid dysgenesis over 16 years in Quebec. *J Clin Endocrinol Metab* 2007, 92(8):3158-3161.
3. Castanet M, Polak M, Bonaiti-Pellie C, Lyonnet S, Czernichow P, Leger J: Nineteen years of national screening for congenital hypothyroidism: familial cases with thyroid dysgenesis suggest the involvement of genetic factors. *J Clin Endocrinol Metab* 2001, 86(5):2009-2014.
4. Stoppa-Vaucher S, Van Vliet G, Deladoey J: Variation by ethnicity in the prevalence of congenital hypothyroidism due to thyroid dysgenesis. *Thyroid* 2011, 21(1):13-18.
5. Castanet M, Marinovic D, Polak M, Leger J: Epidemiology of thyroid dysgenesis: the familial component. *Horm Res Paediatr* 2010, 73(4):231-237.
6. Castanet M, Sura-Trueba S, Chauty A, Carre A, de Roux N, Heath S, Leger J, Lyonnet S, Czernichow P, Polak M: Linkage and mutational analysis of familial thyroid dysgenesis demonstrate genetic heterogeneity implicating novel genes. *Eur J Hum Genet* 2005, 13(2):232-239.
7. Perry R, Heinrichs C, Bourdoux P, Khoury K, Szots F, Dussault JH, Vassart G, Van Vliet G: Discordance of monozygotic twins for thyroid dysgenesis: implications for screening and for molecular pathophysiology. *J Clin Endocrinol Metab* 2002, 87(9):4072-4077.
8. Lin X, Tang W, Ahmad S, Lu J, Colby CC, Zhu J, Yu Q: Applications of targeted gene capture and next-generation sequencing technologies

in studies of human deafness and other genetic disabilities. *Hear Res* 2012, 288(1-2):67-76.

9. Li R, Montpetit A, Rousseau M, Wu SY, Greenwood CM, Spector TD, Pollak M, Polychronakos C, Richards JB: Somatic point mutations occurring early in development: a monozygotic twin study. *J Med Genet* 2014, 51(1):28-34.

10. Weber-Lehmann J, Schilling E, Gradl G, Richter DC, Wiehler J, Rolf B: Finding the needle in the haystack: differentiating "identical" twins in paternity testing and forensics by ultra-deep next generation sequencing. *Forensic Sci Int Genet* 2014, 9:42-46.

11. Baranzini SE, Mudge J, van Velkinburgh JC, Khankhanian P, Khrebtukova I, Miller NA, Zhang L, Farmer AD, Bell CJ, Kim RW et al: Genome, epigenome and RNA sequences of monozygotic twins discordant for multiple sclerosis. *Nature* 2010, 464(7293):1351-1356.

12. Jin M, Zhu S, Hu P, Liu D, Li Q, Li Z, Zhang X, Xie Y, Chen X: Genomic and Epigenomic Analyses of Monozygotic Twins Discordant for Congenital Renal Agenesis. *Am J Kidney Dis* 2014.

13. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytzky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, Daly M et al: The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res* 2010, 20(9):1297-1303.

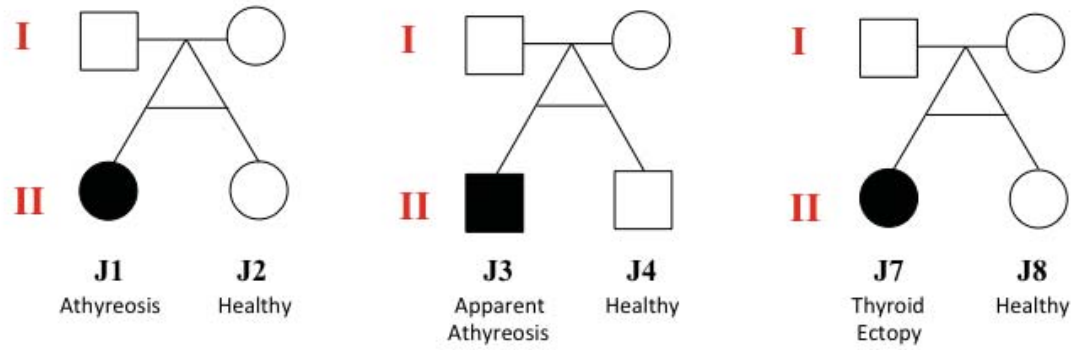
14. Solomon BD, Pineda-Alvarez DE, Hadley DW, Hansen NF, Kamat A, Donovan FX, Chandrasekharappa SC, Hong SK, Roessler E, Mullikin JC: Exome Sequencing and High-Density Microarray Testing in Monozygotic Twin Pairs Discordant for Features of VACTERL Association. *Mol Syndromol* 2013, 4(1-2):27-31.

15. Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, Heine-Suner D, Cigudosa JC, Urioste M, Benitez J et al: Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, 102(30):10604-10609.

16. Deladoey J, Vassart G, Van Vliet G: Possible non-Mendelian mechanisms of thyroid dysgenesis. *Endocr Dev* 2007, 10:29-42.
17. Abu-Khudir R, Paquette J, Lefort A, Libert F, Chanoine JP, Vassart G, Deladoey J: Transcriptome, methylome and genomic variations analysis of ectopic thyroid glands. *PLoS One* 2010, 5(10):e13420.
18. Abu-Khudir R, Magne F, Chanoine JP, Deal C, Van Vliet G, Deladoey J: Role for tissue-dependent methylation differences in the expression of FOXE1 in non-tumoral thyroid glands. *J Clin Endocrinol Metab* 2014:jc20134414.
19. Chess A: Mechanisms and consequences of widespread random monoallelic expression. *Nat Rev Genet* 2012, 13(6):421-428.
20. Fugazzola L, Cerutti N, Mannavola D, Vannucchi G, Fallini C, Persani L, Beck-Peccoz P: Monoallelic expression of mutant thyroid peroxidase allele causing total iodide organification defect. *J Clin Endocrinol Metab* 2003, 88(7):3264-3271.
21. Dal GM, Erguner B, Sagiroglu MS, Yuksel B, Onat OE, Alkan C, Ozelcik T: Early postzygotic mutations contribute to de novo variation in a healthy monozygotic twin pair. *J Med Genet* 2014.
22. Parlato R, Rosica A, Rodriguez-Mallon A, Affuso A, Postiglione MP, Arra C, Mansouri A, Kimura S, Di Lauro R, De Felice M: An integrated regulatory network controlling survival and migration in thyroid organogenesis. *Dev Biol* 2004, 276(2):464-475.
23. Lohmueller KE, Indap AR, Schmidt S, Boyko AR, Hernandez RD, Hubisz MJ, Sninsky JJ, White TJ, Sunyaev SR, Nielsen R et al: Proportionally more deleterious genetic variation in European than in African populations. *Nature* 2008, 451(7181):994-997.
24. Zaghoul NA, Katsanis N: Functional modules, mutational load and human genetic disease. *Trends Genet* 2010, 26(4):168-176.

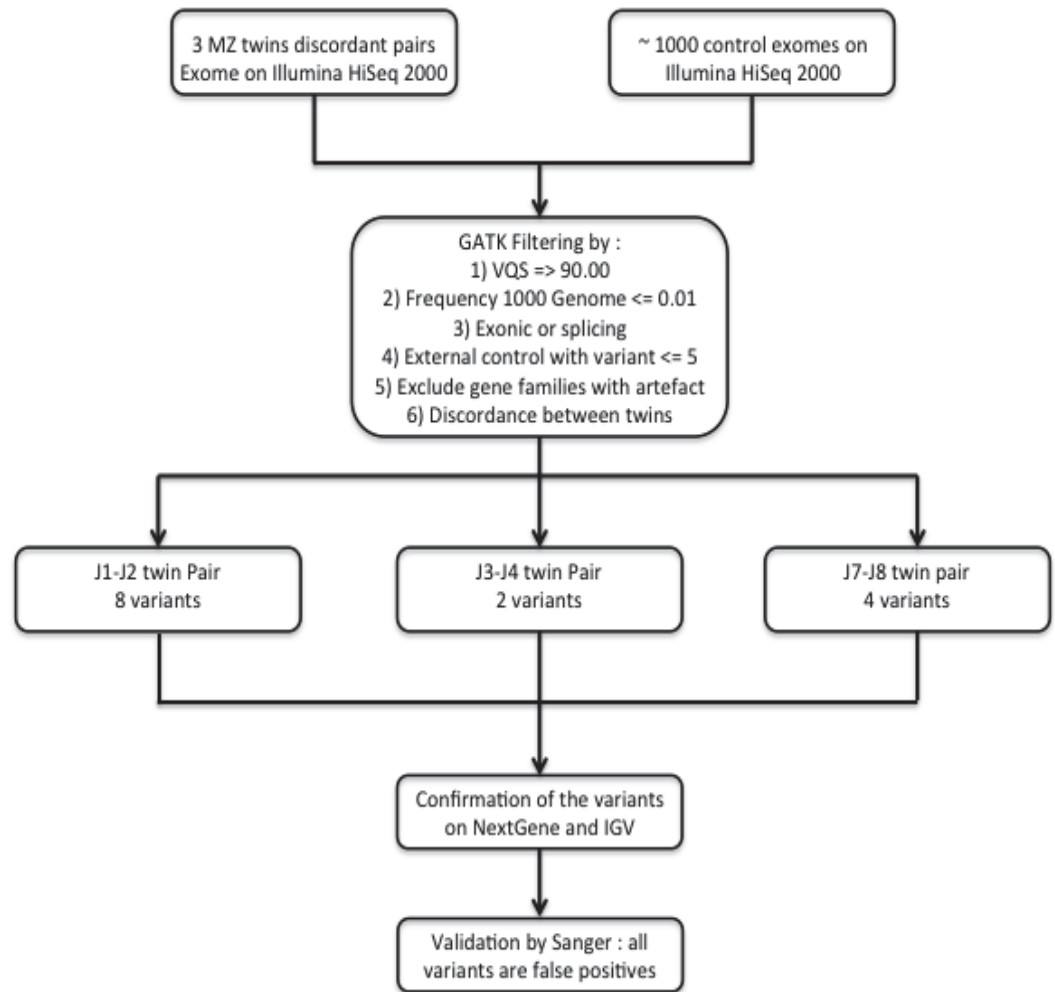
## Figure Legend

**Figure 1:** Pedigrees of the three pairs of twins.



Squares are males, circles are females. Filled symbols denote affected individuals, while open symbols denote unaffected individuals.

**Figure 2:** Breakdown of the experimental protocol including bioinformatics pipeline and filtering of whole-exome sequencing data.



**Table 1:** Clinical characteristics of the affected and healthy MZ twins.

Twins	Sex	Birth Weight (g)	At neonatal screening		At scintigraphy			Dx
			TSH (mU/L)	Total T4 (nmol/L)	TSH (mU/L)	Free T4 (pmol/L)	Tg (ug/L)	
			< 15	120-350	0,4-11	11-23	< 20	
J1	F	2080	38	120	257.75	4.38	1.9	Athyreosis <sup>1</sup>
J2	F	2140	0	180	NA <sup>2</sup>	NA <sup>2</sup>	NA <sup>2</sup>	Healthy
J3	M	2783	22	71	>324	3.42	34.5	Apparent athyreosis <sup>1</sup>
J4	M	2500	0	143	1.35	15.8	57.90	Healthy <sup>1</sup>
J7	F	2460	28	74	338.98	2.44	NA	Thyroid ectopy
J8	F	2020	<2	NA	NA <sup>3</sup>	NA <sup>3</sup>	NA <sup>3</sup>	Healthy

<sup>1</sup> also confirmed by thyroid echography

<sup>2</sup> normal thyroid function at 2 months of age (TSH 2.20 mU/L and free T4 12.32 pmol/L)

<sup>3</sup> normal thyroid function at 6 months of age (TSH 2.47 mU/L and free T4 12.43 pmol/L)



**Table 2:** Numbers of variants obtain after different filters and validation.

Details of numbers of variants obtained after each step of filtration and the number of variants validated for the three twins pairs

Samples	Total detected variants	VQS $\geq 90$	1000 Genomes frequency ( $\leq 0,01 + \text{blank}$ )	1000 Genomes frequency + Exonic or Splicing	1000 Genomes frequency + Exonic or Splicing + external ctrl $\leq 5$	Variants potentially discordant after filtering	Discordant variants validated
J1	135161	72335	13769	2975	437	8	0
J2							
J3	142487	81545	16411	3353	416	2	0
J4							
J7	139213	79953	15807	3135	418	4	0
J8							

**Table 3:** List of variants called after filtering data.

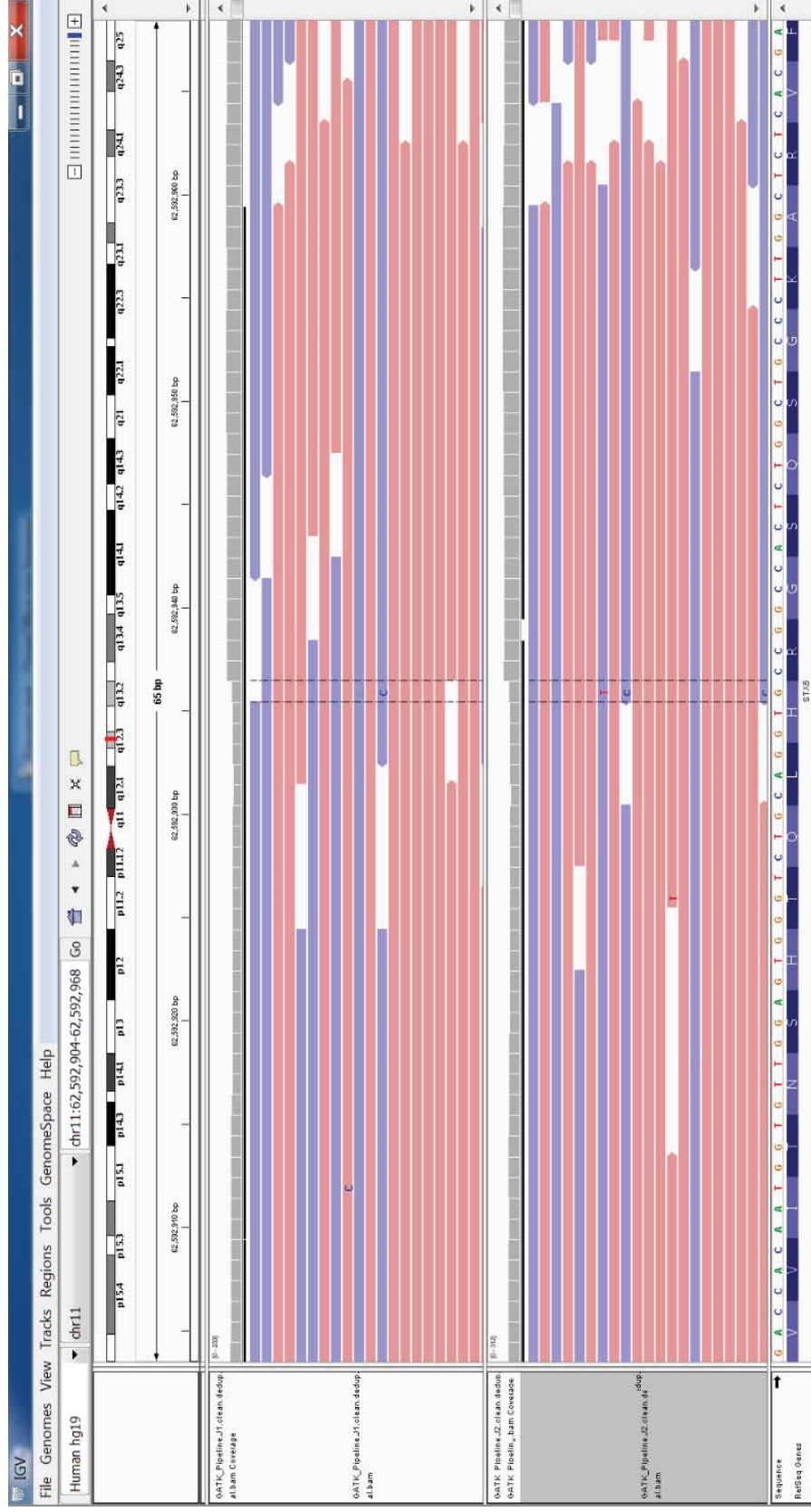
List of all variants (name of gene, number of chromosome, position of the variant, change of nucleotide and acid amine) for each twin pair. Mention if the variant is viewed in which twin with IGV

Sample	w/variant by exome	Gene	Chrom.	Position	Nucleotide changed	Acid Amine changed	Variant in IGV (Jx/Jx)
J1	+	STX5	11	62592936	NM_003164: exon6:c.C499G NM_001244666: exon6:c.C499G	NM_003164: exon6:p.H167D N M_001244666: exon6:p.H167D	- / -
J1	+	FRG1B	20	29625985	ncRNA_splicing:FRG1B:NR_003579(NR_003579:exon4:c.528+1G>A)		- / -
J1	+	MAML3	4	140811125	NM_018717: exon2:c.C1465A	NM_018717: exon2:p.Q489K	- / -
J2	+	AOC2 AOC3	17	41003601	NM_003734: exon1:c.C241G downstream:AOC2:NM_009590 downstream:AOC2:NM_001158	NM_003734: exon1:p.P81A downstream:AOC2:NM_009590	- / -

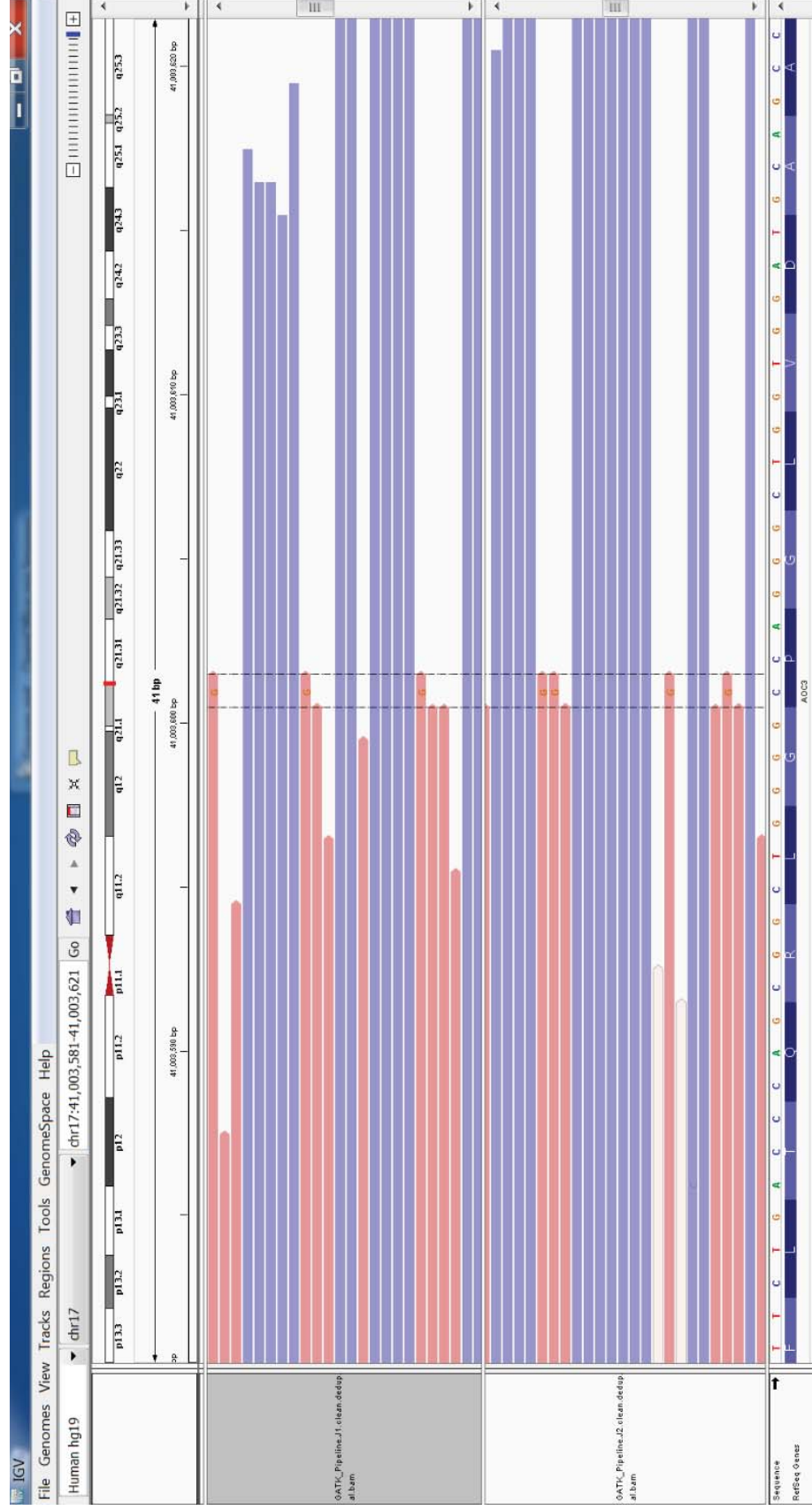
J2	+								downstream:AOC 2:NM_001158	
J2	+	ANKRD20A8P	2	95513877	ncRNA_exonic:ANKRD20A8P:NR_003366					-/-
J2	+	ANKRD20A8P	2	95513880	ncRNA_exonic:ANKRD20A8P:NR_003366					-/-
J2	+	ANKRD20A8P	2	95513889	ncRNA_exonic:ANKRD20A8P:NR_003366					-/-
J2	+	EPPK1	8	144940540	NM_031308: exon1:c.C6882T				NM_031308: exon1:p.G2294G	-/-
J3	+	GANAB	11	62400952	NM_198335: exon7:c.G661C NM_198334: exon6:c.G595C				NM_198335: exon7:p.A221P NM_198334: exon6:p.A199P	-/-
J4	+	JAKMIP1	4	6086690	NM_144720: exon5:c.835_836del NM_001099433: exon5:c.835_836del				NM_144720: exon5:p.279_279d el	-/-

								NM_001099433:exon5:p.279_279del	
J8	+	LOC441666	10	42832211	ncRNA_exonic:LOC441666:NR_024380				-/-
J8	+	WASH2P	2	114355998	ncRNA_exonic:WASH2P:NR_024077				-/-
J8	+	SDHA	5	256514	NM_004168:exon15:c.G1974C			NM_004168:exon15:p.P658P	-/-
J8	+	TCERG1	5	145838680	NM_006706:exon4:c.A672G NM_001040006:exon4:c.A672G			NM_006706:exon4:p.Q224Q NM_001040006:exon4:p.Q224Q	-/-

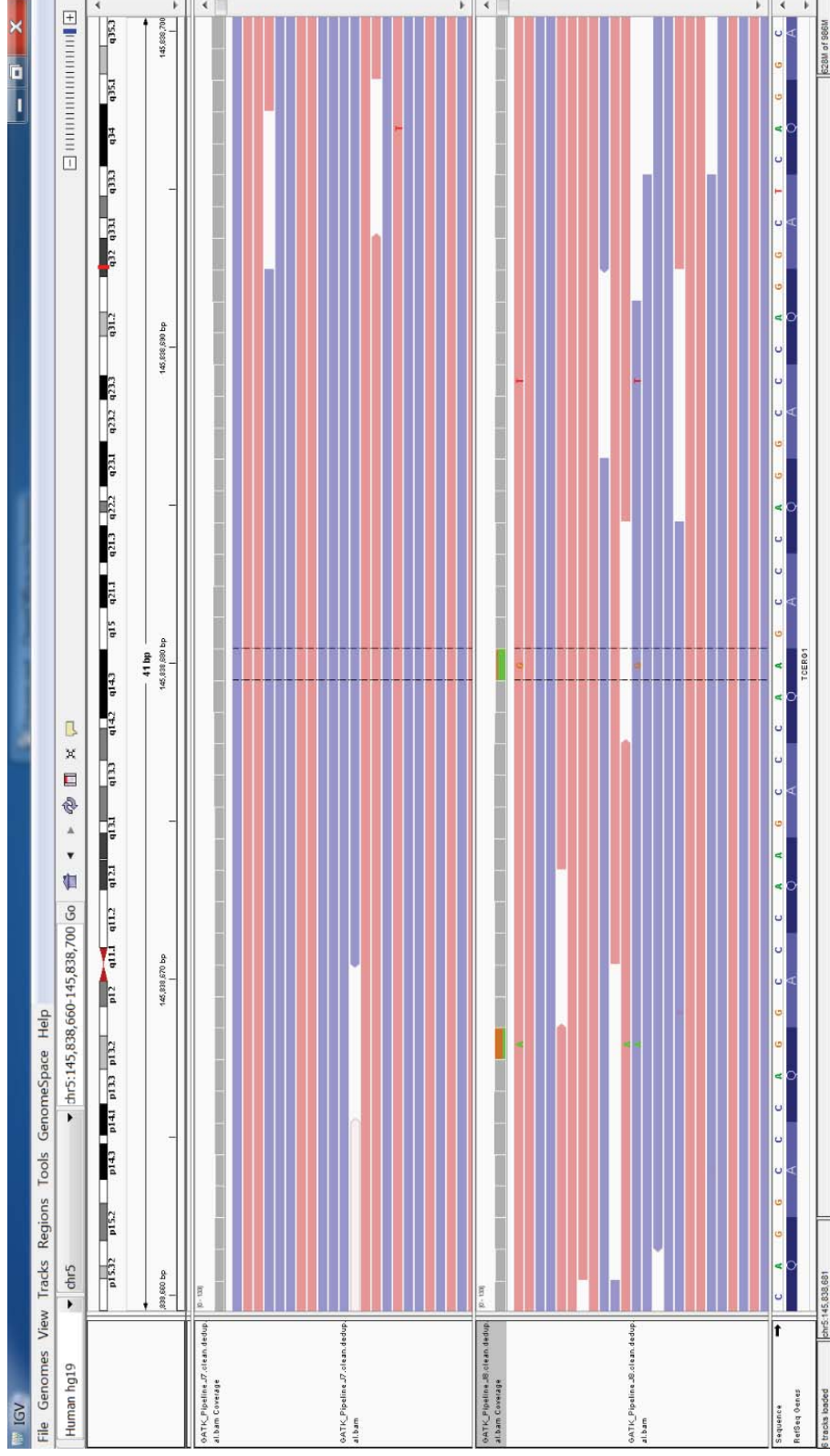
**Supplemental Figure 1S:** Short read alignment of sequences in twins J1 and J2 for a candidate variant in *STX5* gene, using the Integrated Genome Viewer (IGV). Variant was observed in small fraction of reads in both twins, thus presumptive false call.



**Supplemental Figure 2S:** Short read alignment of sequences in twins J1 and J2 for a candidate variant in *AOC3* gene. Variant assessed as absent in both twins with reads containing variant only at the 3' end of forward reads.



**Supplemental Figure 3S:** Short read alignment of sequences in twins J7 and J8 for a candidate variant in *TCERG1* gene. Variant was called in healthy twin with very few reads, thus presumptive false call.



### **1.3. Discussion et perspectives**

La littérature traitant de l'hypothyroïdie congénitale montre clairement qu'il y a un taux de discordance très élevé entre les jumeaux MZ. Dans le but d'identifier des mutations somatiques responsables de cette discordance, l'utilisation des nouvelles technologies de séquençage à haut débit a été utilisée. Au sein de notre banque d'échantillons, nous disposons de 3 paires de jumeaux MZ discordants dont l'ADN leucocytaire a été utilisé pour le séquençage.

Aucun variant spécifique à l'un des jumeaux (atteints ou sains) n'a été validé. De ce fait, aucune cause génétique dans des régions du génome codant pour des protéines n'a pu être montrée. D'autres études devront être réalisées afin de tenter de trouver une explication concrète à cette discordance, laissant supposer plusieurs hypothèses possibles, comme des différences de méthylation, des mutations touchant des zones non-couvertes par le WES (promoteurs et introns) ou bien de l'expression monoallélique (ce que nous discuterons dans un des prochains chapitres de cette thèse) au niveau de la thyroïde du jumeau atteint.



## 2. Étude d'une région promotrice de *FOXE1*, gène impliqué dans l'embryologie de la glande thyroïde

### 2.1. Situation du sujet

*FOXE1* est connu pour jouer un rôle essentiel dans l'embryologie de la glande thyroïde. Grâce à des études chez le modèle murin, il a été montré que ce gène contrôle la migration de la thyroïde, avec une ectopie retrouvée dans 50% des souris (-/-) pour *Foxe1*, faisant de lui le seul gène impliqué dans l'ectopie thyroïdienne.

Nous avons récemment découvert qu'une région du promoteur *FOXE1* est différenciellement méthylée suivant le tissu (leucocytes – thyroïdes) [153]. La méthylation de deux dinucléotides CpG consécutifs de cette région est inversement associée à l'expression de *FOXE1* tant *in vivo* qu'*in vitro* [153]. Cette région différenciellement méthylée (RDM) définit une zone cruciale de contrôle de l'expression de *FOXE1* et des mutations / variants géniques dans cette RDM ont de forte chance d'avoir un impact sur l'expression de *FOXE1*. Dans ce contexte, afin de trouver si des polymorphismes dans cette région sont associés à l'HCdT, nous avons séquencé, au total et dans deux cohortes différentes : 134 cas HCdT sporadiques, 119 témoins Caucasiens et aussi 53 témoins d'origine africaine. Les échantillons Caucasiens sont constitués d'individus Canadiens français et Français. L'HCdT étant très rare dans la population d'origine africaine, on s'attend donc à retrouver des variants significativement différents dans des régions du génome associées à l'HCdT.

## 2.2. Article 2

En préparation pour être soumis à l'American Journal of Human Genetics (AJHG)

Contributions :

J'ai participé, sous la supervision du Dr Deladoëy, à l'élaboration du projet. J'ai mis au point le protocole d'amplification de la région promotrice étudiée. De plus, j'ai analysé les résultats de ce génotypage dans les différentes cohortes utilisées (cas, témoins canadiens-français, témoins d'origine africaine) et j'ai découvert des haplotypes composés associés à HCDT mais aussi des haplotypes « protecteurs » dans la population d'origine africaine. J'ai ensuite réalisé toutes les études fonctionnelles afin : (i) de valider l'impact biologique de ces haplotypes sur l'expression de *FOXE1* et (ii) de démontrer qu'une diminution de 50% d'expression de *FOXE1* diminue la capacité de migration des cellules thyroïdiennes humaines (construction des différents plasmides, essais luciférase, essais de migration ainsi que l'immunofluorescence et les immunobuvardages). Stéphanie Larrivée-Vanier a réalisé l'infection des cellules Nthy-ori avec les shRNA. Michel Polak a fourni les échantillons de la cohorte caucasienne-française, tandis qu'Aurore Carré a réalisé l'amplification et l'analyse des chromatogrammes des cas et contrôles français (données que j'ai également analysées à la demande d'Aurore Carré). Luis B. Barreiro a fourni les échantillons de la cohorte Afro-Américaine. Enfin, j'ai rédigé, avec Dr Deladoëy, une première version de cet article, puis Rasha Abu-Khudir, Guy Van Vliet, Mark E. Samuels,

Michel Polak et Johnny Deladoëy ont également participé à la rédaction et à la révision des versions subséquentes et finales.

## **Association between FOXE1 promoter haplotypes and thyroid dysgenesis**

Fabien Magne<sup>1,2</sup>, Stéphanie Larrivée-Vanier<sup>1</sup>, Aurore Carré<sup>3</sup>, Rasha Abu-Khudir<sup>1,4</sup>, Guy Van Vliet<sup>1</sup>, Luis B. Barreiro<sup>1</sup>, Mark E. Samuels<sup>1</sup>, Michel Polak<sup>3</sup>, Johnny Deladoëy<sup>1,2,4</sup>.

<sup>1</sup> Research Center, Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine, University of Montreal, Montreal H3T 1C5, Canada.

<sup>2</sup> Department of Biomedical Sciences, University of Montreal, Montreal H3C 3J7, Canada.

<sup>3</sup> Hôpital Necker Enfants Malades, INSERM U1016, Affilié IMAGINE, 75006 Paris, France

<sup>4</sup> Department of Biochemistry, University of Montreal, Montreal H3C 3J7, Canada.

**Abbreviated Title:** epigenetic control of FOXE1 expression

**Key terms:** ectopic thyroid, congenital hypothyroidism.

**Words count:** 2493; **Figures & Tables:** 6; **Supplemental data** will be added.

Address all correspondence and requests for reprints to:

Johnny Deladoëy, M.D. Ph.D.

Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine

3175 Côte Sainte-Catherine, Montréal QC, H3T 1C5, Canada

**Grant support:** see the acknowledgments.

**Disclosure summary:** All authors have nothing to disclose.

## **Abstract**

Background: In rodents, the transcription factor forkhead box E1 (*Foxe1*) plays an essential role in thyroid morphogenesis and migration. We previously identified a region in the human *FOXE1* promoter that is differentially methylated (DMR) in a tissue-dependent manner. Here, we assess (i) whether haplotypes of this DMR of the *FOXE1* promoter are associated with congenital hypothyroidism due to thyroid dysgenesis (CHTD). Given that CHTD is frequent in Caucasians and rare in Black-African descents, we also assess whether haplotypes differed by ethnicity.

Methods: This is a haplotype-based association study in two independent cohorts, totaling 135 CHTD cases, 119 Caucasian controls and 53 Black-Africans descent controls. Gene reporter assays were used to assess the functional impact of the discovered variants on *FOXE1* expression in the human thyroid cells. Real-time cell migration analysis was used to assess the cell migration of stable *FOXE1*-knockdown Nthy-ori cells.

Results: One haplotype (Hap1: ACCCCCCdel1C) is associated with CHTD in Caucasians ( $P=5E-03$ ). A significant reduction of the luciferase activity is observed for Hap1 (reduction of 68%,  $P<0.001$ ) when compared to the wild-type *FOXE1* promoter. A 50% reduction of the *FOXE1* expression in human thyroid cells is sufficient to decrease significantly cell migration (reduction of 55%,  $P<0.05$ ). Next, one haplotype (Hap2: ACCCCCC) is observed less frequently in Black-African descents when compared to Caucasians ( $P=1.7E-03$ ) and Hap2

decreases luciferase activity (reduction of 26%,  $P < 0.001$ ). Two distinct haplotypes are found frequently in Black-African controls. The first haplotype (Hap3: GTCCCAAC) is frequent (30.2%) in Black-African controls when compared to Caucasian controls (6.3%;  $P = 2.59 \times 10^{-9}$ ) whereas the second haplotype (Hap4: GTCCGCAC) is found exclusively in Black-African controls (9.4%) and is absent in Caucasian controls ( $P = 2.59 \times 10^{-6}$ ). Hap3 and Hap 4 haplotypes have neutral effects on FOXE1.

Conclusion: We found a functional risk haplotype (Hap1) in the DMR of the *FOXE1* promoter associated with CHTD. In contrast, two distinct neutral haplotypes (Hap3 and Hap4) are frequently found in Black-African descents, an ethnic group in which CHTD incidence is low. Altogether, these results are consistent with a cell-autonomous role of *FOXE1* in thyroid migration during organogenesis and the known low incidence of CHTD observed in Black-African descents.

## **Introduction**

Congenital hypothyroidism from thyroid dysgenesis (CHTD) is a relatively common disorder with a prevalence of one in 4,000 live births [1]. CHTD is the consequence of a failure of the thyroid precursor cells to migrate from their place of origin in the primordial pharynx to their correct final anatomical location (the anterior of the neck). This results in either thyroid ectopy (lingual or sub-lingual) or in a complete absence of the thyroid (athyreosis). The most common diagnostic category is thyroid ectopy, which occurs in up to 80% of CHTD cases. CHTD typically results in a significant deficiency of thyroid hormones (hypothyroidism), which can lead to severe intellectual disabilities if left untreated. Therefore, biochemical screening for CHTD is routinely performed at 2 days of life, enabling the initiation of thyroid hormone therapy during the second week of life, if required. The majority of CHTD cases have no identified genetic cause, and disease incidence is not correlated with any known environmental factors. Even with early treatment, developmental delays are still observed (e.g., a mean IQ reduction of 10 points compared to children with normal thyroid function) [2]. This long-term cognitive deficit does not correlate fully with the biochemical severity of the hypothyroidism. Therefore, the discovery of novel molecular markers to identify patients with possible susceptibility to intellectual disabilities (e.g., genes involved in both neuronal and thyroid migration during development, such as NKX2.1) could have an important clinical impact.

CHTD is predominantly not inherited (98% of cases are sporadic [3]). CHTD also has a high discordance rate (92%) between monozygotic (MZ) twins

[4], and a female and ethnic (Caucasian) predominance [5]. Germline mutations in the thyroid-related transcription factors *NKX2.1*, *NKX2.5*, *FOXE1*, and *PAX-8* have been identified by candidate gene screening in only 3% of patients with sporadic CHTD [6]. Moreover, evidence of non-penetrance of mutations in genes such as *NKX2.5* [7] in close relatives of patients suggests that modifiers, possibly additional germline mutations or somatic SNPs or rare variants, may be associated with CHTD [8, 9].

The transcription factor forkhead box E1 (*FOXE1*), is a member of the forkhead/winged-helix family and plays an essential role in thyroid morphogenesis [10, 11]. In humans, *FOXE1* mutations have been identified in a few syndromic cases of athyreosis associated with spiky hair, cleft palate, sometimes with choanal atresia and bifid epiglottis (aka Bamforth-Lazarus syndrome, OMIM #241850) [12-14]. Animal studies have also pointed to the critical role of Foxe1 in the embryonic migration of the thyroid [11]. We recently discovered a tissue-dependent differentially methylated region (DMR) in the *FOXE1* promoter; this DMR interacts with the polycomb repressive complex 2 (PRC2) and acts as *FOXE1* expression modifier [15].

In the present case-control study, we assess in two independent cohorts whether genetic variants in the DMR of the *FOXE1* promoter are associated with congenital hypothyroidism due to thyroid ectopy.

## **Methods**

### *Subjects, data and DNA collection*



This study was approved by the ethics committees of the CHU Sainte-Justine and the Necker-Enfants-Malades Hospital. All the parents and participants gave written informed consent. We recruited 134 Caucasian patients with CHTD (124 with ectopic thyroid and 10 with athyreosis) and 119 Caucasian controls. Additionally, 53 Black-African descents controls were recruited to assess for genetic differences in an ethnic group rarely affected by CHTD [5]. Isolation of total genomic DNA from peripheral blood leukocytes was available from all participants was available and sequenced with primers as follows: sense 5'-AAGGTGCCTATAATATAATCCAGTT-3' and antisense 5'-CCATTCAGTGGGAGATCCA-3'. A second pair of primers is used on some samples to confirm the previous Sanger results. C-stretch length was also confirmed by capillary electrophoresis. Protocols of RT-PCR (*FOXE1* and *CDHI*) and capillary electrophoresis are available upon request.

#### *Haplotype-based association analysis*

Hardy-Weinberg (HW) equilibrium was calculated and haplotypes were phased and analysed with Haploview version 5.0 [154]. All SNPs with a HW p-value above  $1 \times 10^{-5}$  were considered in HW equilibrium. Then, we performed association analysis with individual haplotypes that had frequencies of 0.01 or greater (8 for CHTD vs controls; 10 for Caucasians vs Black-Africans). To correct for multiple testing, we applied a Bonferroni correction with the alpha set at 0.05 and considered each haplotypes as an individual test. Consequently, the threshold levels were: (i)  $0.05/8 = 6.25 \times 10^{-3}$  for the association analysis between Caucasian

CHTD and Caucasian controls and (ii)  $0.05/10 = 5 \times 10^{-3}$  for the association analysis between Caucasian controls and Black-African controls.

#### *Luciferase reporter gene assay*

To assess whether the haplotypes have any functional impact on the FOXE1 expression, we performed luciferase reporter gene assay using different construct with haplotypes sequences as promoter in human thyroid Nthy-ori 3-1 cells obtained from Sigma (St Louis, MO). Wild type and mutated plasmids (0.5 µg DNA) were transfected in Nthy-ori 3-1 cells ( $0.1 \times 10^5$  cells/well) using XtremeGENE 9 (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada). In each experiment (performed in triplicate) the pRL-TK plasmid (0.5 µg) was cotransfected for normalization purposes. Luminescence was measured 24 h after transfection using the dual-luciferase reporter assay system (Promega, Madison, Wisconsin) by the 2104 EnVision Multilabel Plate Reader (PerkinElmer, MA, USA). Following normalization with *Renilla* luciferase activity, luciferase activity corresponding to each plasmid was obtained relative to pGL3-Basic vector and the mean and standard error of the mean (SEM) from triplicate wells were calculated. Transfections were repeated in six independent experiments.

#### *Gene depletion in human thyroid cell and migration assay*

To determine whether a 50% reduction of *FOXE1* expression hampered human thyroid cell migration, we infect N-thy-ori cells with lentiviral vector PLKO.1-puro-CMV-tGFP with shRNAs targeting *FOXE1* (Sigma-Aldrich, Oakville,

Ontario). A lentiviral vector with a non-targeting shRNA was used as a control. Lentiviral particles were produced in HEK293T cells after co-transfection of lentivirus plasmid with third generation packaging plasmids using lipofectamine 2000 (Life Technologies, Burlington, Ontario). The media containing the lentiviral particles was collected and filtered through a 0,45µm filter after 48h of incubation. Lentivirus were used immediately for infection or stored at -80 °C. Nthy-Ori cells were infected when they reach 80% of confluence with a 1:3 ratio of viral suspension and fresh medium containing 8 µg/mL Polybrene. After overnight incubation, medium was replaced with DMEM containing 10% FBS and antibiotic. Cells were selected with puromycin (3 µg/mL) for 5-6 days. To validate the efficiency of the shRNA, RNAs from infected cells are extracted using a miniRNeasy kit (Qiagen, Toronto, Canada) and reverse transcribed with random primers using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Thermo Fisher), as described by the manufacturer. Then, gene expression was determined using assays designed with the Universal Probe Library (UPL) from Roche ([www.universalprobelibrary.com](http://www.universalprobelibrary.com)). For each qPCR assay, a standard curve was performed to ensure that the efficacy of the assay is between 90% and 110%. qPCR reactions were performed using Perfecta QPCR Fastmix II (Quanta), 2 µM of each primer and 1 µM of the corresponding UPL probe. The Vii7 qPCR instrument (Life Technologies) was used to detect the amplification level of FOXE1 and was programmed with an initial step of 20 sec at 95°C, followed by 40 cycles of: 1 sec at 95°C and 20 sec at 60°C. Relative expression ( $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$ ) was calculated using the Expression Suite software (Life Technologies), and

normalization was done using both *GAPDH* and *HPRT*. Next, we explore cell migration using a Real-Time Cell Analyzer (RTCA XCELLigence system, Roche Applied Sciences) according to the manufacturer's instructions. For migration assays, we used Cell Invasion and Migration (CIM-16) plates which are modified Boyden chambers to allow recording of electric impedance of the microporous membrane (pore size of 8  $\mu\text{m}$ ) when cells move from the upper to the lower chambers filled with cell attractant (10% heat-inactivated fetal bovine serum). We seeded  $0.3 \times 10^5$  cells into each upper chamber for all analyzed clones. The migration assay was realised at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator during 30 hours with impedance recorded each 10 minutes. Five independent assays were performed for each clone. Finally, real-time impedance measurement data are converted in an arbitrary units called *Cell Index*, which is a function of the resistance difference over time. To allow the comparison of multiple clones and different experiments, *Cell Index* values were converted in percentage of the positive control values (clone infected with non-targeting shRNA) after subtraction of random cell movements (values of the negative control, clones assayed without cell attractant in the lower chamber).

## **Results**

### *Deviation from Hardy-Weinberg equilibrium is important in CHTD cases*

If we compare the results of HW p-values of the three different groups (Caucasian CHTD cases, unaffected Caucasians and Afro-American controls), we observed that 6 of the 8 genotyped SNPs are in equilibrium in Black-African descents,

whereas deviation from HW equilibrium increased in unaffected Caucasians (an ethnic group at risk for CHTD) and became extreme in Caucasians CHTD cases (Tables 2-4).

*One haplotype (Hap1) is associated with CHTD and has a functional negative impact on FOXE1 expression and thyroid cell migration.*

One haplotype (Hap1: ACCCCCCdel1C) is associated with CHTD in Caucasians and survived Bonferoni correction for multiple testing (Table 6). Our Hap1 in CHTD cases have severe hypothyroidism associated with thyroid ectopy. To determine the effects of the risk alleles on the *FOXE1* expression, we conducted luciferase assays with various constructs (Figure 1A). Gene reporter assays shows a significant 68% reduction of the luciferase activity of the Hap1 (95%CI 64-71%;  $P < 0.0001$ ) compared to the wild-type *FOXE1* promoter (Figure 1B). The del1C alone shows a modest reduction of 14% (95% CI 6-22%;  $P < 0.001$ ). Next, To assess whether a decreased *FOXE1* expression caused a decreased migration of human thyroid cells, we decreased *FOXE1* expression by transfecting the Nthy-ori cells line with lentiviral vectors containing shRNAs targeting *FOXE1* and we performed real-time cell migration assays. Cell migration was significantly decreased in stable *FOXE1*-knockdown Nthy-ori cells. Reduction ranged from 47% to 58% for shFOX E1-71 and 30% to 64% for shFOX E-69 (all  $P$ -value  $< 0.01$  after correction for multiple testing) when compared to control shCTRL, which did not show reduced *FOXE1* expression (Figure 2).

*One haplotype (Hap2) is less frequent in Black-Africans when compared to Caucasians*

The haplotype Hap2 (ACCCCCC) is observed less frequently in Black-African descents when compared to Caucasians ( $P=1.7 \times 10^{-3}$ , Table 7) and Hap2 shows a 28% reduction of the luciferase activity (27%, 95%CI 18-35%  $P<0.0001$ ; Figure 1B).

*Two haplotypes (Hap3 and Hap4) are more frequent in Black-Africans when compared to Caucasians and have a neutral impact on FOXE1 expression (validation currently in progress).*

The first haplotype (Hap3: GTCCCAAC) is frequent (30.2%) in Black-African controls when compared to Caucasian controls (6.3%;  $P = 2.59 \times 10^{-9}$ ) whereas the second haplotype (Hap4: GTCCGCAC) is found exclusively in Black-African controls (9.4%) and is absent in Caucasian controls ( $P = 1.52 \times 10^{-6}$ , Table 7).

## **Discussion**

*FOXE1* is already known to be a gene which plays a key role in thyroid migration [17]. CHTD has a high discordance rate (92%) between monozygotic (MZ) twins [4], and a female and ethnic (Caucasian) predominance [5]. Germline mutations in the transcription factors implicated in thyroid embryology have been identified in only 3% of patients with sporadic CHTD [6]. Mutations in *FOXE1* gene have been identified in few syndromic cases with athyreosis (Bamforth-Lazarus syndrome) [12-14]. Variability in length of *FOXE1* Alanine stretch has

been show to be associated with thyroid dysgenesis (14/14 alanines) [18] and in thyroid cancer (> 14 alanines) [19, 20] without modify the *FOXE1* expression. On the other hand, no somatic *FOXE1* mutation in has been found in thyroid ectopies [21] (Magne et al, Thyroid, in revision).

According to our hypothesis that genetic variants in genes involved in thyroid development are associated with CHTD, we examined a differentially methylated region (DMR) in the *FOXE1* promoter which modulates the tissue-specific *FOXE1* expression [15] and we found an enrichment of a functional risk haplotype (Hap1) in CHTD cases. In contrast, an enrichment of haplotypes Hap3 and Hap4 in Black-African descent controls. Hap3 and Hap4 showed neutral effect on *FOXE1* expression. Given the very low CHTD incidence in this ethnic group [5], Hap3 and Hap4 can be defined as neutral (if not protective) haplotypes.

Our results have showed a significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (DHW) for all SNPs in the Caucasian CHTD cases, which per se suggest an association between this promoter region of *FOXE1* and CHTD. We also observed, to a lesser extent, DHW in unaffected Caucasians, a population known to have a higher susceptibility to develop CHTD. Therefore, we selected SNPs with conserved HWE in the Black-African descent cohort because this population is known to be rarely affected by CHTD [5]. Moreover, it is well known that the linkage disequilibrium (LD) is higher in non-African populations due to founder effect [22]. In contrast, the decreased genetic variations observed in Caucasians have already shown to increase the susceptibility to diseases [23]. Of note, deviation form HW equilibrium among affected individuals has been used

successfully to fine-scale localization of disease locus [24, 25]. Herein, a gradual loss-of-heterozygosity is observed when comparing Black-African descents with unaffected Caucasians and with Caucasian CHTD cases; this latter group showed an extreme excess of homozygosity. These findings are consistent with the known enrichment of CHTD cases observed in Caucasians, which contrasts with the extreme rarity of CHTD in Black-African populations [5]. Moreover, the variability of variants in region known to be associated with the risk of pathology can be population-specific with sometime a protective effect. A recent study has associated some SNPs and haplotypes in *RET* gene to increased risk in Hirschprung disease in Czech population [26]. Some of these causative variants are found previously in Asian patients. The Hirschprung disease is principally sporadic (1:5000), more frequent in male (ratio 4:1) with an ethnic difference (more frequent in Asians than Caucasians) [27]. Moreover this study has found a variant in haplotype with a protective role (present in Caucasians and absent in Chinese), with their presence and frequency may depend on ethnicity [28-30].

Next, we showed in vitro (i) that the two haplotypes Hap1 and Hap2 decrease the *FOXE1* expression and (ii) that even a 50% of decrease of *FOXE1* expression is sufficient to reduce significantly the migration of human thyroid cells, this latter point being consistent with results observed in Foxe1 knock-out mice [11]. Indeed, homozygous *foxe1*-null mice exhibit thyroid ectopy in 50% of cases [11] and migration of the thyroid bud requires *foxe1* expression in mouse embryos [17]. Altogether, this suggests that *FOXE1* plays a key role in the embryogenesis and migration of the human thyroid, a hypothesis supported by our



results showing a reduced migration of the *FOXE1* depleted human thyroid cells. Moreover, as shown previously by Fernandez et al. [31], we observed an increase expression of cadherin 1 (CDH1) in *FOXE1* depleted human thyroid cells. Up regulation of *CDH1* inhibits the invasion and migration of breast cancers [32]. In contrast, *CDH1* down regulation is associated with progression and metastasis of gastric, breast and thyroid cancers [33, 34]. We hypothesize that, during organogenesis, the thyroid bud migration is impaired as a consequence of the increased *CDH1* expression following an even partial *FOXE1* loss-of-function.

Variable gene expression among genetically identical cells has been implicated in processes including determination of cell fates [35, 36] and the development of genetic disease [37]. Recently Jones et al. have shown that mutations in regulatory DNA (or promoter) can increase gene expression variability [38]. In the same line, random fluctuations of NANOG expression allow pluripotent stem cells to explore multiple lineage options, modulating their probability to change functional state [39]. Therefore, one might hypothesize that the level of the *FOXE1* expression noise at a crucial time-point of the thyroid development modulate the probability of either normal or arrested thyroid cell migration. This implies that CHTD is a genetically driven stochastic event, in which *FOXE1* acts as a chemical morphogenic variable in a system where motion, local physical chemoattractant gradient and even local physical constraints might interfere, as suggested six decades ago by Turing [40, 41].

In conclusion, this study showed that risk haplotypes of the *FOXE1* promoter cause a decreased *FOXE1* expression, the latter being associated with decreased thyroid cell migration. Decreased *FOXE1* expression increased the likelihood of arrested thyroid migration and could explain the ectopic thyroid observed in patients with CHTD.

### **Acknowledgements**

We thank the patients and their parents for their cooperation. We thank Dr. C. Deal (CHU Sainte-Justine, University of Montreal) for her continuous support during this project. This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-130390 to J.D.) and by a collaborative grant from the European Society for Pediatric Endocrinology (ESPE-RU 2011-2013 to J.D., M.P. and G.V.V.); Research in pediatric thyroid diseases at Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Sainte-Justine is supported by the Girafonds / Fondation du CHU Sainte-Justine (to J.D. and G.V.V.).

## References

1. Deladoey J, Belanger N, Van Vliet G: **Random variability in congenital hypothyroidism from thyroid dysgenesis over 16 years in Quebec.** *J Clin Endocrinol Metab* 2007, **92**(8):3158-3161.
2. Dimitropoulos A, Molinari L, Etter K, Torresani T, Lang-Muritano M, Jenni OG, Largo RH, Latal B: **Children with congenital hypothyroidism: long-term intellectual outcome after early high-dose treatment.** *Pediatric research* 2009, **65**(2):242-248.
3. Castanet M, Lyonnet S, Bonaiti-Pellie C, Polak M, Czernichow P, Leger J: **Familial forms of thyroid dysgenesis among infants with congenital hypothyroidism.** *N Engl J Med* 2000, **343**(6):441-442.
4. Perry R, Heinrichs C, Bourdoux P, Khoury K, Szots F, Dussault JH, Vassart G, Van Vliet G: **Discordance of monozygotic twins for thyroid dysgenesis: implications for screening and for molecular pathophysiology.** *J Clin Endocrinol Metab* 2002, **87**(9):4072-4077.
5. Stoppa-Vaucher S, Van Vliet G, Deladoey J: **Variation by ethnicity in the prevalence of congenital hypothyroidism due to thyroid dysgenesis.** *Thyroid* 2011, **21**(1):13-18.
6. Narumi S, Muroya K, Asakura Y, Adachi M, Hasegawa T: **Transcription factor mutations and congenital hypothyroidism: systematic genetic screening of a population-based cohort of Japanese patients.** *J Clin Endocrinol Metab* 2010, **95**(4):1981-1985.
7. Dentice M, Cordeddu V, Rosica A, Ferrara AM, Santarpia L, Salvatore D, Chiovato L, Perri A, Moschini L, Fazzini C *et al*: **Missense mutation in the transcription factor NKX2-5: a novel molecular event in the pathogenesis of thyroid dysgenesis.** *J Clin Endocrinol Metab* 2006, **91**(4):1428-1433.
8. Deladoey J, Vassart G, Van Vliet G: **Possible non-Mendelian mechanisms of thyroid dysgenesis.** *Endocrine development* 2007, **10**:29-42.

9. Abu-Khudir R, Paquette J, Lefort A, Libert F, Chanoine JP, Vassart G, Deladoey J: **Transcriptome, methylome and genomic variations analysis of ectopic thyroid glands.** *PLoS one* 2010, **5**(10):e13420.
10. Dathan N, Parlato R, Rosica A, De Felice M, Di Lauro R: **Distribution of the *tcf2/foxe1* gene product is consistent with an important role in the development of foregut endoderm, palate, and hair.** *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 2002, **224**(4):450-456.
11. De Felice M, Ovitt C, Biffali E, Rodriguez-Mallon A, Arra C, Anastassiadis K, Macchia PE, Mattei MG, Mariano A, Scholer H *et al*: **A mouse model for hereditary thyroid dysgenesis and cleft palate.** *Nat Genet* 1998, **19**(4):395-398.
12. Bamforth JS, Hughes IA, Lazarus JH, Weaver CM, Harper PS: **Congenital hypothyroidism, spiky hair, and cleft palate.** *Journal of medical genetics* 1989, **26**(1):49-51.
13. Clifton-Bligh RJ, Wentworth JM, Heinz P, Crisp MS, John R, Lazarus JH, Ludgate M, Chatterjee VK: **Mutation of the gene encoding human TTF-2 associated with thyroid agenesis, cleft palate and choanal atresia.** *Nat Genet* 1998, **19**(4):399-401.
14. Castanet M, Park SM, Smith A, Bost M, Leger J, Lyonnet S, Pelet A, Czernichow P, Chatterjee K, Polak M: **A novel loss-of-function mutation in TTF-2 is associated with congenital hypothyroidism, thyroid agenesis and cleft palate.** *Human molecular genetics* 2002, **11**(17):2051-2059.
15. Abu-Khudir R, Magne F, Chanoine JP, Deal C, Van Vliet G, Deladoey J: **Role for tissue-dependent methylation differences in the expression of FOXE1 in nontumoral thyroid glands.** *J Clin Endocrinol Metab* 2014, **99**(6):E1120-1129.
16. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ: **Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps.** *Bioinformatics* 2005, **21**(2):263-265.

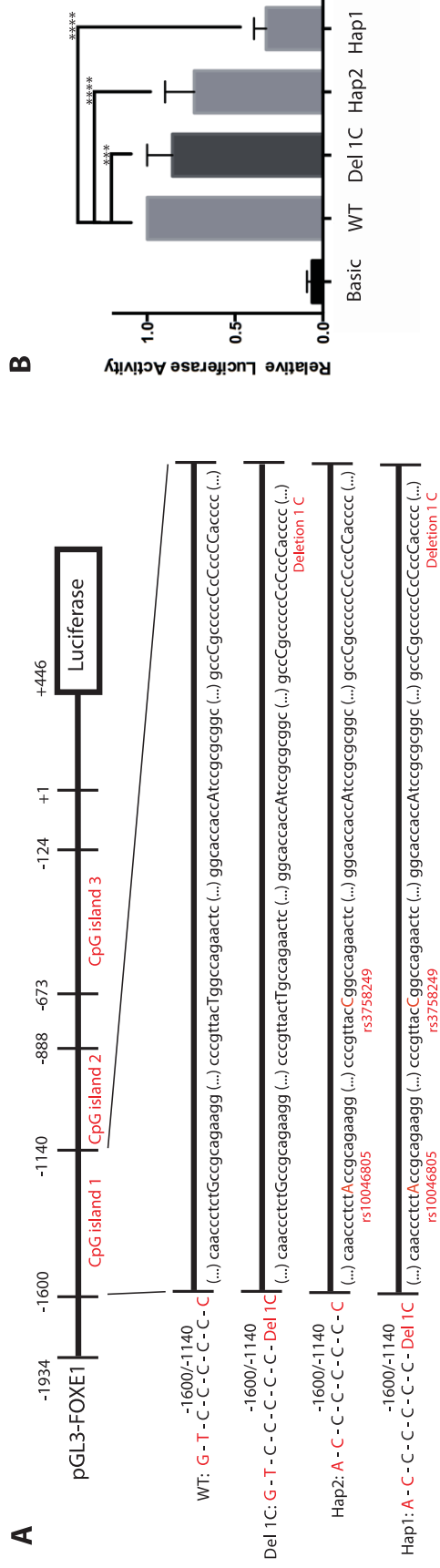
17. Parlato R, Rosica A, Rodriguez-Mallon A, Affuso A, Postiglione MP, Arra C, Mansouri A, Kimura S, Di Lauro R, De Felice M: **An integrated regulatory network controlling survival and migration in thyroid organogenesis.** *Developmental biology* 2004, **276**(2):464-475.
18. Carre A, Castanet M, Sura-Trueba S, Szinnai G, Van Vliet G, Trochet D, Amiel J, Leger J, Czernichow P, Scotet V *et al*: **Polymorphic length of FOXE1 alanine stretch: evidence for genetic susceptibility to thyroid dysgenesis.** *Human genetics* 2007, **122**(5):467-476.
19. Tomaz RA, Sousa I, Silva JG, Santos C, Teixeira MR, Leite V, Cavaco BM: **FOXE1 polymorphisms are associated with familial and sporadic nonmedullary thyroid cancer susceptibility.** *Clinical endocrinology* 2012, **77**(6):926-933.
20. Bullock M, Duncan EL, O'Neill C, Tacon L, Sywak M, Sidhu S, Delbridge L, Learoyd D, Robinson BG, Ludgate M *et al*: **Association of FOXE1 polyalanine repeat region with papillary thyroid cancer.** *J Clin Endocrinol Metab* 2012, **97**(9):E1814-1819.
21. Wildi-Runge S, Stoppa-Vaucher S, Lambert R, Turpin S, Van Vliet G, Deladoey J: **A high prevalence of dual thyroid ectopy in congenital hypothyroidism: evidence for insufficient signaling gradients during embryonic thyroid migration or for the polyclonal nature of the thyroid gland?** *J Clin Endocrinol Metab* 2012, **97**(6):E978-981.
22. Tishkoff SA, Williams SM: **Genetic analysis of African populations: human evolution and complex disease.** *Nat Rev Genet* 2002, **3**(8):611-621.
23. Lohmueller KE, Indap AR, Schmidt S, Boyko AR, Hernandez RD, Hubisz MJ, Sninsky JJ, White TJ, Sunyaev SR, Nielsen R *et al*: **Proportionally more deleterious genetic variation in European than in African populations.** *Nature* 2008, **451**(7181):994-997.
24. Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, Dormishian F, Domingo R, Jr., Ellis MC, Fullan A *et al*: **A novel MHC**

- class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis.** *Nat Genet* 1996, **13**(4):399-408.
25. Nielsen DM, Ehm MG, Weir BS: **Detecting marker-disease association by testing for Hardy-Weinberg disequilibrium at a marker locus.** *American journal of human genetics* 1998, **63**(5):1531-1540.
26. Vaclavikova E, Dvorakova S, Skaba R, Pos L, Sykorova V, Halkova T, Vcelak J, Bendlova B: **RET variants and haplotype analysis in a cohort of Czech patients with Hirschsprung disease.** *PloS one* 2014, **9**(6):e98957.
27. Amiel J, Sproat-Emison E, Garcia-Barcelo M, Lantieri F, Burzynski G, Borrego S, Pelet A, Arnold S, Miao X, Griseri P *et al*: **Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: a review.** *Journal of medical genetics* 2008, **45**(1):1-14.
28. Griseri P, Lantieri F, Puppo F, Bachetti T, Di Duca M, Ravazzolo R, Ceccherini I: **A common variant located in the 3'UTR of the RET gene is associated with protection from Hirschsprung disease.** *Human mutation* 2007, **28**(2):168-176.
29. Pan ZW, Luo CF, Liu ZJ, Li JC: **RET 3'UTR polymorphisms and its protective role in Hirschsprung disease in southeastern Chinese.** *Journal of pediatric surgery* 2012, **47**(9):1699-1705.
30. Griseri P, Sancandi M, Patrone G, Bocciardi R, Hofstra R, Ravazzolo R, Devoto M, Romeo G, Ceccherini I: **A single-nucleotide polymorphic variant of the RET proto-oncogene is underrepresented in sporadic Hirschsprung disease.** *European journal of human genetics : EJHG* 2000, **8**(9):721-724.
31. Fernandez LP, Lopez-Marquez A, Martinez AM, Gomez-Lopez G, Santisteban P: **New insights into FoxE1 functions: identification of direct FoxE1 targets in thyroid cells.** *PLoS One* 2013, **8**(5):e62849.
32. Zhou Y, Ming J, Xu Y, Zhang Y, Jiang J: **ERbeta1 inhibits the migration and invasion of breast cancer cells through upregulation of E-cadherin**

- in a Id1-dependent manner.** *Biochem Biophys Res Commun* 2015, **457**(2):141-147.
33. Berx G, van Roy F: **Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer.** *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009, **1**(6):a003129.
34. Baquero P, Sanchez-Hernandez I, Jimenez-Mora E, Orgaz JL, Jimenez B, Chiloeches A: **(V600E)BRAF promotes invasiveness of thyroid cancer cells by decreasing E-cadherin expression through a Snail-dependent mechanism.** *Cancer Lett* 2013, **335**(1):232-241.
35. Blake WJ, Balazsi G, Kohanski MA, Isaacs FJ, Murphy KF, Kuang Y, Cantor CR, Walt DR, Collins JJ: **Phenotypic consequences of promoter-mediated transcriptional noise.** *Mol Cell* 2006, **24**(6):853-865.
36. Maamar H, Raj A, Dubnau D: **Noise in gene expression determines cell fate in *Bacillus subtilis*.** *Science* 2007, **317**(5837):526-529.
37. Cook DL, Gerber AN, Tapscott SJ: **Modeling stochastic gene expression: implications for haploinsufficiency.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**(26):15641-15646.
38. Jones DL, Brewster RC, Phillips R: **Promoter architecture dictates cell-to-cell variability in gene expression.** *Science* 2014, **346**(6216):1533-1536.
39. Abranches E, Guedes AM, Moravec M, Maamar H, Svoboda P, Raj A, Henrique D: **Stochastic NANOG fluctuations allow mouse embryonic stem cells to explore pluripotency.** *Development* 2014, **141**(14):2770-2779.
40. Turing AM: **The chemical basis of morphogenesis. 1953.** *Bull Math Biol* 1990, **52**(1-2):153-197; discussion 119-152.
41. Tompkins N, Li N, Girabawe C, Heymann M, Ermentrout GB, Epstein IR, Fraden S: **Testing Turing's theory of morphogenesis in chemical cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014, **111**(12):4397-4402.

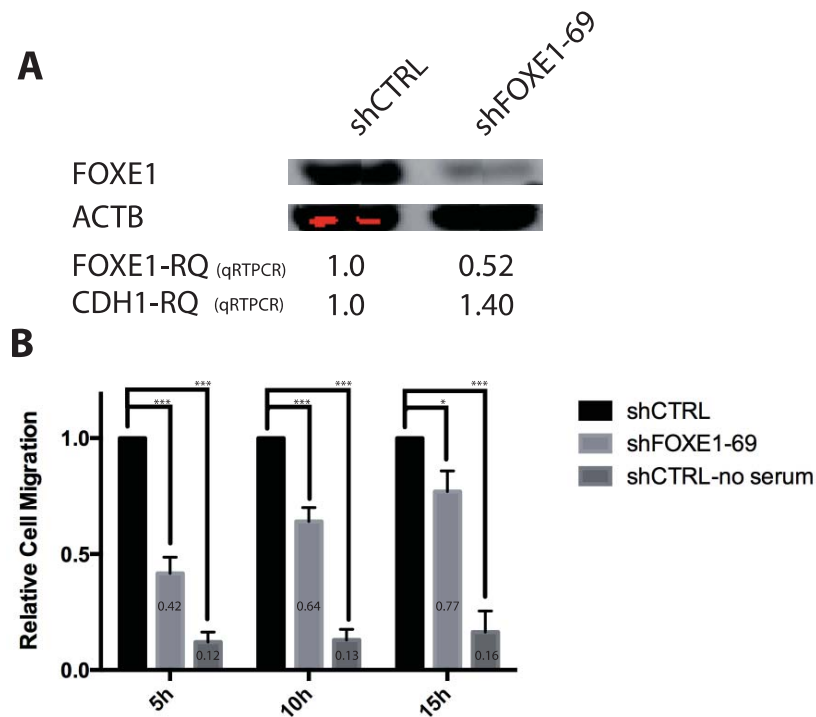
## Figure legends

**Figure 1: Gene reporter assays:** (A) the different constructs used for the luciferase assays. (B) Luciferase reporter assay showing the effect of the del1C variant, the haplotypes Hap1 (A-C-C-C-C-C-del1C) and Hap2 (A-C-C-C-C-C-C-C). A significant reduction of the luciferase activity is observed for Hap1 (68%; 95%CI 64-71%;  $P < 0.0001$ ) and Hap2 (27%; 95%CI 18-35%;  $P < 0.0001$ ) when compared to the wild-type *FOXE1* promoter. Error bars denote SD from biological triplicates performed in six independent experiments. P-values were determined with a bilateral t test. \*\*\*\* $P$ -value  $< 0.0001$ ; \*\*\* $P$ -value  $< 0.001$ .

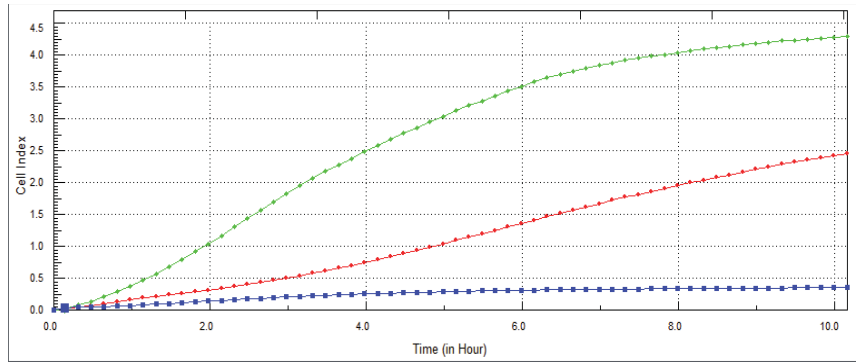




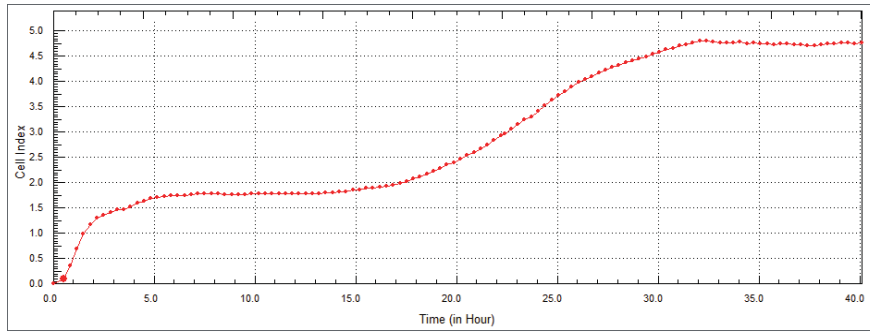
**Figure 2: FOXE1 down-expression and real-time cell migration assays. (A)** Down-expression of FOXE1 using shRNA assessed by semi-quantitative RT-PCR (with ACTB as control) and confirmed by quantitative RT-PCR (RQ, relative quantity as proxy for fold expression compared to the normalized expression of the two housekeeping genes GAPDH and HPRT). **(B)** Real-time measurement of cell migration: at 5h, 10h and 15h, we observed a significant reduction of thyroid cell migration ( $***p<0.001$ ,  $*p<0.05$ , three independent experiments, normalized to shCTRL). **(C)** Real-time measurement of cell migration, example of one assay with Nthy-ori cells: the *green* line represents the shCTRL cells, the *red* line the shFOXE1-69 cells and the blue line represents the shCTRL cells incubated without chemoattractants in the lower chambers. **(D)** Cell proliferation assay of Nthy-ori cells: after 15h, a major increase of cell proliferation is a potential confounder to assess cell migration and therefore only values between 1 and 15h are taken into account.



C



D



**Table Legend**

**Table 1:** Summary of the polymorphisms analysed in the *FOXE1* promoter region

SNP	Chromosome	Position	Allele Reference	Allele Altered
rs10046805	9	97851674	G	A
rs3758249	9	97851858	T	C
new SNP at pos. 97851945	9	97851945	C	G
rs184690826	9	97851947	C	A
rs4743137	9	97851950	C	A
new (deletion 1C)	9	97851951	C	-

**Table 2: Hardy-Weinberg p-value in Caucasians cases**

#	Name	Position	ObsHET	PredHET	HWpval	%Geno	MAF	Alleles
1	rs10046805	97851674	0.104	0.489	1,78E-21	100.0	0.425	A:G
2	rs3758249	97851858	0.104	0.489	1,78E-21	100.0	0.425	C:T
3	rs10983975	97851906	0.104	0.254	1,32E-08	100.0	0.149	C:A
4	rs76376939	97851938	0.037	0.193	9,16E-13	100.0	0.108	C:A
5	new afro	97851945	0.0	0.0	1,00E+00	100.0	0.0	C:C
6	rs184690826	97851947	0.0	0.21	1,47E-21	100.0	0.119	C:A
7	rs4743137	97851950	0.0	0.386	1,07E-33	100.0	0.261	C:A
8	new_del1C	97851951	0.396	0.317	3,10E-03	100.0	0.198	C:Del1C

**Table 3: Hardy-Weinberg p-value in Caucasian unaffected samples**

#	Name	Position	ObsHET	PredHET	HWpval	%Geno	MAF	Alleles
1	rs10046805	97851674	0.151	0.49	1,20E-14	100.0	0.429	G:A
2	rs3758249	97851858	0.151	0.49	1,20E-14	100.0	0.429	T:C
3	rs10983975	97851906	0.151	0.369	2,25E-09	100.0	0.244	C:A
4	rs76376939	97851938	0.034	0.111	2,70E-06	100.0	0.059	C:A
5	new_afro	97851945	0.0	0.0	1,00E+00	100.0	0.0	C:C
6	rs184690826	97851947	0.0080	0.118	1,16E-10	100.0	0.063	C:A
7	rs4743137	97851950	0.0	0.422	5,91E-32	100.0	0.303	C:A
8	new_del1C	97851951	0.345	0.285	3,06E-02	100.0	0.172	C:Del1C

**Table 4: Hardy-Weinberg p-value in Afro-American samples**

#	Name	Position	ObsHET	PredHET	HWpval	%Geno	MAF	Alleles
1	rs10046805	97851674	0.245	0.38	2,53E-02	100.0	0.255	G:A
2	rs3758249	97851858	0.17	0.318	4,30E-03	100.0	0.198	T:C
3	rs10983975	97851906	0.17	0.318	4,30E-03	100.0	0.198	C:A
4	rs76376939	97851938	0.0	0.0	1,00E+00	100.0	0.0	C:C
5	new_afro	97851945	0.038	0.171	8,67E-05	100.0	0.094	C:G
6	rs184690826	97851947	0.038	0.422	2,67E-11	100.0	0.302	C:A
7	rs4743137	97851950	0.0	0.478	9,89E-16	100.0	0.396	A:C
8	new_del1C	97851951	0.358	0.294	2,79E-01	100.0	0.179	C:Del1C

**Table 5: Combination of SNPs defining each haplotypes. For each haplotype, the SNPs implicated are coloured.**

Haplotype	rs10046805	rs3758249	pos. 97851945	rs184690826	rs4743137	pos. 97851951
Hap1	A	C	C	C	C	-
Hap2	A	C	C	C	C	C
Hap3	G	T	C	A	A	C
Hap4	G	T	G	C	A	C

**Table 6: Haplotypes in cases vs unaffected Caucasians samples**

Block Haplotypes	Freq.	Case, Control Ratio Counts	Case,Control Freq.	Chi Square	P Value
ACCCCCCC	0.329	91.6 : 176.4, 74.8 : 163.2	0.342, 0.314	0.434	5,10E-01
GTCCCCAC	0.192	40.0 : 228.0, 57.0 : 181.0	0.149, 0.239	6.625	1,01E-02
GTACCCCC	0.102	20.4 : 247.6, 31.2 : 206.8	0.076, 0.131	4.17	4,11E-02
ACCCCCDeIC	0.094	34.5 : 233.5, 13.2 : 224.8	0.129, 0.056	7.874	5,00E-03
GTACCCDeIC	0.090	18.5 : 249.5, 26.8 : 211.2	0.069, 0.113	2.902	8,85E-02
GTCCCAAC	0.089	30.0 : 238.0, 15.0 : 223.0	0.112, 0.063	3.722	5,37E-02
ACCACCCC	0.083	27.9 : 240.1, 14.0 : 224.0	0.104, 0.059	3.433	6,39E-02
GTCCCCCC	0.014	2.0 : 266.0, 5.0 : 233.0	0.007, 0.021	1.695	1,93E-01

**Table 7: Haplotypes in Afro-American controls vs unaffected Caucasians samples**

<b>Block Haplotypes</b>	<b>Freq.</b>	<b>Case, Control Ratio Counts</b>	<b>Case,Control Freq.</b>	<b>Chi Square</b>	<b>P Value</b>
ACCCCCC	0.269	16.6 : 89.4, 75.9 : 162.1	0.156, 0.319	9.88	1,70E-03
GTCCCCAC	0.230	22.0 : 84.0, 57.0 : 181.0	0.208, 0.239	0.423	5,15E-01
GTCCCAAC	0.137	32.0 : 74.0, 15.0 : 223.0	0.302, 0.063	35.472	2,59E-09
GTACCCCDelIC	0.106	8.6 : 97.4, 27.9 : 210.1	0.081, 0.117	1.032	3,10E-01
GTACCCCC	0.106	6.4 : 99.6, 30.1 : 207.9	0.061, 0.126	3.333	6,79E-02
ACCCCCCDelIC	0.051	5.4 : 100.6, 12.1 : 225.9	0.051, 0.051	0.0	9,83E-01
ACCACCCC	0.041	0.0 : 106.0, 14.0 : 224.0	0.000, 0.059	6.5	1,08E-02
GTCCGCAC	0.029	10.0 : 96.0, 0.0 : 238.0	0.094, 0.000	23.125	1,52E-06
GTCCCCC	0.015	0.0 : 106.0, 5.0 : 233.0	0.000, 0.021	2.26	1,33E-01
ATACCCCDelIC	0.015	5.0 : 101.0, 0.0 : 238.0	0.047, 0.000	11.392	7,00E-04

### 2.3. Discussion et perspectives

Il est connu que *FOXE1* joue un rôle primordial dans l'embryologie de la glande thyroïde. Spécifiquement, les études chez la souris ont montré que ce gène contrôle la migration de la thyroïde [59]. En contrepartie, aucune mutation de ce gène n'a été associée à une ectopie chez l'humain. Cependant une variation de longueur du « stretch » de polyalanine est associée à l'HCDT [86]. Les séquences de 14 alanines successives sont associées à un risque augmenté pour les HCDT au contraire de celles qui en comportent 16 (P-value = 0,0005, 95% IC).

Dans ce travail, nous avons découvert qu'un haplotype (Hap1 : A-C-C-C-C-C-C-del1C) est significativement associé à l'HCDT chez les caucasiens. Cet haplotype diminue l'expression de *FOXE1* et, indirectement, diminue la migration des cellules thyroïdiennes. Des corrélations entre cet haplotype risque et le « polyalanine stretch » de *FOXE1* sont en cours d'évaluation.

Par ailleurs, deux haplotypes (Hap3 et Hap4) sont statistiquement fortement associés aux contrôles d'origine africaine, avec l'haplotype Hap4 retrouvé uniquement chez les Afro-Américains, laissant supposer qu'ils pourraient jouer un rôle protecteur chez cette population connue pour être bien moins touchée pour les HCDT que les Caucasiens. Les essais luciférases sont actuellement en réalisation.

De ce fait, ces haplotypes (de risque ou protecteur) sont trouvés dans un grand nombre de cas, et pourraient être le « premier hit » soulevé par nos hypothèses de travail. Ces haplotypes prédisposeraient les personnes porteuses à

l'HCDT. L'utilisation du séquençage de l'exome à haut débit permettra de découvrir d'autres « hits » chez les individus atteints, aussi bien dans des gènes « connus » (impliqués dans l'embryologie de la thyroïde par exemple) que dans de nouveaux gènes.

En résumé, nous avons découvert, chez plus de 25% des cas d'HCDT (ectopies essentiellement), des haplotypes à risque dans le promoteur de *FOXE1*, ces haplotypes ayant tous un impact sur l'expression de *FOXE1*. De plus, des données préliminaires obtenues par immunofluorescence ont pu montrer que ce « knockdown » de *FOXE1* affectait également la morphologie des cellules thyroïdiennes (Figure 11). En effet, nous avons pu constater que FOXE1 est correctement localisé au noyau (shCTRL et shFOXE1) mais que la forme des cellules a changé (cytosquelette et noyau plus arrondi) dans les cellules shFOXE1.

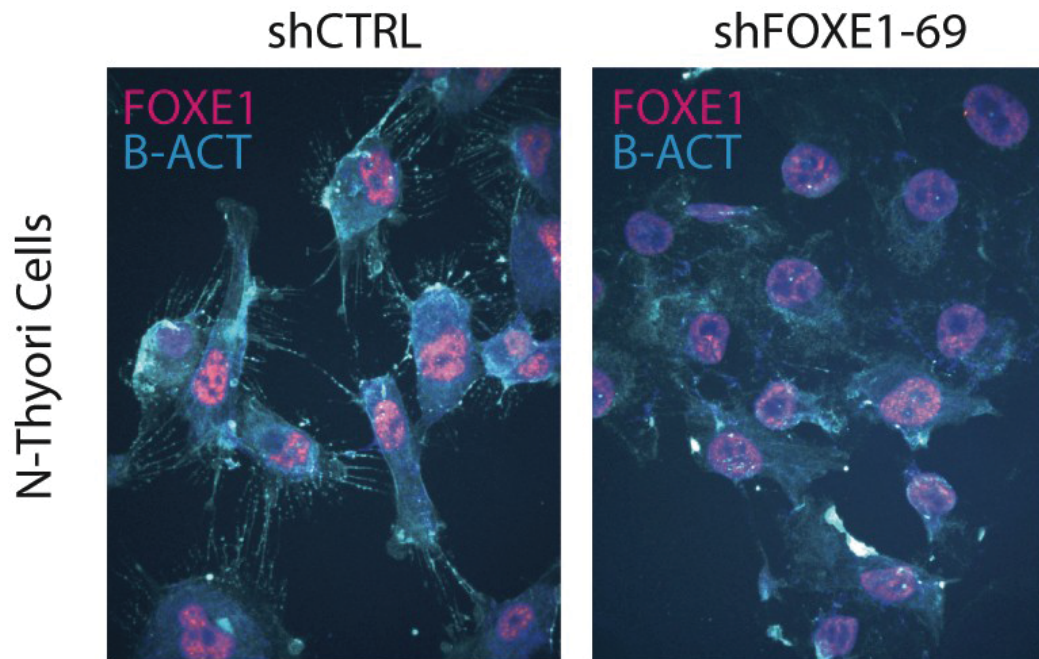


Figure 11 : Effets du "knockdown" de FOXE1 sur le noyau et le cytosquelette des cellules Nthy-ori



Cette région du promoteur définit donc une zone de contrôle de l'expression de *FOXE1* ayant de surcroît une association directe avec la migration des cellules thyroïdiennes chez l'humain.

### **3. Les ectopies thyroïdiennes : des tissus soumis à une expression monoallélique ?**

#### **3.1. Situation du sujet**

Chez les organismes diploïdes, chaque nouvel individu reçoit une copie de chaque gène de ses deux parents. Il est attendu que l'expression de ces gènes est similaire pour chaque copie, ce qui est défini comme une expression biallélique. Cependant dans certains cas, il n'y a qu'une seule copie qui est exprimée, on parle alors d'expression monoallélique. Il existe trois grandes classes de gènes exprimés de façon monoallélique: 1) des gènes soumis à l'empreinte (origine parentale: seul l'allèle paternel ou maternel est exprimé); 2) des gènes sur le chromosome X, suite à l'inactivation aléatoire d'un allèle chez les sujets 46XX; 3) des gènes autosomaux soumis à une expression monoallélique aléatoire et différente suivant le tissu [155]. L'expression d'un seul allèle peut engendrer certaines pathologies, comme par exemple les syndromes endocriniens de Prader-Willi (perte de l'expression paternelle des gènes de la région 15q11-13) et Angelman (perte de l'expression maternelle des gènes de la région 15q11-13) qui sont des loci soumis à l'empreinte [156].

Deux articles ont rapporté des cas de dyshormonogénèse avec expression monoallélique du gène *TPO* dans la thyroïde [157, 158]. De plus, comme mentionné précédemment, Hermans *et al.* ont émis l'hypothèse qu'une expression monoallélique de *PAX8* dans la thyroïde pourrait expliquer une athyréose [105]. Afin de savoir ce qu'il en est dans le tissu thyroïdien (ectopique

ou orthotopique), nous avons séquencé l'ADN (séquençage de l'exome) et de l'ARN (séquençage RNA haut-débit) de 2 thyroïdes ectopiques ainsi que 5 contrôles (4 thyroïdes orthotopiques saines et une lignée de cellules humaines Nthy-Ori [159]).

### 3.2. Article 3

Soumis au journal : Thyroid (Révisions mineures soumises le 12 Mars 2016)

Contributions :

J'ai participé, avec Dr Deladoëy, à l'élaboration de ce projet. J'ai analysé les données génétiques comparatives des séquençages exome et RNA haut-débit des différents échantillons. De plus, j'ai validé les variants par séquençage Sanger. Bing Ge a réalisé toute la partie bio-informatique pour traiter les données du séquençage RNA haut-débit et les comparer à celles des séquençages d'exomes correspondants. Dr Tomi Pastinen a apporté son expertise pour le séquençage de l'ARN et l'interprétation des données. Enfin, j'ai rédigé une première version de cet article, tandis que les Drs Guy Van Vliet, Mark E. Samuels, Tomi Pastinen et Johnny Deladoëy ont également participé à la rédaction et à la révision des versions ultérieures.

**Demonstration of autosomal monoallelic expression in thyroid tissue assessed  
by whole-exome and bulk RNA sequencing**

Fabien Magne<sup>1,2\*</sup>, Bing Ge<sup>3\*</sup>, Stéphanie Larrivée-Vanier<sup>1</sup>, Guy Van Vliet<sup>1</sup>,  
Mark E. Samuels<sup>1</sup>, Tomi Pastinen<sup>3</sup>, Johnny Deladoëy<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup>Endocrinology Service and Research Center, Sainte-Justine University Hospital Center,  
Department of Pediatrics, University of Montreal, Montreal H3T 1C5, Canada

<sup>2</sup>Department of Biomedical Sciences, University of Montreal, Montreal H3C 3J7, Canada

<sup>3</sup>Department of Human Genetics; McGill University; Montréal, QC Canada

<sup>4</sup>Department of Biochemistry, University of Montreal, Montreal H3C 3J7, Canada

\* These authors contributed equally to this work

**Abbreviated Title:**

**Key terms:** ectopic thyroid gland, congenital hypothyroidism, exome sequencing,  
RNA sequencing, monoallelic expression.

**Address all correspondence and requests for reprints to:**

Johnny Deladoëy, M.D. Ph.D.

Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine

3175 Côte Sainte-Catherine, Montréal QC, H3T 1C5, Canada

**Grant support:** This work was supported by a grant from the Canadian Institutes  
of Health Research (MOP-130390 to J.D.); Research in pediatric thyroid diseases  
at Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Sainte-Justine is supported by the  
Girafonds / Fondation du CHU Sainte-Justine (to J.D. and G.V.V.).

**Disclosure summary:** All authors have nothing to disclose.

**Abstract:**

Context: Congenital hypothyroidism due to thyroid dysgenesis (CHTD) is a disorder with a prevalence of one in 4,000 live births, the cause of which remains unknown. The most common diagnostic category is thyroid ectopy, which occurs in up to 80% of CHTD cases. CHTD is predominantly not inherited and has a high discordance rate (>92%) between monozygotic (MZ) twins. The sporadic nature of CHTD might be explained by somatic events such as autosomal monoallelic expression (AME), given that genes expressed in a monoallelic way are more vulnerable to otherwise benign heterozygous genetic or epigenetic mutations.

Objective: To search for complete (90%) AME in normal and dysgenetic thyroid tissues.

Methods: Aggregated analysis of whole-exome and bulk RNA sequencing performed on two ectopic thyroids, four normal thyroids and the human thyroid cell line Nthy-ori.

Results: A median of 5,062 (range 2,081-5,270) genes per sample showed sufficient numbers of heterozygous SNPs to be informative. The median monoallelic expression represented 22 (range 16-32) of the informative genes for each thyroid sample. Examples of genes displaying AME are *FCGBP*, *ZNF331*, *USP10*, *BCLAF1* and some *HLA* genes; these genes are involved in epithelial-mesenchymal transition, cell migration, cancer and immunity.

Conclusions: AME may account for the high discordance rate observed between MZ twins and for the sporadic nature of CHTD. Our findings have also implications for other pathologies including cancers and autoimmune disorders of the thyroid.

## Introduction

Congenital primary hypothyroidism (CH) is a relatively rare disorder estimated to occur in around 1:2,500 live births. This condition is classified principally in two categories, first, dysgenesis defined as a defect during embryologic development, and second, dyshormonogenesis, a functional disorder within an anatomically thyroid. Permanent congenital hypothyroidism due to thyroid dysgenesis (CHTD) occurs with an incidence of 1:4,000 live births, usually with an ectopic thyroid gland (75%) or athyreosis (15%) (1). The ectopic thyroid results from an arrest in the migration of the precursor cells to their final location at the base of neck, while athyreosis (total absence of thyroid) results from a lack of differentiation or disappearance of the thyroid during embryogenesis. At most, 3% of the cases of CHTD are explained by a mutation in transcription factors implicated in the embryology of the thyroid gland (*NKX2.5*, *NKX2.1*, *PAX8*, *FOXE1* and *GLIS3*) (2). Indeed, CHTD is predominantly non-syndromic and sporadic (i.e. 98% of cases are non-familial) (3), has a female and ethnic predominance (4) and has a discordance rate of 92% between monozygotic (MZ) twins (5), which implies that somatic epigenetic and/or genetic mutational events might account for this discordance. However, we did not observe significant somatic methylation profile differences between ectopic and orthotopic thyroids (6), nor did we find somatic mutations by exome sequencing of lymphocytic DNA from MZ twins discordant for CHTD (7). This said, other epigenetic causes might account for differences in the phenotypic expression of the disease. Widespread autosomal monoallelic expression with initial non-



predetermined (“random”) choice between maternal and paternal alleles defines an unusual class of disease-causing genes (8, 9). Recently, biased allele-specific expression has been observed in at least 3% of the genes expressed in thyroid tissue (10), but the exact proportion of genes subject to a complete monoallelic expression in human thyroid remains unclear. Genes expressed in a monoallelic way show decreased expression (11) and may lead otherwise benign heterozygous mutations to cause loss of function in a proportion of cells (12). Consequently, differences in autosomal somatic gene expression might account for thyroid diseases including dysgenesis (13), cancer and autoimmune disorders. In this context, we assessed whether thyroid tissue (ectopic and orthotopic) displays genes subject to autosomal monoallelic expression (AME; Figure 1).

## **Patients & Methods**

### *Patients and tissue samples*

We obtained flash-frozen samples of ectopic thyroid tissue removed from two girls (aged 10 and 8 yr) due to local symptoms (dysphagia); these two girls were treated with L-T4 and had normal thyroid hormones levels before surgery (Supplemental Table). For controls, we used healthy thyroid tissue from four children (3 girls aged 8, 12 and 16 yr, and 1 boys aged 5 yr who were either prophylactically operated (2 RET-mutated individuals of known MEN2 families) or operated for papillary thyroid cancer (Supplemental Table). We also examined the human Nthy-ori cell line (14). Finally, to assess for somatic mutation in ectopic thyroids, whole exome sequencing of leucocyte DNA of cases #1 and #2

was performed and compared with matched data from thyroid samples of these two cases. This study was approved by our institutional research ethics committee and parents gave informed consent.

#### *DNA and RNA extraction from tissue samples*

DNA was extracted using a pureLink genomic DNA Mini kit (Life Technologies, Burlington, Canada). RNA was extracted using a miniRNeasy kit (Qiagen, Toronto, Canada).

#### *Whole-Exome and bulk RNA Sequencing*

Sequencing was performed at the genomic platform of the McGill University and Genome Quebec Innovation Centre. Whole exome sequencing (WES) was performed using the Agilent 50Mb SureSelect exon capture library, followed by 2x100nt paired-end sequencing on the Illumina HiSeq 2000 instrument as described previously (7, 15). We performed paired-end and strand-specific RNA-sequencing in five controls and two case samples (see sample characterisation in Supplemental Table).

#### *Analysis of bulk RNA sequencing*

Analyses were carried out with aligned RNA-sequencing data, where alignment was based on the established TopHat 2 pipeline. To assess allelic expression high quality variant calls of exome sequencing data (generated separately), we used the variant call files for local genotype imputation/phasing (in

RefSeq genes) using IMPUTE2 software with 1000 Genomes reference haplotypes (Phase I, vs3) in two main steps: pre-phasing and imputation. We filter out variants with an  $r^2$  value  $< 0.8$  and phase genotypes using SHAPEIT2 with 1000 Genome reference haplotypes. In the case of singleton SNPs, we attempted to phase based on common heterozygous sites in paired end reads. Allele-specific analyses for transcriptome utilized careful realignment process to phased genomes coupled with combined tests for allelic abundance of each transcript as recently described (van de Geijn, BioRxiv, 2014; <http://dx.doi.org/10.1101/011221>). To assess the thyroid sampling quality, cluster dendrogram were established by unsupervised hierarchical clustering of RNA sequencing data using the software Clustal W (<http://www.clustal.org/clustal2/>) (Supplemental Figure).

#### *Combined analysis of WES and bulk RNA sequencing*

To define monoallelic expression, we identified variants heterozygous in WES and nominally or seemingly homozygous in RNA sequencing data. To generate a list of testable candidate variants, we reduced the number of genes using a hierarchization pipeline for each sample (Figure 2). First, to select genotypes from the exome data, we used the software SAMtools (16) and the variants were filtered through the following criteria: artefacts outside the exome were filtered out, number of reads in exome data (10 or more), genotype quality score (QUAL  $< 50$ ). Only good quality variant calls (genotypes) were used in the latter analysis. Second, to assess which genes showed complete AME, we filtered RNA-sequencing data of the informative genes through the following criteria:

percentage of reads in RNA (either <10% or >90% of the altered or reference reads, respectively), inclusion of genes with two or more variants (to eliminate false positives) and exclusion of imprinted genes (as listed in <http://www.geneimprint.org>). Candidate variants were re-tested by PCR-based Sanger sequencing of copy and genomic DNA. PCR amplicon primers were designed with Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>).

#### *Comparison of WES data from matched DNA leukocytes and ectopic thyroids*

For whole exome sequencing, we typically obtained 100-120 fold median coverage of targeted exonic regions using the Agilent SureSelect plus Illumina HiSeq technologies. Following read alignment, variant calling and gene annotation by our bioinformatics analysis pipeline, each exome typically yielded more than 100,000 candidate variants, of which approximately 25,000 are either in or immediately adjacent to coding exons. To assess for somatic mutation in ectopic thyroids, we verified the genotype of all variants called in the RNA sequencing data (after filtrations) by comparing the number (and percentage) of reads between thyroids and leukocytes.

## **Results**

#### *Gene expression clustering of thyroid tissues*

To assess the quality of our thyroid tissue samples with respect to contamination with other tissue types, we performed an unsupervised hierarchical

clustering of our RNA sequencing data. As compared to other human cells (fibroblasts, monocytes, B- and T-lymphocytes), the gene expression profiles derived from all thyroid tissues clustered together and were distinct from other human cells in a cluster dendrogram (Supplemental Figure, left side branch). These results indicated that our thyroid RNA samples were clean.

*Exome sequencing, RNA sequencing and autosomal monoallelic expression (AME) in thyroid tissue*

To determine whether thyroid tissue shows AME, we performed RNA-sequencing combined with exome sequencing on seven different thyroid samples: 9,078 genes with good quality exonic SNPs were covered by whole-exome sequencing. To exclude non-informative variants (homozygous variants) and false positive variants we used a hierarchization pipeline for each sample (Figure 2). First, a median of 5,062 (range of 2,081 to 5,270) genes per sample showed sufficient numbers of heterozygous SNPs to be informative. Then, the median complete AME represented 22 (range of 16 to 32) of the informative genes for each thyroid sample and AME represented a small fraction of the informative genes (0.46%; range 0.31 to 0.96%). Numbers of specific (non-recurrent) genes in ectopic thyroids are comparable to that of control tissues. Next, validation with Sanger sequencing was performed on cDNA of each sample and confirmed AME for the following genes: *ZNF331*, *CTSF*, *ADRB2*, *USP10*, *BCLAF1* and *FCGBP* (Figure 3). Finally, thirty genes (e.g some HLA region genes) were recurrently (in two or more samples) subject to AME and seven of these genes are located on

chromosome 6 (Table). Only few genes belong to same pathways (assessed in KEGG pathway database; url: <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>): *MAP2K3* of the MAPK pathway showed AME in all samples; *DTX2* (AME in control 1) and *CTBP2* (AME in cases 1 and 2) belong to the Wnt and Notch pathways. Of note, given that only two ectopic thyroids are available for analysis, we did not perform any formal statistics to compare gene occurrence by ontology group and/or pathways.

#### *Absence of somatic mutations in the two ectopic thyroid samples*

To assess whether an early post-zygotic mutation was observed in ectopic thyroids, we sequenced and compared the exome of the matched leukocytes and the thyroid of cases 1 and 2 (leukocytes and thyroid compared for each case separately). Although these exome comparisons initially yielded a large number of candidate somatic variants, after bioinformatics quality filtering and Sanger-resequencing of some candidates, we observed no thyroid-specific mutations, particularly there were no tissue-specific variants in any of the genes currently known to be involved in thyroid development and/or associated with thyroid dysgenesis. As expected, all genes showing AME were found to be heterozygous in both leukocytes and thyroids from the same patient.

## **Discussion**

In humans, genes are generally biallelically expressed, with each parental homologous gene contributing to mRNA. However in some cases only one copy is

expressed, which defines monoallelic expression. There are three known general mechanisms causing monoallelic expression: 1) imprinting, in which imprinted genes are expressed preferentially or exclusively from either the paternal or maternal allele (sometimes with tissue specificity); 2) random but clonally inherited X-chromosome inactivation in female cells; and 3) non-predetermined (“random”) autosomal monoallelic expression (AME).

In fact, the first genes discovered to be subject to AME were those encoding immunoglobulins and T-cells receptors, by yet a different mechanism involving DNA rearrangement (17, 18). However this mechanism is specific to these gene families so far as is known. In 1994, AME was reported in olfactory receptors genes (a family of more than 1000 genes) which suggested that autosomal AME might affect additional autosomal genes (19). Eventually, in 2007, a genome-wide survey analyzing clonal human blood cell lines revealed a widespread AME across the autosomes (8). Over the last years, two forms of autosomal AME have been defined (20). On one hand, fixed AME implies that the allele-specific expression is conserved in daughter cells after division. Thus fixed AME is mitotically conserved and can be studied in cell lines and tissues (or subtissue sections). On the other hand, dynamic AME is observed only during a window of time, is not mitotically transmitted and can be studied only at the single-cell level. In the present study, we therefore have assessed fixed autosomal AME in thyroid tissues and in a thyroid cell line. Of note, given that (i) some class of genes seem to be more prone to AME (8, 12, 21) and (ii) we observed herein a recurrence of AME for a median of 15 genes per thyroid sample, AME probably

reflects a yet unknown tissue-specific genetic and epigenetic phenomenon (22) but is unlikely to be a completely ‘random’ event. The somatic interplay between genetic and epigenetic mechanisms that control establishment and maintenance of widespread AME remain to be discovered (9).

In thyroid tissue, monoallelic expression of *TPO* has been shown in cases of thyroid dysmorphogenesis (23, 24) and it has been hypothesized that *PAX8* monoallelic expression in the thyroid could explain a family case of congenital hypothyroidism due to athyreosis (25). Moreover, RNA sequencing analysis recently showed a widespread biased allele-specific expression (an attenuated form of AME) in thyroid tissue (10). This prompted us to search for autosomal genes displaying AME in thyroid tissues by using paired exome and RNA sequencing of seven different thyroid tissues.

We showed AME for a median of 22 genes per sample in ectopic and orthotopic thyroid glands as well as in the Nthy-ori cell line. These findings confirmed that thyroid tissues are subject to AME. The number of autosomal genes subject to AME per tissue was relatively modest. This can be explained by the design of our study and by some technical limitations. First, we selected only genes with an almost exclusive monoallelic expression: the expressed allele is the almost exclusively transcriptionally active (>90% of reads in RNA sequencing) while the other is transcriptionally silent; next, a significant expression level in the thyroid (a minimum of 10 reads) was required to be called a gene subject to AME (Figure 2). Therefore, our results may represent only the extreme end of a continuum, beginning with allele-biased expression (or allelic specific expression



(10)) and ending with high-confidence genes subject to complete monoallelic expression (20); given that, the median of 0.46% of genes subject to AME was consistent with the 0.7% of AME observed in neural progenitor cells (26). Second, the number of informative genes was relatively low but was expected because most of SNPs are present in non-coding regions of the genome, which are not covered by exome and bulk RNA sequencing. For example, our median number of 5,062 informative genes per sample was consistent with the genome-wide study of AME conducted in B-cells by Gimelbrant et al., which showed about 3900 informative genes per sample (8).

Congenital hypothyroidism due to thyroid dysgenesis (CHTD) is predominantly a sporadic (random) event and ectopic thyroid, the main form of CHTD, results from an arrest in the migration of the precursor cells. By exome sequencing, we previously showed that monozygotic twins discordant for thyroid dysgenesis do not differ in their blood DNA (7), making early post-zygotic somatic mutations a less likely cause of CHTD. Similarly, we did not observe any somatic epimutations in the ectopic thyroids (6). The absence of any validated thyroid-specific somatic mutations in the present study is consistent with all these previous findings. Together these results imply that early post-zygotic coding region mutations, or altered epigenetic markings, are unlikely in CHTD. In contrast, the extensive AME observed in all thyroid samples assessed in the present study, might well account for the discordance between MZ twins and the sporadicity observed in CHTD. Indeed, genes subject to AME might contribute to

cellular (clonal) diversity (8) and are more vulnerable to otherwise benign heterozygous genetic or epigenetic mutations (27).

Only three recurrent genes are common to the two ectopic glands (*CDC27*, *CTBP2* and *MSTIL*) and they do not belong to similar cellular pathways (assessed in KEGG pathway database; url: <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>). Of note, AME genes found in other studies are enriched for transmembrane receptors (8) and glycoproteins which are essential to cell adhesion and organ development (12). Similar examples of genes displaying AME in our ectopic thyroid tissues are *ZNF331* and *FCGBP*; both are involved in cell division and cell migration (28, 29). *ZNF331* encodes a zinc finger protein containing a KRAB (Kruppel-associated box) domain found in transcriptional repressors. Recently, it has been shown that *ZNF331* expression was reduced in human oesophageal cancer by methylation of the promoter and that cell migration is suppressed by *ZNF331* expression (28). *FCGBP* (Fc fragment of IgG binding protein) is a surface protein involved in the epithelial-mesenchymal transition and in tumour progression in gallbladder cancer (29). *FCGBP* expression is reduced in papillary and follicular thyroid cancer, which might suggest a role in thyroid cell division and migration (30). Oddly, we found that seven genes recurrently subject to AME in thyroid were located on chromosome 6 (HLA-A, B, C; DRB1; BCLAF1; PRIM2 and CCHCR1), consistent with long range asynchronous replication and monoallelic expression under the control of a cis-acting gene named Asynchronous replication and Autosomal RNA on chromosome 6, or ASAR6 (31). Indeed, Donley et al. (31) showed that the asynchronous replication of ASAR6 was coordinated in cis

with two loci on the short arm of the chromosome 6, the HLA locus and an olfactory gene cluster. However, we acknowledge that the highly polymorphic nature of MHC Class I and II genes may impact alignment efficiency of RNA-seq reads and lead to spurious allelic imbalances (32). Consequently, the frequent monoallelic events in these genes require additional validation. This suggests that even if the choice of the monoallelically expressed allele is a stochastic (non-predetermined) event, the location of the genes subject to AME is probably determined by genetic and/or epigenetic marks across the genome (9).

Stochastic variable gene expression among genetically identical cells has been implicated in processes including determination of cell fates (33, 34) and development of genetic diseases (11). Reduction of the stochastic expression noise, either by haploinsufficiency or by AME, increases the likelihood of impaired gene function and disease (11). A dynamic AME and transcription dynamic has been recently uncovered in embryonic cells (35). It is therefore likely that stochastic dynamic AME has even more fundamental implications for penetrance and severity of congenital disorders including CHTD (35). Somatic variation in the proportion of cells with normal biallelic expression compared to cell with AME of a pool of genes (9) might also lead to the broad range of phenotype observed in CHTD, ranging from athyreosis, to thyroid ectopy and thyroid hemiagenesis.

In conclusion, our study is the first to show clearly that complete AME is observed for groups of genes in ectopic and orthotopic thyroids. Our findings, together with the reported tendency of surface proteins to be AME-prone, suggest

that a pathogenic variant expressed monoallelically in ectopic thyroid might account for the almost universal discordance between MZ twins for this malformation. This latter point remains speculative as our study is limited by the low number of ectopic thyroids given that patients with thyroid ectopy almost never require surgery to remove the ectopic gland. This would imply that CHTD is a genetically driven stochastic event, in which morphogenic genes might interfere with cell motion, local physical chemoattractant gradient and even local physical constraints, as suggested six decades ago by Turing (36, 37). It is likely that the role of AME in sporadic congenital disorders is greater than currently appreciated (27).

### **Acknowledgements**

We thank the patients and their parents for their cooperation

## References

1. Deladoey J, Ruel J, Giguere Y, Van Vliet G 2011 Is the incidence of congenital hypothyroidism really increasing? A 20-year retrospective population-based study in Quebec. *J Clin Endocrinol Metab* **96**:2422-2429.
2. Narumi S, Muroya K, Asakura Y, Adachi M, Hasegawa T 2010 Transcription factor mutations and congenital hypothyroidism: systematic genetic screening of a population-based cohort of Japanese patients. *J Clin Endocrinol Metab* **95**:1981-1985.
3. Castanet M, Lyonnet S, Bonaiti-Pellie C, Polak M, Czernichow P, Leger J 2000 Familial forms of thyroid dysgenesis among infants with congenital hypothyroidism. *N Engl J Med* **343**:441-442.
4. Stoppa-Vaucher S, Van Vliet G, Deladoey J 2011 Variation by ethnicity in the prevalence of congenital hypothyroidism due to thyroid dysgenesis. *Thyroid* **21**:13-18.
5. Perry R, Heinrichs C, Bourdoux P, Khoury K, Szots F, Dussault JH, Vassart G, Van Vliet G 2002 Discordance of monozygotic twins for thyroid dysgenesis: implications for screening and for molecular pathophysiology. *J Clin Endocrinol Metab* **87**:4072-4077.
6. Abu-Khudir R, Paquette J, Lefort A, Libert F, Chanoine JP, Vassart G, Deladoey J 2010 Transcriptome, methylome and genomic variations analysis of ectopic thyroid glands. *PloS one* **5**:e13420.
7. Magne F, Serpa R, Van Vliet G, Samuels ME, Deladoey J 2015 Somatic mutations are not observed by exome sequencing of lymphocyte DNA from monozygotic twins discordant for congenital hypothyroidism due to thyroid dysgenesis. *Horm Res Paediatr* **83**:79-85.
8. Gimelbrant A, Hutchinson JN, Thompson BR, Chess A 2007 Widespread monoallelic expression on human autosomes. *Science* **318**:1136-1140.
9. Savova V, Vigneau S, Gimelbrant AA 2013 Autosomal monoallelic expression: genetics of epigenetic diversity? *Curr Opin Genet Dev* **23**:642-648.

10. 2015 Human genomics. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) pilot analysis: multitissue gene regulation in humans. *Science* **348**:648-660.
11. Cook DL, Gerber AN, Tapscott SJ 1998 Modeling stochastic gene expression: implications for haploinsufficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:15641-15646.
12. Gendrel AV, Attia M, Chen CJ, Diabangouaya P, Servant N, Barillot E, Heard E 2014 Developmental dynamics and disease potential of random monoallelic gene expression. *Dev Cell* **28**:366-380.
13. Vassart G, Dumont JE 2005 Thyroid dysgenesis: multigenic or epigenetic ... or both? *Endocrinology* **146**:5035-5037.
14. Lemoine NR, Mayall ES, Jones T, Sheer D, McDermid S, Kendall-Taylor P, Wynford-Thomas D 1989 Characterisation of human thyroid epithelial cells immortalised in vitro by simian virus 40 DNA transfection. *Br J Cancer* **60**:897-903.
15. Samuels ME, Gallo-Payet N, Pinard S, Hasselmann C, Magne F, Patry L, Chouinard L, Schwartzentruber J, Rene P, Sawyer N, Bouvier M, Djemli A, Delvin E, Huot C, Eugene D, Deal CL, Van Vliet G, Majewski J, Deladoey J 2013 Bioinactive ACTH causing glucocorticoid deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* **98**:736-742.
16. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R 2009 The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**:2078-2079.
17. Pernis B, Chiappino G, Kelus AS, Gell PG 1965 Cellular localization of immunoglobulins with different allotypic specificities in rabbit lymphoid tissues. *J Exp Med* **122**:853-876.
18. Hozumi N, Tonegawa S 1976 Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**:3628-3632.
19. Chess A, Simon I, Cedar H, Axel R 1994 Allelic inactivation regulates olfactory receptor gene expression. *Cell* **78**:823-834.

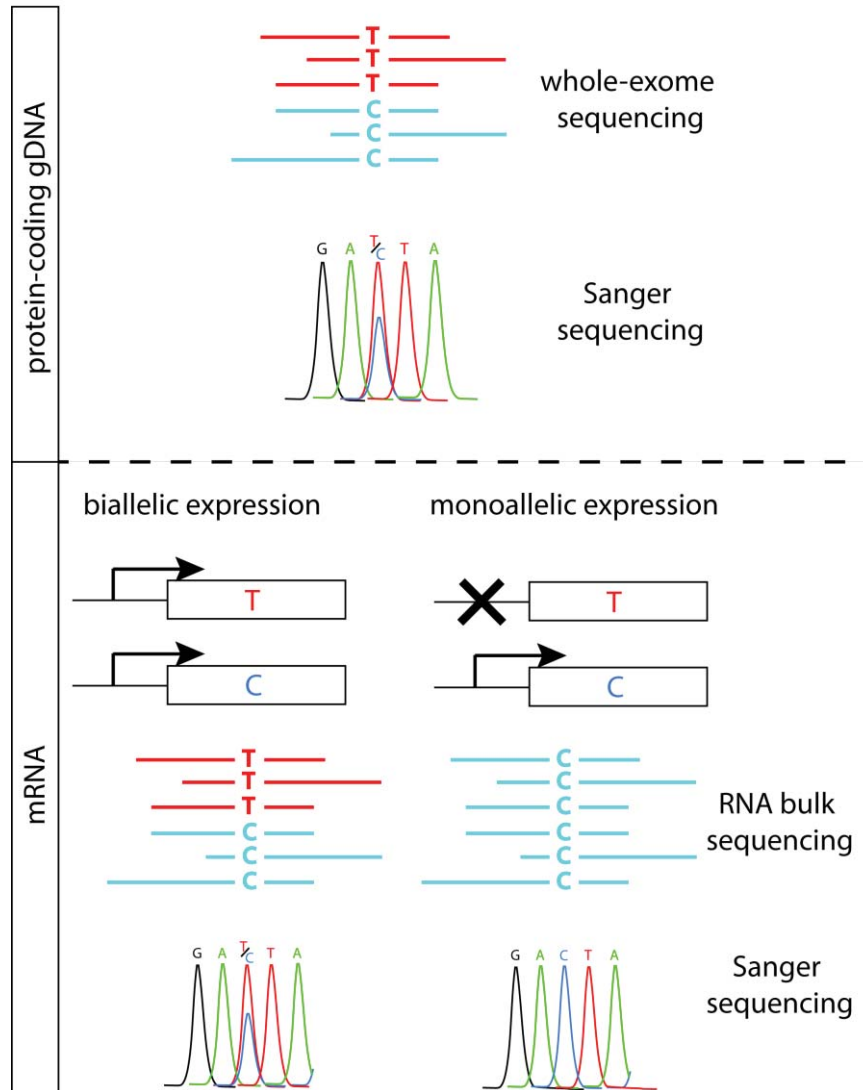
20. Reinius B, Sandberg R 2015 Random monoallelic expression of autosomal genes: stochastic transcription and allele-level regulation. *Nat Rev Genet* **16**:653-664.
21. Zwemer LM, Zak A, Thompson BR, Kirby A, Daly MJ, Chess A, Gimelbrant AA 2012 Autosomal monoallelic expression in the mouse. *Genome Biol* **13**:R10.
22. Zhang K, Li JB, Gao Y, Egli D, Xie B, Deng J, Li Z, Lee JH, Aach J, Leproust EM, Eggen K, Church GM 2009 Digital RNA allelotyping reveals tissue-specific and allele-specific gene expression in human. *Nat Methods* **6**:613-618.
23. Fugazzola L, Cerutti N, Mannavola D, Vannucchi G, Fallini C, Persani L, Beck-Peccoz P 2003 Monoallelic expression of mutant thyroid peroxidase allele causing total iodide organification defect. *J Clin Endocrinol Metab* **88**:3264-3271.
24. Neves SC, Mezalira PR, Dias VM, Chagas AJ, Viana M, Targovnik H, Knobel M, Medeiros-Neto G, Rubio IG 2010 Monoallelic thyroid peroxidase gene mutation in a patient with congenital hypothyroidism with total iodide organification defect. *Arq Bras Endocrinol Metabol* **54**:732-737.
25. Hermanns P, Grasberger H, Refetoff S, Pohlenz J 2011 Mutations in the NKX2.5 gene and the PAX8 promoter in a girl with thyroid dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab* **96**:E977-981.
26. Eckersley-Maslin MA, Thybert D, Bergmann JH, Marioni JC, Flicek P, Spector DL 2014 Random monoallelic gene expression increases upon embryonic stem cell differentiation. *Dev Cell* **28**:351-365.
27. Chess A 2012 Mechanisms and consequences of widespread random monoallelic expression. *Nat Rev Genet* **13**:421-428.
28. Jiang S, Linghu E, Zhan Q, Han W, Guo M 2015 Methylation of ZNF331 Promotes Cell Invasion and Migration in Human Esophageal Cancer. *Current protein & peptide science* **16**:322-328.

29. Xiong L, Wen Y, Miao X, Yang Z 2014 NT5E and FcGBP as key regulators of TGF-1-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) are associated with tumor progression and survival of patients with gallbladder cancer. *Cell and tissue research* **355**:365-374.
30. O'Donovan N, Fischer A, Abdo EM, Simon F, Peter HJ, Gerber H, Buergi U, Marti U 2002 Differential expression of IgG Fc binding protein (FcgammaBP) in human normal thyroid tissue, thyroid adenomas and thyroid carcinomas. *J Endocrinol* **174**:517-524.
31. Donley N, Stoffregen EP, Smith L, Montagna C, Thayer MJ 2013 Asynchronous replication, mono-allelic expression, and long range Cis-effects of ASAR6. *PLoS Genet* **9**:e1003423.
32. van de Geijn B, McVicker G, Gilad Y, Pritchard JK 2015 WASP: allele-specific software for robust molecular quantitative trait locus discovery. *Nat Methods* **12**:1061-1063.
33. Blake WJ, Balazsi G, Kohanski MA, Isaacs FJ, Murphy KF, Kuang Y, Cantor CR, Walt DR, Collins JJ 2006 Phenotypic consequences of promoter-mediated transcriptional noise. *Mol Cell* **24**:853-865.
34. Maamar H, Raj A, Dubnau D 2007 Noise in gene expression determines cell fate in *Bacillus subtilis*. *Science* **317**:526-529.
35. Deng Q, Ramskold D, Reinius B, Sandberg R 2014 Single-cell RNA-seq reveals dynamic, random monoallelic gene expression in mammalian cells. *Science* **343**:193-196.
36. Turing AM 1990 The chemical basis of morphogenesis. 1953. *Bull Math Biol* **52**:153-197; discussion 119-152.
37. Tompkins N, Li N, Girabawe C, Heymann M, Ermentrout GB, Epstein IR, Fraden S 2014 Testing Turing's theory of morphogenesis in chemical cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**:4397-4402.

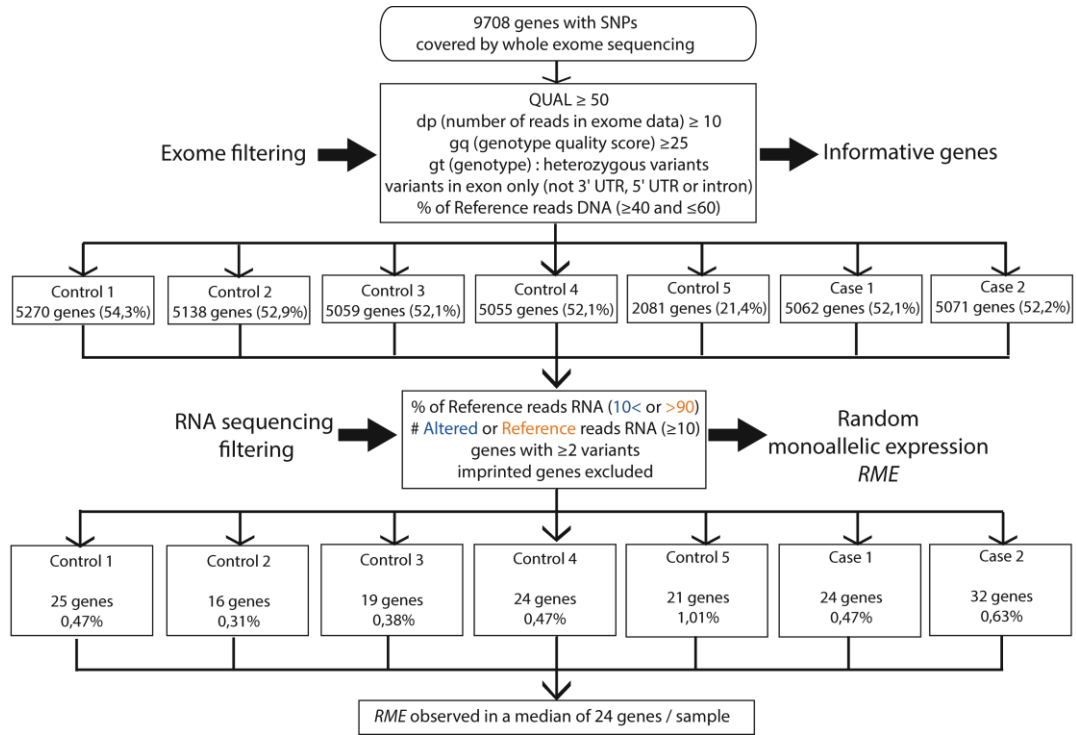


## Figure Legend

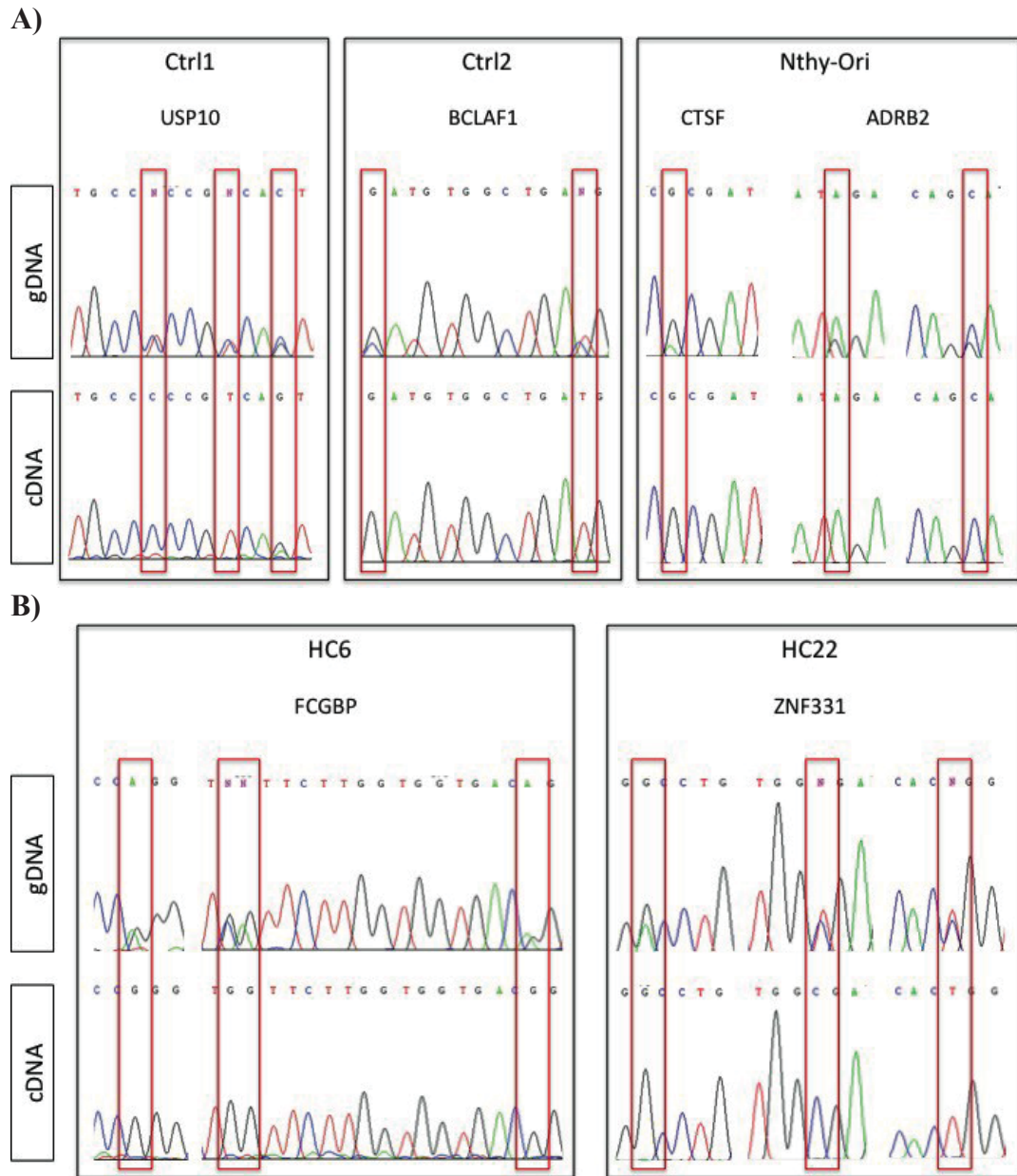
**Figure 1:** Schematic representation of the autosomal monoallelic expression assessed by whole-exome and bulk RNA sequencing.



**Figure 2:** Breakdown of the experimental protocol including bioinformatics pipeline and filtering of whole-exome and bulk RNA sequencing data.



**Figure 3: Monoallelic expression in autosomal genes:** confirmation by Sanger sequencing of monoallelic expression in (A) normal eutopic tissues and Nthy-ori and (B) ectopic tissue.

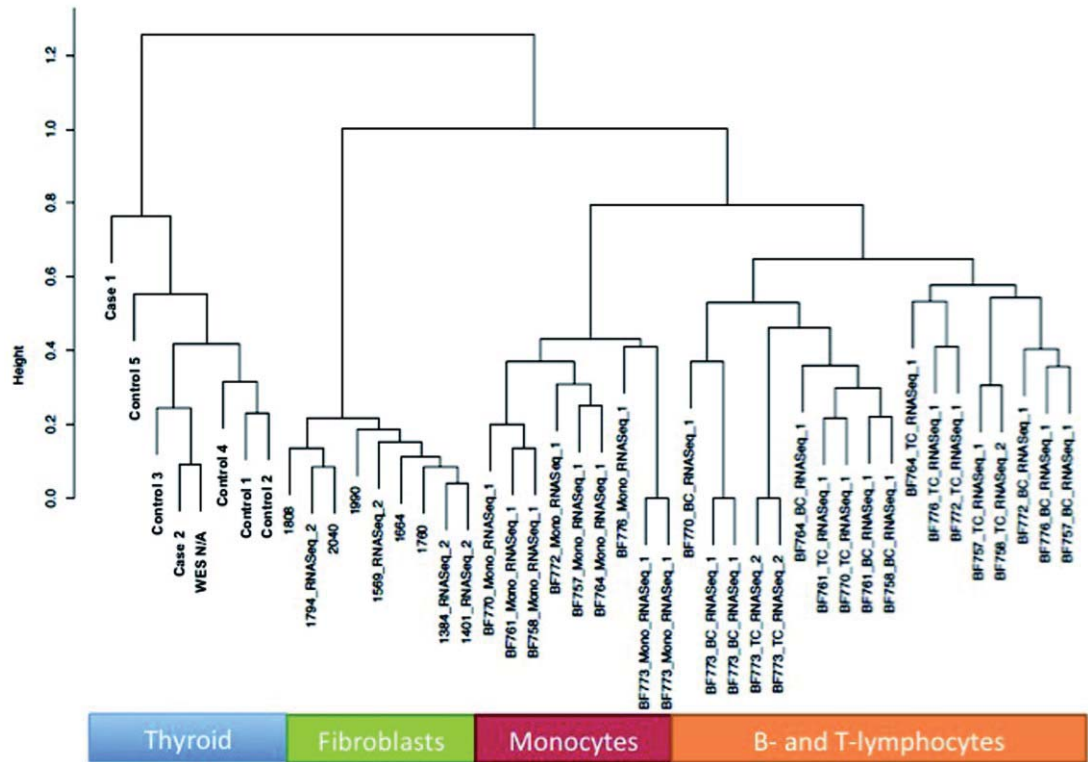


## Supplemental Table

**Characteristic of the thyroid tissues used for combined RNA and exome sequencing. Ectopic thyroid tissues:** case 1 and case 2. **Eutopic (normal) thyroid tissues:** controls 1 to 5. All normal eutopic tissues come from the healthy part of thyroids removed either prophylactically in patients with MEN2A (RET+ patients at risk to develop medullary thyroid cancer – MTC) or in patients with well encapsulated papillary thyroid cancer (PTC).

Sample	Diagnostic	Nature of the tissue	SEX	AGE at surgery (yr)	TSH (mU/L) prior to surgery	ft4 (pmol/L) prior to surgery
case 1	CHTD - Ectopy	ectopic thyroid tissue	F	10	0.08	15.7
case 2	CHTD - Ectopy	ectopic thyroid tissue	F	8	3.9	14.0
control 1	MTC (MEN2A)	healthy part of the orthotopic thyroid specimen	F	8	0.06	NA
control 2	PTC	healthy part of the orthotopic thyroid specimen	F	12	3.0	NA
control 3	PTC	healthy part of the orthotopic thyroid specimen	F	16	3.68	9.93
control 4	MTC (MEN2A)	healthy part of the orthotopic thyroid specimen	M	5	1.76	19.6
control 5	human cell line	N-Thyrori cells	NA	NA	NA	NA

Supplemental Figure :



**Cluster dendrogram** established by unsupervised hierarchical clustering of RNA sequencing data. All thyroid tissues and thyroid derived cell lines cluster together and are distinct from other human tissues in a left-side branch of the cluster dendrogram.

## Discussion et perspectives

Il a déjà été mis en évidence que certains cas d'hypothyroïdie congénitale par dyshormonogénèse peuvent être causés par de l'expression monoallélique dans le gène *TPO*. Dans le but d'identifier si la glande thyroïde (orthotopique mais également ectopique) soit soumise également à de l'expression monoallélique, nous avons réalisé le séquençage de l'exome et de l'ARN haut-débit de quatre thyroïdes normales, d'une lignée de cellules thyroïdiennes normales humaines (Nthy-ori) et de deux thyroïdes ectopiques.

Au cours de cette étude, nous avons pu mettre en évidence pour la première fois que les tissus thyroïdiens sont soumis à de l'expression monoallélique aléatoire. Ayant déjà montré que la discordance des jumeaux monozygotes atteints d'HCDT n'était pas de cause génétique et à la vue de la faible incidence de cette pathologie, une des hypothèses seraient que de l'expression monoallélique aléatoire en soit la cause. En effet, il suffirait qu'un gène connu pour être impliqué dans l'embryologie de la glande thyroïde ou bien un autre gène impliqué dans la migration par exemple, affecte de façon thyroïde-spécifique un individu pour qu'il soit atteint d'HCDT. De plus, nous avons mis en évidence pour la première fois que la lignée Nthy-ori a un profil similaire aux tissus thyroïdiens normaux, ce qui en fait un excellent outil pour les validations d'études fonctionnelles comparativement à d'autres lignées cellulaires thyroïdiennes, qui semblent avoir perdu au cours du temps, partiellement leur profil type [160].

## **4. À la découverte de nouveaux gènes causant l'hypothyroïdie congénitale par dysgénésie thyroïdienne**

### **4.1. Situation du sujet**

Compte tenu que tout au plus 3% des cas de dysgénésies sont expliqués par une mutation germinale des facteurs de transcription impliqués dans l'embryologie de la glande thyroïde, beaucoup d'autres facteurs impliqués dans cette pathologie sont à découvrir. La découverte de nouveaux marqueurs moléculaires est particulièrement importante pour identifier les patients atteints d'HCDT, qui, même avec un dépistage biochimique au 2<sup>ème</sup> jour de vie et un traitement précoce, ont un risque plus élevé de déficience intellectuelle. Ces patients pourraient ainsi bénéficier d'une intervention plus précoce afin de stimuler leur développement neurocognitif. Dans ce but, nous avons utilisé le séquençage de nouvelle génération, en réalisant le séquençage de l'exome de 34 cas sporadiques et de 2 cas issus de la même famille (transmission mère-enfant) atteints d'hypothyroïdie congénitale afin de découvrir les causes génétiques pouvant expliquer cette pathologie.

## 4.2. Article 4

Projet en cours, données non-publiées

Contributions :

Dr Deladoëy et Dr Samuels ont élaboré ce projet. J'ai réalisé l'analyse des données génétiques (36 exomes) permettant d'identifier les différents gènes testés. De plus, j'ai validé les variants sélectionnés par séquençage Sanger. J'ai ensuite réalisé toutes les études fonctionnelles sur les gènes sélectionnés (*SSPO*, *TNXB*, *RYR3* et *IKBKE*) et effectuer les expérimentations suivantes : (i) détermination des niveaux des transcrits et des protéines dans les cellules thyroïdiennes humaines (Nthy-ori) par RT-PCR quantitative et immunobuvardage ; (ii) essais de migration sur les clones déplétés du gène d'intérêt par technique de small-harpin RNA (shRNA), et (iii) immunofluorescence. Stéphanie Larrivée-Vanier a réalisé l'infection des cellules Nthy-ori avec les shRNA et les lignées zebrafish (+/- et -/-) des gènes d'intérêts. Mark E. Samuels a supervisé les analyses génétiques de ce projet.



### **4.3. Résultats préliminaires et conclusions**

#### **Introduction**

L'hypothyroïdie congénitale par dysgénésie thyroïdienne (HCDD, ectopie dans plus de 80 %) a une prévalence de 1 cas sur 4000 naissances vivantes. Les HCDD sont principalement non-syndromiques (soit 98% des cas sont non-familiale), ont un taux de discordance de 92% chez les jumeaux monozygotes, et ont une prédominance féminine et ethnique (i.e., Caucasienne). La majorité des cas d'HCDD n'a pas de cause connue, mais est associée à un déficit sévère en hormones thyroïdiennes (hypothyroïdie). Compte tenu que tout au plus 3% des cas de dysgénésies sont expliqués par une mutation germinale des facteurs de transcription impliqués dans l'embryologie de la glande thyroïde, beaucoup d'autres facteurs impliqués dans cette pathologie sont à découvrir.

Après avoir réalisé le séquençage de 36 exomes de patients atteints d'HCDD, nous avons pu montrer de rares variants récurrents dans au moins 4 gènes (*SSPO*, *TNXB*, *RYR3* et *IKBKE*). Des études fonctionnelles préliminaires ont permis de mettre en évidence le rôle de *SSPO* et *IKBKE* dans la migration cellulaire dans la lignée de cellules thyroïdiennes normales (Nthy-ori).

#### **Matériel et Méthodes**

##### *Patients*

Trente-quatre cas sporadiques et un cas familial (transmission mère-enfants) avec hypothyroïdie congénitale par dysgénésie thyroïdienne ont été recrutés. L'ADN a été préparé à partir de lymphocytes périphériques obtenus par

ponction veineuse après avoir obtenu le consentement éclairé des patients (ou familles) pour le séquençage de l'exome et le séquençage Sanger.

#### *Séquençage de l'exome*

Le séquençage de l'exome entier (WES) a été réalisée en utilisant la bibliothèque de capture Agilent 50Mb SureSelect, suivie d'un séquençage sur l'instrument Illumina HiSeq 2000. Le séquençage a été réalisé à la plate-forme génomique de l'Université McGill et du Centre d'innovation Génome Québec. Les données primaires (séquences sous fichiers fastq) ont été traitées par l'équipe de bioinformatique du Réseau de Médecine Génétique Appliqué (RMGA). Le pipeline d'analyse pour l'alignement des courtes séquences à la séquence consensus du génome humain (v19), l'appel des variants et les annotations fonctionnelles ont été réalisés en utilisant GATK (Genome Analysis Toolkit), samtools et ANNOVAR. Les variants ont ensuite été triés en utilisant plusieurs filtres (bases de données dbSNP, 1000 génome et notre propre base de données de 1000 exomes contrôles provenant d'individus sains ou atteints de pathologies non liées à la fonction thyroïdienne). Les familles de gènes connus pour générer des artefacts d'exome (MUC; PRAMEF; NBPF, etc.) ont été exclus.

#### *Sélection des gènes candidats et validation*

Le choix des gènes candidats a été réalisé suite à une étude minutieuse des données de séquençage filtrées grâce au pipeline du RMGA (l'utilisation de ce pipeline est expliquée dans le Chapitre I - 3.1). Une fois filtrés, les gènes présentant des variants rares (variants présents dans  $\leq 10$  exomes contrôles) dans

un grand nombre d'échantillons ( $\geq 3$ ) et ayant un intérêt biologique ont été sélectionnés.

Les variants candidats ont été validés par séquençage Sanger basée sur l'amplification de la région d'intérêt par PCR. Les amorces PCR pour les variants d'intérêts ont été conçues avec Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>).

### *Études fonctionnelles*

Des lignées shRNA des gènes sélectionnés (utilisation de la lignée cellulaire Nthy-ori (thyroïde normale humaine)) afin d'évaluer l'effet sur la migration cellulaire (xCelligence de Roche) ont été réalisées. L'efficacité de chacune des lignées shRNA a été déterminée par RT-qPCR à partir de leur ARN. L'évaluation des gènes jugés pertinents à partir des expériences de migration par l'établissement de lignées KO de ces gènes sur modèle zebrafish est en cours de réalisation.

### **Résultats**

Sur les 36 cas séquencés, nous avons trouvé et validé des variants rares récurrents dans au moins 4 gènes différents (*SSPO*, *TNXB*, *RYR3* et *IKBKE*) qui sont significativement enrichis chez les patients avec HCDT (Tableau 9).

Tableau 9 : Liste des variants rares validés dans la cohorte de 36 exomes

Gènes	Variants	Nombre d'individus atteints d'HCDT	Individus ID
<i>SSPO</i>	p.P4593L	1	HC6-01
	p.R3968C	1	HC54-01

	p.L295fs	2	HC14-01 et HC22-01
	p.S4632fs	1	HC14-01
	p.W1759C	1	HC177-01
	p.P3929L	1	71-15
	p.C3892W	1	71-15
	p.C4345Y	1	HC167-01
<i>RYR3</i>	p.N898S	1	HC6-01
	p.A2284T	2	HC17-01 et 71-15
	p.S2334N	2	HC168-01 et HC168-02
	p.R1798Q	1	HC178-01
<i>TNXB</i>	p.V1108M	1	HC59-01
	p.R1064H	1	HC59-01
	p.F1806L	1	HC54-01
	p.R1749C	1	HC2-01
	p.V211M	1	HC22-01
<i>IKBKE</i>	p.R187Q	2	64-8 et HC59-01
	p.R47W	1	76-4

Six cas ont un variant rare dans le gène *SSPO* (tous sont hérités d'un parent non-affecté, mais des mutations bialléliques ont été trouvées dans 2 cas hétérozygotes composés), 6 cas ont un variant rare dans le gène *TNXB*, 6 cas ont un variant rare dans le gène *RYR3* et 3 cas ont un variant rare dans le gène *IKBKE*.

En plus de nos 36 exomes, 2 autres cas d'HCDT syndromique présentent une large délétion de la région chromosomique 7q36.1, région englobant le gène *SSPO* (collaboration avec Children's Hospital de Vancouver). Il est fort intéressant de noter que 25% (9/36) de ces patients séquencés ont des variants multiples, ce qui laisse sous entendre l'idée d'une hypothèse polygénique de l'hypothyroïdie congénitale par dysgénésie thyroïdienne (Figure 12).

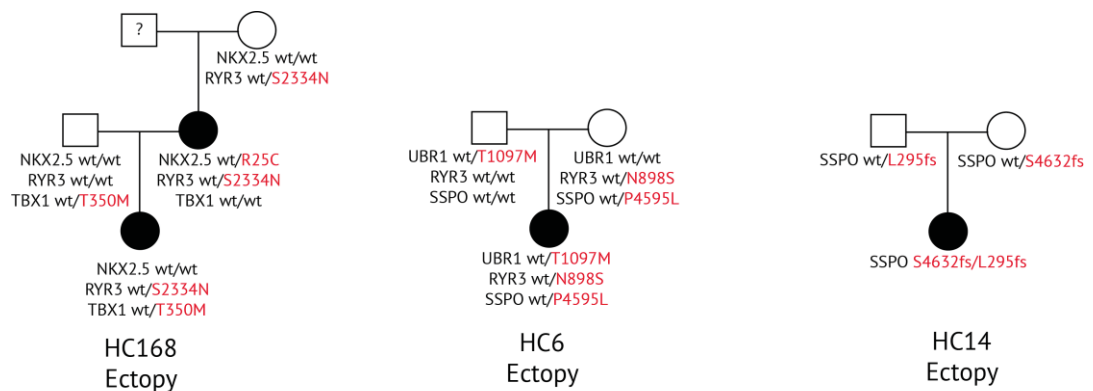


Figure 12 : Exemple de pédigrées de cas HCDT de cause polygénique

Afin de renforcer statistiquement les variants obtenus suite à l'analyse des données par le pipeline du RMGA, nous avons utilisé la base de données ExAc (<http://exac.broadinstitute.org>) comprenant > 61 000 exomes, afin de déterminer la « rareté » des variants dans nos 4 gènes d'intérêts (tableau 10). Cette analyse préliminaire (« gene burden analysis »), complémentaire à celle du RMGA, est actuellement en train d'être raffinée, afin d'être statistiquement plus solide.

Tableau 10 : Analyse statistique « préliminaire » des 36 exomes HCDT avec variants validés dans les gènes sélectionnés

		CHTD (36)	ExAc Database (61,481)	OR	95 CI	P-value
1	SSPO	8*	0*	INF	2885-INF	<2.2 x E-16
2	TNXB	6	200	50,9	17,4-123,9	6,2 x E-09
5	RYR3	6	1876	5,2	1,8-12,7	0,0016
6	IKBKE	3	286	11,1	2,1-35,53	0,003

\*, En addition des 6 cas de notre cohorte, 2 cas d'HCDT syndromique présentent une large délétion de la région chromosomique 7q36.1, région englobant le gène *SSPO*

Des essais fonctionnels afin d'évaluer l'impact de ces gènes sur la glande thyroïde. Dans un premier temps, j'ai validé l'expression de ces 4 gènes dans la lignée Nthy-ori (lignée cellules thyroïdiennes humaines normales, Figure 13).

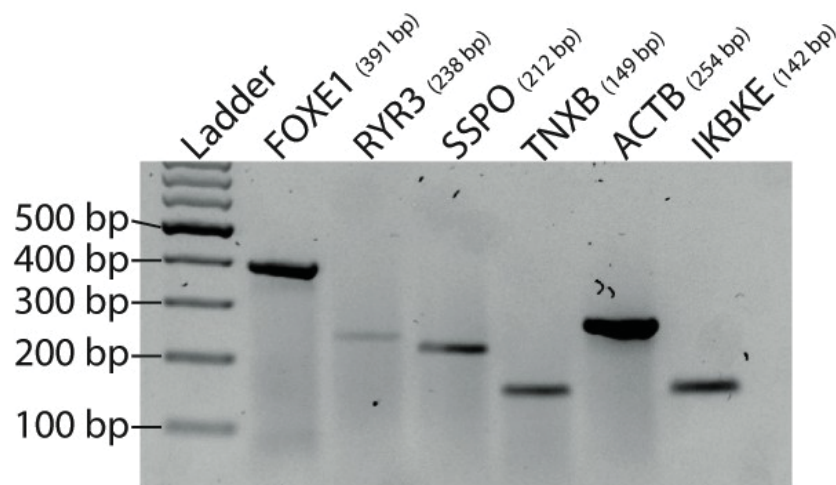


Figure 13 : Validation de l'expression dans les Nthy-ori des gènes d'intérêts

Ensuite, des lignées affectées d'une diminution de l'expression des gènes (shRNA) ont été réalisées. Les « knockdown » de ces gènes ont été évalués par

RT-qPCR et les valeurs rapportées au shCtrl (Tableau 11). Il est important de souligner que pour le gène *RYR3*, bien que son expression apparaisse de façon très faible dans les Nthy-ori (Figure 13), il n'a pas été en mesure de pouvoir réaliser une lignée shRYR3.

Tableau 11 : Résultats de l'effet des shRNA ciblant les gènes d'intérêts

Nom de l'échantillon	RQ	Knockdown expression (%)
SSPO sh20B	0,162	83,80
IKBKE sh19A	0,416	58,40
IKBKE sh19C	0,220	78,00
IKBKE sh19D	0,228	77,20
IKBKE sh19B	0,378	62,20
TNXB sh95A	0,143	85,70
TNXB sh95B	0,554	44,60
TNXB sh95C	0,146	85,40
TNXB sh95D	0,145	85,50
sh21-Ctrl	1,000	

Certaines de ces lignées (SSPO-sh20B, IKBKE-sh19B, IKBKE-sh19C, TNXB-sh95B et TNXB-sh95C) ont été utilisées dans un premier temps afin de réaliser des essais de migration. Les résultats préliminaires (Figure 14) montrent que certaines lignées (shSSPO et shIKBKE) affectent fortement la migration cellulaire (SSPO-sh20B diminue de 61% à 5h et de 40% à 15h, tandis que IKBKE-sh19B et IKBKE-sh19C diminuent de 71% et 67% à 5h et de 50% et 41% à 15h, respectivement) et que les lignées shTNXB n'ont quasiment aucun effet sur la migration (TNXB-sh95C diminue de 37% à 5h et n'a plus d'effet à 15h).

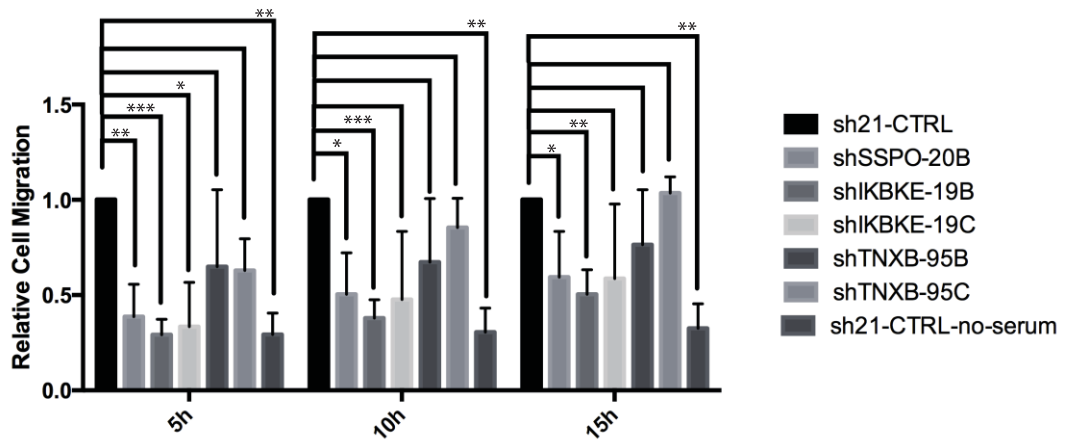


Figure 14 : Essais de migration cellulaire en temps réel des gènes d'intérêts (\*\*\*) $p < 0.0005$ , (\*\*) $p < 0.005$ , (\*) $p < 0.05$ , 4 expériences indépendantes, normalisées au sh21-CTRL)

En ce qui concerne le gène *RYR3*, que nous n'avons pas pu valider au niveau fonctionnel (niveau d'expression du gène trop faible pour pouvoir réaliser une lignée shRNA), il se peut que ce gène ne soit pas directement impliqué dans la thyroïde, mais plutôt dans le tissu mésenchymateux avoisinant, tel qu'il a été déjà montré pour le gène *NTNI* [53]. Pour cela, l'utilisation du modèle du poisson-zèbre devrait permettre éventuellement de valider un rôle de ce gène dans les dysgénésies thyroïdiennes (étude actuellement en cours).

### Discussion

Le gène *SSPO* (ou SCO-spondin) code pour une large glycoprotéine de la famille des thrombospondine, est situé sur le chromosome 7q36.1 et contient 103 exons. Des études ont montré que cette protéine, sécrétée par les cellules épendymaires de l'organe subcommissural (au niveau du cerveau) dès les premières étapes de développement, est détectée chez l'humain dès la sixième semaine de gestation. De plus, elle est essentielle pour le développement



embryonnaire et permet de réguler l'équilibre entre la prolifération et la différenciation neuroépithéliale [161, 162]. Montecinos *et al.* ont montré que l'organe subcommissural synthétise les transthyrélines, une protéine impliquée dans le transport des hormones thyroïdiennes dans le sang et le fluide cérébrospinal [163].

Le gène *IKBKE* (inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit epsilon) code pour un membre de la famille des kinases IκB, est situé sur le chromosome 1q32.1 et contient 22 exons. Ce gène serait un oncogène pour le cancer du sein surexprimé dans plus de 30% des carcinomes du sein [164].

Le gène *RyR3*, situé sur le chromosome 15q13.3 et constitué 105 exons, code pour un membre des récepteurs ryanodine (trois isoformes existent chez les mammifères) [165]. Ce récepteur est localisé dans la membrane du réticulum endoplasmique et est impliqué dans la relâche du calcium intracellulaire. L'isoforme RyR1 est principalement exprimé au niveau des muscles squelettiques, tandis que l'isoforme RyR2 est principalement exprimé au niveau du muscle cardiaque. En ce qui concerne l'isoforme RyR3, qui est le moins étudié des 3 isoformes, il est exprimé dans plusieurs organes (neurones hippocampaux, thalamus, poumons, reins, iléum) sans avoir d'organe prédominant. Des mutations dans l'isoforme RyR1 sont impliquées entre autre dans l'hyperthermie maligne [166], alors que celles dans RyR2 sont impliquées par exemple dans la tachycardie ventriculaire polymorphe catécholergique [167]. En contre partie, peu est connu sur la fonction de RyR3, mais une étude récente suggère qu'il jouerait un rôle dans la maladie d'Alzheimer [168].

Le gène *TNXB* (tenascin XB) code pour un membre des glycoprotéines de la matrice extracellulaire de la famille des tenascines, est situé sur le chromosome 6p21.3 et contient 44 exons. Des mutations dans ce gène sont impliquées dans le syndrome d'Ehlers-Danlos, se caractérisant par une hyper-extensibilité de la peau, hyper-mobilité articulaire et fragilité des tissus, dus à une synthèse anormale du collagène [169]. Cependant, l'hypothyroïdie primaire n'est pas observée chez les patients souffrant du syndrome d'Ehlers-Danlos. Par conséquent, son rôle pathophysiologique apparaît peu important.

Finalement, ces gènes sont fonctionnellement pertinents pour la migration cellulaire, l'adhérence cellule-cellule et de l'interaction [170-172].

À la vue de ces résultats préliminaires, nous pouvons conclure que deux de ces nouveaux gènes (*SSPO* et *IKBKE*) semblent très importants dans l'HCDT puisque nous avons montré leur implication dans la migration des cellules thyroïdiennes (qui est la principale cause des ectopies). Les prochaines expériences à partir de cellules (immunobuvardage et immunofluorescence) mais également sur le modèle du poisson-zèbre (lignée transgénique permettant de visualiser la thyroïde par l'expression de protéine thyroglobuline (tg) fluorescente spécifique à la thyroïde) afin de confirmer ce que nous venons de montrer sur ces deux gènes, en mettant davantage l'accent sur la morphologie de la glande thyroïde, mais également permettra d'apporter les réponses manquantes pour le rôle du gène *RYR3* dans l'embryologie de la glande thyroïde.

## Chapitre IV : Discussion

Nous avons étudié les causes pouvant expliquer l'hypothyroïdie congénitale par dysgénésie thyroïdienne (HCDT), pathologie possiblement polygénique mais dont la cause n'est connue que dans tout au mieux 3% des cas. Pour cela, les technologies de séquençage, traditionnelle et de nouvelle génération, ont été utilisées à large échelle.

Dans un premier temps, nous avons mis en évidence que la discordance des jumeaux monozygotes discordants n'était pas due à une différence génétique touchant les régions codantes du génome (Chapitre III.1, Magne *et al.* 2015), laissant supposer que plusieurs causes pouvaient expliquer cette différence. Parmi celles-ci, nous pouvons citer les différences dans le génome ne se situant pas dans les régions codantes, mais également des différences de méthylation ou bien une expression tissulaire spécifique (expression monoallélique dans la thyroïde).

Dans ce contexte, nous avons montré que les tissus thyroïdiens (orthotopiques et ectopiques) présentaient une expression monoallélique autosomale (environ 1,7% des gènes) (Chapitre III.2, Magne *et al.* 2016, accepté). Ce profil tissu spécifique, déjà associé à d'autres pathologies thyroïdiennes telles que les dyshormonogénèses [157, 158], pourrait bien expliquer les cas de dysgénésies thyroïdiennes, dans la mesure où des gènes impliqués dans l'embryologie de la glande thyroïde ou des gènes jouant un rôle dans la migration cellulaire (cas d'ectopies par exemple) seraient exprimés de façon monoallélique. Par contre, une des difficultés de cette hypothèse est de pouvoir réaliser le

séquençage de cas de dysgénésies. En effet, dans les cas d'athyréoses, il est impossible de valider cette hypothèse vu l'absence de tissu thyroïdien. En ce qui concerne les patients avec ectopies, il est généralement impossible de réaliser cette expérience car le tissu thyroïdien n'est que très rarement enlevé chirurgicalement. Le point fort de nos projets est d'ailleurs d'avoir pu analyser les rares échantillons disponibles de thyroïdes ectopiques.

Les paires de jumeaux monozygotes (MZ) sont essentiellement discordantes pour l'HCDT. Les jumeaux MZ étant identiques génétiquement (Chapitre III.1, Magne *et al.* 2015), des différences épigénétiques, comme le profil de méthylation, pourraient être impliquées dans la pathogenèse de l'HCDT. En analysant le profil de méthylation des promoteurs des gènes impliqués directement dans le développement thyroïdien (*NKX2.1*, *FOXE1* et *PAX8*), nous avons mis en évidence des différences de méthylation tissu spécifique dans une région du promoteur de *FOXE1* [153]. En travaillant davantage sur cette région promotrice, nous avons découvert des haplotypes « risques » présents dans plus de 25% des cas atteints d'HCDT (Chapitre III.3, Magne *et al.* 2016, en préparation) et ayant des impacts fonctionnels importants (expression, migration et morphologie cellulaire). Ces haplotypes, aussi présents dans la population contrôle, peuvent être considéré comme des facteurs de prédisposition nécessaires mais non suffisants à l'apparition de l'HCDT; ceci implique que d'autres facteurs génétiques sont requis et suggèrent que l'HCDT est une condition polygénique, au même titre qu'une autre condition endocrinienne congénitale : le syndrome de Kallmann [116]. La découverte de ces haplotypes de risque soulève aussi d'intéressantes questions de

recherche. En effet, il est intéressant de noter que dans l'haplotype 1 (Hap1: A-C-C-C-C-C-Del1C) à risque, l'apparition du C crée un nouveau dinucléotide CG, et ce dans une région connue pour être méthylée dans le tissu thyroïdien [153]. Il serait intéressant d'évaluer si la méthylation de ce nouveau CpG majore l'effet pathogénique en diminuant encore plus l'expression de *FOXE1*.

D'autre part, nous avons aussi découvert, dans la même région du promoteur *FOXE1*, des haplotypes de « protection » (Hap3 et Hap4) dans une cohorte de contrôles d'origine africaine. Cette observation est compatible avec la très faible incidence d'HCDT chez les individus de descendance africaine [31]. De plus, ces haplotypes démontrent des changements nucléotidiques dans la répétition de 12 cytosines, créant de ce fait des interruptions dans les 12 cytosines successives. Or, des interruptions dans des répétitions de nucléotides (microsatellites) peuvent les stabiliser [173], et plus particulièrement, la fréquence des mutations « frameshift » (changement de cadre de lecture) est diminuée par des interruptions de séquences [174]. Des interruptions dans des microsatellites causant une pathologie agissent comme modificateur de la maladie [175]. À l'inverse, il a été montré qu'un SNP population-spécifique dans le gène *APC* changeant un microsatellite interrompu en un microsatellite sans interruption (8 A consécutifs), entraîne une augmentation du risque de mutation somatique dans ce gène et le cancer colorectal chez les juifs ashkénazes [176].

Finalement, puisque qu'il y a peu d'argument en faveur d'une origine monogénique de l'HCDT (moins de 3% des cas possèdent une mutation dans des facteurs importants pour l'embryologie de la glande thyroïde), nous avons montré

en séquençant une cohorte de 36 cas atteints d’HCDT, la présence de mutations récurrentes dans 4 gènes (*RYR3*, *SSPO*, *IKBKE* et *TNXB*), n’ayant jamais été identifiés comme jouant un rôle dans l’embryologie ou la fonction de la glande thyroïde (Chapitre III.4). Ce projet est en cours, les données préliminaires montrent clairement que 2 de ces gènes (*SSPO* et *IKBKE*) ont un impact important sur la migration de la cellule thyroïdienne. Ce genre de projet a permis de montrer l’intérêt de l’approche par séquençage d’exome pour l’HCDT, mais a permis également de souligner la limite de ce type d’analyse. En effet, bien que nous ayons montré que plusieurs individus atteints d’HCDT avaient des variants dans le gène *TNXB*, gène impliqué dans le syndrome d’Ehlers-Danlos [177], les études fonctionnelles ont cependant montré qu’il ne jouait pas de rôle dans la migration cellulaire thyroïdienne. Ces données corroborent l’absence d’hypothyroïdie chez les individus présentant le syndrome d’Ehlers-Danlos. Ceci souligne l’importance d’une caractérisation fonctionnelle exhaustive afin de s’assurer du lien entre nouveaux gènes et notre pathologie, surtout avec l’utilisation d’une méthode très sensible (et peu spécifique) comme l’est le séquençage d’exomes sur des cohortes cas et témoins.

Dans cette logique, des études sur le modèle du poisson-zèbre sont actuellement en cours afin d’observer un éventuel impact (direct ou indirect) de ces 3 gènes (*SSPO*, *IKBKE* et *RYR3*) sur l’embryologie de la glande thyroïde lors du développement de ce modèle animal. L’utilisation de cette approche permettrait de caractériser embryologiquement ces 3 gènes, en visualisant la glande thyroïde à

différents stades de sa formation, comme cela a été montré pour le gène netrin [53].

## Chapitre V : Conclusion

Ces différentes études ont permis de mettre en évidence de nouveaux éléments qui semblent fort prometteurs. En effet, l'utilisation de différentes techniques de séquençage (Sanger et séquençage haut-débit) a pu apporter de nouvelles réponses aux mécanismes moléculaires des dysgénésies thyroïdiennes.

Cependant, bien que nous ayons montré avec l'utilisation de la technologie du séquençage d'exome que de nouveaux gènes semblent être impliqués, nous avons mis en évidence les limites d'utilisation de cette méthode. Premièrement, une limite « interne » à la technologie en démontrant qu'un allèle-risque est présent dans le promoteur d'un gène connu pour jouer un rôle clé dans l'embryologie de la glande thyroïde, puisque cette partie n'était pas couverte par le séquençage d'exome (région ne couvrant que ce qui est codant dans le génome). Deuxièmement, une limite « externe » avec la découverte de variants dans des gènes connus pour être impliqués dans des pathologies n'ayant aucun lien avec l'HCDT.

Par contre, le séquençage d'exome représente un outil privilégié permettant d'apporter un certain nombre de réponses à bas coût, pouvant être très utile pour les diagnostics cliniques ou bien pour la découverte de mutations dans des pathologies sans cause connue. Cependant, il est évident que le séquençage du génome entier permettra de parer à l'éventualité de manquer des éléments pouvant jouer un rôle primordial dans des pathologies n'ayant pu être élucidées par



l'exome ou bien comme dans notre cas (HCDT) d'y apporter de nouvelles réponses.

## **Annexe I : Bioinactive ACTH Causing Glucocorticoid Deficiency**

Publié dans : J Clin Endocrinol Metab. 2013 Feb;98(2):736-42.

Contributions :

J'ai réalisé les expériences de dosage de l'ACTH par deux techniques : essais immunoradiométriques (IRMA) et essais immunométriques par chimioluminescence. Dr Mark E. Samuels a effectué les analyses du séquençage des exomes. Les mesures de l'AMPc et les essais de liaison ont été réalisés respectivement par Sandra Pinard et Patricia René. Les Drs Michel Bouvier, Guy Van Vliet, Mark E. Samuels, Cheri L. Deal, Nicole Gallo-Payet et Johnny Deladoëy ont participé à la rédaction et à la révision des versions ultérieures.

## Bioinactive ACTH Causing Glucocorticoid Deficiency

Mark E. Samuels, Nicole Gallo-Payet, Sandra Pinard, Caroline Hasselmann, Fabien Magne, Lysanne Patry, Lucie Chouinard, Jeremy Schwartzentruber, Patricia René, Nicole Sawyer, Michel Bouvier, Anissa Djemli, Edgard Delvin, Céline Huot, Dardye Eugene, Cheri L. Deal, Guy Van Vliet, Jacek Majewski, Johnny Deladoëy, and FORGE Canada Consortium

Endocrinology Service and Research Center (M.E.S., C.H., F.M., L.P., A.D., E.D., C.H., C.L.D., G.V.V., J.D.), Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine, Department of Pediatrics, University of Montreal, Montreal H3T 1C5, Canada; Department of Medicine (N.G.-P., S.P., L.C.), Endocrinology Division, University of Sherbrooke, Sherbrooke J1H 5N4, Canada; McGill University and Genome Quebec Innovation Centre (J.S., J.M.), and Department of Human Genetics (J.M.), McGill University, Montreal H3A 1A4, Canada; Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie and Department of Biochemistry (P.R., N.S., M.B.), University of Montreal, Montreal H3C 3J7 Canada; Department of Medicine (M.E.S.), University of Montreal, Montreal H3T 1J4, Canada; and Endocrinology Service (D.E.), Centre Hospitalier de l'Université Laval, Department of Pediatrics, Laval University, Québec G1V 4G2, Canada

**Context:** A 4-year-old girl and a 4-month-old boy presented with hypoglycemia, normal electrolytes, low cortisol, and high ACTH. A diagnosis of primary adrenal insufficiency was made and initial treatment was with glucocorticoids and mineralocorticoids. The genes known to cause ACTH resistance were normal. Whole exome sequencing revealed that the girl was compound heterozygous for *POMC* mutations: one previously described null allele and one novel p.R8C mutation in the sequence encoding ACTH and  $\alpha$ -MSH. The boy was homozygous for the p.R8C mutation.

**Hypothesis:** The p.R8C ACTH mutant is immunoreactive, but the mutant peptides, ACTH-R8C and  $\alpha$ -MSH-R8C, are bioinactive.

**Methods:** Methods included whole exome sequencing, Sanger sequencing, peptide synthesis, ACTH immunoradiometric assay, hormone binding, and activation assays in cells expressing melanocortin receptors.

**Results:** ACTH-R8C was immunoreactive but failed to bind and activate cAMP production in melanocortin-2 receptor (MC2R)-expressing cells, and  $\alpha$ -MSH-R8C failed to bind and stimulate cAMP production in MC1R- and MC4R-expressing cells.

**Conclusion:** These are the first documented cases of glucocorticoid deficiency due to the secretion of an ACTH molecule that lacks biological bioactivity but conserves immunoreactivity. *POMC* mutations should thus be considered in patients presenting with apparent ACTH resistance. Our findings also highlight a limitation to immunoassay-based diagnostics and demonstrate the value of genetic analysis. Establishing the molecular etiology of the disorder in our patients allowed cessation of the unnecessary mineralocorticoids. Finally, discovery of this mutation indicates that in humans, the amino acid sequence His<sup>6</sup>Phe<sup>7</sup>Arg<sup>8</sup>Trp<sup>9</sup> is important not only for cAMP activation but also for ACTH binding to MC2R. (*J Clin Endocrinol Metab* 98: 736–742, 2013)

The adrenocorticotrophic hormone ACTH is the major stimulus of adrenal steroidogenesis and of growth and development of the adrenal cortex (1–3). The effects of ACTH are primarily mediated through the melanocortin-2 receptor (MC2R) (4), which requires the presence of the MC2R accessory protein (MRAP) for its functional expression (5–7).

Familial glucocorticoid deficiency is an autosomal recessive disorder defined by ACTH-resistant isolated cortisol deficiency (MIM [202200]). It can be caused by mutations in genes encoding MC2R (MIM [607397]), MRAP (MIM [699196]), and rarely steroid acute regulatory protein (*StAR*, MIM [600617]) (8). Recently, mutations in the genes encoding minichromosome maintenance-deficient 4 (*MCM4*, MIM [602638]) and nicotinamide nucleotide transhydrogenase (*NNT*, MIM [607878]) have also been reported to cause familial glucocorticoid deficiency (9–11). In all these situations, plasma ACTH is high. By contrast, all reported cases of glucocorticoid deficiency due to mutations in the gene encoding proopiomelanocortin (*POMC*), the precursor protein from which ACTH is derived, had low or undetectable plasma ACTH (12–14). Fragment 1–13 of ACTH generates  $\alpha$ -MSH, which binds to the other members of the melanocortin receptor family (15, 16). Among these, MC4R is involved in energy homeostasis and MC1R in skin pigmentation. All melanocortin receptors use mainly cAMP as second messenger (17, 18). We report glucocorticoid deficiency in two unrelated patients with apparent ACTH resistance due to an unusual mutation in *POMC*, localized in the sequence known in rodents to be essential for cAMP activation by melanocortins through their cognate receptors (17, 18), resulting in immunoreactive but bioinactive ACTH. To confirm pathogenicity, wild-type and mutant ACTH and  $\alpha$ -MSH peptides were studied in functional tests of receptor binding and cAMP production.

## Patients and Methods

### Participants

Patient 1 is the first and only child of healthy, unrelated French-Canadian parents. Family history was negative, and mother's and father's body mass indices (weight in kilograms divided by height in meters squared) were 27.5 and 21.0, respectively. At 4.3 years, she presented in coma; blood glucose was 1.8 mmol/L, and there were abundant urine ketones. Serum sodium was 133 mmol/L (normal range 130–142 mmol/L), and potassium was 4.7 mmol/L (normal range 3.6–6.2 mmol/L). Serum cortisol was low (37 nmol/L; normal range 185–624 nmol/L) and plasma ACTH high (379 pmol/L; normal range 2–11 pmol/L). The patient was also obese (Supplemental Figure 1, published on The Endocrine Society's Journals Online web site at <http://jcem.endojournals.org>). The skin and mucosae were not hyper-

pigmented. The external genitalia were those of a normal prepubertal female. Treatment with glucocorticoids and mineralocorticoids was initiated and continued until results of this study were obtained. Sequencing of the genes known to cause ACTH resistance at the time, *MC2R* (8) and *MRAP* (5), gave normal results. On an ultrasound performed at age 6 years, the adrenals could not be visualized. Theelarche occurred at 9.2 years and menarche at 14.0 years, but there was no axillary or pubic hair development. The patient had red hair (like her mother, Figure 1A), a hallmark of *POMC* deficiency (12); *POMC* mutations were considered unlikely because of the high measured ACTH. However, after we established the molecular diagnosis of *POMC* deficiency, mineralocorticoid treatment was stopped. Electrolyte and renin levels have remained normal with glucocorticoid replacement alone.

Patient 2 is the first and only child of healthy, unrelated French-Canadian parents. Family history was negative, and mother's and father's body mass indices were 24.2 and 27.4, respectively. At 4 months, he presented a generalized seizure. Blood glucose was 0.7 mmol/L, serum sodium 130 mmol/L, and potassium 5.9 mmol/L. Serum cortisol was low (19 nmol/L), and plasma ACTH was high (195 pmol/L). A computerized tomographic scan showed normal adrenals. Treatment with glucocorticoids and mineralocorticoids was started. As in patient 1, obesity developed early (Supplemental Figure 1). The patient had red hair (Figure 1A). At 3 years, acute lymphocytic leukemia was diagnosed and treated with complete remission over the ensuing 14 years. Sequencing of *MC2R* and *MRAP* was normal (see Supplemental Methods).

### Whole exome and Sanger sequencing

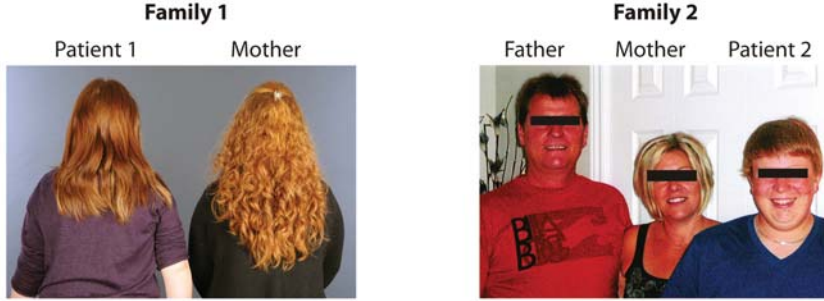
The study was approved by the Ste-Justine Research Ethics Board, and informed consents for exome and Sanger sequencing were obtained from patients and their parents. Blood collection and extraction were performed using standard methods. Whole exome sequencing was performed using the Agilent 50Mb SureSelect library, followed by sequencing on the Illumina HiSeq 2000 instrument. Variants were identified and annotated using two different pipelines, either NextGene (SoftGenetics, Inc, State College, Pennsylvania) or via a custom toolkit including BWA, Picard, Samtools, and Annovar. Variants were filtered using dbSNP and data from the 1000 Genomes project, and potential false positives were removed by comparison with a dataset of variants from exomes of other unrelated projects analyzed with our internal pipeline. Validation by classical Sanger sequencing was performed to confirm the mutation in patient 1 and her parents (see Supplemental Figure 2). Patient 2 and his parents were assessed by Sanger sequencing (see Supplemental Methods). Sanger sequences were analyzed using MutationSurveyor (SoftGenetics, Inc).

### Functional assays

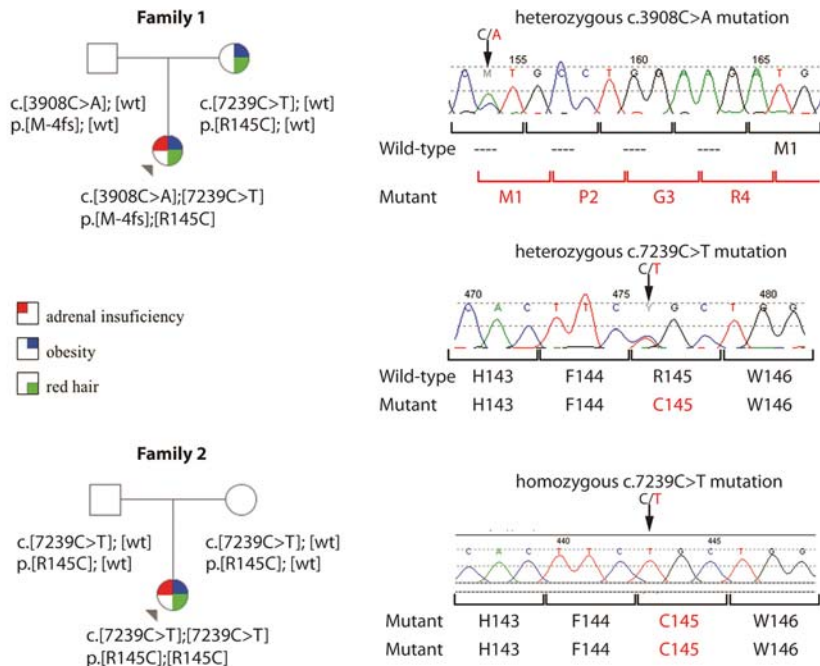
#### Cell culture

Four cell types were used. HEK293-human MC2R (hMC2R) and MRAP $\beta$ -transfected cells were generated as previously described (19, 20), using human MC2R cDNA kindly given by Dr Roger D. Cone (Vanderbilt University, Nashville, Tennessee). The Y1 mouse adrenocortical tumor cell line, which expresses only MC2R, was a gift of Dr Bernard Schimmer (Banting and Best Department of Medical Research and Department of Phar-

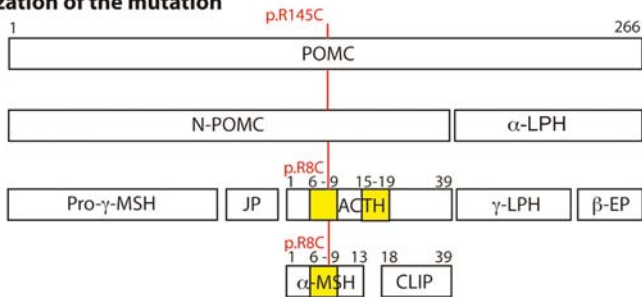
**A Clinical pictures**



**B Pedigree and patient's chromatograms**



**C Localization of the mutation**



**Figure 1.** Phenotype and genotype description. A, Pictures show the red hair of the patients. B, Pedigree with the clinical phenotype (adrenal insufficiency, red; obesity, blue; and red hair, green) and the genotypes for the two *POMC* mutation sites; chromatograms are of the *POMC* sequence for each mutation found in the patients. Each parent carried one of the mutations only (not shown). Nucleotide positions are based on the NCBI reference sequence number NG\_008997. C, Localization in the *POMC* protein and its various peptide cleavage products, of the missense mutation c.7239C>T, which corresponds to *POMC* p.R145C and to ACTH p.R8C. The yellow bands correspond to the amino acid sequences His<sup>6</sup>Phe<sup>7</sup>Arg<sup>8</sup>Trp<sup>9</sup> and Lys<sup>15</sup>Lys<sup>16</sup>Arg<sup>17</sup>Arg<sup>18</sup>Pro<sup>19</sup>. His<sup>6</sup>Phe<sup>7</sup>Arg<sup>8</sup>Trp<sup>9</sup> is important for binding and signal transduction of α-MSH. On the other hand, the His<sup>6</sup>Phe<sup>7</sup>Arg<sup>8</sup>Trp<sup>9</sup> sequence is important for ACTH signal transduction and, as our study suggests, for ACTH binding to MC2R. The Lys<sup>15</sup>Lys<sup>16</sup>Arg<sup>17</sup>Arg<sup>18</sup>Pro<sup>19</sup> is also important for ACTH binding to MC2R.

macology, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada). The M3 Cloudman cells (M3 cells), which express only MC1R, were purchased from American Type Culture Collection (Manassas, Virginia) and cultured as previously described (21). The wild-type (WT) hMC4R-expressing HEK293T stable cell line was generated as described previously (22) (see Supplemental Methods).

**Peptides**

Synthetic ACTH and α-MSH were obtained from GenScript (Piscataway, New Jersey) with either the WT sequence or the p.R8C variant (Supplemental Figures 3 and 4). For the α-MSH synthesis (either wild-type or mutant), the amino terminus was acetylated and carboxy terminus was amidated according to the in vivo biologically active forms of the α-MSH peptide (23, 24).

**cAMP measurements and binding assays**

Measurement of intracellular cAMP accumulation (for human and endogenous MC2R, MC1R, and MC4R) and binding (for human MC2R) was performed as described previously (19). For human MC4R and human MC1R, radioligand binding scintillation proximity assays were performed using membrane preparations from cell lines stably expressing hMC4R or membrane preparations from CHO-K1 cell lines expressing hMC1R (from PerkinElmer, Woodbridge, Ontario, Canada) with competing ligands at various concentrations (see Supplemental Methods).

**ACTH immunoradiometric assay**

WT and mutant synthetic p.R8C ACTH peptides were assayed using two different immunoassays. The first assay was an immunoradiometric assay (IRMA) employed by our clinical diagnostic laboratory (Cis-Bio International, Gif-sur-Yvette, France). The second automated immunoassay (Immulite 2000 ACTH; Siemens, Erlangen, Germany) was a solid-phase, two-site sequential chemiluminescent immunometric assay. These two assays were used to allow multiple measurements and to exclude assay-dependent interferences. Peptides were diluted in pooled heat-inactivated plasma (with undetectable ACTH concentration) to mimic physiological conditions. The diluted samples had theoretical concentrations ranging from 6.25 to 200 pmol/L to fit in the detection range of the Immulite 2000 ACTH assay (5–278 pmol/L), considering that the detection range of the Cis-Bio assay



was wider (4.2–450 pmol/L). The diluted samples were measured in duplicate (Cis-Bio) or in quadruplicate (Immulite), according to the manufacturers' instructions. The normal concentration curve was calibrated with the WT ACTH peptide (see Figure 4).

### Statistical analyses

For the cAMP measurements and binding assays, the results are presented as mean  $\pm$  SEM unless stated otherwise. GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, California) was used for establishing all nonlinear regressions for the determination of  $EC_{50}$ , SEM, and 95% confidence intervals (given as mean [lower limit, higher limit]) (see Supplemental Tables 1 and 2). For the immunoassays, the statistics program R was used for data analysis and graphics production (<http://www.R-project.org>). In Supplemental Table 3, results are presented as mean  $\pm$  SD.

## Results

### Molecular diagnosis

Patient 1 was previously screened in a clinical context for mutations in the known ACTH-resistance genes *MC2R* and *MRAP*, and both were negative for detectable pathogenic variants. After whole exome sequencing of DNA from patient 1, a novel heterozygous variant was observed in the coding region of the *POMC* gene. This missense mutation, encoding p.R145C in the full-length *POMC* protein (Figure 1, B and C), corresponds to p.R8C in the 39-amino-acid coding region of ACTH and in the 13-amino-acid  $\alpha$ -MSH subfragment of ACTH (Figure 1C). We also noted a second heterozygous variant in *POMC*, in the 5' untranslated region, 11 base pairs upstream of the open reading frame and out of frame with the presumptive initiating methionine codon (Figure 1B). Use of this new initiating codon would lead to production of a 73-amino-acid protein with no obvious similarity to any proteins encoded in the human genome. This same 5' untranslated region mutation has been reported in a homozygous patient with ACTH deficiency, obesity, red hair, and undetectable plasma ACTH (12), implying that the alternative translation start site is active and that this corresponds to a functional null *POMC* allele. Both *POMC* mutations were verified by Sanger sequencing (Figure 1B), which also showed that each parent was heterozygous for one of the mutations (Figure 1B). Thus, the patient is a compound heterozygote. Given the similar clinical presentation and ethnic background, patient 2 was assessed directly by Sanger sequencing for the 2 mutations seen in patient 1. Patient 2 was homozygous for the missense mutation encoding p.R145C in the *POMC* protein, and his parents were both heterozygous for this mutation (Figure 1B).

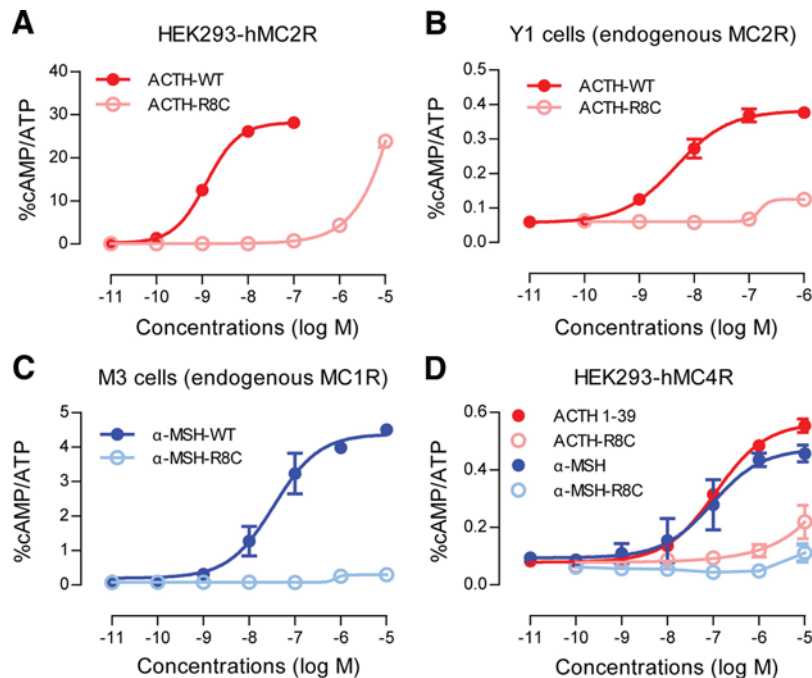
### Functional assays

Because the p.R145C missense mutation was included in a sequence common to ACTH and  $\alpha$ -MSH and because the patients, in addition to having adrenal insufficiency, were obese and had red hair, we tested the functional effects of the mutation not only on MC2R but also on MC4R and on MC1R signaling using WT or mutant synthetic peptides. ACTH-induced cAMP production and ligand binding was first assessed in HEK293 cells stably expressing functional hMC2R (19). As shown in Figure 2A, WT ACTH (ACTH 1–39) induced a dose-dependent increase in cAMP accumulation, which plateaued at the concentration of 100nM, with an  $EC_{50}$  value of 1.22 [0.96, 1.55] nM for ACTH (1–39) (Supplemental Table 1). In sharp contrast, the mutant peptide, ACTH-R8C, induced only a small increase over control with an  $EC_{50}$  value higher than 1 $\mu$ M (Figure 2A). Similar dose-response curves were obtained in the Y1 cell line expressing endogenous MC2R (Figure 2B). Binding studies confirmed that unlabeled ACTH (1–39) competed for [<sup>125</sup>I]ACTH binding to MC2R in a dose-dependent manner, with 50% inhibition ( $IC_{50}$ ) obtained at 5.71 [4.31, 7.57] nM, whereas the mutant peptide ACTH-R8C competed very poorly, with an  $IC_{50}$  greater than 10 $\mu$ M (Figure 3A and Supplemental Table 2).

The same experiments were conducted in MC1R-expressing cells (M3 Cloudman cells) and in hMC4R-expressing cells. In MC1R-expressing cells, the potent agonist, NDP (Nle4, D-Phe7)-MSH and  $\alpha$ -MSH-WT induced the expected increase in cAMP, whereas the mutant peptide  $\alpha$ -MSH-R8C had virtually no effect on cAMP production (Figure 2C and Supplemental Table 1). Binding studies on CHO-K1 membrane cell lines expressing hMC1R revealed, for both mutant peptides ACTH-R8C and  $\alpha$ -MSH-R8C, a reduction in binding to hMC1R of 97-fold and 3.8-fold, respectively, compared with WT peptides (Figure 3B and Supplemental Table 2). In the hMC4R-expressing cells, both mutant peptides  $\alpha$ -MSH-R8C and ACTH-R8C also failed to increase cAMP production through hMC4R in comparison with  $\alpha$ -MSH-WT and ACTH-WT (Figure 2D and Supplemental Table 1). This impairment in their capacity to activate hMC4R is due to their low binding to the receptor, the R8C mutation leading to a 909-fold reduction in binding relative to ACTH-WT ( $IC_{50}$  = 1500nM vs  $IC_{50}$  = 1.65nM, respectively) and an 86-fold reduction in binding relative to  $\alpha$ -MSH-WT ( $IC_{50}$  = 3000nM vs  $IC_{50}$  = 35nM, respectively) (Figure 3C and Supplemental Table 2).

### Immunoreactivity

Mutant ACTH peptide was tested directly using the same test kit employed by our clinical diagnostic labora-



**Figure 2.** In vitro cAMP-production assays. A–D, Comparative effects of ACTH-WT and  $\alpha$ -MSH-WT and of the mutant peptides ACTH-R8C and  $\alpha$ -MSH-R8C on cAMP production in MC2R-expressing cells (A and B), in MC1R-expressing cells (C), and in MC4R-expressing cells (D). Cells were incubated with increasing concentrations of peptides and cAMP was measured as described in Patients and Methods. The data are presented as percentage of intracellular cAMP accumulation over intracellular ATP (y-axis), which is determined by measuring the conversion of tritiated ATP into tritiated cAMP in the presence of increasing concentrations of tested peptides (x-axis). Results represent the mean  $\pm$  SEM of at least four experiments, each performed in duplicate or triplicate.

tory (Cis-Bio IRMA) as well as a second commercial kit (Immulite 2000 ACTH chemiluminescent immunometric assay). Both kits showed that the mutant peptide is immunoreactive, although response curves are nonlinear at higher peptide concentrations. The Cis-Bio IRMA gives similar concentrations for WT and mutant ACTH at 6.25 pmol/L, whereas measurements obtained by the Immulite 2000 ACTH chemiluminescent immunometric assay at 6.25 pmol/L (for WT and mutant ACTH) are too close to the detection limit of 5 pmol/L to be interpretable. At higher concentrations, and in the range measured in the patients' serum (at 12.5 pmol/L and above), the R8C-ACTH gradually lost its immunoreactivity when compared with WT ACTH but remained detectable by both immunoassays. The difference between mutant and WT ACTH increased from 20% at 12.5 pmol/L to more than 50% at 200 pmol/L; this gradually increasing difference was observed with the two different immunoassays used herein and was therefore not due to assay-specific interferences (Figure 4 and Supplemental Table 3).

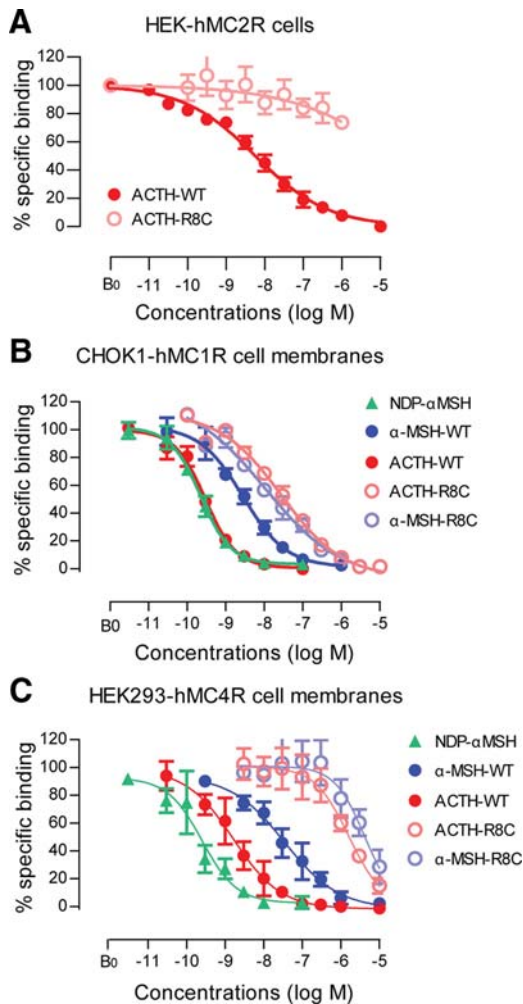
Together, these results strongly indicate that the two mutations in *POMC* are the cause of the patients' clinical presentation of glucocorticoid deficiency with high concentrations of immunoreactive ACTH.

## Discussion

Including the 3 cases initially described in 1998 (12), only 10 patients with the *POMC* deficiency syndrome have been reported, all with low or undetectable plasma ACTH (see Hung et al [14] and references therein). To our knowledge, our cases are thus the first with high serum ACTH due to the secretion of an immunoreactive but bioinactive ACTH molecule. In total, 28 *POMC* variants are annotated by the Human Gene Mutation Database (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>) (12, 13). They include missense and truncating mutations, insertion-deletions, and several regulatory variants including the  $-11$  variant seen in our patient and, in the homozygous state, in one of the patients described by Krude et al (12).

By contrast, the other mutation we detected in our two unrelated cases (*POMC* p.R145C, equivalent to ACTH p.R8C and  $\alpha$ -MSH p.R8C) is novel. It lies in the amino acid sequence HFRW (His<sup>6</sup>Phe<sup>7</sup>Arg<sup>8</sup>Trp<sup>9</sup>), which is essential for all melanocortins (including ACTH and  $\alpha$ -MSH) to activate their receptors' signaling (15–17). There are two reported mutations in the sequence encoding ACTH; both are heterozygous missense mutations in the adjacent *POMC* residues (*POMC* p.F144L [13] and *POMC* p.H143Q [25]), and both were found in the heterozygous state in probands with obesity but without adrenal insufficiency. The effect of these mutations engineered into ACTH was not tested. By contrast, our extensive characterization of the p.R8C mutant ACTH indicates that the amino acid at position p.8 is essential for ACTH and  $\alpha$ -MSH binding as well as cAMP induction with all receptors studied. Our experimental findings are consistent with the phenotype observed, ie, red hair, obesity, and glucocorticoid deficiency without adrenal hyperplasia (26).

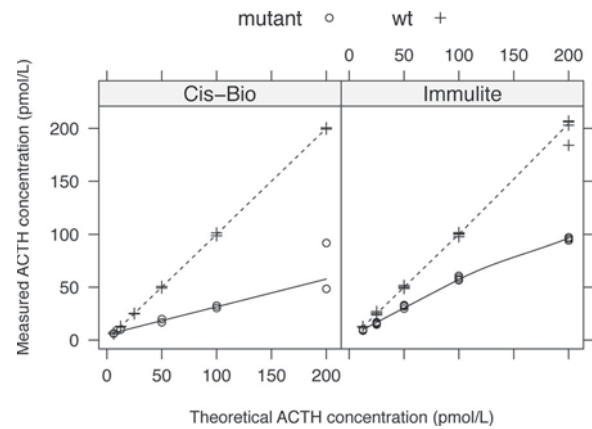
Despite the absence of overt symptoms of mineralocorticoid deficiency, our patients had been receiving both glucocorticoids and mineralocorticoids since the initial diagnosis of primary adrenal insufficiency. This is common practice given that patients with glucocorticoid deficiency often develop mineralocorticoid deficiency, with potentially life-threatening consequences. However, with the identification of likely causal mutations in *POMC*, such progression was considered unlikely and mineralocorticoid treatment was discontinued with close follow-up in patient 1 (the same is planned for patient 2). Patient 1 has



**Figure 3.** Binding competition assays: competition by WT and mutant peptides for radioligand ACTH and  $\alpha$ -MSH receptor binding. A–C, Stably HEK293-hMC2R-expressing cells (A), membrane preparations from CHO-K1 cell lines expressing hMC1R (B), and HEK293 cells stably expressing hMC4R (C) were used to assess displacement of [ $^{125}$ I]ACTH (1–39) by unlabeled ACTH-WT or mutant ACTH-R8C peptide (A) and of [ $^{125}$ I]NDP- $\alpha$ -MSH by unlabeled NDP- $\alpha$ -MSH,  $\alpha$ -MSH-WT, ACTH-WT, or mutant peptides  $\alpha$ -MSH-R8C and ACTHR8C (B and C).

remained well on her simplified therapeutic regimen and has maintained normal electrolytes and renin levels.

Although in our assays the p.R8C mutant ACTH peptide was immunoreactive, the response curves were highly nonlinear at higher peptide concentrations. This appears intrinsic to the peptide given similar results with two different test kits. Conceivably, the mutant peptide aggregates at high concentration. This suggests that the high ACTH concentration measured by our assay in the patients' plasma may in fact be even higher. The lack of recognition of the mutant ACTH at high concentrations could also suggest that the synthetic mutant peptide was misfolded; however, it is more likely that the N-terminal antibody in both assays binds to the site affected by the mutation.



**Figure 4.** Mutant ACTH immunoreactivity. The measured WT and mutant ACTH concentrations are depicted on the y-axis and compared with the theoretical concentration obtained by dilution reported on the x-axis. Two different immunoassays were used: Cis-Bio IRMA (left panel) (measurements performed in duplicate) and Immulite 2000 ACTH chemiluminescent immunometric assay (right panel) (measurements performed in quadruplicate). Each measurement is reported (○, mutant; +, WT) with a smooth curve fitted to the data.

Several studies, performed in rodents in the 1980s, concluded that the sequence HFRW is essential for binding and signaling by  $\alpha$ -MSH. In the case of ACTH, this sequence is essential for signaling only, whereas binding is dependent on another amino acid sequence, KKRRP (Lys<sup>15</sup>Lys<sup>16</sup>Arg<sup>17</sup>Arg<sup>18</sup>Pro<sup>19</sup>) (15–17). By contrast, our results clearly indicate that, in humans, the mutation at p.8 abrogates both ACTH binding to MC2R and signaling. This underlines the importance of fully characterizing the consequences of human mutations as reported here and of not relying on analogies with animal models (27, 28). Finally, our findings also highlight a problem with immunoassay-based diagnostics and demonstrate the value of genetic analysis.

## Acknowledgments

We thank the patients and their parents for their cooperation, Dr Sandra Woods for referring the first patient to us and for providing detailed clinical data, Janet Marcadier (Clinical Coordinator) and Chandree Beaulieu (Project Manager) for their contribution to the infrastructure of the FORGE Canada Consortium, and Drs Louise A. Metherell and Adrian J. L. Clark (Queen Mary University of London, London, UK) for sequencing MC2R and MRAP. We acknowledge the contribution of the high-throughput sequencing platform of the McGill University and Genome Québec Innovation Centre (Montréal, Canada).

The FORGE Canada Steering committee consists of K. Boycott (University of Ottawa), J. Friedman (University of British Columbia), J. Michaud (Université de Montréal), F. Bernier (University of Calgary), M. Brudno (University of Toronto), B. Fernandez (Memorial University), B. Knoppers (McGill Univer-



sity), M. Samuels (Université de Montréal), and S. Scherrer (University of Toronto).

Address all correspondence and requests for reprints to: Johnny Deladoëy, MD, PhD, Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine, 3175 Côte Sainte-Catherine, Montréal, Québec H3T 1C5, Canada.

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-82819 to N.G.-P. and MOP-11215 to M.B.) and by the Girafonds/Fondation du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Sainte-Justine (to J.D. and G.V.V.). FORGE is funded by the Government of Canada through the Canadian Institutes of Health Research, Genome Canada, Genome Quebec, Genome British Columbia, and the Ontario Genomics Institute (OGI-049). M.E.S. is supported by the Centre de Recherche du CHU Ste-Justine. N.G.-P. is a recipient of a Canada Research Chair in Endocrinology of the Adrenal Gland, M.B. is a recipient of a Canada Research Chair in Signal Transduction and Molecular Pharmacology, and J.D. is a Junior Scholar of the Fonds de Recherche du Québec–Santé (FRQ-S).

Disclosure Summary: All authors have nothing to disclose.

## References

1. Sewer MB, Waterman MR. ACTH modulation of transcription factors responsible for steroid hydroxylase gene expression in the adrenal cortex. *Microsc Res Tech*. 2003;61:300–307.
2. Forti FL, Dias MH, Armelin HA. ACTH receptor: ectopic expression, activity and signaling. *Mol Cell Biochem*. 2006;293:147–160.
3. Gallo-Payet N, Payet MD. Mechanism of action of ACTH: beyond cAMP. *Microsc Res Tech*. 2003;61:275–287.
4. Mountjoy KG, Robbins LS, Mortrud MT, Cone RD. The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science*. 1992;257:1248–1251.
5. Metherell LA, Chapple JP, Cooray S, et al. Mutations in MRAP, encoding a new interacting partner of the ACTH receptor, cause familial glucocorticoid deficiency type 2. *Nat Genet*. 2005;37:166–170.
6. Cooray SN, Clark AJ. Melanocortin receptors and their accessory proteins. *Mol Cell Endocrinol*. 2011;331:215–221.
7. Hinkle PM, Sebag JA. Structure and function of the melanocortin2 receptor accessory protein (MRAP). *Mol Cell Endocrinol*. 2009;300:25–31.
8. Clark AJ, Weber A. Adrenocorticotropin insensitivity syndromes. *Endocr Rev*. 1998;19:828–843.
9. Hughes CR, Guasti L, Meimaridou E, et al. MCM4 mutation causes adrenal failure, short stature, and natural killer cell deficiency in humans. *J Clin Invest*. 2012;122:814–820.
10. Gineau L, Cognet C, Kara N, et al. Partial MCM4 deficiency in patients with growth retardation, adrenal insufficiency, and natural killer cell deficiency. *J Clin Invest*. 2012;122:821–832.
11. Meimaridou E, Kowalczyk J, Guasti L, et al. Mutations in NNT encoding nicotinamide nucleotide transhydrogenase cause familial glucocorticoid deficiency. *Nat Genet*. 2012;44:740–742.
12. Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G, Gruters A. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet*. 1998;19:155–157.
13. Dubern B, Lubrano-Berthelier C, Mencarelli M, et al. Mutational analysis of the pro-opiomelanocortin gene in French obese children led to the identification of a novel deleterious heterozygous mutation located in the  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone domain. *Pediatr Res*. 2008;63:211–216.
14. Hung CN, Poon WT, Lee CY, Law CY, Chan AY. A case of early-onset obesity, hypocortisolism, and skin pigmentation problem due to a novel homozygous mutation in the proopiomelanocortin (POMC) gene in an Indian boy. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2012;25:175–179.
15. Schwyzer R. ACTH: a short introductory review. *Ann N Y Acad Sci*. 1977;297:3–26.
16. Dores RM, Baron AJ. Evolution of POMC: origin, phylogeny, post-translational processing, and the melanocortins. *Ann N Y Acad Sci*. 2011;1220:34–48.
17. Dores RM. Adrenocorticotrophic hormone, melanocyte-stimulating hormone, and the melanocortin receptors: revisiting the work of Robert Schwyzer: a thirty-year retrospective. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1163:93–100.
18. Cone RD. Studies on the physiological functions of the melanocortin system. *Endocr Rev*. 2006;27:736–749.
19. Roy S, Rached M, Gallo-Payet N. Differential regulation of the human adrenocorticotropin receptor [melanocortin-2 receptor (MC2R)] by human MC2R accessory protein isoforms  $\alpha$  and  $\beta$  in isogenic human embryonic kidney 293 cells. *Mol Endocrinol*. 2007;21:1656–1669.
20. Roy S, Perron B, Gallo-Payet N. Role of asparagine-linked glycosylation in cell surface expression and function of the human adrenocorticotropin receptor (melanocortin 2 receptor) in 293/FRT cells. *Endocrinology*. 2010;151:660–670.
21. Kilianova Z, Basora N, Kilian P, Payet MD, Gallo-Payet N. Human melanocortin receptor 2 expression and functionality: effects of protein kinase A and protein kinase C on desensitization and internalization. *Endocrinology*. 2006;147:2325–2337.
22. Rene P, Le Gouill C, Pogozeva ID, et al. Pharmacological chaperones restore function to MC4R mutants responsible for severe early-onset obesity. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010;335:520–532.
23. Irani BG, Holder JR, Todorovic A, et al. Progress in the development of melanocortin receptor selective ligands. *Curr Pharm Des*. 2004;10:3443–3479.
24. Smith AI, Funder JW. Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system, and peripheral tissues. *Endocr Rev*. 1988;9:159–179.
25. Lee YS, Challis BG, Thompson DA, et al. A POMC variant implicates  $\beta$ -melanocyte-stimulating hormone in the control of human energy balance. *Cell Metab*. 2006;3:135–140.
26. Biebermann H, Castaneda TR, van Landeghem F, et al. A role for  $\beta$ -melanocyte-stimulating hormone in human body-weight regulation. *Cell Metab*. 2006;3:141–146.
27. Costa JL, Bui S, Reed P, Dores RM, Brennan MB, Hochgeschwender U. Mutational analysis of evolutionarily conserved ACTH residues. *Gen Comp Endocrinol*. 2004;136:12–16.
28. Veo K, Reinick C, Liang L, Moser E, Angleson JK, Dores RM. Observations on the ligand selectivity of the melanocortin 2 receptor. *Gen Comp Endocrinol*. 2011;172:3–9.

## **Annexe II : Conserved Telomere Length in Human Ectopic Thyroids: An Argument Against Premature Differentiation Causing Arrested Migration**

Publié dans : Thyroid. 2015 Sep;25(9):1050-4.

Contributions :

J'ai réalisé les extractions des ADNs et ARNs des tissus thyroïdiens. Stéphanie Larrivée-Vanier a réalisé les expériences de qPCR et de RT-qPCR pour la mesure des télomères. Les Drs Nathalie Patey, Jean-Pierre Chanoine, Jean-Marc Vuissoz, Guy Van Vliet et Johnny Deladoëy ont participé à la rédaction et à la révision des versions ultérieures.

# Conserved Telomere Length in Human Ectopic Thyroids: An Argument Against Premature Differentiation Causing Arrested Migration

Stéphanie Larrivée-Vanier,<sup>1,2</sup> Fabien Magne,<sup>1,2</sup> Natalie Patey,<sup>3</sup> Jean-Pierre Chanoine,<sup>4</sup>  
Jean-Marc Vuissoz,<sup>5</sup> Guy Van Vliet,<sup>1,2</sup> and Johnny Deladoëy<sup>1,2</sup>

**Background:** In humans, the cause of arrested migration of the median thyroid anlage resulting in an ectopic sublingual gland is unknown. These ectopic glands have a normal follicular architecture but their thyrotropin-induced growth is insufficient, leading to congenital hypothyroidism in the vast majority of affected subjects. We hypothesized that arrested migration is due to premature differentiation [reflected by decreased telomere length (TL)], as observed in neural tube defects in mice.

**Methods:** Absolute TL and telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression was measured in four ectopic and six orthotopic thyroids. TL was measured by quantitative polymerase chain reaction of genomic DNA, whereas hTERT expression was measured by quantitative polymerase chain reaction of total RNA.

**Results:** The mean  $\pm$  standard deviation TL (in kilobases per diploid genome) was  $140.45 \pm 40.07$  in ectopic and  $97.50 \pm 30.48$  in orthotopic thyroids ( $p=0.12$ ). Expression of hTERT was quiescent in both ectopic and orthotopic thyroids.

**Conclusions:** Compared with orthotopic thyroids, TL shortening is not observed in ectopic thyroid tissues and, consequently, no compensatory hTERT expression was measured. This makes premature differentiation an unlikely cause of arrested migration and it suggests, indirectly, that ectopic thyroids are not at higher risk of cancer than orthotopic thyroids.

## Introduction

CONGENITAL HYPOTHYROIDISM (CH) AFFECTS one newborn in 2,500 (1,2) and is due to defects in the embryonic development of the thyroid (thyroid dysgenesis, TD) in the vast majority of cases. Among these defects, a round, oval, or dumbbell-shaped ectopic sublingual thyroid lacking lateral lobes is the most common (accounting for 50% of the children with CH in our jurisdiction), and in these cases, there is no thyroid in the normal position (3). The thyroid originates from two distinct anlagen: a median and a lateral anlage. The median anlage initially differentiates at the back of the tongue, at the level of the *foramen caecum*, and then dissociates from the pharyngeal floor. This process occurs between the fifth and the seventh week in the human embryo. The lateral anlagen originate from the fourth pharyngeal pouches before

fusing with the median anlage. It is generally assumed that ectopic sublingual thyroids result from arrested downward migration of the median anlage. Histologically, these ectopic thyroids have a normal follicular architecture and the CH, which is almost always associated, is thought to be due to a limitation to thyrotropin-stimulated growth of the smaller amount of tissue present (4).

The molecular causes of CH due to TD (CHTD) remain unclear. Germline mutation(s) in transcription factors implicated in the morphogenesis of the thyroid gland (*NKX2.1*, *PAX8*, *FOXE1*, and *GLIS3*) have been found in a small percentage of patients with CHTD and are mostly associated with other malformations (5–9). Furthermore, linkage studies have excluded these genes in some multiplex families with CHTD (10). This low prevalence of *germline* mutations, together with the high discordance rate (92%) between

<sup>1</sup>Endocrinology Service and Research Center and Departments of <sup>2</sup>Pediatrics and <sup>3</sup>Pathology, Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine, University of Montreal, Montreal, Canada.

<sup>4</sup>Endocrinology and Diabetes Unit, Department of Pediatrics, British Columbia Children's Hospital, University of British Columbia, Vancouver, Canada.

<sup>5</sup>Division of Pediatric Endocrinology, University Children's Hospital Basel (UKBB), University of Basel, Basel, Switzerland.

monozygotic (MZ) twins (11), underline the importance of looking for *somatic* alterations in the dysgenetic thyroid tissue itself.

Telomeres are specialized functional complexes that protect the ends of eukaryotic chromosomes from chromosomal fusion; hence, telomeres maintain genomic stability and cell replicative capacity (12). In somatic cells, telomere length is primarily maintained by telomerase, a ribonucleoprotein consisting of telomerase reverse transcriptase (TERT) and telomerase RNA (13). Immature undifferentiated cells show telomerase activity, which is lost upon differentiation into a mature specialized cell type (14). TERT overexpression extends the proliferative life span of normal human cells (15). Conversely, telomerase inhibition promotes an initial differentiation step of primate embryonic stem cells (16). Mice genetically deficient for the telomerase RNA (mTR<sup>-/-</sup>) present with telomeres shortening and neural tube defects (17). Cells derived from these mice show increased apoptosis and decreased viability (17). These observations support the concept that decreased telomere length (TL) below a given threshold might impair cell viability during organogenesis. TERT remains active in proliferating spermatocytes, reflecting the importance of maintaining telomere length in the germline (18). In normally differentiating tissues, it decreases rapidly after a peak at the blastocyst stage (19) to become quiescent in most healthy noncancerous somatic tissues. Consequently, TL is at its maximum early in life and shows a progressive decrease with ageing in human somatic tissues (20). Only cancerous cells express TERT to reestablish a TL sufficient to escape senescence and apoptosis (21).

Ectopic thyroids are well-differentiated tissues with normal follicular architecture (4,22) and express all key enzymes required for thyroid hormonogenesis (23). Therefore, the hypothyroidism of patients with ectopic thyroids is likely due to limited thyrotropin-stimulated growth of the smaller amount of tissue present (4). We hypothesized that accelerated differentiation could induce a premature arrest in migration and that this would be reflected in shorter telomere length (TL). We further investigated whether a compensatory increase of TERT expression is observed in ectopic thyroids, as in cancerous tissues which thereby escape senescence (21).

## Patients and Methods

### Patients and tissue samples

We obtained flash-frozen samples of ectopic thyroid tissue removed from four girls (aged 8, 10, 14, and 15 years) to alleviate local symptoms (i.e., dysphagia) or for cosmetic reasons. For controls, we used healthy thyroid tissue from three girls (aged 8, 12, and 16 years) and three boys (aged 5, 5, and 9 years) who were either operated on prophylactically (four RET-mutated individuals of known MEN2 families) or for papillary thyroid cancer (Table 1). This study was approved by the Sainte Justine Ethics committee.

### DNA and RNA extraction from tissue samples

DNA was extracted using a pureLink genomic DNA Mini kit (Life Technologies). RNA was extracted using a mini-RNeasy kit (Qiagen). RNA from HCT116 cells (human colon cancer cells) was used as positive control for human TERT (hTERT) transcript quantification.

TABLE 1. PATIENTS CHARACTERIZATION AND TISSUE PROVENANCE

Patient/ tissue	Diagnostic <sup>a</sup>	Age (years)	Sex <sup>b</sup>	TL (kb) <sup>c</sup>	RQ <sup>d</sup>
Ectopy 1	CH	10	F	102.5	0.024
Ectopy 2	CH	8	F	133.1	0.004
Ectopy 3	CH	15	F	129.2	0
Ectopy 4	CH	14	F	197.0	ND
Control 1	MTC	9	M	67.2	0
Control 2	MTC	5	M	116.0	ND
Control 3	MTC	8	F	66.1	0.007
Control 4	MTC	5	M	108.2	0.006
Control 5	PTC	12	F	84.1	0
Control 6	PTC	16	F	143.4	0.026

<sup>a</sup>CH, congenital hypothyroidism due to thyroid ectopy; MTC, medullary thyroid cancer; healthy thyroid tissue obtained from prophylactic thyroidectomy in RET-positive patients; PTC, papillary thyroid cancer; healthy contralateral thyroid tissue obtained from near total thyroidectomy.

<sup>b</sup>F, female; M, male.

<sup>c</sup>TL (kb), telomere length in kilobases per diploid genome.

<sup>d</sup>RQ, relative expression of human telomerase reverse transcriptase (hTERT). The hTERT expression in HCT116 colon cells serves as reference (set point of 1.0).

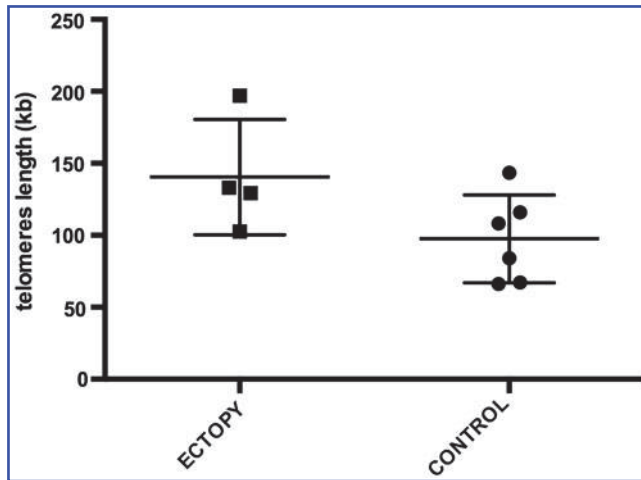
### Measurement of TL by quantitative polymerase chain reaction

Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was performed with 30 ng/ $\mu$ L genomic DNA using the ViiA 7 Real-Time PCR System (Life Technologies) as previously described (24–26). Briefly, telomere repeat copy number is determined relative to a single-copy number in all samples using standard curves. This ratio is proportional to the telomere length. The *36B4* gene, encoding acidic ribosomal phosphoprotein P0, has been used as a reference single-copy gene. Primers, conditions, and standard curves are provided in references (24–26).

### Measurement of hTERT mRNA by reverse transcription quantitative PCR

Total RNA was treated with DNase then reverse transcribed with random primers using the Maxima First Strand cDNA synthesis (Thermo Fisher), as described by the manufacturer. Before use, RT samples were diluted 1:5. Gene expression was determined using assays designed with the Universal Probe Library from Roche ([www.universalprobelibrary.com](http://www.universalprobelibrary.com)). For each qPCR assay, a standard curve was established to ensure an assay efficacy between 90% and 110%. Quantitative PCR reactions were performed using TaqMan Advanced Fast Universal PCR Master Mix (Life Technologies), 2  $\mu$ M of each primer, and 1  $\mu$ M of the corresponding UPL probe. The ViiA7 qPCR instrument (Life Technologies) was used to detect the amplification level and was programmed with an initial step of 20 seconds at 95°C, followed by 40 cycles of 1 second at 95°C and 20 seconds at 60°C. Relative expression ( $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$ ) was calculated using the Expression Suite software (Life Technologies), and normalization was done using *ACTB*. Primer sequences include the following: for *hTERT* (NM\_198253), TERT-Forward Primer: 5'-GCCTTCAAGAGCCACGTC-3' and TERT-Reverse Primer: 5'-CCACGAAGTGTGCG





**FIG. 1.** Telomere length (TL) in orthotopic and ectopic thyroid tissues. TL (reported in kilobases per diploid genome on the y-axis) in four ectopic thyroids (left) represented by a full square and in six orthotopic thyroids as control (right) represented by a full circle. The bar in the middle represents the mean, and the two adjacent upper and lower bars depict the standard deviations. The mean TL (mean  $\pm$  standard deviation) of ectopic thyroids was  $140.45 \pm 40.07$ , actually longer than that of orthotopic thyroids ( $97.50 \pm 30.48$ ), although the difference did not reach significance ( $p = 0.12$  [95%CI  $-16.7$  to  $102.6$ ]; two-tailed Welch's *t*-test).

ATGT-3'; for *ACTB* (NM\_001101.3), *ACTB*-Forward Primer: 5'-ATTGGCAATGAGCGGTTC-3' and *ACTB*-Reverse Primer: 5'-TGAAGGTAGTTTCGTGGATGC-3'. To allow a more direct inspection of these results on a 1.5% agarose gel, we also performed standard reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) with the same primers and amplification procedure except that only 37 cycles were performed instead of 40.

#### Statistical analysis

The data were first analyzed for normal distribution (Kolmogorov-Smirnov test) and homogeneity of variances (Bartlett's test), and group means were then analyzed using bilateral two sample *t*-test with Welch correction. Statistical analyses and graphs were performed using the software package R 3.1.2 (R Core Team) and the GraphPad Prism version 6.00 (GraphPad Software). *Post hoc* power analysis was performed with the G power software (27). To allow for

more detection of differences with a reasonable power, differences were considered significant at  $p < 0.1$ .

## Results

### *TL is not shorter in ectopic thyroids*

The mean TL (mean kilobases per diploid genome  $\pm$  standard deviation) of ectopic thyroids was  $140.45 \pm 40.07$ , actually even longer than that of orthotopic thyroids ( $97.50 \pm 30.48$ ), although the difference did not reach significance ( $p = 0.12$ ; [95%CI  $-16.7$  to  $102.6$ ]; two-tailed Welch's *t*-test) (Table 1 and Fig. 1). Given the hypothesis that TL is shorter in ectopic thyroids when compared with orthotopic thyroid, the analysis using one-tailed two sample *t*-test with Welch correction showed a consistent nonsignificant result ( $p = 0.98$ ; [95%CI  $-89$  to  $\infty$ ]). A linear model showed no significant effect of age on TL for all samples combined, and no significant interactions of age, sex, and diagnosis (ectopic thyroids vs. orthotopic controls) were observed.

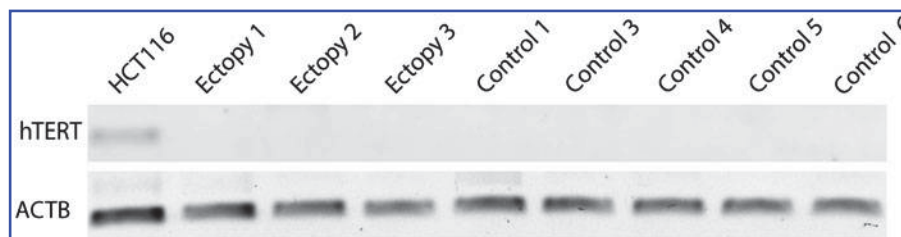
### *Transcription of hTERT is absent in ectopic and orthotopic thyroids*

Human TERT transcripts were not detectable in ectopic and orthotopic thyroids using standard (Fig. 2) and quantitative RT-PCR methods (Table 1; all RQs are less than 0.025), but hTERT transcripts were clearly detectable in HCT116 colon cancer cells (positive controls, Fig. 2) and served as reference (value of 1) for the RQ calculation (Table 1).

## Discussion

Telomere shortening can lead to dysfunctional telomeres, chromosomal instability and apoptosis (28). Apoptosis is a physiological process that starts early during development. In animal models, congenital neural tube defects are linked to reduced telomerase activity and decreased TL (17). TL is tissue-specific even if a high correlation exists between tissues of individuals matched for age and shows a continuous decrease with age (20). A marked synchrony exists in average TL between embryonic human tissues, but this synchrony is lost during extrauterine life, probably as a result of different proliferative programs (28,29). Therefore, to assess the biologically plausible association between reduced telomere length (TL) and congenital malformations, we used ectopic and orthotopic thyroids obtained from children of similar age.

Herein, we show that in both ectopic and orthotopic control thyroids (i) TL is similar and even tends to be longer in



**FIG. 2.** Lack of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcripts in orthotopic and ectopic thyroid tissues. Absent signal of hTERT transcripts with the standard semiquantitative RT-PCR method (1.5% agarose gel, upper panel) are consistent with the results of the quantitative RT-PCR method, which are expressed in relative expression (RQ) to the control (in HCT116 colon cells); RQ values are listed in the last column of Table 1. ACTB, actin beta.

ectopic thyroids, and (ii) *hTERT* expression is quiescent. Of note, all control tissues were healthy thyroid tissue (prophylactic thyroidectomy for MTC and healthy contralateral tissue of unilateral PTC). These findings extend those of our previous study (23) and are consistent with the histological aspect of ectopic thyroids, which shows a well-differentiated tissue with normal follicular architecture (4). Telomerase inhibition promotes the initial steps of cell differentiation of primate embryonic stem cells (16) and, conversely, the induced differentiation of immortal cells inhibits telomerase activity (14). Consequently, quiescent *hTERT* expression is expected in differentiated non-proliferative tissue. Specifically, in papillary thyroid cancer, *hTERT* is expressed (30) and TL is decreased. These results suggest that ectopic thyroids are not more prone to malignant transformation compared with orthotopic thyroids, but the following points hamper any firm conclusion: (i) there is an obvious report bias of cancers in ectopic thyroids because of their “curiosity value” (with the risk of overestimating the risk) (31); (ii) the majority of reports refers to ectopic thyroid tissues in the thyroglossal duct with the presence of normal thyroid gland *in situ* (32), which is different from thyroid cancer arising in a congenital ectopic thyroid; and unfortunately, (iii) the recent US epidemiological survey of thyroid cancer (33) does not contain information about the anatomic location of the cancerous glands (Louise Davies, personal communication).

TL is influenced by environmental cues (34,35) and a conserved TL is also an additional argument against environmental causes of CHTD, consistent with the lack of a seasonal impact on the occurrence of ectopic thyroids (1). TL in blood DNA is more similar in MZ than in DZ twins (36), which is a further argument for a somatic event accounting for discordance of MZ twins for CHTD (11).

This study has some limitations. First, TL and *hTERT* expression profiles in tissue collected and analyzed postnatally may not reflect the dynamics of embryonic expression. Second, the sample number is small, but this is inherent to the exceedingly exceptional indication for surgically removing ectopic and orthotopic thyroid tissue in children. Therefore, our study does not have enough power to reach a firm conclusion, and the fact that zero is contained in the wide 95%CI of the difference between the means indicates that we cannot rule out the possibility that there is no difference (37), but we can at least conclude that it would be unlikely that TL in ectopic thyroids is shorter than in orthotopic thyroids.

## Conclusion

TL shortening—the hallmark of accelerated cell senescence and differentiation—is not observed in ectopic compared with orthotopic thyroid, and *hTERT* is not expressed in either tissue. Ectopic thyroids have a molecular profile comparable to that of normal non-tumoral thyroids (38), which differs from that seen in thyroid cancer. Our findings suggest that TL shortening is unlikely to cause arrested migration and, indirectly, that ectopic thyroids are not at higher risk for thyroid cancer than orthotopic thyroids (30,39).

## Acknowledgments

We thank the patients and their parents for their cooperation. We thank Raphaëlle Lambert (Institut de Recherche en

Immunologie et Cancérologie, Université de Montréal) for technical assistance.

This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR-MOP-130390 to J.D.); Research in pediatric thyroid diseases at Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Sainte-Justine is supported by the Girafonds/Fondation du CHU Sainte-Justine (to J.D. and G.V.V.).

## Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

## References

1. Deladoey J, Belanger N, Van Vliet G 2007 Random variability in congenital hypothyroidism from thyroid dysgenesis over 16 years in Quebec. *J Clin Endocrinol Metab* **92**:3158–3161.
2. Deladoey J, Ruel J, Giguere Y, Van Vliet G 2011 Is the incidence of congenital hypothyroidism really increasing? A 20-year retrospective population-based study in Quebec. *J Clin Endocrinol Metab* **96**:2422–2429.
3. Wildi-Runge S, Stoppa-Vaucher S, Lambert R, Turpin S, Van Vliet G, Deladoey J 2012 A high prevalence of dual thyroid ectopy in congenital hypothyroidism: evidence for insufficient signaling gradients during embryonic thyroid migration or for the polyclonal nature of the thyroid gland? *J Clin Endocrinol Metab* **97**:E978–981.
4. Stoppa-Vaucher S, Lapointe A, Turpin S, Rydlewski C, Vassart G, Deladoey J 2010 Ectopic thyroid gland causing dysphonia: imaging and molecular studies. *J Clin Endocrinol Metab* **95**:4509–4510.
5. Krude H, Schutz B, Biebermann H, von Moers A, Schnabel D, Neitzel H, Tonnies H, Weise D, Lafferty A, Schwarz S, DeFelice M, von Deimling A, van Landeghem F, DiLauro R, Gruters A 2002 Choreoathetosis, hypothyroidism, and pulmonary alterations due to human NKX2-1 haploinsufficiency. *J Clin Invest* **109**:475–480.
6. Clifton-Bligh RJ, Wentworth JM, Heinz P, Crisp MS, John R, Lazarus JH, Ludgate M, Chatterjee VK 1998 Mutation of the gene encoding human TTF-2 associated with thyroid agenesis, cleft palate and choanal atresia. *Nat Genet* **19**:399–401.
7. Castanet M, Park SM, Smith A, Bost M, Leger J, Lyonnet S, Pelet A, Czernichow P, Chatterjee K, Polak M 2002 A novel loss-of-function mutation in TTF-2 is associated with congenital hypothyroidism, thyroid agenesis and cleft palate. *Hum Mol Genet* **11**:2051–2059.
8. Macchia PE, Lapi P, Krude H, Pirro MT, Missero C, Chiovato L, Souabni A, Baserga M, Tassi V, Pinchera A, Fenzi G, Gruters A, Busslinger M, Di Lauro R 1998 PAX8 mutations associated with congenital hypothyroidism caused by thyroid dysgenesis. *Nat Genet* **19**:83–86.
9. Narumi S, Muroya K, Asakura Y, Adachi M, Hasegawa T 2010 Transcription factor mutations and congenital hypothyroidism: systematic genetic screening of a population-based cohort of Japanese patients. *J Clin Endocrinol Metab* **95**:1981–1985.
10. Castanet M, Sura-Trueba S, Chauty A, Carre A, de Roux N, Heath S, Leger J, Lyonnet S, Czernichow P, Polak M 2005 Linkage and mutational analysis of familial thyroid dysgenesis demonstrate genetic heterogeneity implicating novel genes. *Eur J Hum Genet* **13**:232–239.
11. Perry R, Heinrichs C, Bourdoux P, Khoury K, Szots F, Dussault JH, Vassart G, Van Vliet G 2002 Discordance of

- monozygotic twins for thyroid dysgenesis: implications for screening and for molecular pathophysiology. *J Clin Endocrinol Metab* **87**:4072–4077.
12. Blackburn EH 2001 Switching and signaling at the telomere. *Cell* **106**:661–673.
  13. Greider CW, Blackburn EH 1985 Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* **43**:405–413.
  14. Sharma HW, Sokoloski JA, Perez JR, Maltese JY, Sartorelli AC, Stein CA, Nichols G, Khaled Z, Telang NT, Narayanan R 1995 Differentiation of immortal cells inhibits telomerase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**:12343–12346.
  15. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE 1998 Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* **279**:349–352.
  16. Maeda T, Kurita R, Yokoo T, Tani K, Makino N 2011 Telomerase inhibition promotes an initial step of cell differentiation of primate embryonic stem cell. *Biochem Biophys Res Commun* **407**:491–494.
  17. Herrera E, Samper E, Blasco MA 1999 Telomere shortening in mTR<sup>-/-</sup> embryos is associated with failure to close the neural tube. *EMBO J* **18**:1172–1181.
  18. Forsyth NR, Wright WE, Shay JW 2002 Telomerase and differentiation in multicellular organisms: turn it off, turn it on, and turn it off again. *Differentiation* **69**:188–197.
  19. Turner S, Wong HP, Rai J, Hartshorne GM 2010 Telomere lengths in human oocytes, cleavage stage embryos and blastocysts. *Mol Hum Reprod* **16**:685–694.
  20. Daniali L, Benetos A, Susser E, Kark JD, Labat C, Kimura M, Desai K, Granick M, Aviv A 2013 Telomeres shorten at equivalent rates in somatic tissues of adults. *Nat Commun* **4**:1597.
  21. Bernardes de Jesus B, Blasco MA 2013 Telomerase at the intersection of cancer and aging. *Trends Genet* **29**:513–520.
  22. Vandernoot I, Sartelet H, Abu-Khudir R, Chanoine JP, Deladoey J 2012 Evidence for calcitonin-producing cells in human lingual thyroids. *J Clin Endocrinol Metab* **97**:951–956.
  23. Abu-Khudir R, Paquette J, Lefort A, Libert F, Chanoine JP, Vassart G, Deladoey J 2010 Transcriptome, methylome and genomic variations analysis of ectopic thyroid glands. *PLoS One* **5**:e13420.
  24. Cawthon RM 2002 Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res* **30**:e47.
  25. O'Callaghan N, Dhillon V, Thomas P, Fenech M 2008 A quantitative real-time PCR method for absolute telomere length. *BioTechniques* **44**:807–809.
  26. O'Callaghan NJ, Fenech M 2011 A quantitative PCR method for measuring absolute telomere length. *Biol Proced Online* **13**:3.
  27. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A 2007 G\*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods* **39**:175–191.
  28. Bekaert S, Derradji H, Baatout S 2004 Telomere biology in mammalian germ cells and during development. *Dev Biol* **274**:15–30.
  29. Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW 1996 Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet* **18**:173–179.
  30. Capezzone M, Cantara S, Marchisotta S, Busonero G, Formichi C, Benigni M, Capuano S, Toti P, Pazaitou-Panayiotou K, Caruso G, Carli AF, Palumbo N, Pacini F 2011 Telomere length in neoplastic and nonneoplastic tissues of patients with familial and sporadic papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* **96**:E1852–1856.
  31. Sevinc AI, Unek T, Canda AE, Guray M, Kocdor MA, Saydam S, Harmancioglu O 2010 Papillary carcinoma arising in subhyoid ectopic thyroid gland with no orthotopic thyroid tissue. *Am J Surg* **200**:e17–18.
  32. Carter Y, Yeutter N, Mazeh H 2014 Thyroglossal duct remnant carcinoma: beyond the Sistrunk procedure. *Surg Oncol* **23**:161–166.
  33. Davies L, Welch HG 2014 Current thyroid cancer trends in the United States. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* **140**:317–322.
  34. Romano GH, Harari Y, Yehuda T, Podhorzer A, Rubinstein L, Shamir R, Gottlieb A, Silberberg Y, Pe'er D, Ruppin E, Sharan R, Kupiec M 2013 Environmental stresses disrupt telomere length homeostasis. *PLoS Genet* **9**:e1003721.
  35. Aiken CE, Tarry-Adkins JL, Ozanne SE 2013 Suboptimal nutrition in utero causes DNA damage and accelerated aging of the female reproductive tract. *Faseb J* **27**:3959–3965.
  36. Broer L, Codd V, Nyholt DR, Deelen J, Mangino M, Willemsen G, Albrecht E, Amin N, Beekman M, de Geus EJ, Henders A, Nelson CP, Steves CJ, Wright MJ, de Craen AJ, Isaacs A, Matthews M, Moayyeri A, Montgomery GW, Oostra BA, Vink JM, Spector TD, Slagboom PE, Martin NG, Samani NJ, van Duijn CM, Boomsma DI 2013 Meta-analysis of telomere length in 19,713 subjects reveals high heritability, stronger maternal inheritance and a paternal age effect. *Eur J Hum Genet* **21**:1163–1168.
  37. Levine M, Ensom MH 2001 Post hoc power analysis: an idea whose time has passed? *Pharmacotherapy* **21**:405–409.
  38. Haugen BR, Nawaz S, Markham N, Hashizumi T, Shroyer AL, Werness B, Shroyer KR 1997 Telomerase activity in benign and malignant thyroid tumors. *Thyroid* **7**:337–342.
  39. Wang N, Xu D, Sofiadis A, Hoog A, Vukojevic V, Backdahl M, Zedenius J, Larsson C 2014 Telomerase-dependent and independent telomere maintenance and its clinical implications in medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* **99**:E1571–1579.

Address correspondence to:  
*Johnny Deladoëy, MD, PhD*  
*Centre de Recherche*  
*Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine*  
*3175 Côte Sainte-Catherine*  
*Montréal QC, H3T 1C5*  
*Canada*

## Bibliographie

1. Policeni BA, Smoker WR, Reede DL: **Anatomy and embryology of the thyroid and parathyroid glands**. *Seminars in ultrasound, CT, and MR* 2012, **33**(2):104-114.
2. Vlaeminck-Guillem V: **Structure et physiologie thyroïdiennes**. *Endocrinologie-Nutrition* 2011.
3. Fernandez LP, Lopez-Marquez A, Santisteban P: **Thyroid transcription factors in development, differentiation and disease**. *Nature reviews Endocrinology* 2014.
4. Fagman H, Nilsson M: **Morphogenesis of the thyroid gland**. *Molecular and cellular endocrinology* 2010, **323**(1):35-54.
5. De Felice M, Di Lauro R: **Thyroid development and its disorders: genetics and molecular mechanisms**. *Endocrine reviews* 2004, **25**(5):722-746.
6. Nilsson M, Fagman H: **Mechanisms of thyroid development and dysgenesis: an analysis based on developmental stages and concurrent embryonic anatomy**. *Current topics in developmental biology* 2013, **106**:123-170.
7. Gillam MP, Kopp P: **Genetic regulation of thyroid development**. *Current opinion in pediatrics* 2001, **13**(4):358-363.
8. Vandernoot I, Sartelet H, Abu-Khudir R, Chanoine JP, Deladoey J: **Evidence for calcitonin-producing cells in human lingual thyroids**. *J Clin Endocrinol Metab* 2012, **97**(3):951-956.
9. Johansson E, Andersson L, Ornros J, Carlsson T, Ingeson-Carlsson C, Liang S, Dahlberg J, Jansson S, Parrillo L, Zoppoli P *et al*: **Revising the embryonic origin of thyroid C cells in mice and humans**. *Development* 2015, **142**(20):3519-3528.
10. Nussey S, Whitehead S. In: *Endocrinology: An Integrated Approach*. edn. Oxford; 2001.
11. Park SM, Chatterjee VK: **Genetics of congenital hypothyroidism**. *Journal of medical genetics* 2005, **42**(5):379-389.
12. Gilbert ME, Rovet J, Chen Z, Koibuchi N: **Developmental thyroid hormone disruption: prevalence, environmental contaminants and**



- neurodevelopmental consequences.** *Neurotoxicology* 2012, **33**(4):842-852.
13. Alkemade A: **Thyroid hormone and the developing hypothalamus.** *Frontiers in neuroanatomy* 2015, **9**:15.
  14. Brent GA: **Mechanisms of thyroid hormone action.** *The Journal of clinical investigation* 2012, **122**(9):3035-3043.
  15. Pascual A, Aranda A: **Thyroid hormone receptors, cell growth and differentiation.** *Biochimica et biophysica acta* 2013, **1830**(7):3908-3916.
  16. Campbell PN, Doniach D, Hudson RV, Roitt IM: **Auto-antibodies in Hashimoto's disease (lymphadenoid goitre).** *Lancet* 1956, **271**(6947):820-821.
  17. Li Y, Nishihara E, Kakudo K: **Hashimoto's thyroiditis: old concepts and new insights.** *Current opinion in rheumatology* 2011, **23**(1):102-107.
  18. Burek CL, Rose NR: **Autoimmune thyroiditis and ROS.** *Autoimmunity reviews* 2008, **7**(7):530-537.
  19. Wang C, Crapo LM: **The epidemiology of thyroid disease and implications for screening.** *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 1997, **26**(1):189-218.
  20. Kakudo K, Li Y, Hirokawa M, Ozaki T: **Diagnosis of Hashimoto's thyroiditis and IgG4-related sclerosing disease.** *Pathology international* 2011, **61**(4):175-183.
  21. Weetman AP: **Autoimmune thyroid disease.** *Autoimmunity* 2004, **37**(4):337-340.
  22. Greene JN: **Subacute thyroiditis.** *The American journal of medicine* 1971, **51**(1):97-108.
  23. Pearce EN, Farwell AP, Braverman LE: **Thyroiditis.** *N Engl J Med* 2003, **348**(26):2646-2655.
  24. Ogawa E, Katsushima Y, Fujiwara I, Inuma K: **Subacute thyroiditis in children: patient report and review of the literature.** *Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM* 2003, **16**(6):897-900.
  25. Engkakul P, Mahachoklertwattana P, Poomthavorn P: **Eponym : de Quervain thyroiditis.** *European journal of pediatrics* 2011, **170**(4):427-431.

26. Bindra A, Braunstein GD: **Thyroiditis**. *American family physician* 2006, **73**(10):1769-1776.
27. Radwin LS, Michelson JP, et al.: **End results in treatment of congenital hypothyroidism; follow-up study of physical, mental and behavioral development**. *Am J Dis Child* 1949, **78**(6):821-843.
28. Gruters A, Krude H: **Detection and treatment of congenital hypothyroidism**. *Nature reviews Endocrinology* 2012, **8**(2):104-113.
29. Carranza D, Van Vliet G, Polak M: **[Congenital hypothyroidism]**. *Annales d'endocrinologie* 2006, **67**(4):295-302.
30. Dimitropoulos A, Molinari L, Etter K, Torresani T, Lang-Muritano M, Jenni OG, Largo RH, Latal B: **Children with congenital hypothyroidism: long-term intellectual outcome after early high-dose treatment**. *Pediatric research* 2009, **65**(2):242-248.
31. Stoppa-Vaucher S, Van Vliet G, Deladoey J: **Variation by ethnicity in the prevalence of congenital hypothyroidism due to thyroid dysgenesis**. *Thyroid* 2011, **21**(1):13-18.
32. Rastogi MV, LaFranchi SH: **Congenital hypothyroidism**. *Orphanet journal of rare diseases* 2010, **5**:17.
33. Fisher DA: **Second International Conference on Neonatal Thyroid Screening: progress report**. *The Journal of pediatrics* 1983, **102**(5):653-654.
34. Castanet M, Polak M, Bonaiti-Pellie C, Lyonnet S, Czernichow P, Leger J: **Nineteen years of national screening for congenital hypothyroidism: familial cases with thyroid dysgenesis suggest the involvement of genetic factors**. *J Clin Endocrinol Metab* 2001, **86**(5):2009-2014.
35. Narumi S, Muroya K, Asakura Y, Adachi M, Hasegawa T: **Transcription factor mutations and congenital hypothyroidism: systematic genetic screening of a population-based cohort of Japanese patients**. *J Clin Endocrinol Metab* 2010, **95**(4):1981-1985.
36. Narumi S, Muroya K, Abe Y, Yasui M, Asakura Y, Adachi M, Hasegawa T: **TSHR mutations as a cause of congenital hypothyroidism in Japan: a population-based genetic epidemiology study**. *J Clin Endocrinol Metab* 2009, **94**(4):1317-1323.
37. Macchia PE, Lapi P, Krude H, Pirro MT, Missero C, Chiovato L, Souabni A, Baserga M, Tassi V, Pinchera A *et al*: **PAX8 mutations associated**

- with congenital hypothyroidism caused by thyroid dysgenesis. *Nat Genet* 1998, **19**(1):83-86.**
38. Clifton-Bligh RJ, Wentworth JM, Heinz P, Crisp MS, John R, Lazarus JH, Ludgate M, Chatterjee VK: **Mutation of the gene encoding human TTF-2 associated with thyroid agenesis, cleft palate and choanal atresia.** *Nat Genet* 1998, **19**(4):399-401.
39. Krude H, Schutz B, Biebermann H, von Moers A, Schnabel D, Neitzel H, Tonnies H, Weise D, Lafferty A, Schwarz S *et al*: **Choreoathetosis, hypothyroidism, and pulmonary alterations due to human NKX2-1 haploinsufficiency.** *The Journal of clinical investigation* 2002, **109**(4):475-480.
40. Dentice M, Cordeddu V, Rosica A, Ferrara AM, Santarpia L, Salvatore D, Chiovato L, Perri A, Moschini L, Fazzini C *et al*: **Missense mutation in the transcription factor NKX2-5: a novel molecular event in the pathogenesis of thyroid dysgenesis.** *J Clin Endocrinol Metab* 2006, **91**(4):1428-1433.
41. Castanet M, Marinovic D, Polak M, Leger J: **Epidemiology of thyroid dysgenesis: the familial component.** *Horm Res Paediatr* 2010, **73**(4):231-237.
42. Szinnai G: **Genetics of normal and abnormal thyroid development in humans.** *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism* 2014, **28**(2):133-150.
43. Abdelhak S, Kalatzis V, Heilig R, Compain S, Samson D, Vincent C, Levi-Acobas F, Cruaud C, Le Merrer M, Mathieu M *et al*: **Clustering of mutations responsible for branchio-oto-renal (BOR) syndrome in the eyes absent homologous region (eyaHR) of EYA1.** *Human molecular genetics* 1997, **6**(13):2247-2255.
44. Al Taji E, Biebermann H, Limanova Z, Hnikova O, Zikmund J, Dame C, Gruters A, Lebl J, Krude H: **Screening for mutations in transcription factors in a Czech cohort of 170 patients with congenital and early-onset hypothyroidism: identification of a novel PAX8 mutation in dominantly inherited early-onset non-autoimmune hypothyroidism.** *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 2007, **156**(5):521-529.
45. Ferrara AM, Rossi G, Zampella E, Di Candia S, Pagliara V, Nettore IC, Capalbo D, De Sanctis L, Baserga M, Salerno MC *et al*: **Screening for mutations in the ISL1 gene in patients with thyroid dysgenesis.** *Journal of endocrinological investigation* 2011, **34**(7):e149-152.

46. Devriendt K, Vanhole C, Matthijs G, de Zegher F: **Deletion of thyroid transcription factor-1 gene in an infant with neonatal thyroid dysfunction and respiratory failure.** *N Engl J Med* 1998, **338**(18):1317-1318.
47. Deladoey J: **Congenital Hypothyroidism due to Thyroid Dysgenesis: From Epidemiology to Molecular Mechanisms.** In: *A New Look at Hypothyroidism.* edn. Edited by (Ed.) DDS; 2012: 229-242.
48. Bamforth JS, Hughes IA, Lazarus JH, Weaver CM, Harper PS: **Congenital hypothyroidism, spiky hair, and cleft palate.** *Journal of medical genetics* 1989, **26**(1):49-51.
49. Senee V, Chelala C, Duchatelet S, Feng D, Blanc H, Cossec JC, Charon C, Nicolino M, Boileau P, Cavener DR *et al*: **Mutations in GLIS3 are responsible for a rare syndrome with neonatal diabetes mellitus and congenital hypothyroidism.** *Nat Genet* 2006, **38**(6):682-687.
50. Choi WI, Kim JH, Yoo HW, Oh SH: **A family with Townes-Brocks syndrome with congenital hypothyroidism and a novel mutation of the SALL1 gene.** *Korean journal of pediatrics* 2010, **53**(12):1018-1021.
51. Fagman H, Liao J, Westerlund J, Andersson L, Morrow BE, Nilsson M: **The 22q11 deletion syndrome candidate gene Tbx1 determines thyroid size and positioning.** *Human molecular genetics* 2007, **16**(3):276-285.
52. Zenker M, Mayerle J, Lerch MM, Tagariello A, Zerres K, Durie PR, Beier M, Hulskamp G, Guzman C, Rehder H *et al*: **Deficiency of UBR1, a ubiquitin ligase of the N-end rule pathway, causes pancreatic dysfunction, malformations and mental retardation (Johanson-Blizzard syndrome).** *Nat Genet* 2005, **37**(12):1345-1350.
53. Opitz R, Hitz MP, Vandernoot I, Trubiroha A, Abu-Khudir R, Samuels M, Desilets V, Costagliola S, Andelfinger G, Deladoey J: **Functional zebrafish studies based on human genotyping point to netrin-1 as a link between aberrant cardiovascular development and thyroid dysgenesis.** *Endocrinology* 2015, **156**(1):377-388.
54. Bachiller D, Klingensmith J, Shneyder N, Tran U, Anderson R, Rossant J, De Robertis EM: **The role of chordin/Bmp signals in mammalian pharyngeal development and DiGeorge syndrome.** *Development* 2003, **130**(15):3567-3578.
55. Kurihara Y, Kurihara H, Maemura K, Kuwaki T, Kumada M, Yazaki Y: **Impaired development of the thyroid and thymus in endothelin-1 knockout mice.** *Journal of cardiovascular pharmacology* 1995, **26** Suppl 3:S13-16.

56. Xu PX, Zheng W, Laclef C, Maire P, Maas RL, Peters H, Xu X: **Eya1 is required for the morphogenesis of mammalian thymus, parathyroid and thyroid.** *Development* 2002, **129**(13):3033-3044.
57. Ohuchi H, Hori Y, Yamasaki M, Harada H, Sekine K, Kato S, Itoh N: **FGF10 acts as a major ligand for FGF receptor 2 IIIb in mouse multi-organ development.** *Biochemical and biophysical research communications* 2000, **277**(3):643-649.
58. Cooley MA, Kern CB, Fresco VM, Wessels A, Thompson RP, McQuinn TC, Twal WO, Mjaatvedt CH, Drake CJ, Argraves WS: **Fibulin-1 is required for morphogenesis of neural crest-derived structures.** *Developmental biology* 2008, **319**(2):336-345.
59. De Felice M, Ovitt C, Biffali E, Rodriguez-Mallon A, Arra C, Anastassiadis K, Macchia PE, Mattei MG, Mariano A, Scholer H *et al*: **A mouse model for hereditary thyroid dysgenesis and cleft palate.** *Nat Genet* 1998, **19**(4):395-398.
60. Kameda Y, Ito M, Nishimaki T, Gotoh N: **FRS2alpha is required for the separation, migration, and survival of pharyngeal-endoderm derived organs including thyroid, ultimobranchial body, parathyroid, and thymus.** *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 2009, **238**(3):503-513.
61. Carre A, Rachdi L, Tron E, Richard B, Castanet M, Schlumberger M, Bidart JM, Szinnai G, Polak M: **Hes1 is required for appropriate morphogenesis and differentiation during mouse thyroid gland development.** *PLoS one* 2011, **6**(2):e16752.
62. Martinez Barbera JP, Clements M, Thomas P, Rodriguez T, Meloy D, Kioussis D, Beddington RS: **The homeobox gene Hex is required in definitive endodermal tissues for normal forebrain, liver and thyroid formation.** *Development* 2000, **127**(11):2433-2445.
63. Manley NR, Capecchi MR: **The role of Hoxa-3 in mouse thymus and thyroid development.** *Development* 1995, **121**(7):1989-2003.
64. Manley NR, Capecchi MR: **Hox group 3 paralogs regulate the development and migration of the thymus, thyroid, and parathyroid glands.** *Developmental biology* 1998, **195**(1):1-15.
65. Meunier D, Aubin J, Jeannotte L: **Perturbed thyroid morphology and transient hypothyroidism symptoms in Hoxa5 mutant mice.** *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 2003, **227**(3):367-378.

66. Westerlund J, Andersson L, Carlsson T, Zoppoli P, Fagman H, Nilsson M: **Expression of Islet1 in thyroid development related to budding, migration, and fusion of primordia.** *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 2008, **237**(12):3820-3829.
67. Kimura S, Hara Y, Pineau T, Fernandez-Salguero P, Fox CH, Ward JM, Gonzalez FJ: **The T/ebp null mouse: thyroid-specific enhancer-binding protein is essential for the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain, and pituitary.** *Genes & development* 1996, **10**(1):60-69.
68. Franz T: **Persistent truncus arteriosus in the Splotch mutant mouse.** *Anatomy and embryology* 1989, **180**(5):457-464.
69. Mansouri A, Chowdhury K, Gruss P: **Follicular cells of the thyroid gland require Pax8 gene function.** *Nat Genet* 1998, **19**(1):87-90.
70. Fagman H, Grande M, Gritli-Linde A, Nilsson M: **Genetic deletion of sonic hedgehog causes hemiagenesis and ectopic development of the thyroid in mouse.** *The American journal of pathology* 2004, **164**(5):1865-1872.
71. Petryk A, Anderson RM, Jarcho MP, Leaf I, Carlson CS, Klingensmith J, Shawlot W, O'Connor MB: **The mammalian twisted gastrulation gene functions in foregut and craniofacial development.** *Developmental biology* 2004, **267**(2):374-386.
72. Wendl T, Adzic D, Schoenebeck JJ, Scholpp S, Brand M, Yelon D, Rohr KB: **Early developmental specification of the thyroid gland depends on hox-expressing surrounding tissue and on FGF signals.** *Development* 2007, **134**(15):2871-2879.
73. Elsalini OA, Rohr KB: **Phenylthiourea disrupts thyroid function in developing zebrafish.** *Development genes and evolution* 2003, **212**(12):593-598.
74. Elsalini OA, von Gartzen J, Cramer M, Rohr KB: **Zebrafish hhex, nk2.1a, and pax2.1 regulate thyroid growth and differentiation downstream of Nodal-dependent transcription factors.** *Developmental biology* 2003, **263**(1):67-80.
75. Reiter JF, Kikuchi Y, Stainier DY: **Multiple roles for Gata5 in zebrafish endoderm formation.** *Development* 2001, **128**(1):125-135.
76. Wendl T, Lun K, Mione M, Favor J, Brand M, Wilson SW, Rohr KB: **Pax2.1 is required for the development of thyroid follicles in zebrafish.** *Development* 2002, **129**(15):3751-3760.



77. Castanet M, Polak M: **Spectrum of Human Foxe1/TTF2 Mutations.** *Horm Res Paediatr* 2010, **73**(6):423-429.
78. Santisteban P, Bernal J: **Thyroid development and effect on the nervous system.** *Reviews in endocrine & metabolic disorders* 2005, **6**(3):217-228.
79. Civitareale D, Lonigro R, Sinclair AJ, Di Lauro R: **A thyroid-specific nuclear protein essential for tissue-specific expression of the thyroglobulin promoter.** *The EMBO journal* 1989, **8**(9):2537-2542.
80. Orgiazzi J: **Diagnostic génétique des maladies thyroïdiennes.** *Annales d'endocrinologie* 2003, **64**(5):413-418.
81. Sequeira M, Al-Khafaji F, Park S, Lewis MD, Wheeler MH, Chatterjee VK, Jasani B, Ludgate M: **Production and application of polyclonal antibody to human thyroid transcription factor 2 reveals thyroid transcription factor 2 protein expression in adult thyroid and hair follicles and prepubertal testis.** *Thyroid* 2003, **13**(10):927-932.
82. Dathan N, Parlato R, Rosica A, De Felice M, Di Lauro R: **Distribution of the *tif2/foxe1* gene product is consistent with an important role in the development of foregut endoderm, palate, and hair.** *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 2002, **224**(4):450-456.
83. Parlato R, Rosica A, Rodriguez-Mallon A, Affuso A, Postiglione MP, Arra C, Mansouri A, Kimura S, Di Lauro R, De Felice M: **An integrated regulatory network controlling survival and migration in thyroid organogenesis.** *Developmental biology* 2004, **276**(2):464-475.
84. Castanet M, Park SM, Smith A, Bost M, Leger J, Lyonnet S, Pelet A, Czernichow P, Chatterjee K, Polak M: **A novel loss-of-function mutation in TTF-2 is associated with congenital hypothyroidism, thyroid agenesis and cleft palate.** *Human molecular genetics* 2002, **11**(17):2051-2059.
85. Baris I, Arisoy AE, Smith A, Agostini M, Mitchell CS, Park SM, Halefoglu AM, Zengin E, Chatterjee VK, Battaloglu E: **A novel missense mutation in human TTF-2 (FKHL15) gene associated with congenital hypothyroidism but not athyreosis.** *J Clin Endocrinol Metab* 2006, **91**(10):4183-4187.
86. Carre A, Castanet M, Sura-Trueba S, Szinnai G, Van Vliet G, Trochet D, Amiel J, Leger J, Czernichow P, Scotet V *et al*: **Polymorphic length of FOXE1 alanine stretch: evidence for genetic susceptibility to thyroid dysgenesis.** *Human genetics* 2007, **122**(5):467-476.

87. Gruters A, Krude H, Biebermann H: **Molecular genetic defects in congenital hypothyroidism.** *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 2004, **151 Suppl 3**:U39-44.
88. De Felice M, Damante G, Zannini M, Francis-Lang H, Di Lauro R: **Redundant domains contribute to the transcriptional activity of the thyroid transcription factor 1.** *The Journal of biological chemistry* 1995, **270**(44):26649-26656.
89. Puppin C, D'Elia AV, Pellizzari L, Russo D, Arturi F, Presta I, Filetti S, Bogue CW, Denson LA, Damante G: **Thyroid-specific transcription factors control Hex promoter activity.** *Nucleic acids research* 2003, **31**(7):1845-1852.
90. Civitareale D, Castelli MP, Falasca P, Saiardi A: **Thyroid transcription factor 1 activates the promoter of the thyrotropin receptor gene.** *Mol Endocrinol* 1993, **7**(12):1589-1595.
91. Asmus F, Horber V, Pohlenz J, Schwabe D, Zimprich A, Munz M, Schoning M, Gasser T: **A novel TITF-1 mutation causes benign hereditary chorea with response to levodopa.** *Neurology* 2005, **64**(11):1952-1954.
92. Pohlenz J, Dumitrescu A, Zundel D, Martine U, Schonberger W, Koo E, Weiss RE, Cohen RN, Kimura S, Refetoff S: **Partial deficiency of thyroid transcription factor 1 produces predominantly neurological defects in humans and mice.** *The Journal of clinical investigation* 2002, **109**(4):469-473.
93. Doyle DA, Gonzalez I, Thomas B, Scavina M: **Autosomal dominant transmission of congenital hypothyroidism, neonatal respiratory distress, and ataxia caused by a mutation of NKX2-1.** *The Journal of pediatrics* 2004, **145**(2):190-193.
94. Maquet E, Costagliola S, Parma J, Christophe-Hobertus C, Oligny LL, Fournet JC, Robitaille Y, Vuissoz JM, Payot A, Laberge S *et al*: **Lethal respiratory failure and mild primary hypothyroidism in a term girl with a de novo heterozygous mutation in the TITF1/NKX2.1 gene.** *J Clin Endocrinol Metab* 2009, **94**(1):197-203.
95. Carre A, Szinnai G, Castanet M, Sura-Trueba S, Tron E, Broutin-L'Hermite I, Barat P, Goizet C, Lacombe D, Moutard ML *et al*: **Five new TTF1/NKX2.1 mutations in brain-lung-thyroid syndrome: rescue by PAX8 synergism in one case.** *Human molecular genetics* 2009, **18**(12):2266-2276.



96. Thorwarth A, Schnittert-Hubener S, Schrupf P, Muller I, Jyrch S, Dame C, Biebermann H, Kleinau G, Katchanov J, Schuelke M *et al*: **Comprehensive genotyping and clinical characterisation reveal 27 novel NKX2-1 mutations and expand the phenotypic spectrum.** *Journal of medical genetics* 2014, **51**(6):375-387.
97. Plachov D, Chowdhury K, Walther C, Simon D, Guenet JL, Gruss P: **Pax8, a murine paired box gene expressed in the developing excretory system and thyroid gland.** *Development* 1990, **110**(2):643-651.
98. Montanelli L, Tonacchera M: **Genetics and phenomics of hypothyroidism and thyroid dys- and agenesis due to PAX8 and TTF1 mutations.** *Molecular and cellular endocrinology* 2010, **322**(1-2):64-71.
99. Poleev A, Fickenscher H, Mundlos S, Winterpacht A, Zabel B, Fidler A, Gruss P, Plachov D: **PAX8, a human paired box gene: isolation and expression in developing thyroid, kidney and Wilms' tumors.** *Development* 1992, **116**(3):611-623.
100. Vilain C, Rydlewski C, Duprez L, Heinrichs C, Abramowicz M, Malvaux P, Renneboog B, Parma J, Costagliola S, Vassart G: **Autosomal dominant transmission of congenital thyroid hypoplasia due to loss-of-function mutation of PAX8.** *J Clin Endocrinol Metab* 2001, **86**(1):234-238.
101. Meeus L, Gilbert B, Rydlewski C, Parma J, Roussie AL, Abramowicz M, Vilain C, Christophe D, Costagliola S, Vassart G: **Characterization of a novel loss of function mutation of PAX8 in a familial case of congenital hypothyroidism with in-place, normal-sized thyroid.** *J Clin Endocrinol Metab* 2004, **89**(9):4285-4291.
102. Congdon T, Nguyen LQ, Nogueira CR, Habiby RL, Medeiros-Neto G, Kopp P: **A novel mutation (Q40P) in PAX8 associated with congenital hypothyroidism and thyroid hypoplasia: evidence for phenotypic variability in mother and child.** *J Clin Endocrinol Metab* 2001, **86**(8):3962-3967.
103. Grasberger H, Ringkananont U, Lefrancois P, Abramowicz M, Vassart G, Refetoff S: **Thyroid transcription factor 1 rescues PAX8/p300 synergism impaired by a natural PAX8 paired domain mutation with dominant negative activity.** *Mol Endocrinol* 2005, **19**(7):1779-1791.
104. Narumi S, Araki S, Hori N, Muroya K, Yamamoto Y, Asakura Y, Adachi M, Hasegawa T: **Functional characterization of four novel PAX8 mutations causing congenital hypothyroidism: new evidence for haploinsufficiency as a disease mechanism.** *European journal of*

*endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 2012, **167**(5):625-632.

105. Hermanns P, Grasberger H, Refetoff S, Pohlenz J: **Mutations in the NKX2.5 gene and the PAX8 promoter in a girl with thyroid dysgenesis.** *J Clin Endocrinol Metab* 2011, **96**(6):E977-981.
106. van Engelen K, Mommersteeg MT, Baars MJ, Lam J, Ilgun A, van Trotsenburg AS, Smets AM, Christoffels VM, Mulder BJ, Postma AV: **The ambiguous role of NKX2-5 mutations in thyroid dysgenesis.** *PloS one* 2012, **7**(12):e52685.
107. Bedford FK, Ashworth A, Enver T, Wiedemann LM: **HEX: a novel homeobox gene expressed during haematopoiesis and conserved between mouse and human.** *Nucleic acids research* 1993, **21**(5):1245-1249.
108. Bogue CW, Ganea GR, Sturm E, Ianucci R, Jacobs HC: **Hex expression suggests a role in the development and function of organs derived from foregut endoderm.** *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 2000, **219**(1):84-89.
109. Amendola E, De Luca P, Macchia PE, Terracciano D, Rosica A, Chiappetta G, Kimura S, Mansouri A, Affuso A, Arra C *et al*: **A mouse model demonstrates a multigenic origin of congenital hypothyroidism.** *Endocrinology* 2005, **146**(12):5038-5047.
110. Vassart G, Dumont JE: **Thyroid dysgenesis: multigenic or epigenetic ... or both?** *Endocrinology* 2005, **146**(12):5035-5037.
111. Lohmueller KE, Indap AR, Schmidt S, Boyko AR, Hernandez RD, Hubisz MJ, Sninsky JJ, White TJ, Sunyaev SR, Nielsen R *et al*: **Proportionally more deleterious genetic variation in European than in African populations.** *Nature* 2008, **451**(7181):994-997.
112. Sriprapradang C, German A, Dumitrescu AM, Refetoff S: **Consecutive Mutational Events in a Thyroid Stimulating Hormone (TSH) Receptor Allele of Arab Families with Resistance to TSH.** *Thyroid* 2011.
113. Lado-Abeal J, Castro-Piedras I, Palos-Paz F, Labarta-Aizpun JI, Albero-Gamboa R: **A family with congenital hypothyroidism caused by a combination of loss-of-function mutations in the thyrotropin receptor and adenylate cyclase-stimulating G alpha-protein subunit genes.** *Thyroid* 2011, **21**(2):103-109.

114. Deladoey J, Belanger N, Van Vliet G: **Random variability in congenital hypothyroidism from thyroid dysgenesis over 16 years in Quebec.** *J Clin Endocrinol Metab* 2007, **92**(8):3158-3161.
115. Deladoey J, Ruel J, Giguere Y, Van Vliet G: **Is the incidence of congenital hypothyroidism really increasing? A 20-year retrospective population-based study in Quebec.** *J Clin Endocrinol Metab* 2011, **96**(8):2422-2429.
116. Van Vliet G, Deladoey J: **Sublingual thyroid ectopy: similarities and differences with Kallmann syndrome.** *F1000prime reports* 2015, **7**:20.
117. Grasberger H, Refetoff S: **Genetic causes of congenital hypothyroidism due to dysmorphogenesis.** *Current opinion in pediatrics* 2011, **23**(4):421-428.
118. Kimura S, Kotani T, McBride OW, Umeki K, Hirai K, Nakayama T, Ohtaki S: **Human thyroid peroxidase: complete cDNA and protein sequence, chromosome mapping, and identification of two alternately spliced mRNAs.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987, **84**(16):5555-5559.
119. Kimura S, Hong YS, Kotani T, Ohtaki S, Kikkawa F: **Structure of the human thyroid peroxidase gene: comparison and relationship to the human myeloperoxidase gene.** *Biochemistry* 1989, **28**(10):4481-4489.
120. Abramowicz MJ, Targovnik HM, Varela V, Cochaux P, Krawiec L, Pisarev MA, Propato FV, Juvenal G, Chester HA, Vassart G: **Identification of a mutation in the coding sequence of the human thyroid peroxidase gene causing congenital goiter.** *The Journal of clinical investigation* 1992, **90**(4):1200-1204.
121. Bakker B, Bikker H, Vulsma T, de Randamie JS, Wiedijk BM, De Vijlder JJ: **Two decades of screening for congenital hypothyroidism in The Netherlands: TPO gene mutations in total iodide organification defects (an update).** *J Clin Endocrinol Metab* 2000, **85**(10):3708-3712.
122. Ris-Stalpers C, Bikker H: **Genetics and phenomics of hypothyroidism and goiter due to TPO mutations.** *Molecular and cellular endocrinology* 2010, **322**(1-2):38-43.
123. Mendive FM, Rivolta CM, Vassart G, Targovnik HM: **Genomic organization of the 3' region of the human thyroglobulin gene.** *Thyroid* 1999, **9**(9):903-912.
124. van de Graaf SA, Ris-Stalpers C, Pauws E, Mendive FM, Targovnik HM, de Vijlder JJ: **Up to date with human thyroglobulin.** *J Endocrinol* 2001, **170**(2):307-321.

125. Targovnik HM, Citterio CE, Rivolta CM: **Thyroglobulin gene mutations in congenital hypothyroidism.** *Horm Res Paediatr* 2011, **75**(5):311-321.
126. Ieiri T, Cochaux P, Targovnik HM, Suzuki M, Shimoda S, Perret J, Vassart G: **A 3' splice site mutation in the thyroglobulin gene responsible for congenital goiter with hypothyroidism.** *The Journal of clinical investigation* 1991, **88**(6):1901-1905.
127. Reardon W, Coffey R, Phelps PD, Luxon LM, Stephens D, Kendall-Taylor P, Britton KE, Grossman A, Trembath R: **Pendred syndrome--100 years of underascertainment?** *QJM : monthly journal of the Association of Physicians* 1997, **90**(7):443-447.
128. Kopp P: **Pendred's syndrome and genetic defects in thyroid hormone synthesis.** *Reviews in endocrine & metabolic disorders* 2000, **1**(1-2):109-121.
129. Yoshida A, Hisatome I, Taniguchi S, Sasaki N, Yamamoto Y, Miake J, Fukui H, Shimizu H, Okamura T, Okura T *et al*: **Mechanism of iodide/chloride exchange by pendrin.** *Endocrinology* 2004, **145**(9):4301-4308.
130. Rozenfeld J, Efrati E, Adler L, Tal O, Carrithers SL, Alper SL, Zelikovic I: **Transcriptional regulation of the pendrin gene.** *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 2011, **28**(3):385-396.
131. Kuhnen P, Turan S, Frohler S, Guran T, Abali S, Biebermann H, Bereket A, Gruters A, Chen W, Krude H: **Identification of PENDRIN (SLC26A4) mutations in patients with congenital hypothyroidism and "apparent" thyroid dysgenesis.** *J Clin Endocrinol Metab* 2014, **99**(1):E169-176.
132. Donko A, Peterfi Z, Sum A, Leto T, Geiszt M: **Dual oxidases.** *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 2005, **360**(1464):2301-2308.
133. Ohye H, Sugawara M: **Dual oxidase, hydrogen peroxide and thyroid diseases.** *Exp Biol Med (Maywood)* 2010, **235**(4):424-433.
134. Gaudino R, Garel C, Czernichow P, Leger J: **Proportion of various types of thyroid disorders among newborns with congenital hypothyroidism and normally located gland: a regional cohort study.** *Clinical endocrinology* 2005, **62**(4):444-448.
135. Moreno JC, Bikker H, Kempers MJ, van Trotsenburg AS, Baas F, de Vijlder JJ, Vulsma T, Ris-Stalpers C: **Inactivating mutations in the gene**

- for thyroid oxidase 2 (THOX2) and congenital hypothyroidism.** *N Engl J Med* 2002, **347**(2):95-102.
136. Zamproni I, Grasberger H, Cortinovis F, Vigone MC, Chiumello G, Mora S, Onigata K, Fugazzola L, Refetoff S, Persani L *et al*: **Biallelic inactivation of the dual oxidase maturation factor 2 (DUOXA2) gene as a novel cause of congenital hypothyroidism.** *J Clin Endocrinol Metab* 2008, **93**(2):605-610.
  137. Grayston F: **Hyperthyroidism and Graves' disease.** *Oxford Journals* 2011, **4**(12):698-705.
  138. Weetman AP: **Graves' disease.** *N Engl J Med* 2000, **343**(17):1236-1248.
  139. Hebrant A, van Staveren WC, Maenhaut C, Dumont JE, Leclere J: **Genetic hyperthyroidism: hyperthyroidism due to activating TSHR mutations.** *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 2011, **164**(1):1-9.
  140. Weinstein LS, Shenker A, Gejman PV, Merino MJ, Friedman E, Spiegel AM: **Activating mutations of the stimulatory G protein in the McCune-Albright syndrome.** *N Engl J Med* 1991, **325**(24):1688-1695.
  141. Maxam AM, Gilbert W: **A new method for sequencing DNA.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977, **74**(2):560-564.
  142. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977, **74**(12):5463-5467.
  143. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H: **Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.** *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 1986, **51 Pt 1**:263-273.
  144. Majewski J, Schwartzenruber J, Lalonde E, Montpetit A, Jabado N: **What can exome sequencing do for you?** *Journal of medical genetics* 2011, **48**(9):580-589.
  145. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W *et al*: **Initial sequencing and analysis of the human genome.** *Nature* 2001, **409**(6822):860-921.
  146. Lin X, Tang W, Ahmad S, Lu J, Colby CC, Zhu J, Yu Q: **Applications of targeted gene capture and next-generation sequencing technologies in studies of human deafness and other genetic disabilities.** *Hearing research* 2012, **288**(1-2):67-76.

147. Hedges DJ, Burges D, Powell E, Almonte C, Huang J, Young S, Boese B, Schmidt M, Pericak-Vance MA, Martin E *et al*: **Exome sequencing of a multigenerational human pedigree.** *PloS one* 2009, **4**(12):e8232.
148. Bamshad MJ, Ng SB, Bigham AW, Tabor HK, Emond MJ, Nickerson DA, Shendure J: **Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery.** *Nat Rev Genet* 2011, **12**(11):745-755.
149. Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, Handsaker RE, Kang HM, Marth GT, McVean GA: **An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes.** *Nature* 2012, **491**(7422):56-65.
150. Gilissen C, Hoischen A, Brunner HG, Veltman JA: **Disease gene identification strategies for exome sequencing.** *European journal of human genetics : EJHG* 2012, **20**(5):490-497.
151. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR: **A method and server for predicting damaging missense mutations.** *Nat Methods* 2010, **7**(4):248-249.
152. Kumar P, Henikoff S, Ng PC: **Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm.** *Nature protocols* 2009, **4**(7):1073-1081.
153. Abu-Khudir R, Magne F, Chanoine JP, Deal C, Van Vliet G, Deladoey J: **Role for tissue-dependent methylation differences in the expression of FOXE1 in non-tumoral thyroid glands.** *J Clin Endocrinol Metab* 2014:jc20134414.
154. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ: **Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps.** *Bioinformatics* 2005, **21**(2):263-265.
155. Chess A: **Random and non-random monoallelic expression.** *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 2013, **38**(1):55-61.
156. Peters J: **The role of genomic imprinting in biology and disease: an expanding view.** *Nat Rev Genet* 2014, **15**(8):517-530.
157. Fugazzola L, Cerutti N, Mannavola D, Vannucchi G, Fallini C, Persani L, Beck-Peccoz P: **Monoallelic expression of mutant thyroid peroxidase allele causing total iodide organification defect.** *J Clin Endocrinol Metab* 2003, **88**(7):3264-3271.
158. Neves SC, Mezalira PR, Dias VM, Chagas AJ, Viana M, Targovnik H, Knobel M, Medeiros-Neto G, Rubio IG: **Monoallelic thyroid peroxidase**



- gene mutation in a patient with congenital hypothyroidism with total iodide organification defect.** *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2010, **54**(8):732-737.
159. Lemoine NR, Mayall ES, Jones T, Sheer D, McDermid S, Kendall-Taylor P, Wynford-Thomas D: **Characterisation of human thyroid epithelial cells immortalised in vitro by simian virus 40 DNA transfection.** *Br J Cancer* 1989, **60**(6):897-903.
160. Saiselet M, Floor S, Tarabichi M, Dom G, Hebrant A, van Staveren WC, Maenhaut C: **Thyroid cancer cell lines: an overview.** *Frontiers in endocrinology* 2012, **3**:133.
161. Vera A, Recabal A, Saldivia N, Stanic K, Torrejon M, Montecinos H, Caprile T: **Interaction between SCO-spondin and low density lipoproteins from embryonic cerebrospinal fluid modulates their roles in early neurogenesis.** *Frontiers in neuroanatomy* 2015, **9**:72.
162. Goncalves-Mendes N, Blanchon L, Meiniel A, Dastugue B, Sapin V: **Placental expression of SCO-spondin during mouse and human development.** *Gene expression patterns : GEP* 2004, **4**(3):309-314.
163. Montecinos HA, Richter H, Caprile T, Rodriguez EM: **Synthesis of transthyretin by the ependymal cells of the subcommissural organ.** *Cell and tissue research* 2005, **320**(3):487-499.
164. Hutti JE, Shen RR, Abbott DW, Zhou AY, Sprott KM, Asara JM, Hahn WC, Cantley LC: **Phosphorylation of the tumor suppressor CYLD by the breast cancer oncogene IKKepsilon promotes cell transformation.** *Mol Cell* 2009, **34**(4):461-472.
165. Lanner JT, Georgiou DK, Joshi AD, Hamilton SL: **Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release.** *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2010, **2**(11):a003996.
166. MacLennan DH, Duff C, Zorzato F, Fujii J, Phillips M, Korneluk RG, Frodis W, Britt BA, Worton RG: **Ryanodine receptor gene is a candidate for predisposition to malignant hyperthermia.** *Nature* 1990, **343**(6258):559-561.
167. Marks AR, Priori S, Memmi M, Kontula K, Laitinen PJ: **Involvement of the cardiac ryanodine receptor/calcium release channel in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia.** *Journal of cellular physiology* 2002, **190**(1):1-6.
168. Supnet C, Noonan C, Richard K, Bradley J, Mayne M: **Up-regulation of the type 3 ryanodine receptor is neuroprotective in the TgCRND8**

- mouse model of Alzheimer's disease.** *Journal of neurochemistry* 2010, **112**(2):356-365.
169. Parapia LA, Jackson C: **Ehlers-Danlos syndrome--a historical review.** *British journal of haematology* 2008, **141**(1):32-35.
170. Zhang L, Liu Y, Song F, Zheng H, Hu L, Lu H, Liu P, Hao X, Zhang W, Chen K: **Functional SNP in the microRNA-367 binding site in the 3'UTR of the calcium channel ryanodine receptor gene 3 (RYR3) affects breast cancer risk and calcification.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**(33):13653-13658.
171. Tian Y, Hao S, Ye M, Zhang A, Nan Y, Wang G, Jia Z, Yu K, Guo L, Pu P *et al*: **MicroRNAs let-7b/i suppress human glioma cell invasion and migration by targeting IKBKE directly.** *Biochemical and biophysical research communications* 2015, **458**(2):307-312.
172. Gobron S, Monnerie H, Meiniel R, Creveaux I, Lehmann W, Lamalle D, Dastugue B, Meiniel A: **SCO-spondin: a new member of the thrombospondin family secreted by the subcommissural organ is a candidate in the modulation of neuronal aggregation.** *Journal of cell science* 1996, **109 ( Pt 5)**:1053-1061.
173. Boyer JC, Hawk JD, Stefanovic L, Farber RA: **Sequence-dependent effect of interruptions on microsatellite mutation rate in mismatch repair-deficient human cells.** *Mutation research* 2008, **640**(1-2):89-96.
174. Kunkel TA: **The mutational specificity of DNA polymerase-beta during in vitro DNA synthesis. Production of frameshift, base substitution, and deletion mutations.** *The Journal of biological chemistry* 1985, **260**(9):5787-5796.
175. Matsuura T, Fang P, Pearson CE, Jayakar P, Ashizawa T, Roa BB, Nelson DL: **Interruptions in the expanded ATTCT repeat of spinocerebellar ataxia type 10: repeat purity as a disease modifier?** *American journal of human genetics* 2006, **78**(1):125-129.
176. Laken SJ, Petersen GM, Gruber SB, Oddoux C, Ostrer H, Giardiello FM, Hamilton SR, Hampel H, Markowitz A, Klimstra D *et al*: **Familial colorectal cancer in Ashkenazim due to a hypermutable tract in APC.** *Nat Genet* 1997, **17**(1):79-83.
177. Burch GH, Gong Y, Liu W, Dettman RW, Curry CJ, Smith L, Miller WL, Bristow J: **Tenascin-X deficiency is associated with Ehlers-Danlos syndrome.** *Nat Genet* 1997, **17**(1):104-108.



