

Université de Montréal

Morphogenèse de la thyroïde: de l'humain au poisson-zèbre

Par

Stéphanie Larrivée Vanier

Département de biochimie et médecine moléculaire

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures

en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (PhD)

en Biochimie, option génétique moléculaire

5 Novembre 2021

© Stéphanie Larrivée Vanier, 2021

Université de Montréal

Faculté de Médecine

Cette thèse intitulée

Morphogenèse de la thyroïde: de l'humain au poisson-zèbre

Présentée par

Stéphanie Larrivée Vanier

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Jacques Drouin

Président-rapporteur

Johnny Deladoëy

Directeur de recherche

Zoha Kibar

Codirectrice

Éric Samarut

Membre du jury

Aurore Carré

Examinatrice externe

Résumé

L'hypothyroïdie congénitale (HC), qui se traduit par une insuffisance d'hormone thyroïdienne (HT) à la naissance, est la maladie endocrinienne congénitale la plus fréquente avec une prévalence d'un cas sur 2,500 naissances vivantes. Non-traitée, cette insuffisance peut entraîner un retard de développement sévère, surtout au niveau cognitif. L'HC est le plus souvent due à un défaut lors du développement de la thyroïde (dysgénésie thyroïdienne (DT)) ou lors de la production des hormones thyroïdiennes (dyshormonogenèse (D)). La majorité des cas d'HC par dysgénésie thyroïdienne (HCDT) ont une ectopie, soit une glande mal positionnée. Contrairement aux dyshormonogenèses, qui s'expliquent fréquemment par des mutations dans les gènes responsables de la production des HT, selon un modèle autosomique récessif, les causes de l'HCDT demeurent largement inconnues. Certains arguments sont en faveur d'une prédisposition génétique (le risque relatif chez les parents de premier degré est de 40 fois supérieur à celui de la population générale) mais l'HCDT ne suit pas un modèle Mendélien: 98 % des cas sont sporadiques et 92 % des jumeaux monozygotiques sont discordants pour l'HCDT. De ce fait, nous avons suggéré une hypothèse de *double-hit* pour expliquer les HCDT, hypothèse combinant une prédisposition germinale (héritée ou *de novo*) à un évènement somatique (génétique ou épigénétique). Par le passé, nous avons étudié l'évènement somatique, mais nous n'avons pas encore étudié la prédisposition germinale. Le séquençage d'exome complet peut permettre d'identifier la cause génétique dans des formes familiales d'HC, mais aussi déterminer si les cas avec une HCDT isolée sont enrichis en variants délétères, tel qu'observé chez des patients avec une malformation cardiaque congénitale, patients qui partagent des caractéristiques similaires avec ceux atteints d'HCDT. De plus, cette technique pourrait permettre d'identifier de nouveaux gènes de prédisposition associés à l'HCDT.

D'une part, nous avons séquencé l'exome d'un trio (parent-enfant) afin d'identifier la cause de l'HC dans une famille avec plusieurs enfants sévèrement atteints d'HC. D'autre part, nous avons comparé les données d'exome d'une cohorte de cas avec une HCDT isolée (HCDT non syndromique, HCDT-NS) à celles d'une cohorte contrôle, à l'aide d'une approche biaisée (*gene-*

based burden) et non biaisée (gènes candidats). Finalement, nous avons développé le modèle de poisson-zèbre afin de pouvoir valider, *in vivo*, l'implication de potentiels gènes candidats, dans le développement thyroïdien.

L'analyse de l'exome du trio a révélé un variant dans le gène *TSHR* qui co-ségrégait parfaitement avec le phénotype, et les études de minigène ont permis de montrer que ce variant intronique loin des sites d'épissage traditionnels introduisait un pseudo-exon dans la séquence du *TSHR*, créant ainsi un récepteur tronqué et inactif. L'analyse par comparaison de cohorte (cas-contrôle) a montré que les cas avec une HCDT-NS n'ont pas davantage de variants rares délétères comparé aux contrôles. De plus, après correction, le *gene-based burden* n'a pas identifié de gène candidat. Par contre, des variants rares pathogéniques ou probablement pathogéniques dans des gènes liés à l'hypothyroïdie congénitale ont été identifiés chez 42% des cas. Les études réalisées chez le poisson-zèbre sur un gène candidat, *IKBKE*, identifié par une analyse préliminaire de l'exome dans la cohorte de cas, confirme que les vaisseaux sanguins sont importants pour le bon positionnement de la glande thyroïde chez le poisson-zèbre, mais ne permet pas d'établir le rôle d'*IKBKE* dans la migration thyroïdienne.

Nous avons d'abord montré que l'exome est une bonne technique pour identifier la cause de l'HC dans une famille avec plusieurs enfants atteints. Toutefois, une connaissance approfondie de la maladie et des isoformes du gène d'intérêt s'est avérée essentielle afin de bien analyser les données d'exome. Ensuite, nos résultats suggèrent que les cas avec une HCDT-NS n'ont pas davantage de variants délétères que les contrôles et que l'exome complet n'est pas suffisant pour identifier des gènes de prédisposition. Le séquençage du génome est peut-être nécessaire pour trouver une prédisposition génétique à l'HCDT-NS. Par contre, il est aussi possible que la génétique ne joue pas un rôle majeur dans les dysgénésies thyroïdiennes. Finalement, nous avons validé que le poisson-zèbre est un bon modèle pour étudier le développement de la thyroïde.

Mots-clés: hypothyroïdie congénitale non-syndromique, dysgénésie thyroïdienne, séquençage d'exome, *TSHR*, épissage alternatif, migration de la thyroïde, poisson-zèbre.

Abstract

Congenital hypothyroidism (CH) is a disorder with a prevalence of one in 2,500 live births. CH can lead to severe intellectual disability if left untreated. It is most commonly caused by a defect during thyroid development (thyroid dysgenesis), which results in an ectopic gland in the majority of cases. A defect in thyroid hormone production (dyshormonogenesis) is the second most common cause of CH. In contrast to dyshormonogenesis, which generally has an identified cause and follows a Mendelian mode of inheritance, the cause of CHTD remains mostly unknown. CHTD is generally sporadic (98%) and has a high discordance rate (92%) between monozygotic twins. However, first-degree relatives are affected more often than by chance alone (40x) and there is an ethnic and female predominance. We thus hypothesized that CHTD is a disorder caused by two events, one germinal (a necessary but not sufficient predisposing factor) becoming pathogenic only if a second genetic or epigenetic event occurs at the somatic level. Whole exome sequencing (WES) can allow for identification of the genetic cause of CHTD in familial forms, but may also reveal if non-syndromic CHTD (NS-CHTD) cases are enriched in rare protein-altering variant, as seen in congenital heart malformations, a developmental defect that shares several characteristics with CHTD. Moreover, it might also identify new predisposing genes.

First, we performed WES on a trio (parent-child) in a family with several siblings affected with severe CH. Second, we compared WES data of a NS-CHTD cohort with data from a control cohort, using a gene-based burden (unbiased) approach and a candidate gene (biased) approach to evaluate whether WES analysis allows to identify new predisposing genes in a well-characterized cohort. Finally, we developed the zebrafish model to test the roles of candidate genes, that will be identified by WES, in thyroid development.

We first identified a variant in *TSHR* that segregated perfectly with the phenotype in the family with CHTD and a mini gene assay showed that this deep intronic variant induced a pseudo-exon, leading to a truncated protein missing the transmembrane domain, thus an inactive TSH receptor. Next, we found that NS-CHTD cases are not enriched in rare protein-altering variants

and gene-base burden analysis did not identify novel candidate genes. However, WES data revealed pathogenic or likely pathogenic variants in CH-related genes in 42% of the NS-CHTD cases. Finally, zebrafish is a good model to study thyroid development and our results on *IKBKE* confirm the importance of vessels in thyroid positioning, but not its role in thyroid migration.

First, we showed that WES analysis is a good tool to identify the causative variant in a family with several siblings affected by CH. However, the interpretation of the exome analysis required knowledge of the expression of the relevant isoforms and of the biology of the disease. Second, while a gene-based burden test, using WES data from a well-characterised NS-CHTD cohort, did not identify new predisposing genes, it identified pathogenic or likely pathogenic variants in 42% of the NS-CHTD cases. Whole genome sequencing might be required to identify the genetic causes in NS-CHTD. However, our result may indicate that genetics does not play a major role in thyroid dysgenesis. Finally, we have established that zebrafish is a good model to study thyroid development and may help, in the future, identify pathways implicated in this process.

Keywords: non-syndromic congenital hypothyroidism, thyroid dysgenesis, whole exome sequencing, TSHR, alternative splicing, thyroid migration, zebrafish model.

Table des matières

Résumé.....	3
Abstract.....	5
Table des matières.....	7
Liste des tableaux.....	11
Liste des figures.....	12
Liste des sigles et abréviations.....	14
Remerciements.....	16
Chapitre 1 – Introduction.....	18
1. La thyroïde.....	18
1.1 Anatomie et histologie.....	18
1.2 Développement de la thyroïde.....	20
1.3 Synthèse des hormones thyroïdiennes.....	23
2. Hypothyroïdie congénitale (HC).....	26
2.1 Hypothyroïdie congénitale par dysgénésie thyroïdienne (HCDT).....	26
2.2 Génétique de l’HCDT.....	28
2.2.1 Hypothèses pour expliquer les HCDT.....	30
2.2.1.1 Modèle du double-hit.....	31
2.2.1.2 Modèle multigénique.....	33
2.3 HCDT Syndromiques et non-syndromiques.....	36
2.4 Gènes associés aux HCDT.....	36
2.4.1 Gènes identifiés chez l’humain.....	36
Facteurs de transcription.....	36

TSHR	37
Autres gènes.....	38
2.4.2 Gènes identifiés à partir de modèles animaux	38
2.5 Hypothyroïdie congénitale par dysmorphogénèse (HCD)	39
2.6 Approches pour identifier les gènes associés aux HCDT.....	41
3. Étape du développement de la thyroïde et gènes impliqués	42
3.1 Spécification	42
3.2 Bourgeonnement	44
3.3 Migration.....	45
3.4 Prolifération/bilobation	49
3.5 Folliculogénèse	49
3.6 Facteurs intrinsèques	51
3.6.1 <i>HHEX</i>	51
3.6.2 <i>NKX2.1</i>	51
3.6.3 <i>PAX8</i>	52
3.6.4 <i>FOXE1</i>	53
3.6.5 <i>SOX9</i>	54
3.7 Facteurs extrinsèques	55
3.7.1 Les voies de signalisation FGF/BMP	55
3.7.2 La voie de signalisation Notch.....	56
3.7.3 Le facteur de transcription Tbx1	56
3.7.4 La voie de signalisation Shh (Sonic hedgehog).....	57
3.7.5 Famille des Hox	58
3.7.6 La voie des Wnt	58

3.7.7 Cofacteurs de transcription.....	59
3.8 Interaction avec d'autres tissus	59
4. Poisson-zèbre comme modèle d'étude pour le développement de la thyroïde	61
5. Hypothèses et Objectifs	65
Chapitre 2 – 1 ^{ère} publication.....	68
2.1 Contributions des auteurs.....	69
2.2 Résumé.....	70
2.3 Article	71
2.4 Discussion relative à l'article 1	80
Chapitre 3 – 2 ^e publication.....	82
3.1 Contributions des auteurs.....	83
3.2 Résumé.....	84
3.3 Introduction spécifique	85
3.3.1 Les défis de l'analyse de l'exome entier	86
3.3.2 analyse statistique.....	87
3.4 Article	88
3.5 discussion relative à l'article 2	116
3.5.1 Approche non-biaisée (<i>gene-base burden test</i>).....	116
3.5.2 Approche biaisée.....	117
Chapitre 4 – 3 ^e publication.....	120
4.1 Contributions des auteurs.....	122
4.2 Résumé.....	123
4.3 Introduction spécifique	124
4.3.1 Justification du choix de gène	124

4.4 Article	126
4.5 Discussion relative à l'article 3	152
4.5.1 Migration de la glande thyroïde.....	154
Chapitre 5- Perspectives.....	156
Chapitre 6 – Conclusions.....	158
Références bibliographiques.....	160
Annexe 1 – 4 ^e publication	177
Contributions des auteurs.....	178
Article	179

Liste des tableaux

Tableau 1. – Principales étapes du développement thyroïdien dans différentes espèces (adapté de Fagman et al., 2010 (14))	23
Tableau 2. – Gènes associés aux dysgénésies thyroïdiennes	29

Liste des figures

Figure 1. – Schématisation des formes de la thyroïde chez différents vertébrés (adapté de Gorbman, 1955 (4)).....	19
Figure 2. – Coloration hématoxyline-éosine d’une thyroïde de souris Black 6 (adaptée de Lin et al., 2019 (9))	20
Figure 3. – Région pharyngienne pendant le développement. Chez l’humain, la glande thyroïde est formée à partir de cellules provenant du plancher pharyngien (foramen caecum) et de la 4 ^e poche des arcs pharyngiens (adapté de Manley et Capecchi, 1995 (11))	21
Figure 4. – Principales étapes du développement de la thyroïde (adapté de López-Marquez et al., 2021 (16))	22
Figure 5. – Représentation schématique de l’axe hypothalamus-hypophyse-thyroïde (créé par Biorender et adapté de Feldt-Rasmussen et al., 2021 (22))	24
Figure 6. – Schéma présentant les différentes composantes nécessaires à la formation des hormones thyroïdiennes (adapté de Deladoey et al., 2021 (21)).....	25
Figure 7. – Scintigraphie au technétium de nouveau-nés hypothyroïdiens présentant une thyroïde ectopique ronde (A) ou en forme de sablier (B), une athyréose (C) ou une thyroïde orthotopique (D) (adapté de Deladoey et al., 2007(44) et Wildi-Runge et al., 2012 (46)).....	27
Figure 8. – Schématisation de l’hypothèse double-hit (adapté de Deladoey et al., 2007 (44))	31
Figure 9. – Interaction entre les facteurs de transcription de la signature spécifique des pTFCs (adapté de Nilsson et Fagman, 2013 (1)).	44
Figure 10. – Migration de la thyroïde chez la souris (A, B) et le poisson zèbre (C-H). Chez la souris, le bourgeon thyroïdien perd le contact avec le sac aortique au début de la migration (A) mais se retrouve à nouveau près de ce dernier à la fin de la migration (B) tandis que chez le poisson-zèbre, la thyroïde demeure en contact étroit avec l’ébauche du cœur tout au long de la migration précoce (C-H). as : sac aortique; e :endoderme; th : thyroïde; vert (A,B) : endoderme hpf : heure post-fertilisation, mCherry : exprimé sous le promoteur de la thyroglobuline, un marqueur de la thyroïde; EGFP : exprimé sous le promoteur de myl7, un marqueur du cœur; E-cad : marqueur de l’endoderme (adapté de Fagman et al., 2006 (150) et d’Opitz et al., 2012 (3))	46

Figure 11. – Les souris déficientes pour *Cdc42* (*cko*) (B, D, F, H) ne forment pas de bourgeon thyroïdien à E10.5 dû en partie à l’absence d’expression spécifique de ZO-1 à la membrane apicale (D), contrairement aux souris contrôles (C). E-cad : marque l’endoderme au niveau du bourgeon thyroïdien; DAPI : marque les noyaux (adapté de Loebel et al., 2016 (165)).....47

Figure 12. – Des cellules endothéliales ectopiques affectent la migration des cellules thyroïdiennes. E. Schéma de la technique utilisée. L’injection d’ARNm de *scl* et *Imo2* en plus de la biotine induit l’apparition massive de cellules endothéliales. (E, F, G) Le prélèvement de certaines de ces cellules et la greffe de ces dernières dans un autre embryon permet l’apparition de cellules endothéliales ectopiques exprimant le marqueur endothélial *kdr*. H. L’injection de ces cellules près des cellules thyroïdiennes induit la migration de ces dernières vers ces cellules endothéliales ectopiques. Des cellules *gfp* qui ne sont pas des cellules endothéliales n’induisent pas la migration de cellules thyroïdiennes (adapté d’Alt et al., 2006 (170)).....48

Figure 13. – Schéma résumé des principaux gènes impliqués dans la morphogenèse des cellules thyroïdiennes et de leurs interactions (adapté de López-Marquez et al., 2021 (16)).....61

Figure 14. – Les facteurs de transcription qui représentent la signature spécifique des pTFCs ont les mêmes interactions chez le poisson-zèbre que chez la souris, c’est-à-dire qu’initialement leur expression est indépendante mais qu’ensuite elle devient interdépendante (adapté de De Felice et Di Lauro, 2011 (20)).....62

Figure 15. – Schéma représentant les différentes étapes du développement de la thyroïde chez le poisson-zèbre de même que l’expression de certains gènes impliqués (adapté de Larrivée-Vanier et al., 2018, article de revue joint en annexe (171)).63

Figure 16. – Migration en temps réels de cellules thyroïdiennes déficientes pour *IKBKE*. À 5h, 10h, et 15h, la migration cellulaire est significativement diminuée comparée à des cellules infectées avec un sh-contrôle (*shCTRL*). *n*=1, *h* : heure après le début de l’expérience.....125

Liste des sigles et abréviations

ADN: acide déoxyribonucléique

ARN: acide ribonucléique

ARNg: ARN guide

CNV: nombre de copies de variants (copy number variant)

CXCR4: C-X-C motif chemokine receptor 4

D: dyshormonogénèse

DIT: tyrosine diiodée

dpf: jour post-fertilisation

DT: dysgénésie thyroïdienne

DUOX: dual oxydase

E: jour embryonnaire

GATK: genome analysis toolkit

GIS: glande *in situ* (glande bien localisée)

H₂O₂: peroxide d'hydrogène

HC: hypothyroïdie congénitale

HCDT: hypothyroïdie congénitale par dysgénésie thyroïdienne

hpf: heure post-fertilisation

HSF: human splicing finder

HT: hormones thyroïdiennes

KO : knock out, modèle déficient pour un gène donné

MIT: tyrosine monoiodée

MZ: monozygotique

NGS: séquençage de nouvelle génération

NIS: symporteur Na/I

pTFC: cellules précurseurs folliculaires (precursor Thyroid Follicular Cells)

SDF-1: stromal cell-derived factor-1

T3: triiodothyronine

T4: thyroxine

Tg: thyroglobuline

TPO: thyroperoxidase

TRH: thyrotropin releasing hormone

TRHR: thyrotropin releasing hormone receptor

TSH: thyroid stimulating hormone (thyrotropin)

TSHR: thyroid stimulating hormone receptor

VUS: variant avec un score de pathogénicité incertain (variant of unknown significance)

WES: séquençage de l'exome entier (whole exome sequencing)

Remerciements

Cinq ans déjà, le temps passe si vite. Je tiens tout à bord à remercier Johnny de m'avoir encouragé à faire un doctorat et d'être demeuré mon directeur de recherche même après son départ outre-mer. Sans cette générosité je n'aurais pu poursuivre mon doctorat. Vos idées et votre approche m'ont rejoint lorsque j'étais assistante de recherche dans votre labo et c'est ce qui m'a poussé à accepter le défi de poursuivre un doctorat. Vous m'avez donné beaucoup de liberté tout en demeurant présent pour partager votre avis et vos suggestions. Vous m'avez permis de jumeler étude, enseignement et vie familiale. Je tiens aussi à remercier Guy, qui a été présent du début à la fin avec moi et encore davantage après le départ de Johnny. Nos discussions scientifiques autant que non-scientifiques ont ensoleillé mes journées, ta disponibilité et ton soutien m'ont suivi tout au long de ce périple. Tes connaissances impressionnantes et ta mémoire d'éléphant m'ont, plus d'une fois, été utiles au cours de ces années! Merci à vous deux de m'avoir transmis votre passion pour l'endocrinologie et plus précisément pour le lobe droit de la thyroïde! Je tiens aussi à remercier Pierre Drapeau d'avoir accepté de co-diriger mon doctorat et à Zoha Kibar d'avoir pris la relève en milieu de parcours, et ce malgré le fait que la thyroïde n'est pas votre domaine d'expertise. Je remercie les membres passés du laboratoire de même que ceux du laboratoire d'André Tremblay qui m'ont apporté un sentiment d'appartenance, poursuivre des études doctorales en partie seule dans un labo n'est pas toujours évident, mais je ne me suis jamais sentie seule car vous n'étiez jamais très loin. Je tiens aussi à remercier Martineau, pour toutes nos discussions, surtout celles sur la bio-informatique, j'espère avoir retenu une partie de tes nombreuses leçons. Je remercie aussi les organismes subventionnaires, le Girafonds et le FRQS.

Un merci spécial à ma famille, en commençant par mes parents, Claudette et Raymond, vous m'avez toujours encouragée à repousser mes limites et à poursuivre mes rêves. Vos nombreuses questions sur mes projets m'ont montré à quel point vous étiez intéressés par ce que je faisais. Je remercie mes frères et sœurs et tout particulièrement ma grande sœur. Véro, tu as toujours été là pour moi, ton écoute et tes encouragements m'ont tellement aidé. Finalement, ce projet n'aurait pas été possible sans l'investissement et la résilience de mon conjoint, Michel.

Tu as toujours accepté mes horaires parfois chargés, tu as été présent à toutes les étapes pour m'encourager et me féliciter. Bref, merci pour tout. Finalement merci à mes trois cocos: Lucas, Mathéo et Maeva qui illuminent mes journées.

Chapitre 1 – Introduction

1. La thyroïde

1.1 Anatomie et histologie

La thyroïde est la glande en forme de papillon située à la base du cou. Elle est la seule source de synthèse de la thyroxine (T_4) et la principale source de triiodothyronine (T_3). La T_4 est une prohormone dépourvue d'activité biologique, alors que la T_3 est l'hormone active. La T_3 est principalement produite à partir de la T_4 dans les tissus cibles par l'entremise de désiodases. Les hormones thyroïdiennes (HT) sont essentielles au développement normal de l'enfant, principalement à celui du cerveau et des os, et jouent un rôle majeur dans le métabolisme chez l'adulte. Chez la majorité des mammifères, tels l'humain et la souris, la thyroïde est formée de deux lobes reliés par un isthme et elle est encapsulée dans du tissu conjonctif (1). Cette organisation est spécifique aux mammifères. En effet, la forme de la thyroïde est variable à travers le règne animal (Figure 1). Par exemple, chez le poisson-zèbre, la thyroïde est dispersée sous forme de multiples follicules le long de l'artère hypobranchiale, au niveau de la ligne médiane pharyngée (2, 3).

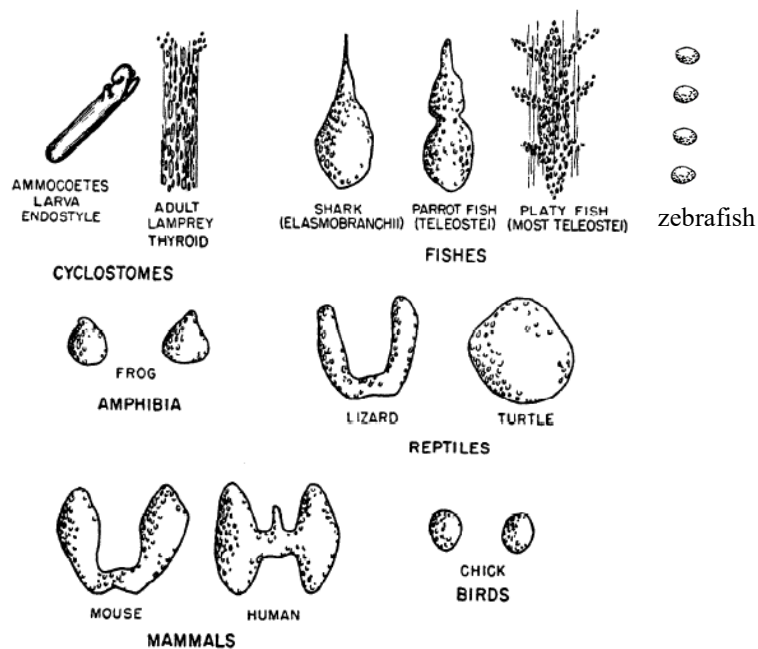


Figure 1. – Schématisation des formes de la thyroïde chez différents vertébrés (adapté de Gorbman, 1955 (4))

La thyroïde est principalement composée de cellules épithéliales; soit de cellules folliculaires, aussi appelées thyrocytes, responsables de la synthèse et de la sécrétion des HT, et de cellules parafolliculaires (ou cellules C), la principale source de calcitonine (1). Ces dernières représentent environ 1 % des cellules épithéliales de la thyroïde et proviennent majoritairement des corps ultimo-branchiaux, et seraient d'origine neuroectodermique chez les volailles mais endodermique chez la souris (5, 6). Les cellules thyroïdiennes sont polarisées, donc composées d'une membrane basale et apicale. Elles sont organisées en monocouche et forment des follicules entourant une lumière, le colloïde, qui sert à entreposer la thyroglobuline (Tg) iodée jusqu'à son utilisation. Les follicules occupent l'essentiel de l'espace de la thyroïde, mais ils partagent ce dernier avec des vaisseaux sanguins essentiels au fonctionnement de la glande, quelques fibroblastes et les cellules C (figure 2) (7, 8). Chez certains vertébrés, tel le poisson-zèbre, les cellules C demeurent séparées des follicules puisque les corps ultimo-branchiaux ne fusionnent pas avec la thyroïde durant le développement (2). Finalement, la structure de la thyroïde est maintenue tout au long de la vie et est assurée par une différenciation continue des thyrocytes.

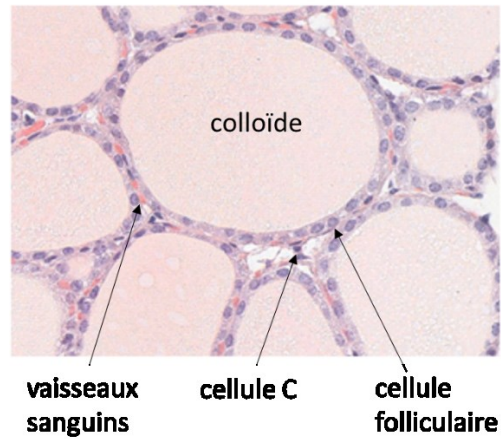


Figure 2. – Coloration hématoxyline-éosine d’une thyroïde de souris Black 6 (adaptée de Lin et al., 2019 (9))

1.2 Développement de la thyroïde

La glande thyroïde est la première glande à se former lors de l’embryogenèse et elle provient de la partie antérieure de l’endoderme, tout comme d’autres organes tels le pancréas, le foie et les poumons (10). Chez les mammifères, la glande thyroïde provient de deux structures distinctes de l’endoderme. D’une part, le bourgeon thyroïdien, qui provient du plancher pharyngien et donnera l’essentiel des cellules folliculaires et d’autre part, les corps ultimo-branchiaux, qui proviennent de la 4^e poche des arcs pharyngiens et qui sont à l’origine de la majorité des cellules C (Figure 3) (6, 11-14). Par contre, il est à noter que dans les thyroïdes linguales, qui n’ont pas fusionné avec les corps ultimo-branchiaux, des cellules C sont présentes (14). Ceci démontre que les corps ultimo-branchiaux ne sont pas la seule source de cellules C, contrairement à ce qui était supposé jusqu’alors. Cette organisation est spécifique aux mammifères, puisque chez tous les autres vertébrés, tel le poisson-zèbre, les corps ultimo-branchiaux ne fusionnent pas avec le bourgeon thyroïdien et demeurent une structure distincte de la thyroïde (12).

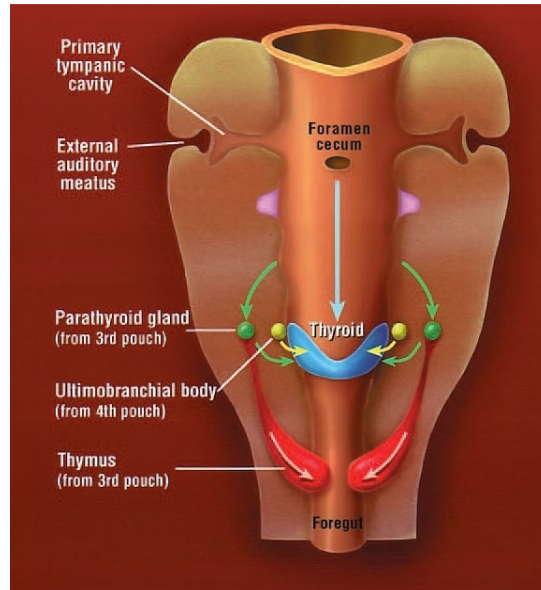


Figure 3. – Région pharyngienne pendant le développement. Chez l'humain, la glande thyroïde est formée à partir de cellules provenant du plancher pharyngien (foramen caecum) et de la 4^e poche des arcs pharyngiens (adapté de Manley et Capecchi, 1995 (11))

L'embryogenèse de la thyroïde est souvent présentée en quatre ou six étapes principales (12, 15, 16). Les six étapes sont : la spécification, le bourgeonnement, la migration, la prolifération, la bilobation et la folliculogenèse (Figure 4). Les étapes peuvent se chevaucher et varier légèrement dépendamment du modèle étudié (Tableau 1). Chez l'humain, les premières cellules spécifiques de la thyroïde sont reconnaissables, grâce à une signature moléculaire spécifique, à E22, la glande atteint sa destination finale à E40-50 et elle est fonctionnelle à partir de E80 (13). Les cellules précurseur thyroïdiennes (pTFC) sont les seules cellules à exprimer simultanément les gènes *HHEX*, *NKX2.1*, *FOXE1*, et *PAX8* ou leurs orthologues dans les autres modèles animaux (17, 18). Chez le poisson-zèbre, les étapes pour se rendre à une glande fonctionnelle prennent environ 60 h et chez la souris environ deux semaines (12, 19).

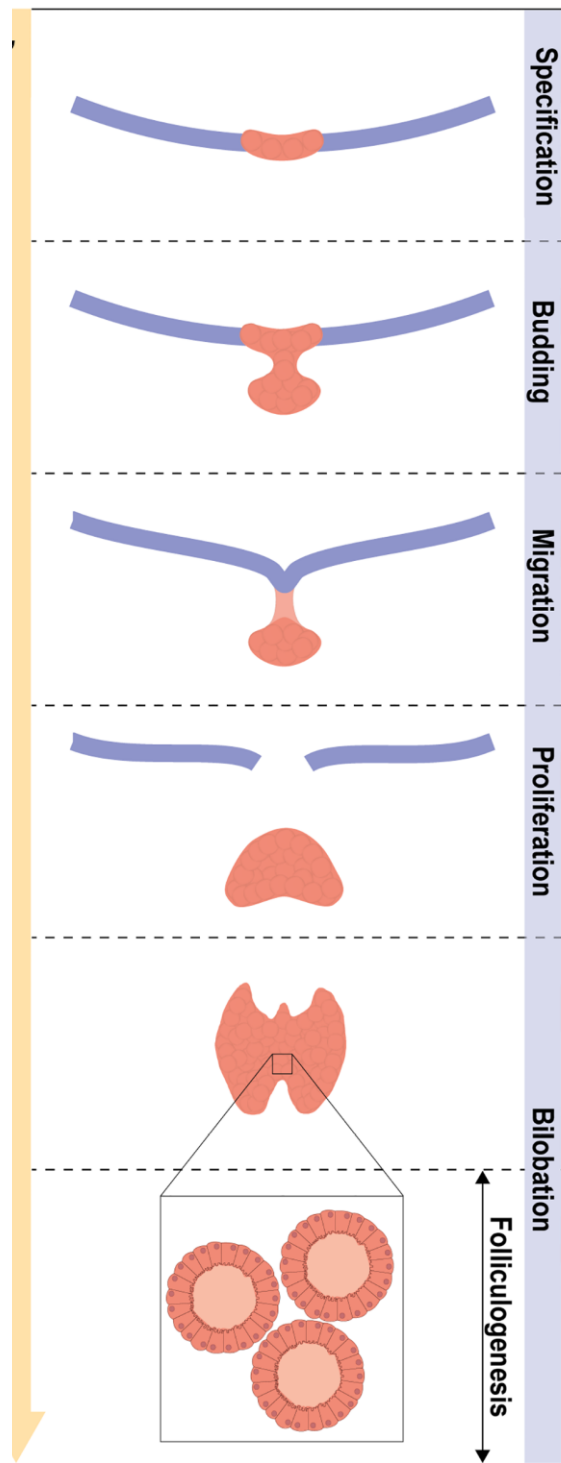


Figure 4. – Principales étapes du développement de la thyroïde (adapté de López-Marquez et al., 2021 (16))

Tableau 1. – Principales étapes du développement thyroïdien dans différentes espèces (adapté de Fagman et al., 2010 (15))

	spécification	bourgeonnement	migration	prolifération	folliculogénèse
Humain	E20-22	E24	E25-50	E45-50	E70
Souris	E8-8.5	E10	E10.5-13.5	E11.5-17.5	E15.5
Poisson-zèbre	20hpf	32hpf	35-45hpf	55hpf	55hpf

E : jour embryonnaire, hpf : heure post-fertilisation

Certaines voies de signalisation et gènes indispensables à l'embryogenèse de la thyroïde sont connus, mais leurs interactions, les autres voies de signalisation potentiellement impliquées, et le rôle de certains facteurs intrinsèques et extrinsèques demeurent encore largement inconnus (12, 20). De plus, il a été démontré que certaines structures adjacentes à la thyroïde lors du développement comme les vaisseaux sanguins, le cœur, et les cellules de la crête neurale jouent un rôle dans ce processus (12). Dans une section subséquente, les principales étapes seront détaillées, de même que les rôles des quatre principaux facteurs de transcription et de certains facteurs intrinsèques et extrinsèques qui sont impliqués dans le développement thyroïdien.

1.3 Synthèse des hormones thyroïdiennes

La synthèse des hormones thyroïdiennes comprend de nombreuses étapes qui seront abordées brièvement dans ce chapitre, puisque des mutations dans les gènes impliqués dans cette synthèse expliquent la majorité des dysmorphonogénèses (D), une forme d'hypothyroïdie congénitale (HC). La synthèse d'HT est sous le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire (Figure 5). Tout d'abord, l'hypothalamus reçoit un stimulus extérieur, par exemple une exposition au froid, ou perçoit un niveau faible de T_3 , ce qui stimulera la relâche de la TRH (thyrotropin releasing hormone). Par la suite, la TRH se liera à son récepteur (TRHR) présent à la surface des cellules thyrotropes, dans l'hypophyse antérieure. Finalement, ces dernières sécrèteront l'hormone thyrotrope (thyrotrophine ou TSH: thyroid stimulating hormone) qui se liera à son

récepteur (TSHR) situé à la membrane basolatérale des cellules folliculaires. La Figure 6 présente les différentes composantes impliquées dans la synthèse des hormones thyroïdiennes (21)

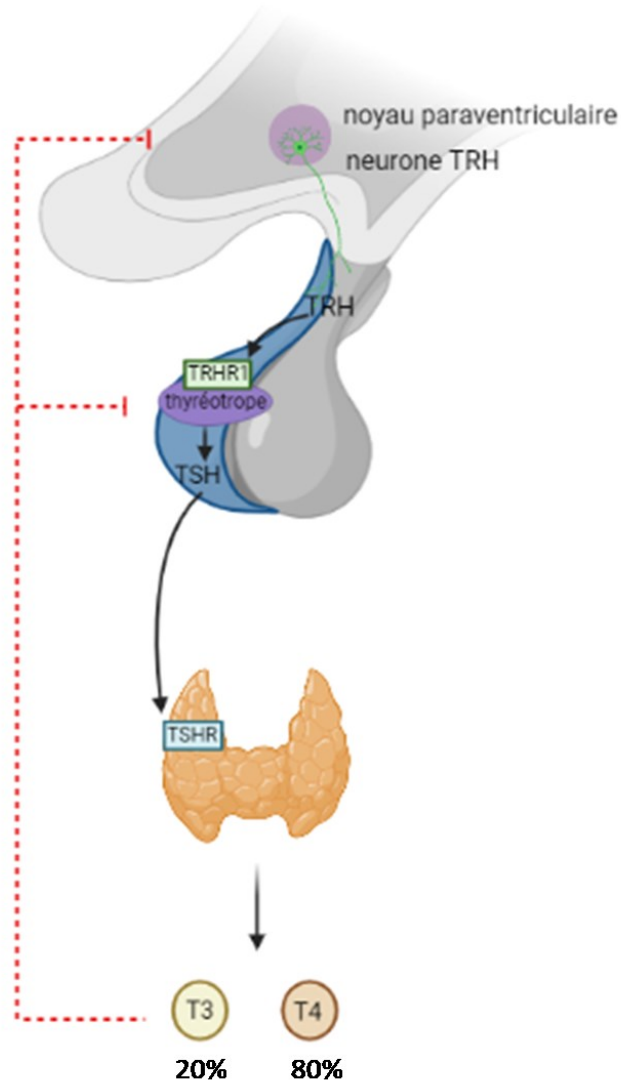


Figure 5. – Représentation schématique de l'axe hypothalamus-hypophyse-thyroïde (créé par Biorender et adapté de Feldt-Rasmussen et al., 2021 (22))

La liaison de la TSH à son récepteur stimule la synthèse des HT en induisant plusieurs étapes, dont l'entrée d'iodure au niveau de la membrane basolatérale des cellules folliculaires, l'étape limitante de la synthèse de HT (Figure 6) (23). Le transporteur NIS, connu depuis des années, est responsable de cette étape (24). Le manque d'iode demeure encore aujourd'hui un problème de

santé publique dans certaines parties du monde et peut être associé au crétinisme, c'est-à-dire une hypothyroïdie congénitale sévère associée à un retard cognitif important et une petite taille (25). L'iode est ensuite transporté jusqu'à la colloïde, via les transporteurs PENDRIN et ANO1, situés à la membrane apicale des cellules folliculaires. De manière concomitante, la TSH stimule la synthèse, par les cellules folliculaires, de la thyroglobuline qui sera transportée jusqu'à la colloïde (26, 27). Les DUOX (DUOX1, DUOX2, DUOXA1, DUOXA2) produisent le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) nécessaire à l'oxydation de l'iode et la thyroperoxidase (TPO), située à la membrane apicale, oxyde l'iode et conjugue l'iode oxydé aux résidus tyrosine de la Tg. La Tg est composée de plusieurs tyrosines qui peuvent lier un ou deux ions iodures, produisant ainsi des résidus MIT (tyrosine monoiodée) ou DIT (tyrosine diiodée) respectivement. La conjugaison des DIT et MIT produit de la thyroxine (T_4) ou de la triiodothyronine (T_3). La T_4 est produite en plus grande quantité, probablement parce que la T_3 , même si elle est beaucoup plus active que la T_4 , a une demi-vie plus courte. Suite à une demande en HT, la thyroglobuline iodée sera endocytée, fusionnera avec des lysosomes à l'intérieur desquels la T_4 et la T_3 seront produites avant d'être acheminées aux différents tissus via la circulation. L'iode présent dans les MIT et DIT sera recyclé par une déhalogénase (*YID/DEHAL1*) (Figure 6).

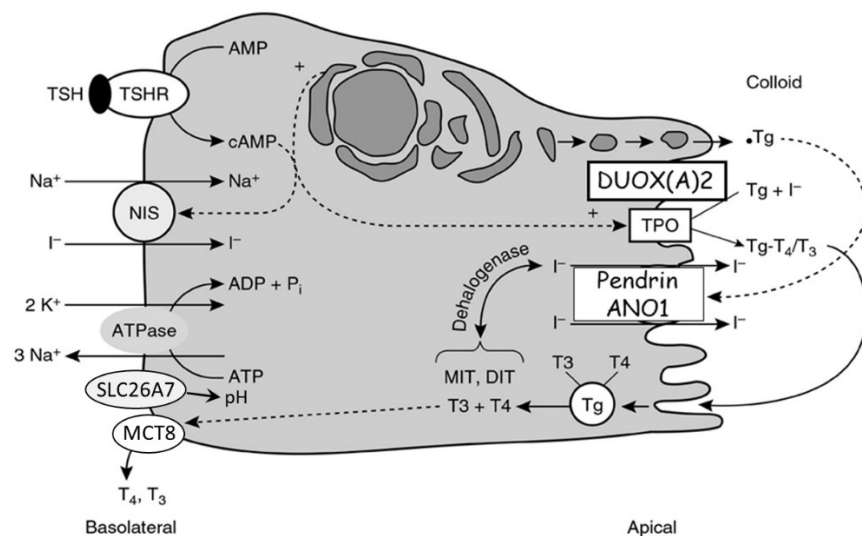


Figure 6. – Schéma présentant les différentes composantes nécessaires à la formation des hormones thyroïdiennes (adapté de Deladoey et al., 2021 (21))

2. Hypothyroïdie congénitale (HC)

Un problème lors du développement de la thyroïde ou lors de la synthèse des hormones thyroïdiennes peut causer une maladie congénitale, soit l'hypothyroïdie congénitale (HC). L'HC est caractérisée par une déficience en hormones thyroïdiennes à la naissance et elle affecte environ un nouveau-né sur 2,500, ce qui en fait la maladie congénitale endocrinienne la plus fréquente (8). Cette prévalence varie en fonction de l'ethnicité, mais aussi en fonction de la valeur seuil établie de TSH, qui est un des biomarqueurs servant à détecter l'HC (28). Puisque les hormones thyroïdiennes sont essentielles, entre autres au développement du cerveau, un niveau trop bas d'hormones pendant le développement du nouveau-né peut mener à un déficit cognitif sévère et irréversible (29). Le diagnostic et le traitement de l'HC sont assez simples, le retard cognitif et moteur peuvent donc être évités par un traitement précoce (30). Pour cette raison, un dépistage néonatal dans la majorité des pays industrialisés a été développé, il y a plus de 40 ans afin de diagnostiquer et traiter rapidement les nouveau-nés atteints d'HC (31). Malgré ce traitement précoce, une légère diminution du quotient intellectuel (mais dans l'étendue de la norme) est toujours observée chez quelques patients d'après certaines études (32, 33).

Un problème lors du développement embryonnaire de la glande, appelé dysgénésie thyroïdienne (DT), est la principale cause d'HC dite primaire (présent chez 75 à 80 % des patients) tandis qu'une déficience lors de la production des hormones thyroïdiennes, désignée dyshormonogénèse, est observée chez environ 15 % des patients (28). Les autres causes des HC, qui ne sont pas directement liées à la glande thyroïde, sont nommées HC secondaires. Par exemple, des HC centrales, caractérisées par un problème au niveau de l'hypothalamus ou de l'hypophyse, sont aussi parfois observées (34). De plus, une HC périphérique est observée lorsqu'il y a dégradation excessive de T_4 (35, 36), défaut d'entrée des HT dans les cellules (37, 38), ou dans la sensibilité aux HT (39, 40). Seuls les HC primaires seront abordés dans cet ouvrage.

2.1 Hypothyroïdie congénitale par dysgénésie thyroïdienne (HCDT)

L'HCDT a une prévalence d'environ une naissance sur 4000 chez les Caucasiens, mais cette prévalence varie grandement selon la population étudiée (28). Par exemple, la prévalence chez

les descendants de noirs Africains est plus basse (41, 42). Jusqu'à 80 % des HCDT sont dues à un problème lors de la migration des cellules précurseurs folliculaires (pTFC : precursor Thyroid Follicular Cells). Durant l'embryogenèse, ces dernières se déplacent de leur point d'origine, soit le foramen caecum présent dans le pharynx primitif, à leur destination finale, soit la base du cou. Un défaut de migration résulte en une thyroïde linguale, donc ectopique, mais fonctionnelle avec des follicules matures dans la majorité des cas (43, 44). Le mot migration sera employé tout au long de ce document, même s'il ne fait pas consensus à travers la communauté scientifique, puisqu'une migration active n'a pas encore été prouvée. Certains suggèrent que le déplacement apparent de la thyroïde lors de l'embryogenèse résulte de l'allongement du pharynx (45). Les thyroïdes ectopiques peuvent avoir différentes formes, allant d'une petite sphère à une forme de sablier (Figure 7). Les patients avec cette dernière forme ont généralement une HC un peu moins sévère (46). Afin d'expliquer ce patron de migration singulier, les auteurs ont suggéré que les cellules thyroïdiennes étaient peut-être hétérogènes au niveau moléculaire, ce qui pourrait provoquer une différence dans leur capacité de migration. Récemment, il a été montré que c'était effectivement le cas pour les cellules thyroïdiennes de poisson-zèbre. Ces dernières ont un patron d'expression génique hétérogène, que les animaux soient au stade embryonnaire ou adulte (47, 48).

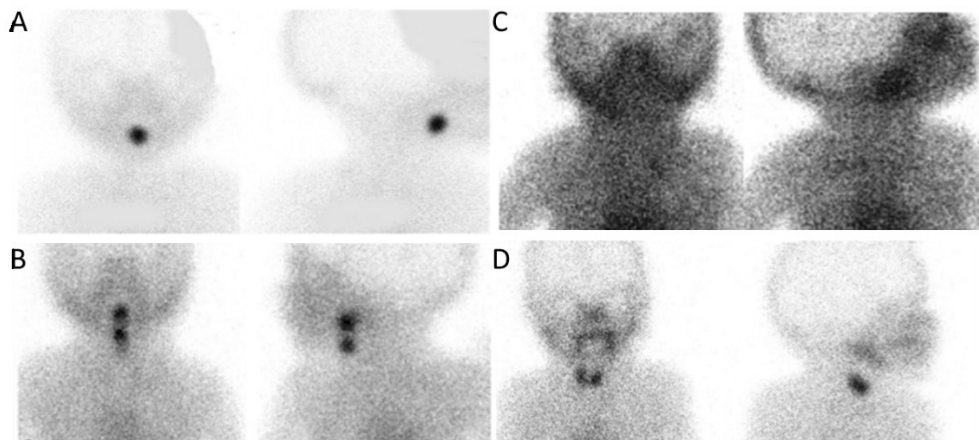


Figure 7. – Scintigraphie au technétium de nouveau-nés hypothyroïdiens présentant une thyroïde ectopique ronde (A) ou en forme de sablier (B), une athyréose (C) ou une

thyroïde orthotopique (D) (adapté de Deladoey et al., 2007(44) et Wildi-Runge et al., 2012 (46))

La prolifération et la différenciation des pTFC peuvent aussi être affectées dans les HCDT puisqu'une absence complète de tissu thyroïdien, nommée athyréose, est observée chez 15 à 20 % des nouveau-nés (Figure 5) (8). Finalement, une hypoplasie avec glande en place ou une hémithyroïde, c'est-à-dire la présence d'un seul lobe au lieu de deux lobes, sont rarement observées (respectivement environ 5 % et moins de 1 %) (44, 49).

Les dysgénésies thyroïdiennes sont pratiquement toujours associées à une HC puisque c'est lors de la confirmation du résultat de dépistage que la thyroïde est évaluée par scintigraphie ou par échographie. La très grande majorité des cas d'HCDT demeure inexpliquée, surtout les ectopies, et l'incidence ne semble pas être affectée par des facteurs environnementaux tels les saisons (28, 50). Par contre, une étude récente effectuée en Écosse suggère que certains facteurs environnementaux inconnus pourraient influencer la prévalence de l'HCDT, plus spécifiquement les hypothyroïdie congénitale avec une glande hypoplasique orthotopique (située à la bonne place) (51). Les auteurs affirment que la génétique est certainement plus importante qu'initialement supposée dans l'HCDT, considérant le nombre important de publications récentes à ce sujet, mais ils suggèrent que les facteurs environnementaux pourraient être impliqués dans certains cas. Les données épidémiologiques recueillies au fil des années sur l'HCDT suggèrent une implication significative de la génétique dans le développement de cette pathologie (8, 44, 52).

2.2 Génétique de l'HCDT

L'HCDT est une maladie complexe et même si la communauté scientifique travaillant sur cette pathologie admet une composante génétique, la nature de cette dernière ne fait pas consensus; certains groupes suggèrent qu'il s'agit d'une maladie Mendélienne avec une pénétrance variable de mutations dominantes, tandis que d'autres suggèrent un modèle avec une prédisposition génétique associée à un autre évènement somatique ou un modèle multigénique (44, 52-56). Du point de vue génétique, les dyshormonogénèses semblent plus

simples à expliquer, puisqu'elles sont un groupe de maladies à transmission autosomale récessive avec quelques exceptions qui seront discutées plus tard (57-61).

D'une part, l'HCDT est une maladie principalement non-syndromique (NS) et sporadique. En effet, plus de 90 % des cas d'HCDT sont non-syndromiques (HCDT-NS) et l'histoire familiale est négative dans 98 % des cas (52). De plus, il y a une prédominance chez les femmes (ratio de 3 : 1), qui demeure toujours inexpliquée, et la très grande majorité des jumeaux monozygotiques (MZ) (toutes les paires décrites depuis que le dépistage néonatal de l'HC a été instauré, sauf une) sont discordants (49, 62-64). Ces caractéristiques ne concordent pas avec le modèle Mendélien classique.

D'autre part, quelques cas familiaux ont été rapportés (2 %) et le risque relatif chez les parents de premier degré d'avoir la maladie est 40 fois plus élevé que dans la population générale (un patient sur 100 a un parent de premier degré affecté, comparativement à la prévalence de un sur 4000 dans la population générale) (55, 65, 66). De plus, la prévalence varie selon le groupe ethnique (41). Finalement, certaines anomalies congénitales et certains syndromes bien définis sont observés chez des patients avec une dysgénésie thyroïdienne (principalement des hypoplasies avec glande en place ou des athyréoses) (Tableau 2) (55, 56). Par exemple, jusqu'à 8 % des patients avec une dysgénésie thyroïdienne ont une malformation cardiaque congénitale (49, 67). Par ailleurs, les syndromes de Bamforth-Lazarus, de Di George, de *brain-lung-thyroid*, d'Alagille, de Johanson-Blizzard ont tous été diagnostiqués chez certains patients avec HCDT (68-73). Ces données épidémiologiques suggèrent une implication génétique.

Tableau 2. – Gènes associés aux dysgénésies thyroïdiennes

Gène	Classe de protéine	Phénotype thyroïdien principal	Phénotypes additionnels	références
<i>FOXE 1</i>	Facteur de transcription (FT) Forkhead	Athyréose	Fente palatine, atrésie choanale, cheveux hérissés	Bamforth et al, 1989
<i>NKX2.1</i>	FT homéodomaine	GIS avec HC	Choreoathetosis, problème respiratoire	Krude et al., 2002

<i>NKX2.5</i>	FT homéodomaine	GIS avec HC		Malformation congénitales cardiaque	Dentice et al., 2006
<i>PAX8</i>	FT Paired-box	Hypoplasie GIS	d'une	Agénésie rénal unilatérale	Macchia et al., 1998
<i>GLIS3</i>	FT en forme de doigt de zinc	Hypoplasie GIS	d'une	Diabète néonatal, rein kystique, cholestase	Senée, et al., 2006
<i>SALL1</i>	FT en forme de doigt de zinc	GIS avec HC		Syndrome Townes-Brocks	Botzenhart et al., 2005
<i>TBX1</i>	FT T-box	GIS avec HC		Syndrome de Di George	Fagman et al., 2007
<i>URB1</i>	Ligase E3 ubiquitin	GIS avec HC		Syndrome Johanson-Blizzard	Zenker et al., 2005
<i>NTN1</i>	Protéine sécrétée laminine-reliée	ectopie		Arthrogryposis	Opitz et al., 2015
<i>JAG1</i>	Protéine jagg-1, ligandt du récepteur Notch	GIS avec HC		Syndrome d'Alagille de type1	De Filippis et al., 2016
<i>BOREALIN</i>	Composante du complexe chromosomal	ectopie		N/A	Carré et al., 2017
<i>TUBB1</i>	Protéine de la famille b-tubuline	ectopie		Défaut de plaquettes	Stoupa et al., 2018
<i>DYRK1A</i>	Tyrosine kinase	GIS avec HC		Trisomie 21	Kariyawan et al., 2015
<i>ELN</i>	élastine	GIS avec HC		Syndrome de Williams-Beuren	Morris, 1999
<i>KMT2D</i>	Lysine méthyltransférase	GIS avec HC		Syndrome de Kabuki	Adam et al., 2011
<i>KDM6A</i>	Lysine déméthylase	GIS avec HC		Syndrome de Kabuki	Lederer et al., 2012
<i>KAT6B</i>	Lysine acétyltransférase	GIS avec HC		Syndrome génitopatellaire et de Ohdo	Clayton-Smith et al., 2011

FT : facteur de transcription, GIS : glande in situ, HC, hypothyroïdie congénitale, N/A : non applicable

2.2.1 Hypothèses pour expliquer les HCdT

Le modèle monogénique explique maximum 5 % des cas d'HCdT et les mutations sont retrouvées à l'état monoallélique (*PAX8*, *NKX2.1*, *NTN1*, *JAG1*, *TBX1*), biallélique (*FOXE1*, *GLIS3*) ou les deux (*TSHR*, *BOREALIN*, *TUBB1*) (53, 56). Parmi les mutations monoalléliques, certaines sont aussi retrouvées chez des parents sains. Par conséquent, les mutations ne co-ségrégaient

pas nécessairement avec le phénotype, ce qui a mené certains groupes de recherche à proposer le modèle Mendélien avec pénétrance variable afin d'expliquer les HCDT (52, 53). Par contre, ce modèle ne concorde pas avec les différentes données épidémiologiques de cette maladie.

2.2.1.1 Modèle du double-hit

D'autres groupes de recherche suggèrent plutôt un mécanisme polygénique et/ou épigénétique (44, 54, 74). Un modèle de double-hit a été proposé par notre groupe de recherche, qui combinerait une mutation germinale à un événement somatique (figure 8) (44). Le variant de prédisposition, le premier hit, est soit hérité des parents soit *de novo*. Pour le deuxième hit, différents mécanismes ont été proposés et pourraient expliquer la nature sporadique de la maladie et la discordance entre les jumeaux MZ : (I) une mutation somatique précoce (II) une mutation tissu-spécifique, ou (III) de l'expression monoallélique des gènes associés au développement de la thyroïde, qu'ils soient exprimés dans cette dernière ou dans les tissus adjacents.

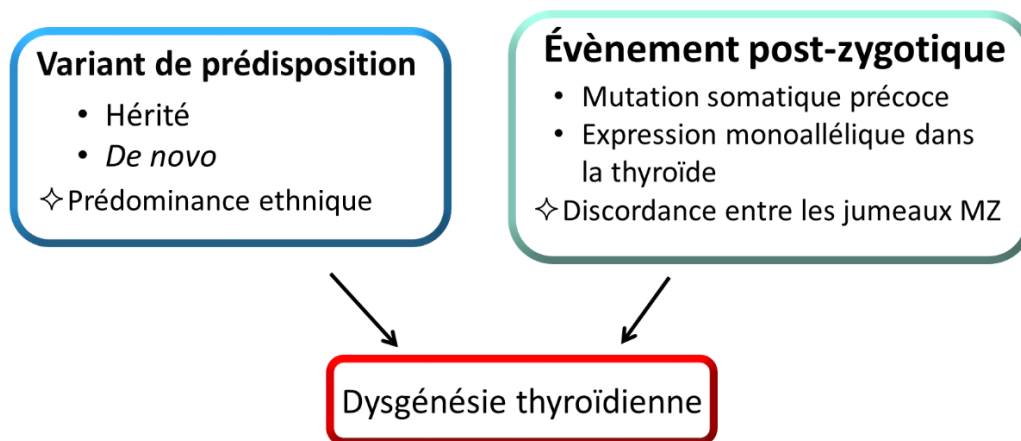


Figure 8. – Schématisation de l'hypothèse double-hit (adapté de Deladoëy et al., 2007 (44))

À ce jour, certaines de ces hypothèses ont été étudiées dans mon laboratoire d'accueil, mais aucune n'a été confirmée. Tout d'abord, afin d'étudier le rôle des mutations somatiques et de la méthylation sur l'expression génique dans les ectopies, des tissus ectopiques et orthotopiques ont été comparés (75). Des profils d'expression différents ont été observés entre les tissus, avec plusieurs gènes de la voie des WNT qui avaient une expression modifiée, mais

aucune différence de méthylation n'a pu être identifiée (75). Une étude réalisée en 2018 par un groupe indépendant n'a pas été davantage concluante, puisque les auteurs n'ont trouvé aucune différence de méthylation entre l'ADN leucocytaire provenant de cas avec ectopie et celui provenant de contrôles sans ectopie (76).

Ensuite, utilisant l'ADN leucocytaire, aucune mutation somatique précoce n'a été retrouvée dans le génome codant des jumeaux monozygotiques (MZ) avec HCDT comparé à celui des jumeaux MZ sains (77). De manière similaire, un autre groupe de recherche n'a pas trouvé de différence dans le nombre de copies de variants (CNV : copy number variant) entre deux paires de jumeaux MZ discordants (78). Plus récemment, une étude de l'exome ciblé sur 14 gènes associés aux HC n'a pas identifié de variants différents entre des jumeaux MZ discordants (79). Ces résultats concordent avec d'autres études effectuées sur des jumeaux MZ ayant diverses pathologies (agénésie rénale congénitale, sclérose multiple) et ne montrant aucune différence significative pouvant expliquer leur discordance pour la maladie (80, 81).

Finalement, l'expression monoallélique a été observée dans quelques gènes (16 à 32) exprimés dans le tissu thyroïdien, que ce dernier soit ectopique ou orthotopique, mais aucune expression monoallélique n'a été observée dans des gènes liés au développement de la thyroïde (82). Par analogie, une étude a montré une perte d'hétérozygoté, induisant donc l'expression d'une seule copie d'un gène au niveau d'une partie du pancréas, dans des gènes causant de l'hyperinsulinisme focal (83).

Plusieurs limitations étaient présentes lors des différentes études, ce qui permet d'affirmer que l'hypothèse de double-hit demeure une bonne hypothèse (75-77, 82). Premièrement, seul le génome codant a été étudié et il est bien connu que plusieurs régions non codantes du génome, telles les régions régulatrices, sont impliquées dans plusieurs pathologies. Deuxièmement, l'ADN tissulaire devrait être idéalement utilisé au lieu de l'ADN leucocytaire, mais les thyroïdes ectopiques ne sont que très rarement réséquées. Troisièmement, pour chacune des études, le nombre d'échantillon était faible dû à la rareté du matériel (ADN et ARN de thyroïdes ectopiques). Dernièrement, concernant les études sur les jumeaux MZ, l'épigénétique devrait

être étudiée puisqu'elle est impliquée dans de nombreuses pathologies et les jumeaux MZ discordants sont connus pour avoir un profil épigénétique différent (44, 77, 84).

L'hypothèse de double hit a été confirmée pour au moins une maladie congénitale, soit l'hyperinsulinisme focal, où une mutation germinale dans les gènes *SUR1*, *KIR6.2*, ou *ABCC8* et une perte d'hétérozygotie dans un sous-groupe de cellules pancréatiques beta conduisent à un hyperinsulinisme congénital (83, 85). L'hypothèse de double-hit impliquant deux mutations a été initialement montrée chez des cas avec un rétinoblastome (86). Par contre, ce modèle a été modifié au fil du temps pour inclure d'autres événements qu'uniquement des mutations (87). Un modèle de double-hit a aussi été avancé afin d'expliquer une forme plus sévère de retard cognitif. Le phénotype est plus sévère lorsqu'il y a une combinaison d'une microdélétion héritée avec des CNV comparé à la microdélétion seule (88). Finalement, la prévalence plus faible chez les descendants de noirs Africains concorde bien avec cette hypothèse. Ces personnes ont une plus grande diversité génétique et moins de mutations délétères que les Caucasiens (89, 90). Par conséquent, même si le risque d'avoir un deuxième hit est comparable aux autres ethnies, la prédisposition au premier hit est moindre, ce qui pourrait expliquer la faible prévalence des HCDT dans ces populations.

2.2.1.2 Modèle multigénique

Une autre hypothèse est le modèle multigénique. La différence entre ce modèle et le modèle de double-hit, est que le modèle multigénique inclut uniquement des mutations dans des gènes et n'inclut pas d'autres mécanismes, comme l'expression monoallélique ou la différence de méthylation. Encore une fois, ce modèle n'est pas compatible avec la discordance entre les jumeaux monozygotiques. Les maladies multigéniques tel le diabète de type 2 ont une concordance d'environ 50 % entre les jumeaux MZ, ce qui est de beaucoup supérieure à la concordance entre les jumeaux MZ avec HCDT, cette dernière étant rarissime (une paire (McLean et al., 1985) sur plus de 20 recensées (Perry et al., 2002 et Van Vliet, données non publiées)) (91). D'un autre côté, le modèle multigénique est de plus en plus proposé pour expliquer certains cas de dysmorphogénèses et même de dysgénésies thyroïdiennes (54, 92, 93). Les premiers indices suggérant la possibilité d'une cause multigénique sont ceux obtenus dans le modèle de souris

hétérozygotes pour *Nkx2.1* et *Pax8* (74). Ces auteurs ont démontré que le phénotype thyroïdien était présent dans une souche de souris particulière (souris Black 6) et ils ont découvert qu'au moins un autre gène (*Dnajc17*) était impliqué dans le phénotype thyroïdien caractérisé par une thyroïde hypoplasique ou une hémithyroïde (94).

Récemment, grâce à l'avancement des technologies de séquençage qui permet de séquencer l'exome complet ou plusieurs gènes cibles (exome ciblé) rapidement et à faible coût, plusieurs études ont suggéré une composante multigénique chez des patients avec HC (54, 92, 93, 95, 96). Parmi ces études, seules deux de ces études ont identifié une cause multigénique chez les dysgénésies (54, 93). Dans l'étude de de Filippis et al., 47 % (83/177) des cas ont une HCdT et, parmi ces cas, environ 12 % (10/83) ont au moins un variant rare potentiellement dommageable (variants faux-sens, non-sens, et situés dans les régions d'épissage) dans au moins 2 gènes associés aux HC (54). Par contre, le phénotype de ces cas n'est pas mentionné et, parmi les dysgénésies, 17% (30/83) ont seulement une hypoplasie.

De plus, les variants ne co-ségrèguent pas nécessairement avec le phénotype. Par exemple, une mère et une fille ont les mêmes variants, mais seule l'enfant a une ectopie (Figure 4 : CH20) (54). L'étude de Yamaguchi et al. 2020, quant à elle, observe une composante multigénique dans 9 % des cas (3/32) avec HCdT, mais un seul cas avec des variants dans des gènes associés aux dysgénésies thyroïdiennes, soit *PAX8* et *TSHR* (93). L'absence de co-ségrégation des variants avec le phénotype n'est pas nouveau (97, 98). Dans un papier de 2011, deux membres d'une même fratrie ont un variant dans le promoteur de *PAX8* hérité de la mère et un variant dans *NKX2.5* hérité du père, mais seule la fille présente une athyréose, soit une absence de tissu thyroïdien, son frère étant euthyroïdien (thyroïde bien placée et absence d'hypothyroïdie) (98). Dans un papier de 1998, un enfant avec une athyréose apparente est hétérozygote composé pour le gène *TSHR*, mais sa tante avec une athyréose n'a pas ces mutations, donc même phénotype mais génotype différent (97). Cela confirme la complexité de la maladie. De plus, même si de plus en plus de variants sont découverts, la causalité de ces derniers est parfois discutable (99, 100). Finalement, une des raisons pouvant expliquer une

absence de co-ségrégation est que les variants retrouvés dans des causes multigéniques ont souvent une pénétrance incomplète (101).

Finalement, la découverte de multiples variants chez un individu à l'aide du séquençage haut-débit ne permet pas de savoir si ce variant est causatif ou modifie simplement le phénotype; par exemple, il est possible de trouver des variants touchant l'hormonogénèse dans certains cas avec ectopies : ces variants n'expliquent en rien l'ectopie mais majore l'hypothyroïdie. Par exemple, les auteurs des deux articles (Yamaguchi et al., et de Filippis et al.,) mentionnent que certains variants dans des gènes liés à la dyshormonogénèse (défaut dans la production des hormones thyroïdiennes) se retrouvent chez des patients avec une dysgénésie thyroïdienne et vice versa. Ce n'est pas surprenant que des mutations dans des gènes de dyshormonogénèse se retrouvent chez des patients avec des dysgénésies, puisque le premier critère de sélection est basé sur des niveaux de TSH, donc une mesure biochimique permettant d'évaluer la fonction thyroïdienne indépendamment de la position de la glande. Un patient avec une dysgénésie peut donc avoir des variants dans les gènes liés aux dysgénésies thyroïdiennes, mais aussi aux dyshormonogénèses. La question est plutôt de savoir si ceci survient plus fréquemment que dans la population générale. Des patients avec dyshormonogénèse possédant des variants dans des gènes liés aux dysgénésies thyroïdiennes concorde aussi avec l'hypothèse de double-hit, qui suggère qu'un seul variant dans un des gènes liés au développement de la thyroïde n'est pas suffisant pour induire une dysgénésie et confirme qu'un deuxième hit est nécessaire. En conclusion, l'hypothèse multigénique est envisageable pour expliquer les dysgénésies thyroïdiennes même si elle semble plutôt rare, d'après les récentes études publiées, et elle n'est pas compatible avec la discordance entre les jumeaux MZ. De plus, identifier des variants dans des gènes liés aux dyshormonogénèses chez des patients avec DT est tout à fait attendu. Finalement, le groupe de Yamaguchi et al. a été le premier à montrer que les cas d'HC avec une cause multigénique étaient plus sévèrement atteints que les cas d'HC avec une cause monogénique (93).

2.3 HCDT Syndromiques et non-syndromiques

Précédemment, il a été mentionné qu'environ 9 % des cas d'HCDT étaient syndromiques, donc associés à d'autres maladies ou malformations (52, 67). Récemment, il a été montré qu'il existe une différence marquée, au niveau génétique, entre les cas syndromiques et non-syndromiques chez des patients avec une malformation cardiaque congénitale, condition ayant des caractéristiques similaires à celles retrouvées dans les HCDT (sporadicité, faible concordance des jumeaux MZ, cas familiaux rares). Cette étude suggère que les cas syndromiques sont dus à des mutations *de novo* tandis que les cas non syndromiques sont plutôt expliqués par des variants rares hérités (102). Dans l'étude de de Filippis et al., 31.1% des cas ont une anomalie en plus de leur HC (54). Ce pourcentage plus élevé peut s'expliquer en partie par l'inclusion d'anomalies qui ne sont pas des syndromes bien définis, par exemple un retard de croissance. Par analogie avec les cardiopathies congénitales, les cas syndromiques et non syndromiques d'HCDT devraient être considérés indépendamment puisque les causes en sont potentiellement différentes (102).

2.4 Gènes associés aux HCDT

2.4.1 Gènes identifiés chez l'humain

Facteurs de transcription

À ce jour, des mutations dans divers gènes associés au développement de la thyroïde ont été identifiés chez des patients avec HCDT (tableau 2) (55, 56, 103). Ces gènes ont tous été étudiés dans des modèles animaux afin de mieux comprendre leur rôle dans le développement. Comme mentionné précédemment, les cas monogéniques sont rares et le phénotype peut être très variable même au sein d'une même famille. Des mutations dans les gènes codant pour des facteurs de transcription associés au développement de la thyroïde, soit *NKX2.1*, *PAX8*, et *FOXE1* ont été découvertes chez quelques cas d'HCDT. Une liste citant la majorité des variants identifiés dans ces gènes est présentée dans l'article de Nettore et al. et une description des phénotypes observés chez les patients est présentée dans les articles d'Abu-Kudhir et al., et de Mio et al. (55, 104, 105).

Les mutations dans ces gènes sont pour la plupart retrouvées à l'état hétérozygote chez des patients avec une GIS hypoplasique (104). La principale exception est *FOXE1* dont l'inactivation biallélique entraîne une athyréose et le syndrome de Bamforth-Lazarus, qui est caractérisé par une hypothyroïdie congénitale, une fente palatine, des cheveux hérissés et parfois une atrésie choanale (69, 106). Les mutations de *FOXE1* induisent en général une perte de liaison complète avec ses gènes cibles (104). Il est à noter que récemment, des mutations biallélique et monoallélique de *FOXE1* ont été identifiés chez des patients avec une GIS hypoplasique, mais sans syndrome de Bamforth-Lazarus (54, 107). De plus, il a été montré que les personnes ayant une queue polyA de *FOXE1* plus courte étaient plus à risque d'avoir une HCDT (108). Les mutations dans *NKX2.1* sont majoritairement *de novo*, induisent principalement une haploinsuffisance, et sont associées au syndrome *brain-lung-thyroid* (BLT), un syndrome caractérisé par des problèmes neurologiques et respiratoires variables ainsi qu'une hypothyroïdie (104, 109-111). Les mutations dans *PAX8* ont été observées uniquement à l'état hétérozygote et sont souvent héritées de parents sains (104). Pour les cas familiaux, les phénotypes rapportés sont très variables, mais une glande hypoplasique en place est majoritairement observée (68, 112, 113). *NKX2.5* semblait être un bon candidat pour expliquer les DT puisque quatre patients avec des mutations hétérozygotes induisant une perte de fonction ont été identifiées, mais par la suite, il a été démontré que ces mutations ne co-ségréguaient pas avec le phénotype chez d'autres patients (99, 114). Par conséquent, il ne fait plus partie de principaux gènes associés aux DT.

TSHR

Des mutations dans *TSHR* sont assez fréquentes et sont associées à une résistance à la TSH, qui s'accompagne parfois d'une HC avec une hypoplasie sévère, mais jamais à une ectopie ou une athyréose puisque la TSH n'est pas impliquée dans la migration et la prolifération des cellules précurseurs folliculaires (donc de la prolifération durant l'embryogenèse) chez l'humain (55, 97). La résistance à la TSH est une maladie autosomale récessive homozygote ou hétérozygote composée et le phénotype dépend principalement de la conséquence de la ou des mutations du gène *TSHR*. Il peut aller d'une hyperthyrotropinémie isolée (115) à une HC sévère associée à une athyréose apparente (97) (55, 116, 117).

Autres gènes

La majorité des autres gènes associés aux HCDT ont été identifiés chez des patients syndromiques, présentant généralement une HC moyennement sévère excepté pour *GLIS3* qui peut être très sévère. *GLIS3* (diabète sucré néonatal), *URB1* (syndrome de Johanson-Blizzard), *SALL1* (syndrome de Townes-Brocks), *TBX1* (syndrome de Di George), *ELN* et *BAZ1B* (syndrome de Williams-Beuren), *KMT2D* et *KDM6A* (syndrome de Kabuki), *KAT6B* (syndrome d'Ohdo et génitopatellaire), et *DYRK1A* (syndrome de Down), dans une moindre mesure, sont tous des gènes ayant été identifiés chez des patients syndromiques (68, 71, 106, 114, 118-121). Récemment, des mutations dans *NTN1*, *JAG1*, *BOREALIN* et *TUBB1* ont aussi été découvertes chez des patients avec une HCDT syndromique (72, 122-124).

Tel que mentionné précédemment, tous ces cas ne représentent qu'au maximum 5 % des cas d'HCDT, et ces derniers n'ont généralement pas le phénotype le plus fréquent, soit une ectopie. L'HCDT est donc une maladie complexe et plusieurs gènes peuvent affecter le développement ou la fonction de la thyroïde. Les causes sont donc multiples et suivent probablement un modèle multigénique ou de double-hit. Les cas avec des ectopies demeurent encore aujourd'hui les moins bien compris. Davantage de recherches sont nécessaires afin d'identifier les causes dans la grande majorité des cas, qui sont encore aujourd'hui inexplicables. L'étude des gènes peut permettre d'identifier le premier hit, soit les gènes de prédisposition. Par contre, il faut considérer la nature syndromique ou non des cas avec HCDT, afin de bien choisir l'approche expérimentale.

2.4.2 Gènes identifiés à partir de modèles animaux

Le rôle de plusieurs gènes impliqués dans l'embryogenèse de la thyroïde a été identifié chez la souris. Par exemple, l'importance de *Hhex*, *Pax8*, *Foxe1*, et *Nkx2.1* pour la survie des thyrocytes et la migration des cellules précurseurs folliculaires a été découverte chez la souris (17). Une déficience complète d'un de ces gènes chez la souris entraîne une athyréose, excepté pour *Foxe1* (125-127). Chez les souris *Foxe1*^{-/-}, la moitié des embryons au jour embryonnaire (E) 11.5 ont une absence complète de tissu, donc une athyréose, tandis que l'autre moitié ont une ectopie, les cellules étant restées liées au plancher pharyngien. Par contre, tous les nouveau-nés

ont une athyréose (127). Les gènes identifiés chez l'humain et mentionnés précédemment (*NTN1*, *JAG1*, *BOREALIN*, *GLIS3*, et *TUBB1*) ont tous été étudiés dans un modèle animal (murin ou poisson-zèbre) afin de valider leur implication dans le développement de la thyroïde.

Les rôles de plusieurs gènes lors du développement de la thyroïde ont été découverts suite à l'étude de modèles animaux déficients pour ces gènes, sans qu'une mutation n'ait été identifiée au préalable chez l'homme. Par exemple, aucune mutation dans *HHEX* n'a été identifiée à ce jour. Divers gènes exprimés dans l'endoderme de la souris (*Hoxa3*, *Shh* et *Hes1*) ou du poisson-zèbre (*bon*, *cas*, *oep*) sont importants pour le développement de la thyroïde (2, 10, 12, 128-130). De plus, des gènes impliqués dans les malformations cardiaques tels *Tbx1*, *Fibulin-1*, *Isl1*, et *Chordin* et les malformations musculosquelettiques (*Fgf10*) sont impliqués dans l'embryogenèse de la thyroïde (131). Ceci concorde avec les données épidémiologiques montrant une incidence plus élevée de malformations cardiaques et musculosquelettiques chez les cas avec HCDT comparé à la population générale (49, 132). Certaines de ces associations mettent en lumière l'importance de structures à proximité de la thyroïde durant le développement. Elles seront davantage discutées dans la section embryogenèse de la thyroïde.

2.5 Hypothyroïdie congénitale par dyshormonogénèse (HCD)

Tel que mentionné précédemment, les dyshormonogénèses représentent 15 à 20 % des cas d'HC. Le déficit en hormones thyroïdiennes dû à un défaut de synthèse stimule l'axe hypothalamo-hypophysaire résultant en une augmentation de la production de TSH et un développement progressif d'un goître (57). Contrairement au HCDT, la majorité des cas d'hypothyroïdie congénitale due à une dyshormonogénèse ont une cause connue et la génétique pourrait expliquer la majorité des cas (57, 79). La prévalence de mutations causales (principalement bialléliques) chez les cas avec HCD varie d'une étude à l'autre. Par exemple, des mutations probablement causales ont été identifiées chez 33 % de patients avec HCD dans une cohorte japonaise, mais chez 58.2 % et 59 % dans une autre cohorte italienne et multiethnique respectivement (54, 92, 93). La prévalence varie de 20 à 60 % en comparant les données obtenues à partir du séquençage de nouvelle génération pour les différentes cohortes et ethnies étudiées (133). Outre l'ethnie qui peut influencer la prévalence de l'HC, plusieurs autres raisons peuvent

expliquer la différence de prévalence observée entre les études. Par exemple, (1) les outils pour classer la pathogénicité des variants (2) la présence de cas familiaux ou non (3) la classification des variants en fonction de leur mode de transmission (récessif ou dominant) et (4) le phénotypage des cas (dysgénésie thyroïdienne ou dyshormonogénèse avec ou sans inclusion de cas avec goître).

La synthèse des HT implique plusieurs étapes et un bon fonctionnement de chacune d'elles est essentiel afin d'avoir un niveau adéquat d'HT pour le développement. Une ou des mutations dans un des gènes impliqués dans ces étapes peuvent causer une hypothyroïdie avec ou sans goître. Des mutations dans plusieurs gènes impliqués dans la synthèse des hormones thyroïdiennes ont été identifiées, notamment au niveau du transport basal ou apical de l'iode (*NIS/SLC5A5*, *PENDRIN/SLC26A4*), de son organification (*TPO*, *DUOX2*, *DUOXA2*), de la thyroglobuline (*TG*), ou du recyclage de l'iode (*IYD/DEHAL1*) (24, 56, 59, 134-143). Selon la population étudiée, les gènes les plus fréquemment mutés diffèrent. Par exemple, des mutations dans *DUOX2* sont les plus communes dans les populations de l'Asie de l'Est (93, 95, 144). De plus, *DUOX2* est le gène le plus muté dans l'étude italienne (37 % des cas possèdent un variant dans ce gène) (54). Des mutations dans *TG* sont les plus fréquentes chez les Caucasiens (56, 92, 134). De plus, des mutations dans *TPO* sont fréquemment observées et sont la principale cause de défaut d'organification (54, 92, 145, 146). Finalement, des mutations dans les autres gènes (*NIS/SLC5A5*, *SLC26A7*, *DUOXA2*, *PENDRIN/SLC26A4*, et *IYD*) sont rarement observées (59, 133).

Les HCD sont associés à un éventail de phénotypes thyroïdiens, et ce parfois même pour un seul gène. C'est le cas pour *DUOX2*, qui peut causer un phénotype allant d'un goître potentiellement léthal à un état euthyroïdien (147). Le mode de transmission des HCD est généralement autosomique récessif (57, 59). Tout comme avec les HCdT, grâce à l'avancement des technologies de séquençage, une cause multigénique est de plus en plus observée chez des patients avec HCD (54, 93). Par exemple, la coexistence d'une mutation monoallélique dans les gènes *SLC26A4* et *TG* est probablement la cause d'HC d'un patient dans l'étude italienne et celle dans les gènes *DUOX2* et *TG* la cause d'HC d'un patient de la cohorte japonaise (54, 93). Afin d'expliquer comment une mutation monoallélique dans deux gènes différents peut mener à l'HC,

il faut introduire la notion d'haploinsuffisance, qui peut se définir comme une incapacité d'un allèle à compenser la perte de l'autre allèle (dû à une mutation inhibitrice ou à une perte d'hétérozygotie). Probablement que ces mutations seules n'affectent pas suffisamment la production d'hormones thyroïdiennes pour causer une hypothyroïdie, mais si deux de ces mutations sont associées, les niveaux d'HT peuvent être suffisamment diminués pour induire une augmentation de la TSH au-dessus du seuil établi pour diagnostiquer les HC et donc induire une hypothyroïdie congénitale détectable. C'est ce qui a été montré avec certaines mutations dans le récepteur de la TSH, les parents porteurs d'un variant dans *TSHR* ont parfois une légère augmentation de la TSH afin de compenser l'haploinsuffisance créée par le variant, et des niveaux normaux de T₄. Par contre, lorsque la mutation est homozygote chez l'enfant, il est possible que l'organisme ne puisse compenser pour la résistance à la TSH et l'enfant peut avoir une hypothyroïdie (115, 116, 148). Tout comme pour les HCDT, des variants présents dans des gènes associés aux dysgénésies thyroïdiennes ont aussi été trouvés chez des patients avec une dysmorphogénèse (54, 93, 95, 103).

2.6 Approches pour identifier les gènes associés aux HCDT

Le séquençage de nouvelle génération (NGS) est maintenant fréquemment utilisé autant en recherche qu'en clinique afin de déterminer les causes de certaines maladies. À la différence du séquençage traditionnel (ex : séquençage Sanger), il requiert peu de matériel de départ et il est beaucoup plus rapide. Il permet de séquencer le génome au complet, l'exome, ou encore des régions plus petites, selon la technique utilisée. Le principe est assez simple, il consiste en (1) une extraction de l'ADN suivi d'une fragmentation, (2) de la capture (et de l'amplification de la région d'intérêt (ex : tous les exons), (3) du séquençage, et (4) de l'analyse bio-informatique des données brutes et de l'interprétation. Pour le séquençage d'exome entier, qui est la principale technique de NGS utilisée dans ce projet, une librairie de sondes spécifiques ciblant les régions codantes (exons) a été utilisée. L'analyse des données débute par un alignement des séquences obtenues avec un génome de référence. Par la suite, les variants sont annotés (*variant calling*) à l'aide de logiciels bio-informatiques (ex : GATK) et la qualité de l'annotation est vérifiée. Finalement, les variants doivent être filtrés et interprétés. La vérification de la qualité est une étape importante

puisque même si le NGS est une bonne technique, certaines erreurs peuvent s'insérer lors du séquençage et des limitations existent. Par exemple, les suites de nucléotides dans les régions riches en dinucléotides guanine-cytosine (GC) sont plus difficiles à séquencer. Les pseudogènes peuvent compliquer l'alignement et certains gènes et exons ne sont parfois pas suffisamment couverts (149).

De plus en plus d'études utilisent le séquençage de nouvelle génération afin d'identifier la cause chez de nombreux patients avec une hypothyroïdie congénitale par dysgénésie thyroïdienne ou dyshormonogénèse. La majorité des études utilisent le NGS en étudiant uniquement les gènes déjà associés au HC. Cette approche est adéquate pour les HCD, mais elle est discutable pour les HCDT sachant que les gènes déjà liés au HCDT n'expliquent pas la majorité des cas de DT. L'exome complet est donc une meilleure approche pour les cas avec HCDT, et ce même si l'exome est plus complexe à interpréter.

3. Étape du développement de la thyroïde et gènes impliqués

Cette section détaille les différentes étapes du développement de la thyroïde de même que les gènes et les voies de signalisation qui sont impliqués. Cet ouvrage se concentre sur les cellules folliculaires, les cellules C ne seront pratiquement pas abordées. Pour des références plus complètes, le lecteur peut consulter les références suivantes : (12, 15).

3.1 Spécification

Le développement de la thyroïde est un phénomène assez précoce chez tous les vertébrés puisque l'épaississement de l'épithélium endodermique et la formation de l'ébauche médiane (qui deviendra le bourgeon thyroïdien) au niveau de la partie antérieure du plancher pharyngien est visible autour du jours embryonnaire (E) 20-22 chez l'humain, de E8-8.5 chez la souris et à 20 heures post-fertilisation (hpf) chez le poisson-zèbre (Tableau 1) (2, 13, 150, 151). À ce stade, les cellules précurseurs folliculaires (pTFCs) ont déjà acquis une signature moléculaire spécifique. Ce sont les seules cellules à exprimer simultanément les gènes *HHEX*, *NKX2.1*, *FOXE1*, et *PAX8* ou leurs orthologues dans les autres modèles animaux (17, 18). L'inhibition d'un seul de ces facteurs

de transcription induit une athyréose ou une hypoplasie importante de la glande, et ce même en présence des autres facteurs (17, 106, 125-127, 152). L'exception est pour *foxe1* chez le poisson-zèbre qui ne semble pas avoir un rôle lors de l'embryogenèse de la thyroïde (153). Il est à noter que peu de cellules acquièrent cette signature spécifique et que ces dernières ne prolifèrent pas avant la migration (44, 150, 154, 155). Par conséquent, l'augmentation du nombre de cellules précurseurs folliculaires à ce stade se fait par le recrutement de nouvelles cellules à l'extérieur de cette ébauche médiane. À ce stade précoce du développement, l'expression de ces facteurs est indépendante, excepté pour *Foxe1* qui est régulé par *Pax8* (Figure 9). Même si tous ces facteurs semblent importants pour le développement normal de la thyroïde, aucun ne semble essentiel à la spécification puisque tous les modèles déficients pour ces gènes ont un bourgeon thyroïdien (17). Récemment, il a été montré que FGF et BMP jouent un rôle majeur dans la spécification, principalement en influençant l'expression de *NKX2.1* et *PAX8*, ce qui avait déjà été proposé par d'autres (48, 156-161). De plus, l'inhibition de la voie des Wnt est nécessaire à une spécification adéquate (156). D'importantes avancées ont été faites dans la compréhension du mécanisme de spécification, par contre des recherches sont encore nécessaires afin de comprendre tous les éléments impliqués dans ce phénomène.

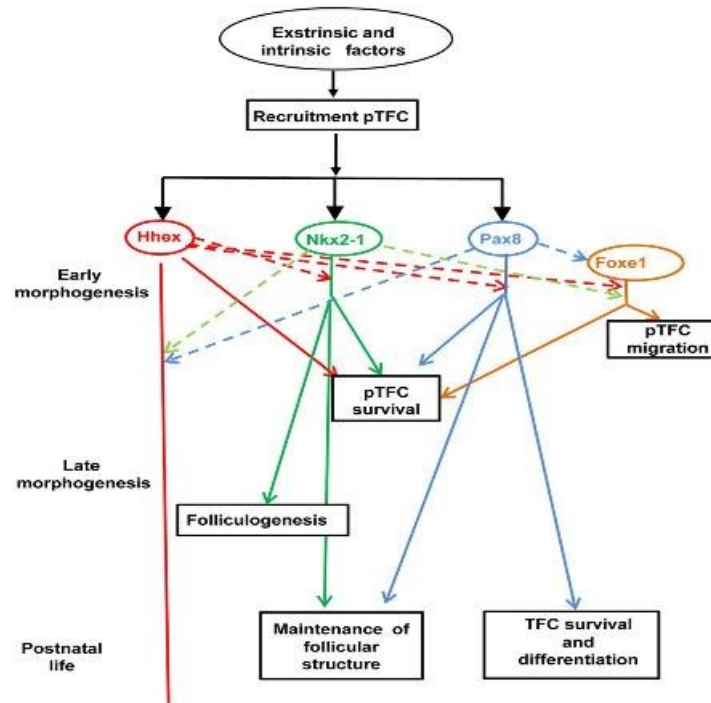


Figure 9. – Interaction entre les facteurs de transcription de la signature spécifique des pTFCs (adapté de Nilsson et Fagman, 2013 (1)).

3.2 Bourgeonnement

Suite à la spécification, les cellules précurseurs folliculaires (pTFCs) subissent divers changements morphologiques. L'épaississement du plancher pharyngien près de la base de langue est suivi de la formation du bourgeon thyroïdien (12). Durant ces étapes, le sac aortique, une structure embryonnaire transitoire, est très proche des pTFCs (12, 150, 151). Le bourgeonnement se produit autour de E10 chez la souris et 32hpf chez le poisson-zèbre (2, 17, 150). Le patron d'expression de ces quatre gènes, qui est la signature des pTFCs, se modifie durant le bourgeonnement et l'expression de l'un affecte désormais l'expression des autres (Figure 10) (1). Par exemple, à ce stade, *Hhex* régule l'expression de *Pax8* et *Foxe1* (17). Le mécanisme du bourgeonnement n'est pas très bien connu, mais l'importance de *HEX* semble débiter lors du bourgeonnement, puisque chez la souris déficiente pour *Hhex*, l'épaississement du plancher pharyngien est visible autour de E9, mais à E10 le bourgeon thyroïdien est sévèrement affecté avec pratiquement aucune cellules précurseurs folliculaires visible (17). Par contre, chez le poisson-zèbre, *hhex* ne semble pas important pour le bourgeonnement, puisque des pTFCs sont

visibles à 30hpf malgré l'inhibition de *hhex* par un morpholino (18). *Nkx2.1* semble aussi jouer un rôle puisqu'à E10 le bourgeon est plus petit dans un modèle de souris *Nkx2.1*^{-/-} de même que dans un modèle de poisson-zèbre dont l'expression de *nkx2.1a* est diminuée (17, 18, 125).

3.3 Migration

La migration de la thyroïde est un concept qui ne fait pas consensus dans la communauté scientifique, puisqu'aucune migration active n'a encore été confirmée. Certains suggèrent que la thyroïde ne migre pas réellement, mais qu'elle semble se déplacer à cause de l'allongement du pharynx (45). Malgré tout, lors de l'embryogenèse, la thyroïde part de la base de la langue pour se rendre à la base du cou. Chez la souris, la migration du bourgeon thyroïdien se fait initialement en maintenant une liaison avec le plancher pharyngien, au niveau du foramen caecum (le site d'origine des cellules précurseurs folliculaires) par un canal, le canal thyroïdienne, et en perdant le contact avec le sac aortique. Par contre, rapidement après la perte de contact avec l'endoderme pharyngien, due à la disparition du canal thyroïdienne, la thyroïde retrouve une proximité avec le sac aortique (Figure 10A, B) (150). Chez le poisson-zèbre, la migration du bourgeon thyroïdien est la première de deux étapes de migration et la thyroïde demeure en contact étroit avec le cœur pendant toute cette première étape (Figure 10C-H) (3). La migration se produit entre E25-50 chez l'humain, E10.5-13.5 chez la souris et 35-45 hpf chez le poisson (15, 17). Cette étape est la moins bien comprise en termes de mécanisme. Le seul facteur jouant un rôle dans la migration est *FOXE1*. Tel que mentionné précédemment, la moitié des souris déficientes pour *Foxe1* ont une ectopie à E11.5, mais naissent avec une athyréose (127). Par contre, au regard de tous les résultats obtenus pour *FOXE1*, une certaine ambiguïté, qui sera discutée plus loin, demeure présente.

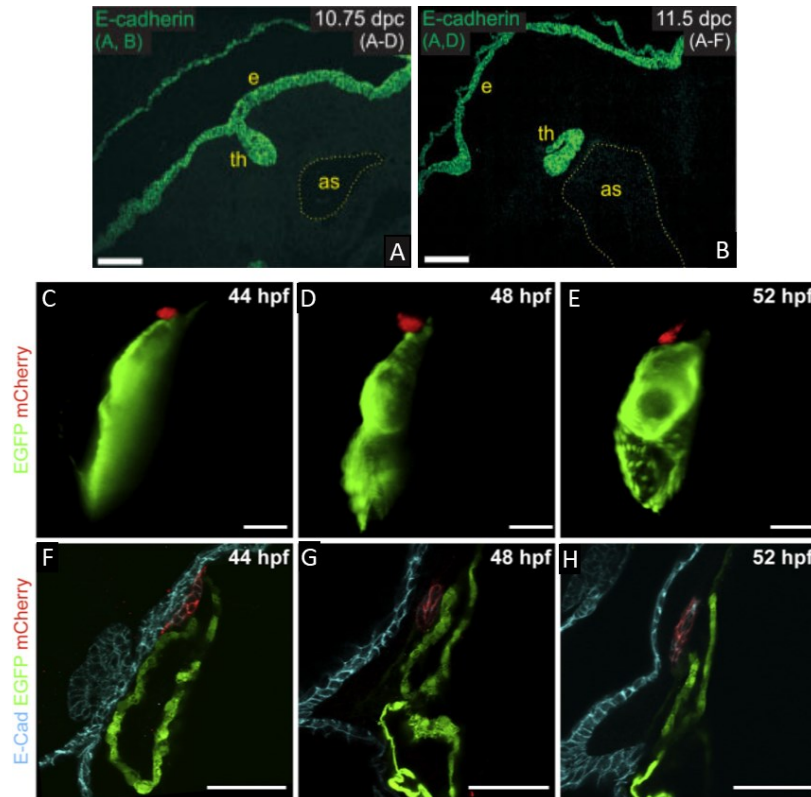


Figure 10. – Migration de la thyroïde chez la souris (A, B) et le poisson zèbre (C-H). Chez la souris, le bourgeon thyroïdien perd le contact avec le sac aortique au début de la migration (A) mais se retrouve à nouveau près de ce dernier à la fin de la migration (B) tandis que chez le poisson-zèbre, la thyroïde demeure en contact étroit avec l'ébauche du cœur tout au long de la migration précoce (C-H). as : sac aortique; e :endoderme; th : thyroïde; vert (A,B) : endoderme hpf : heure post-fertilisation, mCherry : exprimé sous le promoteur de la thyroglobuline, un marqueur de la thyroïde; EGFP : exprimé sous le promoteur de myl7, un marqueur du cœur; E-cad : marqueur de l'endoderme (adapté de Fagman et al., 2006 (150) et d'Opitz et al., 2012 (3))

Une question qui demeure encore aujourd'hui sans réponse est de savoir si la migration est active ou passive, et si elle est active, est-elle collective ou individuelle? Il a été démontré que les cellules précurseurs folliculaires (pTFCs) demeurent en amas compact et maintiennent l'expression d'E-cadhérine dans les jonctions serrées durant la migration. Par conséquent, les pTFCs ne subissent pas de transition épithélium-mésenchyme, qui est souvent une étape

essentielle caractéristique d'une migration active (162). Par contre, un maintien de l'expression d'E-cadhérine peut aussi être associé à la migration active, mais collective plutôt qu'individuelle (163, 164). De plus, les pTFCs sont polarisées, comme le confirme l'expression de ZO-1 à la membrane apicale (150, 165). Lorsque cette polarité est affectée, par exemple en inhibant *Cdc42* et *Shroom3*, la formation du bourgeon thyroïdien est compromise, puisque les cellules ne sont pas en mesure d'effectuer une constriction apicale afin de former le bourgeon (Figure 11) (165).

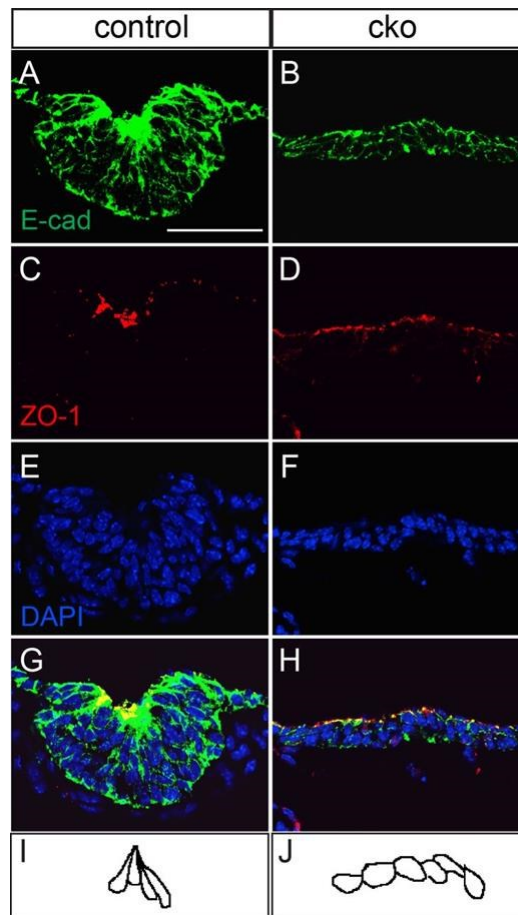


Figure 11. – Les souris déficientes pour *Cdc42* (cko) (B, D, F, H) ne forment pas de bourgeon thyroïdien à E10.5 dû en partie à l'absence d'expression spécifique de ZO-1 à la membrane apicale (D), contrairement aux souris contrôles (C). E-cad : marque l'endoderme au niveau du bourgeon thyroïdien; DAPI : marque les noyaux (adapté de Loebel et al., 2016 (165))

Les cellules qui migrent collectivement sont souvent polarisées et expriment Cdc42 et Shroom3 (164, 166-169). De plus, l'expression de FGF n'est pas uniforme au sein de l'amas de pTFCs, ce qui est aussi fréquemment observé lors de migrations collectives (163). Finalement, une étude réalisée chez le poisson-zèbre suggère que les pTFCs migrent vers des cellules endothéliales lorsque ces dernières sont injectées près de la thyroïde (Figure 12) (170). Même si plusieurs résultats suggèrent une migration collective, des études sont encore nécessaires pour confirmer cette hypothèse. En résumé, le mystère demeure entier en ce qui concerne le mécanisme et les facteurs induisant la migration de la thyroïde.

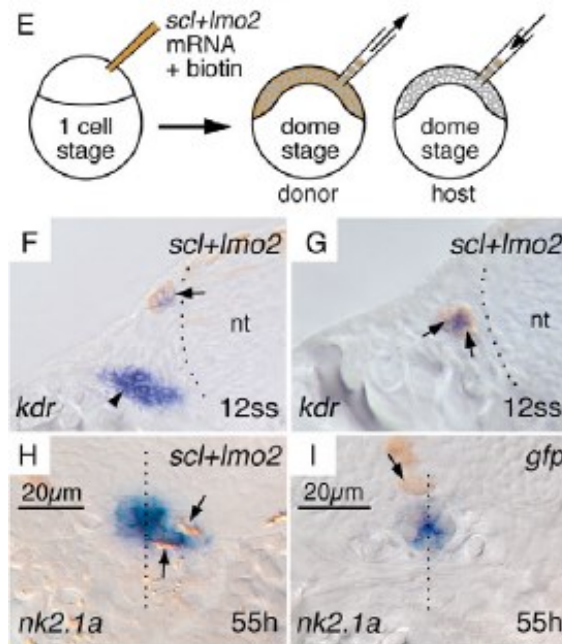


Figure 12. – Des cellules endothéliales ectopiques affectent la migration des cellules thyroïdiennes. E. Schéma de la technique utilisée. L'injection d'ARNm de *scl* et *Imo2* en plus de la biotine induit l'apparition massive de cellules endothéliales. (E, F, G) Le prélèvement de certaines de ces cellules et la greffe de ces dernières dans un autre embryon permet l'apparition de cellules endothéliales ectopiques exprimant le marqueur endothélial *kdr*. H. L'injection de ces cellules près des cellules thyroïdiennes induit la migration de ces dernières vers ces cellules endothéliales ectopiques. Des cellules *gfp* qui ne sont pas des cellules endothéliales n'induisent pas la migration de cellules thyroïdiennes (adapté d'Alt et al., 2006 (170))

3.4 Prolifération/bilobation

Suite à la migration, la thyroïde des mammifères et du poisson-zèbre ne suivront plus exactement les mêmes étapes de développement, ce qui induira une morphologie différente, mais la structure des follicules demeure très similaire. La prolifération débute à divers moments, dépendamment du modèle étudié, et l'intensité de la prolifération semble varier tout au long du développement (Tableau 2) (12, 150, 171, 172). Chez la souris, la prolifération des cellules précurseurs folliculaires débute lorsque la thyroïde est encore en migration (12, 150). Une prolifération intense est observée entre E12.5 et E13.5, et c'est à ce moment que la bilobation se produit. À E13.5 les corps ultimobranchiaux ont déjà fusionné avec les pTFCs (150). Chez le poisson, des changements importants sont aussi observés. Les cellules commencent à proliférer de manière importante autour de 55hpf et perdent le contact avec le cœur peu après et vont commencer leur deuxième migration, soit la migration rostrale (ou migration tardive) (3, 155). Les vaisseaux sanguins sont très importants pour la bilobation de même que pour la migration rostrale (3, 12, 122, 128).

Contrairement à ce qui est observé chez l'adulte, la prolifération durant l'embryogenèse est indépendante de la TSH (12, 173, 174). Plusieurs voies de signalisation semblent stimuler la prolifération des cellules précurseurs folliculaires (pTFCs), puisque plusieurs modèles déficients pour certains gènes présentent une diminution du nombre de cellules folliculaires ou une hypoplasie de la glande (131). Par exemple, mais de manière non exhaustive : *Hoxa3*, *Tbx1*, *Shh*, *Fgf10*, *Eya1*, et *Taz* semblent tous affecter la prolifération des pTFCs (11, 70, 128, 175-177). Certains FGF de même que la voie Notch, via *Hes1*, semblent participer au contrôle de la prolifération à différents stades de développement (12, 129). Comme il est possible de le constater, un éventail de gènes et de voies semble influencer la prolifération des cellules thyroïdiennes, mais les interactions entre chacune d'elles ne sont pas encore très claires.

3.5 Folliculogenèse

La dernière étape du développement de la thyroïde est la différenciation des cellules précurseurs folliculaires en cellules folliculaires matures et la formation des follicules. Cette étape

est très bien régulée et arrive à un moment très précis, mais ce moment diffère grandement entre les espèces. Par exemple, lors de la morphogenèse normale de la thyroïde, chez la souris et l'humain, la folliculogenèse ne commence pas avant que les pTFCs n'aient atteint leur destination finale et que la bilobation ait eu lieu. Étant donné que des follicules matures sont présents dans les ectopies, la folliculogenèse peut se produire même lors d'un défaut de migration ou de bilobation. Chez la souris, des micro-follicules composés d'une petite lumière sont discernables à E15 (12, 150, 178). Par contre, chez le poisson-zèbre le premier follicule apparaît très tôt, autour de 55-60 hpf, et les marqueurs de la différenciation fonctionnelle peuvent être observés entre 36hpf (*tg*) et 42hpf (*tpo*, et *slc5a5*), donc avant et pendant la migration du bourgeon thyroïdien (2, 174). Cependant, ces follicules précoces ne sont pas fonctionnels, la T₄ ne devient mesurable dans les cellules thyroïdiennes qu'autour de 72-80hpf (3, 130, 179). Comme mentionné précédemment, les follicules chez le poisson-zèbre sont dispersés le long de l'aorte hypobranchiale (3). Chez la souris, à E15.5, les follicules sont assemblés en cordons formant des ramifications et à E17.5 ces cordons ont disparu laissant place à des follicules séparés. La folliculogenèse est accompagnée d'une diminution importante de la prolifération (150). L'expression des gènes de la différenciation fonctionnelle est observée de manière séquentielle : l'expression de *Tg* est visible autour de E14.5, suivie de *Tpo* et *Tshr* à E15, *Slc5a5* et *Duox2* à E15.5 et finalement T₄ devient détectable dans les cellules folliculaires autour de E16.5 (16, 173, 180-182).

Les voies impliquées dans la folliculogenèse sont mal connues, car très peu étudiées. Des facteurs intrinsèques et extrinsèques sont impliqués. *PAX8* et *NKX2.1* sont connus depuis longtemps pour être impliqués (12, 183, 184). Ces derniers sont suffisants pour différencier des cellules embryonnaires souches (ESCs) de souris en follicules thyroïdiens fonctionnels lorsque ceux-ci sont traités par la TSH. Ces follicules, lorsque greffés dans des souris avec athyréose, permettent de rétablir les niveaux d'hormones thyroïdiennes (185). *Nkx2.1* et *Pax8* semblent tous deux influencer les niveaux de cadhérine 16 (183, 184, 186). Il a été montré que l'inhibition de l'activité kinase de *Nkx2.1* empêche la folliculogenèse en affectant l'expression de protéines de jonction telles les cadhérines 1 et 16 et ZO-1 (183). *Pax8* semble stimuler la folliculogenèse dans les thyrocytes en culture en favorisant la polarisation des cellules via l'expression de cadhérine

16 au pôle apicale (184). Ce mécanisme pourrait aussi être impliqué dans le développement embryonnaire même s'il n'a pas été confirmé. La TSH, même si essentielle à la folliculogénèse chez l'adulte n'est pas impliquée dans celle chez l'embryon. Les follicules sont bien formés chez des souris *Tshr*^{-/-} (173). Par contre, la TSH semble importante pour la différenciation optimale chez le poisson-zèbre (174). *Smad5*, *Sox9*, *Vegfa*, et *Fgf10* sont tous des facteurs jouant un rôle dans ce processus complexe, certains sont exprimés dans la thyroïde, tel *Sox9*, mais d'autres sont extrinsèques comme *Fgf10* (175, 186-188).

3.6 Facteurs intrinsèques

3.6.1 HHEX

HHEX est un facteur de transcription qui fait partie de la signature spécifique des pTFC. Durant le développement, *HHEX* est exprimé dans la partie antérieure de l'endoderme et joue un rôle dans le développement de divers organes, tels les poumons, le foie, le pancréas, et la thyroïde (152, 189). Par exemple, il joue un rôle primordial dans le positionnement du bourgeon du foie, ce qui n'est pas le cas pour le bourgeon thyroïdien (17, 190). Les souris *Hhex*^{-/-} ont une spécification adéquate, un bourgeon hypoplasique bien positionné, mais un faible nombre de cellules précurseurs folliculaires (17, 152). *Hhex* n'est donc pas indispensable à la spécification, mais essentiel à la survie des pTFCs, comme il est possible de le constater avec la diminution importante de la taille du bourgeon thyroïdien à E10 chez la souris et la diminution du nombre pTFC chez le poisson-zèbre à hpf (17, 18). Tel qu'écrit précédemment, à un certain point dans le développement, *Hhex* est important pour le maintien de l'expression de *Pax8* et *Nkx2.1* (17). Les rôles d'*Hhex* dans les étapes plus tardives n'ont pas été étudiés.

3.6.2 NKX2.1

NKX2.1 (aussi nommé *TTF-1*, *TITF1*, ou *T/EBP*) a été initialement identifié dans la thyroïde, ce qui lui a valu sa première appellation (*TTF-1* : thyroid-specific transcription factor 1), et ultérieurement dans plusieurs autres organes (12, 180). Il est exprimé dans les cellules folliculaires et parafolliculaires tout au long du développement, mais aussi chez l'adulte. Il régule l'expression de *Foxe1*, de *Hhex*, et de *Pax8* (17, 20). L'orthologue chez le poisson-zèbre est *nkx2.4b* (par le

passé il était nommé *nkx2.1a*) (151). *NKX2.1* est un facteur qui joue une panoplie de rôles dans les différentes étapes du développement, mais en général, en étroite collaboration avec *PAX8*. Tout d'abord, l'expression de *NKX2.1* et *PAX8* est suffisante pour induire la spécification des cellules précurseurs folliculaires (pTFCs) dans des modèles *in vitro* (160, 185). Récemment, il a été montré chez le poisson-zèbre qu'il existe, au tout début de la spécification, deux types de population de pTFCs distinguables par leurs niveaux d'expression de *nkx2.4b* et de *pax2a*. Un type n'exprime que *pax2a* tandis que l'autre exprime *pax2a* et *nkx2.4b* et cette différence d'expression serait le premier signe de la spécification (48). Par contre, il est important de mentionner que les souris *Nkx2.1*^{-/-} n'ont pas de problème de spécification des pTFCs ni de formation du bourgeon thyroïdien, et ce même si les pTFCs meurent rapidement suivant la formation de ce dernier, probablement par apoptose (17, 125). Cela suggère que *Nkx2.1* est très important mais non indispensable pour la spécification *in vivo*. Ensuite, comme mentionné dans la section bourgeonnement, son rôle dans la survie et la prolifération des pTFCs a été démontré dans des modèles animaux (17, 18, 125). Excepté l'influence de *Nkx2.1* sur l'expression de *Foxe1*, aucun rôle direct de *Nkx2.1* dans la migration n'a été montré ni chez la souris ni chez le poisson-zèbre. Finalement, pour la folliculogénèse, il a été montré que l'inhibition de l'activité kinase de *Nkx2.1* empêche la folliculogénèse en affectant l'expression de protéine de jonction (cadhérine 1 et 16 et ZO-1) (183). *Nkx2.1* affecte aussi l'expression de nombreux marqueurs de la différenciation fonctionnelle (*Tshr*, *Tg*, *Tpo*, et *Slc5a5*) des cellules folliculaires, en se liant directement à leur promoteur (105, 191-193).

3.6.3 PAX8

PAX8 (*Pax8/pax2.1*) est un facteur de transcription faisant partie de la famille des paired-box (*Pax*) connue pour leur rôle majeur durant l'embryogénèse. Il a été préalablement identifié dans le rein de la souris et ensuite dans la thyroïde, qui est le seul organe provenant de l'endoderme où il est exprimé (16, 194). Il est exprimé dès le début de la spécification tant chez la souris (E8.5) que chez le poisson-zèbre (24hpf) et maintenu durant tout le développement et à l'âge adulte (16, 179, 194). Tout comme *Nkx2.1*, *Pax8* joue un rôle dans la plupart des étapes du développement de la thyroïde, et augmente l'expression de tous les gènes de la signature des cellules précurseurs folliculaires (17, 20). Il est un des deux premiers facteurs de transcription à

être exprimés dans les pTFCs (48). De plus, les souris *Pax8*^{-/-} naissent avec une athyréose, mais la spécification des pTFCs se produit (17, 126). Contrairement aux souris *Nkx2.1*^{-/-}, elles ont des cellules parafolliculaires. Les pTFCs semblent mourir par apoptose autant chez la souris (E12.5) que chez le poisson-zèbre (30hpf) (17, 18, 126, 179). Ces souris déficientes meurent de leur hypothyroïdie sévère si elle demeurent non-traitées par de la thyroxine contrairement aux autres modèles, dans lesquels la mort survient à cause d'autres malformations sévères (126, 195). *Pax8* semble jouer un rôle particulièrement important dans le maintien des facteurs anti-apoptiques puisque son inhibition induit une diminution de *Bcl2*, ce qui induit l'apoptose des cellules (196, 197). Cette diminution de *Bcl2* pourrait aussi en partie expliquer le phénotype d'apoptose dans le modèle *Nkx2.1*^{-/-}, sachant que ce dernier régule l'expression de *Pax8* et donc indirectement celle de *Bcl2*. Il est important de mentionner que la souris *Pax8*^{-/-} perd aussi l'expression de *Foxe1*, mais cela ne mène pas à un défaut de migration, ce qui suggère que *Foxe1* n'est pas indispensable à la migration du bourgeon thyroïdien (17). Ensuite, *Pax8* stimule la folliculogenèse dans les thyrocytes en culture en favorisant la polarisation apicale des cellules par l'augmentation de l'expression de cadhérine 16 (184). Finalement, *Pax8* régule l'expression de nombreux marqueurs de la différenciation fonctionnelle, tels *Tg*, *Tpo*, *Tshr*, et *Sl5a5* (16, 185, 198, 199).

3.6.4 FOXE1

FOXE1 (TTF2) a lui aussi été identifié en premier chez des thyrocytes (de rat cette fois-ci), il fait partie de la famille des Fox, une autre importante famille avec un rôle crucial dans le développement (200). Il est exprimé dans plusieurs autres tissus durant le développement incluant la langue, le palais, l'hypophyse et les follicules pileux, ce qui explique pourquoi une mutation dans ce gène induit des défauts dans plusieurs de ces tissus et correspond au syndrome de Bamforth-Lazarus (69). Son expression est régulée par tous les autres gènes de la signature des cellules précurseurs folliculaires, mais il n'en régule aucun (17, 20). C'est le seul facteur identifié pour son implication dans la migration, tel que présenté précédemment à l'aide des souris *Foxe1*^{-/-} dont la moitié présentent une ectopie à E11.5, mais naissent avec une athyréose (127). La ré-expression spécifique de *Foxe1* dans les pTFCs de ces souris déficientes empêche le phénotype thyroïdien (17). Par contre, il ne semble pas être un facteur indispensable, puisque comme mentionné précédemment le modèle de souris déficient pour *Pax8* n'exprime pas *Foxe1*

et n'a pas de problème de migration (15, 17, 126). Une explication potentielle pour expliquer le phénotype de souris *Foxe1*^{-/-} pourrait être le fond génétique des souris utilisées, tout comme pour le modèle hétérozygote *Pax8* et *Nkx2.1* (74). *FOXE1* est exprimé de manière similaire dans des tissus thyroïdiens ectopiques et orthotopiques, et aucune ectopie n'a été trouvée chez des patients avec des mutations de *FOXE1*, suggérant que d'autres facteurs régulent la migration (75). Il est important de mentionner que l'importance de *Foxe1* dans la migration semble être un effet évolutif puisque des études avec d'autres modèles tels le poisson-zèbre, l'amphioxus et le tunique ne démontrent aucun effet de *foxe1* dans le développement thyroïdien (153, 201).

Un mécanisme potentiel afin d'expliquer le rôle de *Foxe1* dans la migration aurait pu être son implication de la transition épithélium-mésenchyme, puisqu'il régule l'expression de *Msx1* et *Tgfb3*, deux facteurs impliqués dans cette transition (202). Par contre, ce mécanisme n'est pas prédominant durant l'embryogenèse de la thyroïde puisque l'expression d'E-cadhérine est maintenue durant le processus (162, 202). *Foxe1* pourrait aussi affecter la migration collective, le mécanisme proposé pour la migration du bourgeon thyroïdien (12). En conclusion, *Foxe1* semble jouer un rôle dans la migration, mais le mécanisme demeure obscur. Le rôle de *Foxe1* dans les étapes ultérieures de la différenciation n'a pas été étudié, mais il serait intéressant de l'investiguer, puisque les thyroïdes *Foxe1*^{-/-} à E15.5 produisent de la Tg (127).

3.6.5 SOX9

Sox9 est exprimé dans les pTFCs à partir E9.5 et semble impliqué dans le processus de ramification de la thyroïde embryonnaire tel que suggéré par Liang et al (175). Ceci concorderait avec son rôle important dans le processus de ramification du poumon et du pancréas. L'expression de *Sox9* est maintenue durant tout la morphogenèse de la thyroïde et dans les cellules folliculaires matures, ce qui est contraire à ce qui est observé dans le poumon. De plus, même si *Sox9* est régulé par *Fgf10* dans le poumon, cela ne semble pas être le cas dans la thyroïde, et ce même si *Fgf10* joue un rôle dans la prolifération et la ramification de la thyroïde (175, 203). Lors du processus de ramification embryonnaire et de folliculogenèse, il est principalement exprimé dans les cellules distales, expliquant ainsi son rôle présumé dans ces processus. Il est aussi exprimé dans le mésoderme adjacent au bourgeon thyroïdien, ce qui pourrait suggérer un

rôle paracrine. Malgré son expression précoce, son rôle dans les étapes ultérieures n'a pas été évalué.

3.7 Facteurs extrinsèques

3.7.1 Les voies de signalisation FGF/BMP

FGF en combinaison avec BMP est un facteur extrinsèque clé dans le développement de la thyroïde, autant dans la spécification que plus tardivement. Les rôles des FGF dans le développement thyroïdien sont connus depuis longtemps, tandis que ceux des BMP ont été identifiés plus récemment (158, 160). Tout d'abord, des souris déficientes pour *Fgfr2b* et *Fgf10* présentent une absence de thyroïde et de plusieurs autres organes (157, 158). Chez le xénope, l'inhibition de FGF ou BMP empêche le développement de la thyroïde (12). Chez le poisson-zèbre, l'expression de *fgf1*, *fgf2*, ou *fgf8* permet l'induction du marqueur thyroïdien *slc5a5* dans le mutant *han* (*hand off*, le locus *han* comprend le facteur de transcription *hand2*) qui est dépourvu d'une thyroïde et dont la spécification des cellules précurseurs folliculaires semble affectée puisque l'expression de *nkx2.4b* est fortement diminuée ou absente chez les larves (159). Très récemment, une étude chez le poisson-zèbre a montré les rôles essentiels de FGF et BMP lors de la spécification, et confirmé qu'ils proviennent du mésoderme comme suggéré par Wendl et al. en 2007 (48). Selon cette étude, il existe deux types de population de cellules précurseurs folliculaires différenciables par leur niveau d'expression de *nkx2.4b* et de *pax2a* tel que mentionné précédemment. Il semblerait que FGF2 contrôle l'expression de *pax2a* et que BMP4 contrôle celle de *nkx2.4b*. Les deux facteurs sont essentiels à la spécification puisque leur inhibition affecte sévèrement ce processus et BMP semble agir via FGF (48, 159). Ces deux facteurs proviendraient par vague du mésoderme cardiaque afin d'induire de manière séquentielle l'expression de *pax2a* et *nkx2.4b*. Ceci induirait la spécification de certaines cellules de l'endoderme pharyngien en pTFCs (48), ce qui concorde avec les études précédentes montrant l'importance de FGF et BMP dans la spécification (160, 161, 204).

En effet, il a été montré *in vitro* que *Fgf2* et *Bmp4* étaient nécessaires pour induire la spécification de cellules souches embryonnaires (ESCs) murines et humaines de même que des

cellules souches pluripotentes (iPSCs) en pTFC (160, 161, 204). Par contre, il est important de mentionner que ce traitement induit aussi des cellules progénitrices de poumon, puisque ces deux facteurs sont aussi exprimés dans les poumons (161).

Les rôles des FGF dans les autres étapes du développement de la thyroïde n'ont pas été spécifiquement étudiés puisque les études ont été réalisées uniquement chez des mutants où l'expression des *FGF* était absente dès le début de l'embryogenèse. Les souris déficientes pour *Fgf10* ont des unités angiofolliculaires désorganisées et des défauts de ramification embryonnaire et les souris *Tbx1*^{-/-}, caractérisées par une diminution importante de *Fgf8*, ont une glande ectopique hypoplasique avec hémithyroïde, mais pas de défaut de spécification (70, 175).

3.7.2 La voie de signalisation Notch

La voie des Notch est exprimée dans les thyrocytes en développement et matures chez la souris (205). Une diminution de la voie Notch, et principalement *Hes1*, a d'abord été découverte dans les tissus thyroïdiens cancéreux et sa réexpression affecte l'expression du marqueur des thyrocytes matures, *Slc5a5* (205). Ceci a mené le groupe de Carré *et al.* à évaluer le rôle de *Hes1* dans le développement de la thyroïde. Chez la souris *Hes1*^{-/-}, le bourgeon thyroïdien est plus petit avec un nombre de cellules précurseurs folliculaires exprimant *Nkx2.1* inférieur. La thyroïde est hypoplasique et la synthèse de la T₄ est diminuée, probablement à cause de la diminution de l'expression de NIS, et la calcitonine est également diminuée. Cela suggère un rôle dans la prolifération des pTFCs mais aussi dans la différenciation des pTFCs en thyrocytes matures (129). Chez le poisson-zèbre, une diminution de *jab1a* et *jag1b*, deux ligands de la voie Notch, affecte la migration tardive de la thyroïde et un nombre inférieur de cellules folliculaires et de follicules est observé (206, 207).

3.7.3 Le facteur de transcription Tbx1

TBX1, un des gènes associés à une HCDT syndromique (Di George) joue un rôle important dans l'expression de *Nkx2.1* dans les cellules précurseurs folliculaires (cellules *Nkx2.1*⁺) (208). Il est considéré comme un facteur extrinsèque puisque, bien qu'il soit exprimé dans l'endoderme pharyngien, c'est son expression dans le mésoderme qui semble impliqué dans l'apparition de la

sous-population de pTFC exprimant *nkx2.1*, c'est aussi ce qui est observé dans le développement cardiaque (208, 209). Chez la souris, l'effet de *Tbx1* est médié via *Fgf8* et semble affecter les étapes ultérieures de la morphogenèse puisque malgré la présence d'un bourgeon thyroïdien, les souris *Tbx1*^{-/-} ont une glande ectopique hypoplasique avec un seul lobe (70). L'hypothèse avancée par les auteurs de l'étude chez la souris, pour expliquer ce mécanisme, est un retard dans la formation du bourgeon thyroïdien induisant une absence de contact avec le sac aortique et ainsi une perte de contact avec les facteurs induisant le détachement du bourgeon et sa migration (70). D'autre part, l'hypoplasie de la thyroïde pourrait être due à une perte de contact avec les vaisseaux malformés observés chez la souris *Tbx1*^{-/-}, ce qui occasionnerait une diminution de l'exposition des pTFCs aux différents facteurs, favorisant la prolifération, sécrétés par les cellules endothéliales des vaisseaux (210). Chez le poisson-zèbre, *fgf8a* affecte la spécification puisque le nombre de pTFC est diminué (mutants *ace* et *han*) (159).

3.7.4 La voie de signalisation Shh (Sonic hedgehog)

Shh est principalement exprimé dans la région ventrale de l'endoderme près de la formation du bourgeon thyroïdien et joue un rôle dans le développement de la thyroïde, plus précisément dans sa morphogenèse, puisque les souris déficientes pour Shh présentent une thyroïde hypoplasique, semblable à une hémithyroïde, et une absence de fusion des corps ultimobranchiaux (128). La position des vaisseaux sanguins, principalement des artères, joue un rôle dans la bilobation et dans la migration tardive de la thyroïde comme démontré chez la souris et le poisson-zèbre (128, 170). Fait intéressant, Shh doit être réprimé afin de permettre l'apparition du bourgeon thyroïdien, mais seulement à l'endroit où il doit apparaître, autrement il n'apparaîtra jamais (17, 128). Ce n'est pas le seul facteur qui doit être réprimé pour que le bourgeon thyroïdien se forme, c'est aussi le cas pour *Foxa2* (6, 196, 211). Ceci suggère que le rôle de Shh est plutôt extrinsèque, même si plus tard Shh est faiblement exprimé dans certaines cellules thyroïdiennes. Cela affecte peut-être la prolifération de manière intrinsèque, mais cela n'a pas été démontré à ce jour (12, 212). Chez le poisson-zèbre, *glis3* affecte la spécification des cellules précurseurs folliculaires, ce qui entraîne une hypoplasie de la glande et une diminution des marqueurs des thyrocytes différenciés *tg* et *nis* (213). Les auteurs suggèrent que cela se produit via la voie Shh, puisqu'une inhibition pharmacologique de Shh récapitule le phénotype

observé chez les morphants. Par contre, chez la souris *Glis3*^{-/-}, aucun défaut de la thyroïde n'est visible à la naissance excepté des follicules plus petits, mais fonctionnels, même si les souris développent une hypothyroïdie due à une diminution des gènes impliqués dans la synthèse des HT (213, 214). Il est intéressant de rappeler que des mutations de *GLIS3* ont été identifiées chez l'humain et qu'elles sont souvent associées à une HCDT sévère (121, 215). *GLIS3* joue donc certainement un rôle dans le développement ou la fonction de la thyroïde. Finalement, *Glis3* et *Shh* sont exprimés dans les cils primaires, et il a été suggéré qu'ils jouent un rôle dans la fonction des cellules thyroïdiennes puisqu'ils sont présents dans ces dernières durant le développement, mais aussi à l'âge adulte (16, 216).

3.7.5 Famille des Hox

Les gènes de la famille Hox ne sont pas directement exprimés dans les cellules folliculaires durant le développement, mais plutôt dans les corps ultimo-branchiaux et dans l'endoderme environnant, où ils sont importants pour la migration des corps ultimo-branchiaux (217). Les souris *Hoxa3*^{-/-} et ses paralogues *Hoxb3* et *Hoxd3* ont une hémithyroïde avec peu de follicules, ce qui suggère un rôle dans la prolifération (10, 11). *Hoxa5*, qui est exprimé près des pTFCs de E12.5 à E18.5, influence aussi le développement de la thyroïde puisque son inhibition entraîne une désorganisation des follicules et une diminution d'expression de certains facteurs de transcription exprimés dans la thyroïde et de certains gènes impliqués dans la synthèse des HT tel *Nkx2.5*, *Foxe1*, *Pax8*, *Tg*, et *Tpo* (218, 219). Il est important de mentionner que l'effet sur la morphologie de la thyroïde semble transitoire (218).

3.7.6 La voie des Wnt

Certaines études suggèrent un rôle de la voie des Wnt dans le développement de la thyroïde. D'une part, dans l'étude d'Abu-Khudir en 2010, plusieurs gènes de la voie des Wnt avaient une expression modifiée dans les thyroïdes ectopiques comparé aux tissus contrôles (75). D'autre part, une étude récente réalisée chez le poisson-zèbre montre que la voie des Wnt est essentielle à la spécification des cellules précurseurs folliculaires (156).

3.7.7 Cofacteurs de transcription

Certains régulateurs de la transcription, identifiés à l'aide des modèles animaux, semblent jouer un rôle dans le développement de la thyroïde. *Eya1* et *Taz* (*Wwtr1*) en sont deux exemples. D'une part, *Eya1* est impliqué dans le développement de plusieurs tissus dérivés du pharynx embryonnaire, soit le thymus, la parathyroïde, et la thyroïde (176). Les souris déficientes pour *Eya1* ont une hypoplasie de la thyroïde, des corps ultimo-branchiaux persistants qui n'ont pas fusionné avec la thyroïde, et une diminution de nombre de follicules et de cellules C. D'autre part, *Taz* est un cofacteur régulant l'expression de nombreux facteurs de transcription qui est exprimé dans les pTFCs chez la souris à E14.5 et chez le poisson-zèbre à 42 hpf, donc tardivement dans le développement (177, 220). Chez la souris, son expression demeure jusqu'à l'âge adulte mais elle disparaît à 4 jours post-fertilisation chez le poisson-zèbre. Il a été démontré que *Taz* pourrait directement lier *Pax8* et *Nkx2.1*, mais son rôle dans le développement de la thyroïde n'est pas encore très bien compris (220, 221). La thyroïde n'a pas été étudiée dans la souris *Wwtr1*^{-/-} et chez le poisson-zèbre dont l'expression de *wwtr1* a été inhibée à l'aide de morpholinos, la thyroïde semble plus petite mais fonctionnelle (177). Malgré une thyroïde fonctionnelle, 17.2% des larves morphants présentaient des défauts au niveau de la migration rostrales, suggérant l'implication de *taz* dans le développement des vaisseaux sanguins (177) Il a été suggéré qu'une activation continue de *Taz* pourrait induire l'expression de *Nkx2*, *Pax8*, *Tpo*, *Tg*, et *Slc5a5* et donc induire la spécification des cellules précurseurs folliculaires (221). Tous ces résultats suggèrent un rôle pour *Taz*, mais certains points restent à éclaircir.

3.8 Interaction avec d'autres tissus

Plusieurs facteurs sécrétés par des tissus adjacents à la thyroïde influencent son développement. Le fait que certains facteurs de transcription, tels *Nkx2-5*, *Isl1*, et *Tbx1* influencent le développement du cœur et de la thyroïde suggère un lien entre les deux organes (12, 70, 114, 222). Les études sur *fgf* et *bmp* chez le poisson-zèbre montrent bien que le mésoderme est une source importante de facteurs extrinsèques (48). De plus, l'ébauche du cœur demeure à proximité de la thyroïde durant les étapes de spécification, de bourgeonnement et de migration autant chez la souris que chez le poisson-zèbre (migration précoce) (3, 150).

Les vaisseaux sanguins ont aussi un effet sur la migration tardive de la thyroïde chez le poisson-zèbre, mais non sur le développement précoce (3). Les vaisseaux sanguins guident la bilobation chez la souris (150). L'inhibition de gènes affectant la formation des vaisseaux sanguins (*Shh*, *vegfa*, *kdrl*, *cloche*, *ntn1a*, *jag1a*) induit aussi des défauts de position ou de prolifération de la thyroïde. Par exemple, chez la souris déficiente pour *Shh*, les vaisseaux mal formés semblent affecter la bilobation et induire une thyroïde ectopique avec des problèmes structuraux aux niveaux des lobes (128). Chez le poisson-zèbre, une diminution de nétrine-1 entraîne un défaut de positionnement des vaisseaux et de la thyroïde visible dès 55hpf (122). Finalement, un autre argument en faveur de l'importance des vaisseaux est l'implication de *Vegfa*, un facteur angiogénique. VEGFA est sécrété par les cellules précurseurs folliculaires qui induisent le recrutement des cellules endothéliales afin de former le réseau vasculaire intrinsèquement lié aux follicules (186). Les cellules endothéliales semblent aussi importantes pour la formation des follicules (186-188).

Les cellules de la crête neurale ont aussi un effet sur la morphogenèse de la thyroïde, que ce soit chez la poule ou la souris (12, 223-225). En effet, lorsque certaines cellules de la crête neurale sont absentes chez la poule, la thyroïde possède un seul lobe ou est absente (225).

En résumé, plusieurs facteurs jouent un rôle dans la morphogenèse de la thyroïde et même si plusieurs facteurs et interactions ont été identifiés, plusieurs étapes demeurent encore partiellement comprises. La figure 13 résume, ce qui a été confirmé jusqu'à ce jour (16).

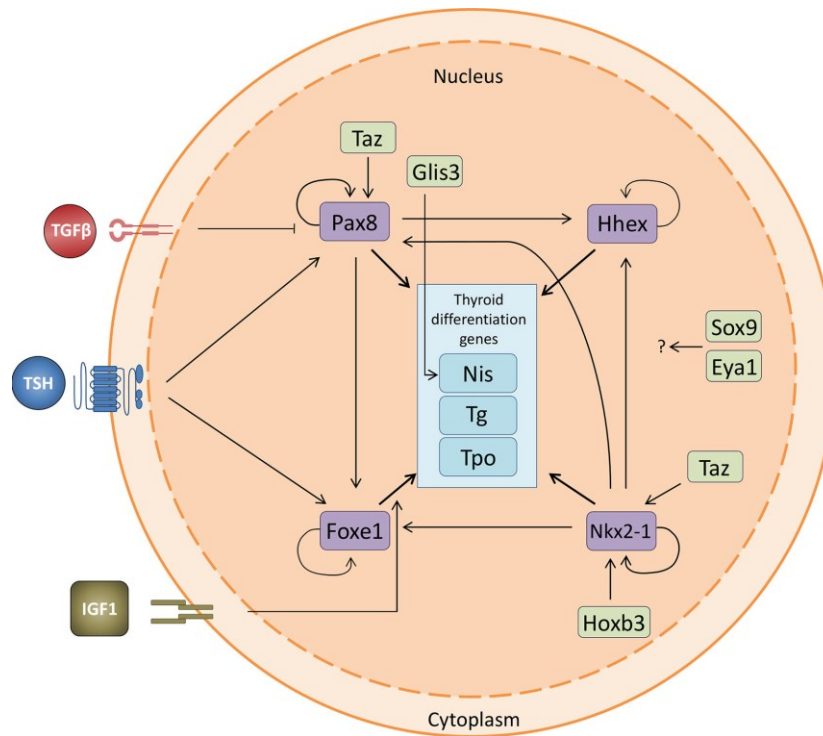


Figure 13. – Schéma résumé des principaux gènes impliqués dans la morphogenèse des cellules thyroïdiennes et de leurs interactions (adapté de López-Marquez et al., 2021 (16))

4. Poisson-zèbre comme modèle d'étude pour le développement de la thyroïde

Le poisson-zèbre est considéré comme un bon modèle afin d'étudier les différentes étapes du développement (171, 226-228). Sa transparence, le nombre important d'œufs obtenus pour chaque croisement, son développement *ex utero*, et la facilité à manipuler son génome en font un modèle très intéressant. Plusieurs études démontrent l'utilité de ce modèle dans l'étude de gènes associés aux HC (2, 18, 72, 122, 151, 170, 171, 179, 213). À travers les différents exemples mentionnés dans cet ouvrage, il a été possible de constater que le développement thyroïdien chez le poisson-zèbre est similaire à celui des mammifères, même si quelques différences existent. Par exemple, l'expression de différents marqueurs des pTFCs, *hhex*, *nkx2.4.b* et *pax2.1a*, est indépendante au début de l'embryogenèse (24hpf), mais autour de 60hpf leur expression devient interdépendante, tel qu'observé chez la souris (159, 196) (figure 14). Cependant, *foxe1* ne joue aucun rôle dans le développement de la thyroïde chez le poisson-zèbre (153). Les

principales étapes du développement thyroïdien sont les mêmes et l'histologie des follicules est similaire à celles des mammifères (Figure 15) (2, 130, 151, 170, 172, 174, 179). De plus, les marqueurs de la différenciation des thyrocytes sont conservés entre le poisson-zèbre et l'humain (174, 229). Ensuite, les follicules du poisson-zèbre ont le même rôle que ceux des mammifères, c'est-à-dire organiser l'iode pour ensuite produire de la T₄ et de la T₃ (172). Finalement, le mécanisme permettant d'éliminer les pTFCs déficientes pour un de ces gènes a été maintenu à travers l'évolution des vertébrés (20).

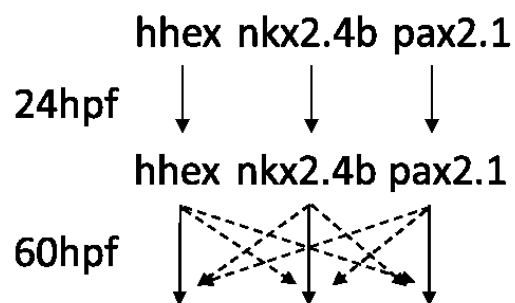


Figure 14. – Les facteurs de transcription qui représentent la signature spécifique des pTFCs ont les mêmes interactions chez le poisson-zèbre que chez la souris, c'est-à-dire qu'initialement leur expression est indépendante mais qu'ensuite elle devient interdépendante (adapté de De Felice et Di Lauro, 2011 (20)).

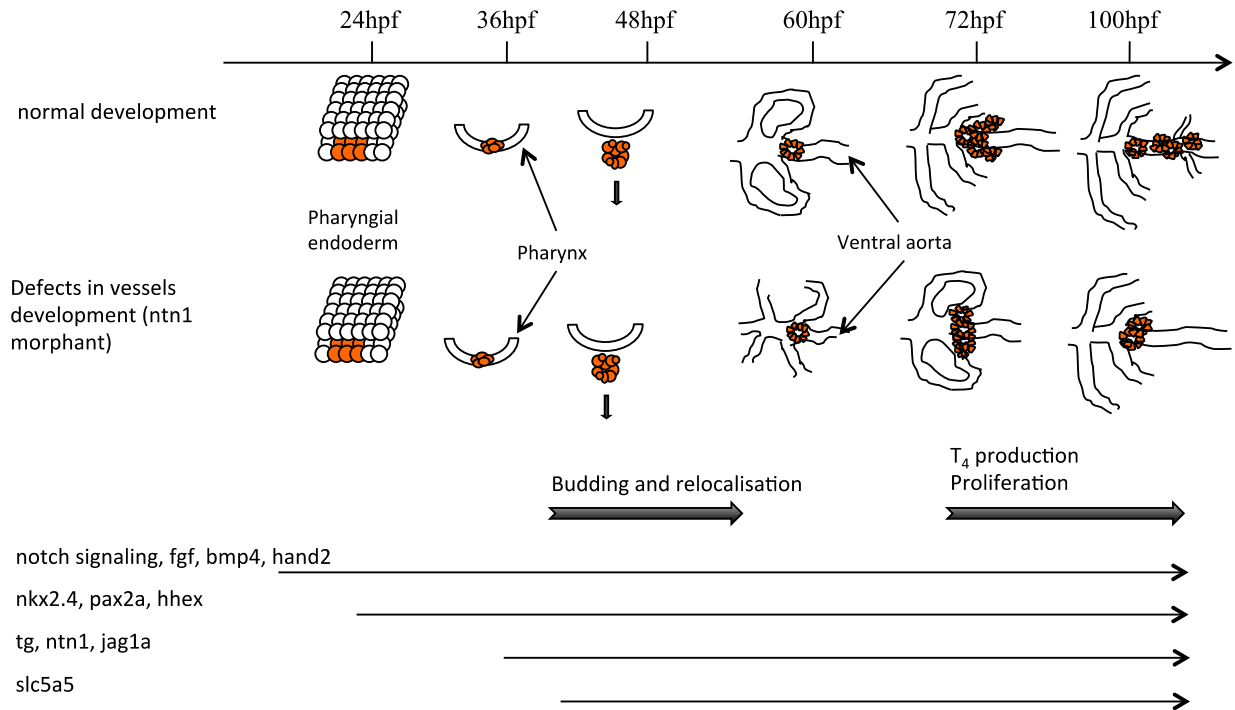


Figure 15. – Schéma représentant les différentes étapes du développement de la thyroïde chez le poisson-zèbre de même que l’expression de certains gènes impliqués (adapté de Larrivée-Vanier et al., 2018, article de revue joint en annexe (171)).

Plusieurs avantages sont liés à l’utilisation du poisson-zèbre. Tout d’abord, la maturité sexuelle est atteinte vers trois mois tout comme chez la souris, mais une femelle peut donner plus de 150 œufs par croisement. Ces dernières peuvent être croisées chaque semaine, ce qui permet d’avoir beaucoup plus de matériel qu’en utilisant la souris. Ensuite, les larves étant transparentes les trois premiers jours et la pigmentation étant facilement inhibée par la suite, l’observation des phénotypes est facilitée. Finalement, puisque le développement de l’embryon se fait *ex utero* il est beaucoup plus facile de l’étudier et de le manipuler génétiquement.

L’utilisation de la transposase *tol2* permet de créer des modèles transgéniques facilement, ce qui a permis à un groupe de recherche de créer deux modèles transgéniques exprimant soit la protéine fluorescente verte (GFP : green fluorescent protein) dans le noyau des cellules thyroïdiennes, soit la protéine fluorescente mCherry à la membrane des cellules thyroïdiennes (3, 228). Puisque ces chercheurs ont utilisé le promoteur de la thyroglobuline pour contrôler

l'expression de ces protéines fluorescentes, le signal est exclusif à la thyroïde. D'autres groupes ont aussi utilisé la même technique pour créer des modèles transgéniques avec l'expression d'un fluorophore dans la thyroïde (79, 230-232). Les modèles transgéniques sont très utiles et les possibilités sont grandes. Par exemple, il est possible de croiser les différentes lignées afin de mettre en lumière plus d'un tissu à la fois. De plus, il est possible de contrôler l'expression ou l'inhibition des gènes en créant des transgènes inductibles par la chaleur.

La création de modèles mutants a aussi été grandement simplifiée ces dernières années avec l'arrivée de la technique CRISPR/Cas9. Ces derniers étaient par le passé créés par des techniques plus compliquées et plus longues comme les TALENs ou les *zinc finger*, mais avec l'avènement des CRISPR, il est maintenant très simple de créer des lignées mutantes. La facilité à utiliser les CRISPR chez le poisson-zèbre, par injection directement dans le zygote, est un autre avantage du modèle. Les CRISPR deviennent aussi de plus en plus versatiles. En plus de choisir exactement l'endroit de la mutation et même de pouvoir insérer des mutations spécifiques, même si l'efficacité est assez faible dans ce dernier cas, il est possible de moduler, en activant ou inactivant, l'expression des gènes avec des variantes du CRISPR classique. L'injection est la méthode phare afin de moduler l'expression génique chez le poisson-zèbre, donc la surexpression en injectant directement de l'ARNm dans le zygote ou l'inhibition en injectant des morpholinos, une séquence de nucléotides avec un anneau morpholine stabilisant ainsi sa structure, sont fréquemment utilisés. Par contre, cette dernière technique ne fait pas consensus dû à des effets non spécifiques souvent observés dans ces modèles morphants (embryons dans lesquelles des morpholinos ont été injectés). Chaque technique a ses avantages et inconvénients. Par exemple, il a été montré que les CRISPR pouvaient provoquer de la compensation génique et donc les mutants créés n'ont pas de phénotype. Par conséquent, deux techniques différentes pour montrer un effet sont de plus en plus utilisées. Dernièrement, les technologies pour étudier les poissons-zèbres se sont grandement diversifiées et grâce à la petite taille du modèle il est possible de faire des traitements pharmacologiques à grande échelle et d'étudier leur effet en temps réel sur plusieurs poissons-zèbres en même temps.

5. Hypothèses et Objectifs

L'HC est une maladie complexe et deux types d'HC sont principalement observés, soit une dysgénésie thyroïdienne (HCDT) ou une dyshormonogénèse (D).

Les cas de dyshormonogénèse sont généralement associés à des mutations dans des gènes impliqués dans la synthèse des hormones thyroïdiennes et, par conséquent, ces pathologies ont des causes génétiques suivant le modèle mendélien de transmission autosomique récessif. Ainsi, pour identifier les causes des dyshormonogénèses, un séquençage d'exome ciblé sur les gènes impliqués dans la synthèse des hormones thyroïdiennes est la première étape. Si cette première étape ne donne pas de résultats, l'étude de l'exome complet nous permettrait d'identifier d'éventuels nouveaux variants associées aux HC. **Notre première hypothèse** est que le séquençage de l'exome complet d'un trio parent-enfant permettra une identification rapide des gènes causant une HC sévère dans une famille dont plusieurs individus de la même fratrie sont atteints.

Les causes des HCDT restent quant à elles moins connues et peu de cas sont expliqués par des mutations dans des gènes associés au développement de la thyroïde. Malgré tout, la littérature suggère qu'une composante génétique est impliquée, mais celle-ci ne suit pas les lois de transmission mendélienne. L'hypothèse de notre laboratoire pour expliquer cette maladie complexe est basée sur un modèle de double-hit : un variant germinal de prédisposition est nécessaire mais pas suffisant, un deuxième événement somatique est requis pour perturber la morphogénèse thyroïdienne. Actuellement, cette hypothèse est la seule qui permet de réconcilier la prédisposition familiale pour HCDT avec la discordance entre jumeaux MZ observée dans plus de 90% des cas d'HCDT. Des études, effectuées par notre groupe et auxquelles j'ai participé, sur l'expression monoallélique, la méthylation de l'ADN et les jumeaux monozygotiques avaient pour objectif de démontrer la présence éventuelle d'évènements somatiques. Ces études n'ont pas permis d'identifier d'évènement somatiques, que ce soit de l'expression monoallélique dans les gènes impliqués dans le développement de la thyroïde ou une différence de méthylation entre des tissus thyroïdiens ectopiques et orthotopiques. De plus, aucune différence au niveau

de l'exome n'a été observée chez des jumeaux monozygotiques discordants pour l'HCDT. Par contre, aucune étude n'avait encore été réalisée sur la composante germinale de notre modèle double-hit, soit les gènes de prédisposition. Dans ce travail nous nous concentrerons sur la recherche des variants germinaux de prédisposition dans les HCDT.

Il a été montré chez des cas avec une malformation cardiaque congénitale, condition ayant des caractéristiques similaires à celles retrouvées dans les HCDT (sporadicité, cas familiaux rares), que les patients non-syndromiques étaient enrichis en variants rares, affectant la séquence protéique, hérités de parents sains tandis que les patients syndromiques étaient enrichis en variants *de novo* affectant la séquence protéique. Par conséquent, ce groupe privilégie une approche par comparaison de cohorte lorsque les patients sont non-syndromiques et c'est ce qui sera réalisée (102). **Notre deuxième hypothèse** est que des gènes avec des variants pathogéniques (rares) sont davantage présents dans les cas HCDT non syndromiques comparés à un groupe contrôle et que l'analyse de l'exome permettra d'identifier de nouveaux gènes de prédisposition pour l'HCDT. **Notre troisième hypothèse** est que le modèle du poisson-zèbre est un bon modèle pour étudier le rôle des gènes candidats identifiés par l'analyse de l'exome complet dans la migration thyroïdienne.

Nos objectifs sont :

- I. Identifier, à l'aide du séquençage de l'exome entier, la cause génétique d'une HC sévère probablement due à une dyshormonogénèse chez une famille dont plusieurs membres sont affectés. Ensuite, valider la pathogénicité des variants candidats *in vitro*.
- II. Étudier les données du séquençage de l'exome entier d'une cohorte de 36 patients avec HCDT isolée en utilisant l'approche non biaisée de *gene-based burden* (comparaison de cohorte) et biaisée. L'approche biaisée correspond à l'étude des variants rares potentiellement pathogéniques présents dans les gènes associés à toutes les formes d'hypothyroïdies congénitales.
- III. Étudier les rôles des gènes enrichis en variant potentiels rares dans la migration de la thyroïde chez le modèle du poisson-zèbre.

L'identification de nouveaux gènes de prédisposition pour l'HCDT et l'étude de leur rôle dans un modèle animal permettra d'accroître les connaissances sur les facteurs impliqués dans la migration de la thyroïde. D'un point de vue clinique, l'identification d'un variant causal ou encore de gènes de prédisposition dans certaines familles permet à ces dernières de connaître les causes de leur maladie, permet un meilleur conseil génétique de même qu'une meilleure adhérence au traitement (qui consiste en la prise quotidienne de thyroxine par voie orale pendant toute la vie).

Chapitre 2 – 1^{ère} publication

Severe congenital hypothyroidism in three siblings with a novel deep intronic mutation in the TSH receptor gene causing intron retention

(publié dans *JES*, février 2021)

Stéphanie Larrivée-Vanier^{1,3}, Fabien Magne¹, Elwaseila Hamdoun⁵, Anna Petryk^{5,*},

Zoha Kibar^{1,3,4}, Guy Van Vliet^{1,2}, Johnny Deladoëy^{1,2,3,6,7}

¹Research Center of Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine and Departments of Pediatrics², Biochemistry³, and Neurosciences⁴, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada. ⁵Division of Pediatric Endocrinology, University of Minnesota, Minneapolis, Minnesota, USA. ⁶Pediatric Institute of Southern Switzerland, Bellinzona, Switzerland. ⁷University of Southern Switzerland, Lugano, Switzerland.

*Current affiliation: Alexion Pharmaceuticals, Inc. Boston, MA, USA.

Abbreviated Title (40/40 characters): CH due to TSHR variant causing intron retention

Key terms: non goitrous congenital hypothyroidism; whole exome sequencing; diagnosis; birth defects; TSHR inactivation.

Address all correspondence and requests for reprints to:

Johnny Deladoëy, M.D. Ph.D.

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

phone: 514-345-4735; fax: 514-345-4988, e-mail: Stephanie.larrivee-vanier.hsj@ssss.gouv.qc.ca

Financial Support: Research in pediatric thyroid diseases at the Ste-Justine Hospital is supported by private donations to JD and GVV (Girafonds, Ste-Justine Foundation). SLV is the recipient of a Ph.D. Scholarship from the Fonds de Recherche du Québec-Santé.

Disclosure statement: All authors have nothing to disclose.

2.1 Contributions des auteurs

Stéphanie Larrivée-Vanier : J'ai participé à la conception du projet, j'ai analysé les données d'exome et réalisé toutes les expériences excepté le séquençage de l'exome (Génome Québec) et la transformation des données brutes du séquençage en données analysables (C3G). J'ai rédigé et corrigé le manuscrit.

Fabien Magne : Ce projet a débuté lors de son PhD, il a donc participé à l'analyse des données d'exomes et à la correction du manuscrit.

Elwaseila Hamdoun et Anna Petryk : Les Dr Hamdoun et Petryk ont initialement rapporté cette famille dans la littérature et lorsque Dr Van Vliet a montré de l'intérêt pour poursuivre les recherches afin d'identifier les causes de l'HC, ils ont prélevé les échantillons sanguins de la famille. Ils ont participé à la correction du manuscrit.

Zoha Kibar: Dre Kibar est devenue ma co-directrice en 2018, elle a fourni le plasmide pour réaliser le mini-gene assay et donné son avis scientifique sur le projet. Elle aussi corrigé le manuscrit.

Guy Van Vliet: En tant que mentor du laboratoire, Dr Van Vliet a remarqué cette famille intéressante lors d'un congrès, a participé à la conception du projet, à l'écriture et à la correction de l'article.

Johnny Deladoëy: En tant que directeur du laboratoire, Dr Deladoëy supervisé et participé à la conception du projet. Il a aussi analysé les données d'exome et corrigé le manuscrit.

2.2 Résumé

Trois membres (deux frères et une sœur) d'une fratrie de neuf, en provenance de la Somalie, avaient une hypothyroïdie congénitale sévère qui a été diagnostiquée à leur arrivée aux États-Unis. Afin d'identifier la cause de l'hypothyroïdie, le séquençage de l'exome entier a été réalisé et un variant dans le gène *TSHR*, qui ségrégeait parfaitement avec le phénotype familial, a été identifié. Dans l'isoforme 3 du gène *TSHR*, ce variant a été considéré bénin par les outils de prédiction *in silico*. Par contre, dans l'isoforme 1, le seul isoforme exprimé dans la thyroïde, ce variant est intronique (NM_00369:c.692+130C>A). Les enfants porteurs de la mutation à l'état homozygote n'expriment pas l'isoforme 1. À l'aide de la technique du mini-gène, nous avons montré que ce variant, situé loin dans l'intron 8, provoque la création d'un pseudo-exon et l'insertion d'un codon stop après l'exon 8, expliquant ainsi l'absence d'expression de l'isoforme 1 chez les cas. Nous avons montré, pour la première fois, qu'un variant intronique profond pouvait mener à un récepteur de la TSH inactif. Nos résultats suggèrent que bien que l'analyse de l'exome soit un bon outil pour identifier la cause dans certain cas d'hypothyroïdie congénitale, une connaissance de la maladie, de la biologie de la thyroïde et des isoformes des gènes d'intérêt est nécessaire afin de confirmer la causalité des variants identifiés par l'exome.

2.3 Article

ABSTRACT

In three Somalian siblings with severe nongoitrous congenital hypothyroidism, exome sequencing identified a variant in *TSHR* predicted to be benign in isoform 3 but leading to an intronic mutation in isoform 1 (NM_00369:c.692+130C>A), which is the isoform expressed in the thyroid. This mutation creates a pseudo-exon that results in a protein that, if transcribed, would lack the transmembrane domain, thereby hampering its expression at the cell surface. Our findings illustrate that the interpretation of exome analysis requires knowledge of the relevant isoform expression and of the biology of the disease. This is the first description of a deep intronic mutation creating a pseudo-exon and inactivating the TSH receptor.

Congenital hypothyroidism (CH) with orthotopic thyroid hypoplasia may be caused by inactivating mutations in various transcription factors or in *TSHR* [1]. Specifically, biallelic loss-of-function mutations in *TSHR* lead to a wide spectrum of phenotypes, ranging from isolated hyperthyrotropinemia to severe CH with apparent athyreosis [2].

In three Somalian siblings with such severe phenotype, whole exome sequencing (WES) was performed. While WES pointed to the gene likely responsible for the phenotype, knowledge of the expression of this gene and of the biology of the disease was required to design additional studies to prove that the variant was indeed disease-causing.

1. Patients Report

The clinical presentation of the three siblings has been published in 2016 [3]. Briefly, in a family without known consanguinity who had emigrated from Somalia to the USA, three of nine siblings were found at ages 0.5, 7.7 and 14.8 y to have severe CH and orthotopic thyroid hypoplasia (Figure 1a). The parents and the other siblings are clinically euthyroid.

2. Methods

Patients and sample collection

Written consent for genetic testing was obtained from all subjects. DNA was extracted from leucocytes using phenol-chloroform isoamyl alcohol and RNA from whole blood using the Tempus Spin RNA isolation kit (Applied Biosystems, California, USA). cDNA was reverse transcribed from RNA using RevertAid H minus reverse transcriptase and Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed using Phusion High-Fidelity DNA polymerase (Life Technologies, California, USA).

Whole exome sequencing

WES and Sanger sequencing were performed at the McGill University and Genome Quebec Innovation Centre. WES was performed using the Agilent SureSelect exon capture library, followed by Illumina base pair (2x100bp) HiSeq 2000 sequencing technology. Raw data were aligned to the reference genome (GRCh37) using the Burrow-Wheeler Alignment (BWA) tool and

the variants were called using the Genome Analysis Toolkit (GATK) haplotype caller. Finally, the variant dataset was annotated by ANNOVAR. Only rare variants (MAF<0.01 in Exact database and 1000 Genome project) and protein altering variants (nonsynonymous, frameshift, stop-gain, stop-loss, exonic or exonic splicing) were kept. An autosomal recessive model was used to analyze WES data.

In silico analysis

In silico analysis for exonic variants was performed using SIFT and Polyphen2 via the webtool

Ensembl	Variant	Effect	Predictor
http://grch37.ensembl.org/Homo_sapiens/Tools/VEP?db=core			Mutation Taster

 and Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org/>). The potential effect of intronic variants on splicing was assessed with Human Splicing Finder (<http://www.umd.be/HSF/>).

Minigene assay

A minigene assay was carried out using the exon trapping vector pSPL3b [4]. Exon 8 of *TSHR* flanked by 128 bp of intron 7 and 195 bp of intron 8 with or without the identified variant (GrCh37: chr14: 81574926C>A, see below) was PCR-amplified using the following primers: forward, 5'-GAGCGGCCGCTGCAGGATCCTATCTTCTAAATTCTTGAAATCAGTCA-3' and reverse, 5'-GTACGGGATCACCATATCTCTCAAAGGACAAGGACTTTCT-3'. Restriction sites included in primers for standard cloning are underlined and the sequences in italic are complementary to *TSHR* DNA. DNA from a control subject and from patient III-2 were used as template. The PCR products were cloned in pSPL3b. The wild type or mutant vector was transfected in HEK293 cells, using 10 µl of Lipofectamine 2000 (Life Technologies, California, USA) and 5 µg of vector. Two days after transfection, RNA was extracted from cells using Trizol Reagent (Life Technologies, California, USA) according to the manufacturer's protocol. Reverse transcription PCR (RT-PCR) on extracted RNA using the following pSPL3b specific primers: SD6, 5'- TCTGAGTCACCTGGACAACC-3' and SA2, 5'- ATCTCAGTGGTATTTGTGAGC-3' followed by Sanger sequencing of RT-PCR fragments was performed to evaluate the effect of the variant on splicing.

3. Results

WES, performed on DNA from two affected siblings and from the parents, identified a novel homozygous variant not reported in public databases in isoform 3 of *TSHR* (GrCh37: chr14: 81574926C>A; NM_001142626:c.C726A; p.F242L). This variant was the only rare, protein-altering variant homozygous in both siblings and heterozygous in the parents. *TSHR* has three isoforms that share the first eight exons. Exon 9 is different for each isoform and isoform 1 is the only one containing exon 10, which encodes the transmembrane domain and the intracellular loop. Isoform 1 is therefore the only full-length functional isoform (Figure 1b).

Sanger sequencing was used to confirm WES results in all three siblings and the parents. The exonic variant mapping to exon 9 in isoform 3 was classified as benign by Polyphen2, SIFT, and Mutation Taster. However, the phenotype of the patients was consistent with complete *TSHR* inactivation. In isoform 1, the functional isoform, the variant is intronic and maps to intron 8 (NM_00369:c.692+130C>A). While some heterozygous variants in other genes related to CH were found, the *TSHR* variant is the only one that is present in the homozygous state in the affected siblings and in the heterozygous state in both parents, thus segregating perfectly with the family pedigree. RT-PCR on all three patients' RNA showed absence of isoform 1 and presence of isoform 3 (Figure 1c). Unfortunately, RNA from the parents or an unaffected sibling was not available.

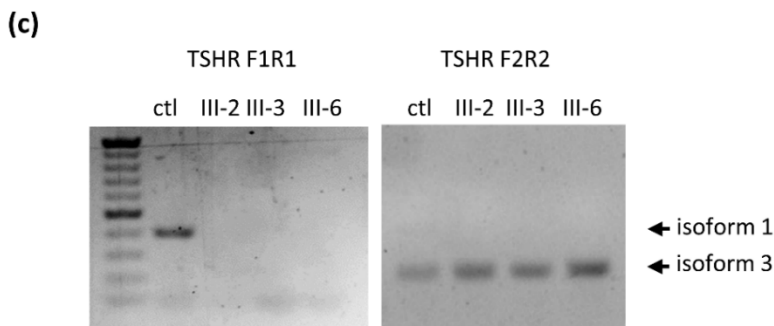
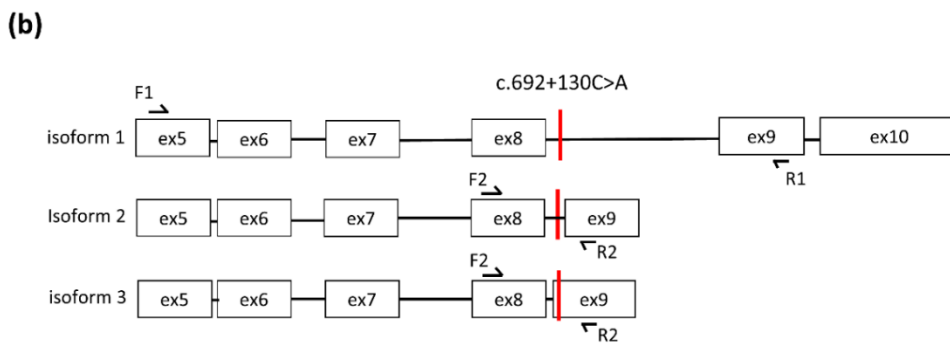
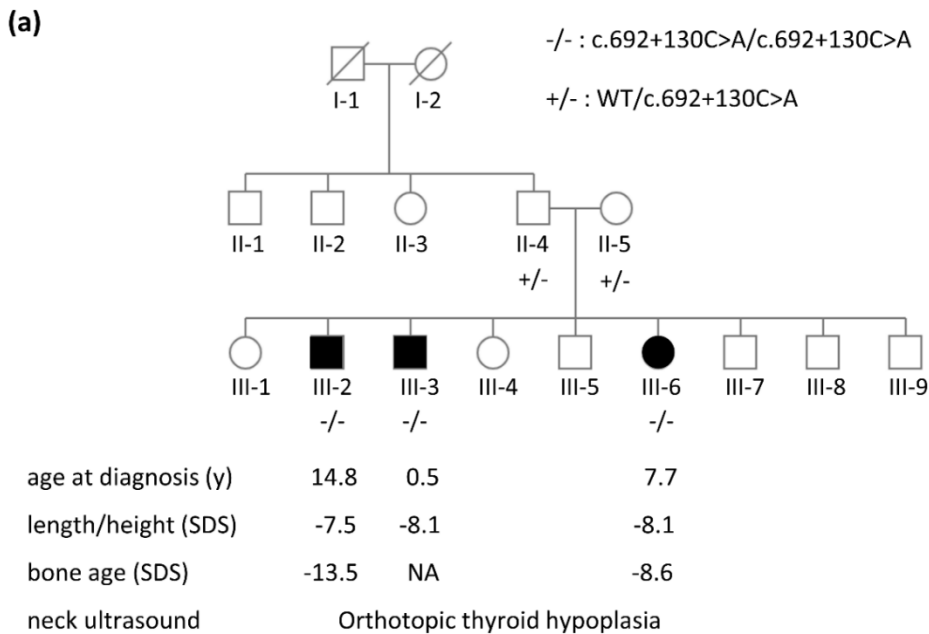
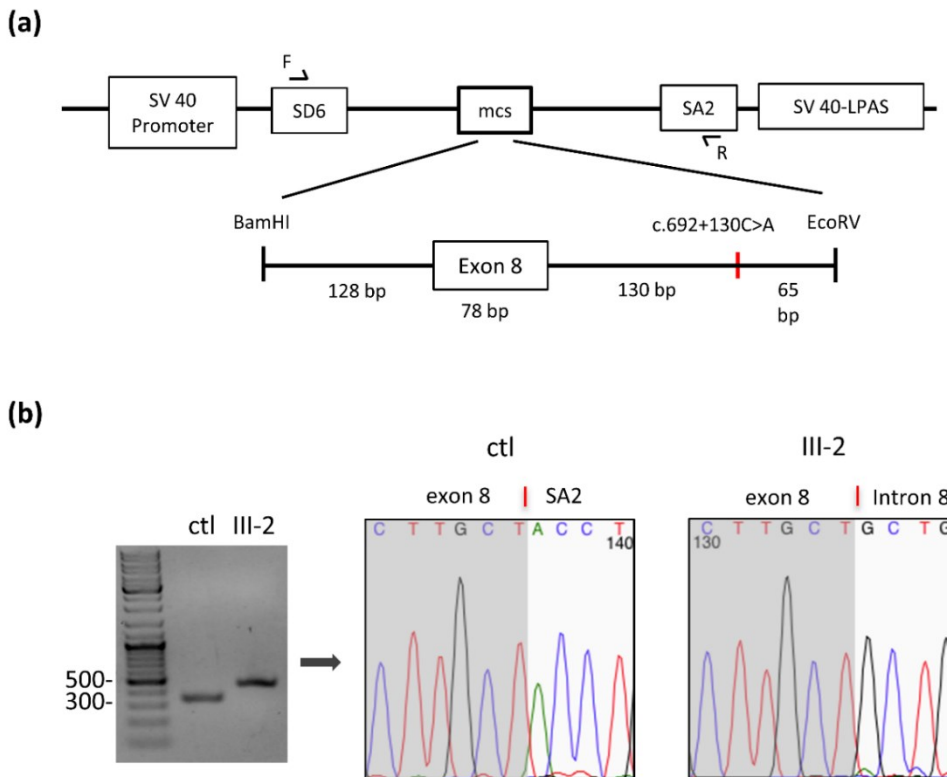


Figure 1. (a) Family pedigree. Patients, in black, are homozygous for an intronic mutation while the parents are heterozygous. (b) Schematic representation of a portion of TSHR isoform 1, 2, and 3 with the variant's position. The first 8 exons are identical, while exon 9 is different. Only isoform 1 includes exon 10, which encodes the transmembrane domain and intracellular loop. Specific

primers were designed for isoform 1 and for isoforms 2 and 3. (c) RT-PCR revealed absence of isoform 1 in patients' RNA, while isoform 3 is present in all samples. NA: not reported, ctl: control

In silico analysis to evaluate the potential effect of the variant on splicing suggested that it introduced a new enhancer splicing element or eliminated a silencer splicing element. To investigate whether this variant affected splicing of isoform 1, a minigene assay was performed. Exon 8 and part of intron 7 and 8 of wild type and mutant *TSHR* were cloned in pSPL3b vector (Figure 2a). Constructions were transfected in HEK293 cells followed by RNA extraction and RT-PCR. The generated fragments were sequenced by Sanger and resulted in a fragment of 335 bp for the wild type vector and 455 bp for the mutant (Figure 2b), confirming that the variant induced insertion of a segment of intron 8 starting 30 nucleotides downstream of the variant (position GrCh37: chr14: 81574956), thus creating a pseudo-exon. This pseudo-exon follows a cryptic AG acceptor splice-site. If transcribed, this would lead to a shorter protein containing only exon 1 to 8, thus a non-functional protein.



(c)

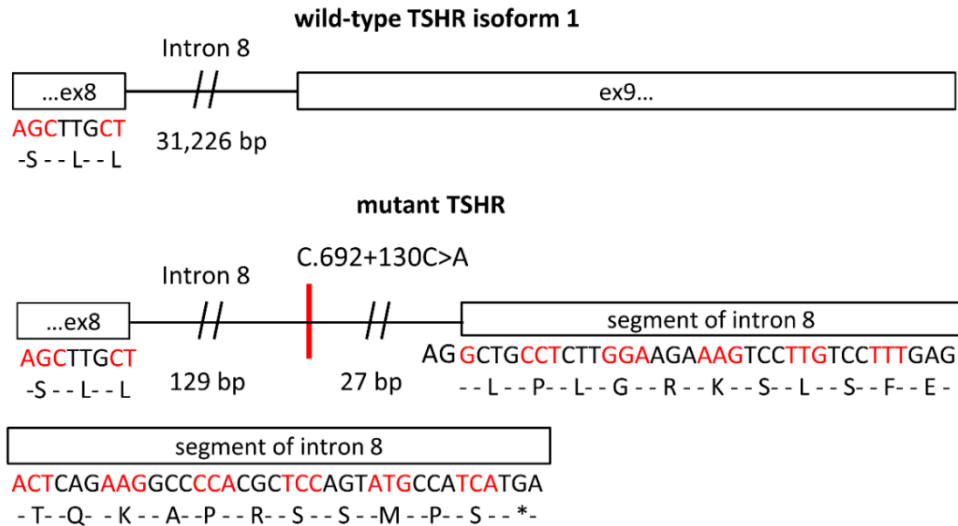


Figure 2. (a) Minigene assay. Exon 8 flanked by 128 bp of intron 7 and 195 bp of intron 8 was cloned in pSPL3b vector. DNA from a control subject and from patient III-2 was used to amplify the region. (b) RT-PCR on RNA using SD6 and SA2 primers show a higher fragment for the mutant vector compared to the wild type, suggesting that the variant induced retention of part of intron 8. Sanger sequencing revealed insertion of a segment of intron 8. (c) Schematic representation of the putative truncated protein. The insertion likely introduced a stop codon 24 amino acid after exon 8. MCS: multiple cloning site, ctl: control

4. Discussion

The objective of our study was to identify the gene mutation causing severe nongoitrous CH in three siblings. WES analysis identified a novel homozygous variant in exon 9 of isoform 3 of *TSHR* (NM_001142626:c.C726A; p.F242L), predicted to be benign by three predictive tools. Thus, while WES analysis pointed to the right gene, the variant was first annotated to a non-functional isoform. However, the patients' phenotype was consistent with complete *TSHR* inactivation and the variant is 130 bp after exon 8 in the functional isoform 1 (NM_00369:c.692+130C>A). *In silico* analysis suggested this variant could affect regulatory splicing elements, which may lead to partial intron retention [5]. More importantly, this variant is the only one to segregate with the CH phenotype in the homozygous state.

We showed that isoform 1 mRNA was absent in all three patients while it was present in a control subject (Figure 1C). Moreover, the minigene assay and Sanger sequencing revealed that the variant induced the insertion of a segment of intron 8, allowing the spliceosome machinery to recognize a cryptic donor splice-site 28 bp downstream of the variant. This pseudo-exon likely introduces an in-frame stop codon after exon 8, resulting in a shorter non-functional protein, lacking the transmembrane domain and intracellular loop (Figure 2c). Moreover, the absence of isoform 1 may be explained by an in-frame stop codon, since it probably leads to nonsense-mediated mRNA decay. Pseudo-exon inclusion has been reported with deep intronic variants in large introns and has been shown to cause diseases such as cystic fibrosis and androgen insensitivity [5]. To our knowledge, we present the first evidence for this mechanism of *TSHR* inactivation.

5. Conclusion

WES is a valuable tool to identify the cause of familial congenital hypothyroidism. Our findings illustrate that the interpretation of exome analysis requires knowledge of the expression of the various isoforms of the relevant genes and of the biology of the disease.

Acknowledgements

We thank the patients and their parents for their collaboration. Moreover, we thank Genome Quebec for whole exome sequencing and Dr Guy Rouleau's lab for exome annotation.

Authors disclosure statement

None of the authors has a relevant conflict of interest to disclose.

Financial Support

Research in pediatric thyroid diseases at the Ste-Justine Hospital is supported by private donations to JD and GVV (Girafonds, Ste-Justine Foundation). SLV is the recipient of a Ph.D. Scholarship from the Fonds de Recherche du Québec-Santé.

Data Availability

Some or all datasets generated during and/or analyzed during the current study are not publicly available but are available from the corresponding author on request.

References

1. Abu-Khudir, R., et al., *Disorders of thyroid morphogenesis*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2017. **31**(2): p. 143-159.
2. Gagne, N., et al., *Apparent congenital athyreosis contrasting with normal plasma thyroglobulin levels and associated with inactivating mutations in the thyrotropin receptor gene: are athyreosis and ectopic thyroid distinct entities?* J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(5): p. 1771-5.
3. Hamdoun, E., et al., *Case Report: The Specter of Untreated Congenital Hypothyroidism in Immigrant Families*. Pediatrics, 2016. **137**(5).
4. Schneider, B., A. Koppius, and R. Sedlmeier, *Use of an exon-trapping vector for the evaluation of splice-site mutations*. Mamm Genome, 2007. **18**(9): p. 670-6.
5. Vaz-Drago, R., N. Custodio, and M. Carmo-Fonseca, *Deep intronic mutations and human disease*. Hum Genet, 2017. **136**(9): p. 1093-1111.

2.4 Discussion relative à l'article 1

Pour ce projet, l'exome aura permis d'identifier un gène candidat, soit le *TSHR*. Par contre, seule une étude plus approfondie et une connaissance précise de la maladie a permis de confirmer la causalité de la mutation. Par défaut, l'annotation d'un exome mentionne en premier la position des variants exoniques, peu importe l'isoforme, et ensuite la position dans les autres isoformes, indépendamment de la fonction de ces derniers. L'annotation a d'abord identifié le variant dans l'isoforme 3 suivi de l'isoforme 2, puisque dans ces derniers, il est exonique. La position dans l'isoforme 1 était mentionnée en dernier puisque le variant se retrouve dans un intron, loin d'une région d'épissage classique. Dans un même ordre d'idées, les scores de pathogénicité (SIFT, Polyphen et Mutation Taster), sont généralement mentionnés pour la première annotation uniquement. Ces derniers classifiaient le variant comme bénin. Évidemment, ces algorithmes n'attribuent pas de score pour un variant intronique, puisqu'ils prédisent l'effet des variants sur la structure des protéines. Par contre, le seul isoforme fonctionnel encodé par le gène *TSHR* est l'isoforme 1, puisqu'il contient la séquence codant pour la partie transmembranaire et qu'il est exprimé dans la thyroïde. La connaissance de cette particularité pour le gène *TSHR*, et la connaissance des caractéristiques associées à une HC sévère causée par une résistance à la TSH était nécessaire pour continuer à étudier cette mutation, autrement cette voie aurait été abandonnée.

Dans l'isoforme 1, ce variant est situé loin dans l'intron 8, ce qui n'est pas, de prime abord, considéré comme un variant intronique intéressant pouvant affecter l'épissage de l'ARNm. Ces derniers sont généralement situés dans les deux ou trois paires de base adjacentes aux exons et sont nommés variants d'épissage. Toutefois, ce variant co-ségrégait parfaitement avec le phénotype familial, justifiant ainsi la poursuite des recherches. La littérature suggère que les variants introniques situés loin dans les introns peuvent influencer l'épissage lorsque ces derniers sont grands, ce qui est le cas avec l'intron 8 (plus de 30,000pb). L'analyse, à l'aide d'outils bioinformatiques évaluant l'effet de variants introniques (HSF), suggérait que ce variant affecte des éléments régulateurs de l'épissage. Nos études *in vitro* d'un essai mini-gène démontrent bien la présence d'un pseudo-exon dans l'ARNm des patients. Par conséquent, ce variant affecte une

région régulatrice de l'épissage et permet à la machinerie d'épissage de reconnaître un site accepteur AG cryptique induisant ainsi la création d'un pseudo-exon. Ce pseudo-exon introduit un codon STOP 24 acides aminés après l'exon 8, empêchant donc la traduction des exons 9 et 10 codant pour la partie transmembranaire du récepteur: la protéine tronquée est donc non fonctionnelle. L'insertion d'un pseudo-exon induisant une inactivation d'un gène a déjà été observée dans d'autres pathologies (235), mais c'est la première fois que ce mécanisme a été démontré pour le TSHR. Ce projet a permis de mettre en lumière l'utilité de l'exome pour identifier de nouveaux variants dans les cas familiaux avec HC, mais illustre qu'une connaissance de la maladie et des isoformes des gènes d'intérêt est nécessaire afin de pouvoir bien interpréter les données d'exome et de poursuivre avec la validation de la causalité de variants prometteurs.

Chapitre 3 – 2^e publication

Whole exome sequencing in congenital hypothyroidism due to thyroid dysgenesis

(accepté par *Thyroid*, Janvier 2022)

Stéphanie Larrivée-Vanier^{1,4}, Martineau Jean-Louis¹, Fabien Magne¹, Helen Bui²,
Guy A. Rouleau³, Dan Spiegelman³, Mark E. Samuels^{1,5}, Zoha Kibar^{1,6},
Guy Van Vliet^{1,7}, Johnny Deladoëy^{1,7,8,9}

¹Research Center of Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine, Université de Montréal, Montréal, Québec H3T 1C5, Canada

²McGill University Health Center, Montréal, Québec H4A 3J1, Canada

³Montreal Neurological Institute, McGill University, Montréal, Québec H3A 2B4, Canada

Departments of ⁴Biochemistry, ⁵Medicine, ⁶Neurosciences, and ⁷Pediatrics, Université de Montréal, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada

⁸Pediatric Institute of Southern Switzerland, 6500 Bellinzona, Switzerland. ⁹ Faculty of Biomedical Sciences, University of Southern Switzerland, 6900 Lugano, Switzerland.

Abbreviated Title (38/40 characters): WES in thyroid dysgenesis

Key terms: non-syndromic congenital hypothyroidism; birth defects; thyroid dysgenesis; thyroid ectopy; athyreosis.

Address all correspondence and requests for reprints to:

Johnny Deladoëy, M.D. Ph.D.

Facoltà di scienze biomediche

Università della Svizzera Italiana, Campus Est, 6900 Lugano, Switzerland

phone: +41 27 722 00 55; fax: +41 27 722 00 54

e-mail: j.deladoey@hin.ch

3.1 Contributions des auteurs

Stéphanie Larrivée Vanier : J'ai participé à la conception du projet. J'ai analysé les données et évalué la qualité des données résultant des différentes analyses de *gene-based burden* test. L'analyse a dû être répétée à maintes reprises. Je me suis occupée de l'analyse suivant le *gene-based burden*, c'est-à-dire j'ai évalué la valeur scientifique et biologique des gènes candidats en effectuant plusieurs revues de littérature. J'ai fait les listes pour les gènes impliqués dans les différentes voies de signalisation pour l'approche biaisée et j'ai réalisé la correction FDR avec le logiciel R pour cette section. J'ai répertorié tous les variants dans les gènes associés aux HC et collecté les différentes informations sur les patients, à l'aide du Dr Van Vliet. J'ai rédigé le manuscrit et corrigé ce dernier.

Martineau Jean-Louis : M. Jean-Louis a réalisé les analyses bio-informatiques, soit l'alignement des données brutes et leurs annotations, le *gene-based burden* test et les différents test statistiques. Il a participé à la rédaction de la section *Matériel et Méthodes* et corrigé le manuscrit.

Fabien Magne : Le Dr Magne a réalisé les analyses préliminaires avant que M. Jean-Louis se joigne au projet pour réaliser les analyses bio-informatiques.

Helen Bui : La Dre Bui a fourni la famille avec transmission directe pour l'exome.

Mark E. Samuels : Le Dr Samuels a participé à la conception du projet, et à la correction du manuscrit. Il a partagé son expertise en génétique.

Zoha Kibar : La Dre Kibar est devenue ma co-directrice en 2018, elle a donné son avis scientifique sur le projet et corrigé le manuscrit.

Guy Van Vliet : Le Dr Van Vliet, en tant que mentor et endocrinologue, a participé à la conception du projet, au recrutement des patients, à la collecte des informations sur les patients, et a participé de manière importante à la correction du manuscrit.

Johnny Delaodöy : Dr Deladoëy a conceptualisé le projet, participé au recrutement des patients, et corrigé l'article. Il a partagé son expérience en génétique endocrinienne.

3.2 Résumé

Introduction : L'hypothyroïdie congénitale due à une dysgénésie thyroïdienne (HCDT) est une maladie endocrinienne avec une prévalence d'une naissance sur 4,000. C'est une maladie principalement sporadique (1% de cas familiaux) et isolée, qui présente une prédominance ethnique et qui est majoritairement discordante entre les jumeaux monozygotiques (plus de 92%). Une hypothèse de double-hit a été proposée pour expliquer cette pathologie, combinant une prédisposition génétique (hérité ou *de novo*) à un évènement post-zygotique. Ce modèle permet d'intégrer toutes les données épidémiologiques. La grande majorité des cas d'ectopie thyroïdienne n'ont toujours pas de cause connue. Dans ce travail, nous voulions étudier la prédisposition génétique.

Objectif : Identifier des gènes qui pourraient prédisposer à l'HCDT, à l'aide d'une analyse de l'exome entier.

Méthode : Nous avons effectué une analyse par comparaison de cohorte. L'exome de 36 patients avec une HCDT non-syndromique (HCDT-NS) bien caractérisés a été comparé à celui d'une cohorte de 301 contrôles. Nous avons évalué d'une part, si les patients avaient davantage de variants rares probablement délétères que les contrôles et d'autre part, nous avons effectué un *gene-based burden test* afin d'évaluer si certains gènes avec des variants rares étaient surreprésentés chez les cas comparés aux contrôles. Finalement, tous les variants rares présents dans 27 gènes associés à l'hypothyroïdie congénitale ont été répertoriés et leur pathogénicité a été évaluée à l'aide d'outils de prédiction *in silico*.

Résultats : Les cas n'ont pas davantage de variants rares probablement délétères que les contrôles. De plus, aucun gène n'a été identifié suite à notre analyse par comparaison multiple (*gene-based burden test*). D'un autre côté, 42% des cas sont porteurs d'un variant hétérozygote pathogénique ou probablement pathogénique dans un gène lié à l'HC. Huit pourcent des cas ont un variant dans plus d'un gène, mais ces derniers ne présentaient pas une hypothyroïdie plus sévère. Finalement, les cas avec des variants dans des gènes de dyshormonogénèse ne sont pas plus affectés que les cas sans ce type de variant.

Conclusion : L'analyse de l'exome entier n'a pas identifié de nouveaux gènes de prédisposition pour les cas avec une HCDT non-syndromique bien caractérisée. D'un autre côté 42% des cas ont

un variant hétérozygote dans un gène associé à l'HC, ce qui est similaire à la littérature. Par contre, ces variants ne peuvent expliquer la dysgénésie thyroïdienne et confirment la complexité de la maladie. Des expériences dans des cohortes plus nombreuses ou utilisant de nouvelles approches sont nécessaires pour mieux comprendre l'implication de la génétique dans les HCDT-NS.

3.3 Introduction spécifique

Afin d'identifier les causes de l'hypothyroïdie congénitale (HC), le séquençage de nouvelle génération (NGS) des gènes déjà associés aux HC (donc de l'exome ciblé) a été fréquemment utilisé (54, 56, 93). Cette approche est adéquate pour les dyshormonogénèses, mais elle n'est pas optimale pour les dysgénésies thyroïdiennes puisque les gènes liés aux HCDT, soit les gènes impliqués dans le développement thyroïdien, n'expliquent pas la majorité des cas. Le séquençage de l'exome entier (WES) est donc une meilleure approche pour investiguer la génétique de l'HCDT. Par contre, certains désavantages sont associés au WES, comme une couverture plus faible que le NGS et un séquençage de faible qualité pour certaines régions (149, 236-238). Une expertise en programmation est aussi nécessaire afin d'utiliser les différents algorithmes permettant l'analyse des données (237, 239). Dépendamment du choix d'analyse, le nombre d'échantillons doit être suffisamment grand pour avoir une puissance statistique (240-242). Finalement, Le séquençage de l'exome entier permet d'étudier uniquement les régions codantes et les régions d'épissage situées près des exons, ce qui représente seulement environ 1.5% du génome (149). Bien que les variants dans l'exome pourraient expliquer jusqu'à 85% des maladies (243), le séquençage de l'exome entier ne peut pas identifier les variants non codants qui peuvent être impliqués dans l'étiologie de maladies complexes. Malgré tout, cela demeure un outil très utilisé.

Deux approches sont fréquemment utilisées pour l'étude d'exome, soit l'approche par trio ou par famille soit celle par comparaison entre une cohorte saine et une autre atteinte (ex : *gene-based burden test*). L'approche par trio (parent-enfant) est privilégiée pour l'identification des variants *de novo* non transmis par les parents, lorsqu'un modèle autosomique récessif explique certains cas d'une maladie, ou lorsque la consanguinité est suspectée (244). Notre projet TSHR (chapitre 2), réalisé dans une famille dont trois des neuf enfants ont une hypothyroïdie

congénitale sévère inexplicée, correspondait à ces critères. L'approche par comparaison de cohorte est privilégiée lorsque la maladie étudiée est principalement sporadique et non syndromique (102). C'est donc cette approche qui a été retenue pour essayer d'identifier de nouveaux gènes candidats dans une cohorte de patients avec HCDT non-syndromique. Le *gene-based burden test*, utilisé dans ce projet, consiste à compiler pour chaque gène le nombre de cas et de contrôles avec au moins un variant probablement délétère et d'effectuer un calcul d'odds ratio pour savoir si les cas ont davantage de ce type de gènes. Puisque nous voulons évaluer si ces gènes peuvent prédire la maladie, nous conservons uniquement les gènes qui ont un odds ratio plus grand que un, car cela suggère que ces gènes sont plus souvent observés chez les cas et donc peuvent être liés à la maladie. Ensuite, le test exact de Fisher permet d'évaluer si la probabilité d'avoir des gènes avec des variants rares probablement délétères chez des cas avec HCDT est significative (valeur de $p < 0.05$). Puisqu'un test exact de Fisher est effectué par gène sélectionné, une correction est effectuée pour le nombre de tests réalisés.

3.3.1 Les défis de l'analyse de l'exome entier

L'exome étant de plus en plus utilisé, son analyse peut sembler simple, mais ce n'est pas le cas (236, 239, 242, 245). Les premières étapes suivant l'obtention des données brutes sont: un contrôle de la qualité du séquençage, suivi de l'alignement sur un génome de référence et d'un autre contrôle de qualité pour l'alignement (237, 246). Les étapes subséquentes sont souvent différentes et dépendent de la question posée (237). Toutes les étapes de l'analyse bio-informatique précédant la comparaison des deux cohortes, doivent être faites avec minutie afin de déceler des erreurs potentielles dans les lignes de commandes (script) qui pourraient influencer la sortie des données. Des données de qualité, bien filtrées et annotées, et sans erreur sont essentielles. De plus, un défi important pour les études de comparaison de cohorte, est d'harmoniser les données des deux cohortes si elles n'ont pas été séquencées en même temps (247). Ceci est le cas pour notre étude de cohorte. L'utilisation d'une cohorte contrôle harmonisée pour l'ethnicité est un facteur important à considérer puisque le génome (et donc l'exome) diffère davantage entre les ethnies qu'entre les individus d'une même ethnie (244, 246). Dans notre étude, la majorité des contrôles avaient une origine ethnique similaire aux cas (Caucasiens et

Admixed Americans). La taille de l'échantillon est aussi un enjeu majeur dans les analyses de comparaison de cohorte (240-242, 244, 246).

3.3.2 analyse statistique

Lors d'une analyse par comparaisons multiples, comme le *gene-based burden test*, dans laquelle plusieurs tests statistiques sont effectués, une correction doit être utilisée puisque certaines valeurs de p seront inférieures à 0.05 uniquement par chance, et ce, même si l'hypothèse nulle est vraie (248). L'utilisation de la correction de Bonferroni est une méthode simple qui corrige pour le nombre de tests lorsqu'il y a peu de tests statistiques effectués. Par contre, lorsque le nombre de test est élevé, cette méthode devient très conservatrice et augmente les chances de manquer une différence significative entre deux groupes. L'ajustement pour le FDR (*false discovery rate*), aussi appelé procédure de Benjamini-Hochberg, contrôle pour la proportion de faux-positifs, en considérant entre autres le nombre de test statistiques effectués, et est la méthode à préconiser lorsque plusieurs tests statistiques sont effectués et lorsque d'autres techniques subséquentes sont utilisées pour confirmer les résultats, comme c'est le cas pour notre analyse (249, 250). Suite à l'analyse, il est important de vérifier la nature et la position des variants, car un biais souvent observé dans les données d'exome est un mauvais alignement des séquences par le pipeline d'alignement (BWE-MEM).

3.4 Article

Abstract

Context: Congenital hypothyroidism due to thyroid dysgenesis (CHTD) is a predominantly sporadic and non-syndromic condition of unknown etiology. Non-syndromic (NS) CHTD shows a 40-fold increase in relative risk among first-degree relatives (one in 100 compared to a birth prevalence of one in 4,000 in the general population) but a discordance rate between monozygotic (MZ) twins of 92%. This suggests a two-hit mechanism, combining a genetic predisposition (incomplete penetrance of inherited variants) with post-zygotic events (accounting for MZ twin discordance).

Objective: To evaluate whether whole exome sequencing (WES) allows to identify new predisposing genes in NS-CHTD.

Methods: We performed a case-control study by comparing the whole exome of 36 non-consanguineous cases of NS-CHTD (33 with lingual thyroid ectopy and 3 with athyreosis, based on technetium pertechnetate scintigraphy at diagnosis) to that of 301 unaffected controls to assess for enrichment in rare protein-altering variants. We performed an unbiased approach using a gene-based burden with a false discovery rate (FDR) correction. Moreover, we identified all rare pathogenic and likely pathogenic variants, based on *in silico* prediction tools, in 27 genes previously associated with CH (thyroid dysgenesis and dyshormonogenesis).

Results: After correction for multiple testing, no enrichment in rare protein-altering variants was observed in NS-CHTD. Pathogenic or likely pathogenic variants (21 variants in 12 CH genes) were identified in 42% of cases. Eight percent of cases had variants in more than one gene (oligogenic group); these were not more severely affected than monogenic cases. Moreover, cases with protein-altering variants in dyshormonogenesis-related genes were not more severely affected than those without.

Conclusions: No new predisposing genes were identified following an unbiased analysis of WES data in a well-characterized NS-CHDT cohort. Nonetheless, the discovery rate of rare pathogenic or likely pathogenic variants was 42%. Eight percent of the cases harboured multiple variants in genes associated with thyroid dysgenesis or dyshormonogenesis, but these variants did not explain the variability of the hypothyroidism observed in dysgenesis. WES did not identify a

genetic cause in NS-CHTD cases, confirming the complex etiology of this disease. Additional studies in larger cohorts and/or novel discovery approaches are required.

Introduction

Congenital hypothyroidism (CH) due to thyroid dysgenesis (TD) (CHTD) occurs in one of 4,000 newborns (1, 2). CHTD results from a failure of the thyroid precursor cells to differentiate, to survive or to migrate from the primordial pharynx to the neck (3). This results in either absence of thyroid follicular cells (athyreosis) or, more commonly, in lingual thyroid ectopy (2). CHTD generally has no identified cause, and its incidence is not affected by any known environmental factor (1, 2).

CHTD shows a female to male ratio of 3:1 (4). It is predominantly sporadic (98% of cases are non-familial) (5) and has a discordance rate of 92% between monozygotic (MZ) twins (6); these observations argue against fully penetrant classical Mendelian inheritance of CHTD. On the other hand, the occurrence of familial cases and the variation of the incidence by ethnicity suggest a genetic predisposition to CHTD. Indeed, the likelihood of CHTD in a first-degree relative is 1%, 40 times greater than in the general population (1/100 vs 1/4,000). In addition, CHTD is much less common in Black-African individuals (7). Lastly, several single gene mutations (in *TSHR*, *NKX2.1*, *PAX8*, *FOXE1*, *GLIS3*, *NTN1*, *JAG1*, *CDCA8/BOREALIN*, and *TUBB1* (8-20)) cause CHTD, mainly orthotopic thyroid hypoplasia, most with associated syndromic features.

More than 95% of cases of CHTD remain unexplained, especially those with thyroid ectopy (8). This led us to propose a two-hit model to explain NS-CHTD (21): first a predisposing variant in the germline is inherited or occurs *de novo*; second, somatic mechanisms might be involved, although our investigations into these mechanisms have been unsuccessful (21-25).

Recently, an enrichment in inherited protein-truncating variants has been reported in non-syndromic congenital heart disease (26). More generally, inherited variants might contribute to the phenotype of congenital malformations, although how this inherited predisposition leads to a phenotype remains to be further investigated. Sifrim et al. (26) also suggested that different study designs must be considered for the assessment of congenital heart disorders: a trio approach for the syndromic forms and a case-control approach for the non-syndromic ones. This

prompted us to evaluate, for the first time, the burden of rare protein-altering variants in 36 NS-CHTD cases compared to 301 unaffected controls.

Subjects and methods

Ethics Statement

This study was approved by the Sainte Justine Ethics committee (ERB number 94). All the parents or legal guardians provided written informed consent.

Cohort and sample collection

Whole exome sequencing (WES) of thirty cases with scintigraphy-proven thyroid dysgenesis was performed. WES data of six patients that have already been published (23, 24) were reanalyzed in this study. All cases have NS-CHTD (33 ectopy and 3 true athyreosis) and they are mostly females (26 cases), as expected for CHTD. The eligibility criteria were CH due to thyroid dysgenesis proven by scintigraphy and absence of other congenital anomalies. Three discordant MZ twins and one family in which both mother and daughter have ectopy were included. The control cohort consisted of 310 subjects without CH, whose exomes were produced from a next-generation sequencing (NGS) platform (Réseau de Médecine Génétique Appliquée (RMGA)). Controls were selected based on the absence of any endocrine disease, on a matched capture library kit, and on being unrelated to the NS-CHTD subjects. Exome data of both patients and controls were obtained using similar sequencing technologies and were analysed through the same bioinformatics pipeline. Blood was obtained by peripheral venipuncture. DNA was extracted using standard methods and conserved at -20°C.

Whole-exome sequencing

The cases and controls were sequenced using the Agilent 50Mb SureSelect all exon V5 capture library, followed by Illumina base pair (2x100bp) HiSeq 2000 or 2500 sequencing technology as described previously (23, 27). Cases were sequenced at Génome Québec (Montreal, Canada) and controls at Macrogen (Seoul, South Korea). In our experience, it is essential to match cases and controls not just for combined bioinformatic analysis, but also for

the specific version of the exon capture kit obtained from the supplier. Different kits include different content in both well-documented and newly annotated genes (especially non-protein-coding genes such as lncRNAs).

Bioinformatics

To acquire high quality single nucleotide variant (SNV) data, the NGS raw fastQ data were cleaned by the Trimmomatic tools (28), aligned to the human reference genome (GRCh37.1/Hg19) using Burrows-Wheeler Aligner with Maximal Exact Matches (BWA-MEM) genome alignment tool and the SNVs were called using the Genome Analysis Toolkit (GATK) haplotype caller (29, 30). The detailed SNV calling protocol of the Broad Institute SNV calling best practice pipeline was used (29). Our SNV called dataset was annotated by ANNOVAR (31, 32). The SNV annotation was done only for good quality reads (total read depth >10 and variant read depth >5).

The SNV dataset was filtered to keep only high quality rare SNVs with a probably damaging effect. The filtering criteria were as follows: (1) SNVs in a coding region or in exon-intron junctions, (2) with a minor allele frequency (MAF) ≤ 0.01 compared to the ExAC and GnomAD databases, (3) uncommon in the control dataset (fewer than 5 controls with the SNV, fewer than 10 alleles per SNV in the control dataset), (4) and with a presumably protein-altering effect (stop gain, frameshift, missense or exon-adjacent intronic splice variants). A total of 8,201 genes with potentially protein-altering variants passed all these criteria (Figure 1).

Data manipulation was implemented using Python-based scripts version 3.5 and statistical modules such as Numerical Python (NumPy) and Scientific Python (SciPy) were used to build up the statistical functions of the scripts (33). Further statistical computation and graphics were processed with R scripts and R graphic packages (version 4.1.0) (34, 35).

Principle component analysis (PCA)

Prior to the gene-based burden analysis, we performed a PCA to keep only controls with a similar ethnic background to that of the cases. First, we compared cases and controls data with the 1000genome (1KG) data. All cases and most controls clustered with Caucasian and Admixed American samples according to 1KG data (Figure S1). Next, we performed a PCA of our cases and controls to remove outliers by ancestry stratification. Nine controls, who were close to Asian or African 1KG samples, were removed from the 310 samples, resulting in 301 controls included in the gene burden analysis (Figure S1).

Gene burden analysis

We performed a case-control study. The burden of rare potentially protein-altering variants for each gene was compared between the 36 NS-CHTD cases and the 301 controls. For each gene, we computed the frequency of the mutated genes observed in cases and controls followed by a one-tailed Fisher exact test. A FDR correction on gene-associated p-values that had an odds ratio > 1 was applied, based on guidelines from the Handbook of Biological Statistics (36). Genes with a FDR p-value below 0.05 were considered as significantly enriched.

As part of validating our bioinformatics pipeline variant calling, we compared, using a Mann Whitney test, the unbiased gene burden of synonymous variants, presumptively mostly or all neutral. Similar burdens were observed in cases versus controls, as required in order to meaningfully interpret any differences observed for protein-altering, potentially pathogenic variants (Figure 2).

CH-related gene analysis

From our filtered exome dataset, we extracted all the rare variants in 27 genes known to be associated with CH and genes reported to be mutated in syndromes associated with thyroid dysgenesis (Table S1) (8-19, 37). Several tools were used to evaluate the pathogenicity of the variants including SIFT, Polyphen, Mutation Taster, and CADD (available with ANNOVAR annotation). A rare variant was considered as pathogenic if the CADD score was higher than 15

and at least one of the other pathogenicity scores classified it as deleterious or pathogenic. A rare variant was considered as likely pathogenic if the CADD score was between 10 and 15 and at least one of the other pathogenicity scores classified it as deleterious or pathogenic. A rare variant was considered as benign if the CADD score was under 10 and no more than one of the other pathogenicity scores classified it as deleterious or pathogenic. Finally, a rare variant was considered of uncertain significance if the CADD score was between 10 and 20 and none of the other pathogenicity scores classified it as deleterious or pathogenic or if the CADD score was under 10 but at least one of the other pathogenicity scores classified it as deleterious or pathogenic. We only kept pathogenic and likely pathogenic variants for this analysis. We compared the number of cases and controls with pathogenic or likely pathogenic variants using a Fisher exact test.

Sanger Sequencing

Sanger sequencing using standard methods was carried out to validate variants in genes identified from the unbiased approach and in CH-related genes. Variants in CH-related genes were also assessed in the parents. PCR products were sequenced using the 3730xl DNA Analyzer technology (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in the Genome Quebec Innovation Centre.

Results

CHTD cases are not enriched in rare protein-altering variants

WES analysis resulted in a total of 22,664 genes with at least one variant in a coding region and 16,383 genes with at least one rare variant (MAF<0.01 in public databases and frequency <0.01 in the control cohort) (Figure 1). Of these, 8,201 genes with at least one rare protein-altering variant were found in cases. As expected, the number of genes with synonymous variants was similar in cases and controls (p-value: 0.2612). More importantly, the number of genes with nonsense or missense variants was also similar between cases and controls (p-value of 0.26 for nonsense variants and 0.8515 for missense variants) (Figure 2).

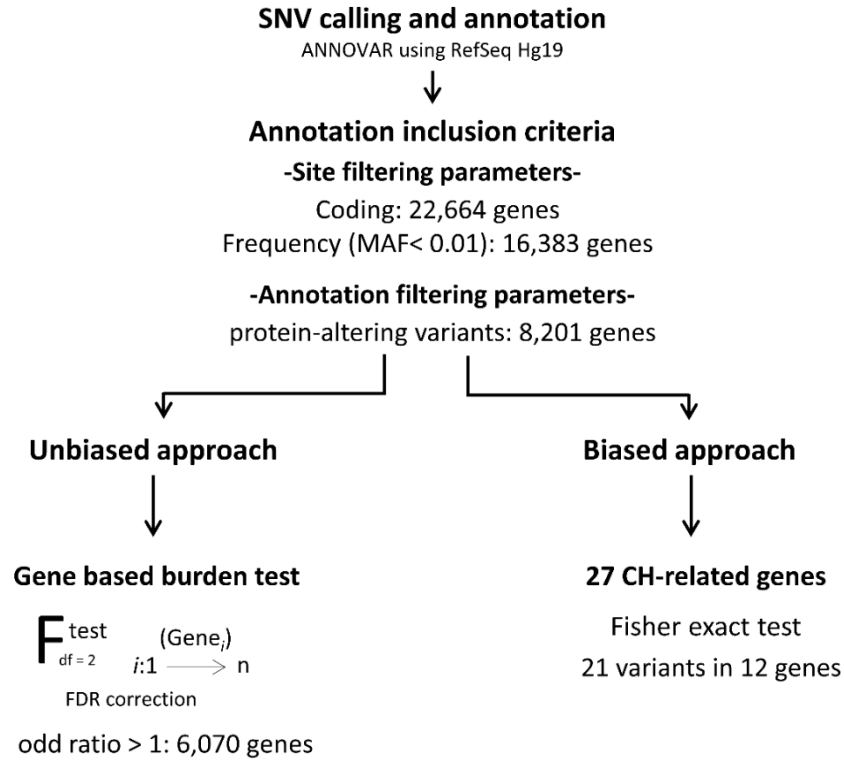


Figure 1: Analysis pipeline for whole exome sequencing data of NS-CHTD cases and controls.

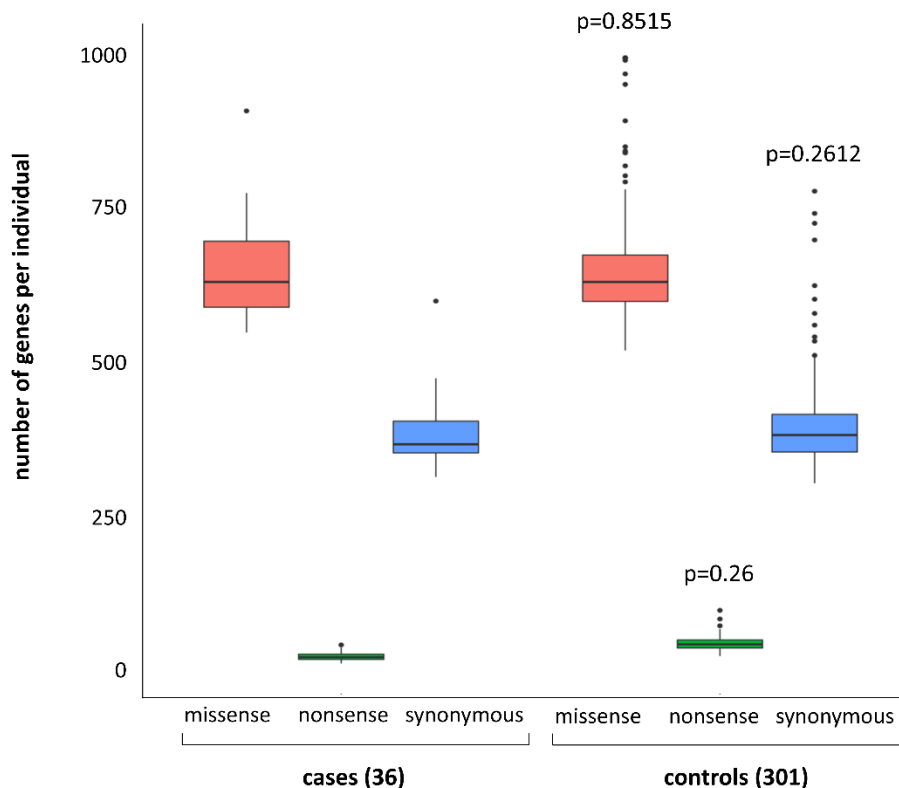


Figure 2: Box blot of rare SNVs in cases compared to controls with raw numbers of gene per individual with at least one rare SNVs given as median and interquartile range, p-value of Mann Whitney test. Nonsense variants included frameshift and stop codon variants.

Gene burden analysis does not reveal new candidate predisposing genes

We performed a gene-based burden analysis to identify genes enriched with rare protein-altering variants in the cases, using the 8,201 genes (Figure 3). A two-tailed Fisher exact test was conducted and only genes with an odds ratio > 1 were considered for the FDR correction. Only two genes were initially considered as candidate genes, *PRR23A* and *COA7*. *PRR23A* had four protein-altering variants. However, this gene has two paralogs (*PRR23B* and *PRR23C*) with a duplication of a segmental region. Thus, variants identified in *PRR23A* are due to misalignment from the pipeline. *COA7* harbored one protein-altering variant in six patients but Sanger sequencing revealed that the variant was a false positive.

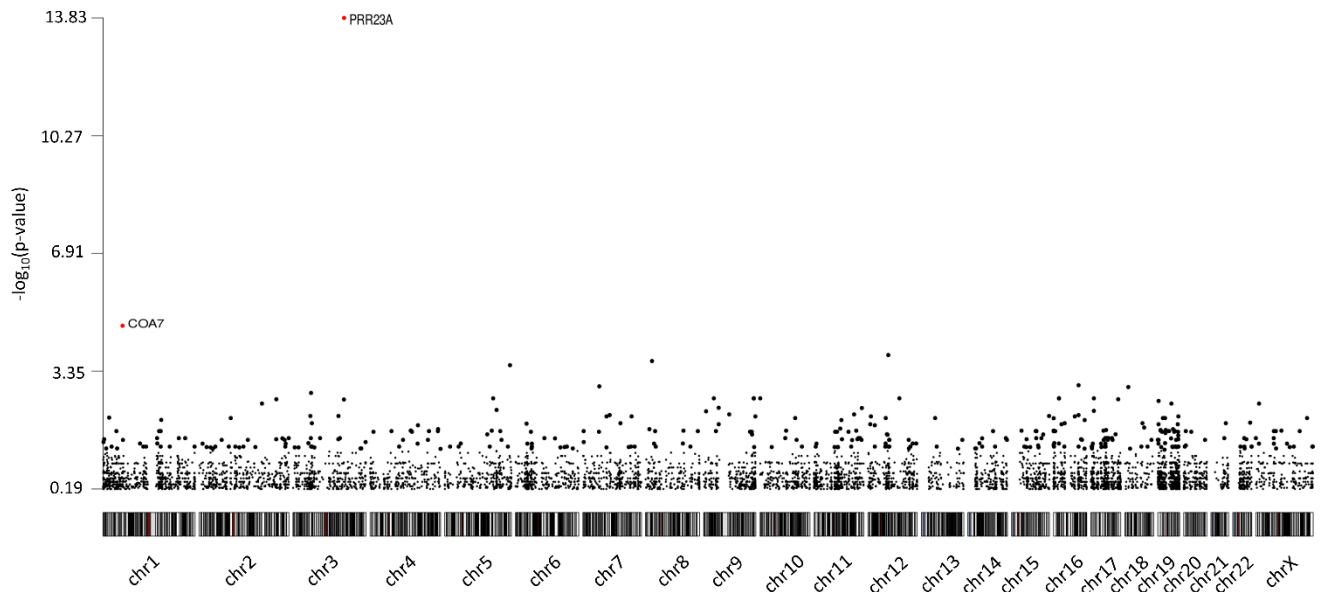


Figure 3: Manhattan plot of the gene based burden test. The plot shows the negative log₁₀ of the p-value of the Fisher exact test per chromosome. *PRR23A* had a FDR corrected p-value of 1.41×10^{-10} and *COA7* of 0.043. However, variants in these genes were false positives.

Identification of rare pathogenic or likely pathogenic variants in CH-related genes

We next identified all pathogenic and likely pathogenic variants in CH-related genes carried by NS-CHTD cases (Table 1). Twenty-seven genes related to a variable extent to thyroid dysgenesis or dysmorphogenesis (D) were assessed (Table S1). The percentage of cases with pathogenic or likely pathogenic variants in CH-related genes (44%), before validation by Sanger sequencing, is similar to what was observed in the controls (49%) (p-value of 0.8761). Unfortunately, we did not have access to the controls' DNA to validate variants. In cases, all variants were validated by Sanger sequencing. Forty-two percent of CHDT cases (15/36) have at least one validated pathogenic or likely pathogenic variant and 8% (3/36) have at least one pathogenic or likely pathogenic variant in more than one CH-related gene (Figure 4a). The most frequently mutated gene is *TG* (six mutations in five patients), followed by *KMT2D* (four mutations in four patients). The patients with variants in *JAG1* and *NKX2-5* have an ectopy but neither cardiac nor pulmonary anomalies. The patient with a *TUBB1* variant also has an ectopy but her

haematological parameters were not assessed. Of note, affected mother and daughter do not share variants in either genes associated with CHTD or in interesting candidate genes.

Table 1 Rare pathogenic or likely pathogenic variants identified in CH-related genes in NS-CHTD cases

Patient	Gene	Variant position (GRCh37)	Amino acid change	Status	Inheritance	rs number	GnomAD MAF	<i>In silico</i> prediction			
								SIFT	Polyphen-2 HDIV	Mutation Taster	CADD score
5	TUBB1	20:57599401C>T	Arg370Cys	het	father	rs62639974	0.0042	deleterious	damaging	tolerated	31
6	DUOX2	15:45392277C>T	Cys1052Tyr	het	father	rs76343591	0.0013	deleterious	benign	tolerated	19
8	SLC26A4/ Pendrin	7:107355874C>T	Arg776Cys	het	father	rs111033255	0.0018	tolerated	damaging	deleterious	28.5
9	TBX1	22:19751796G>A	Val211Met	het	U	rs749275495	2.848e-05	deleterious	damaging	deleterious	29.2
12	TG	8:133919047G>T	Arg1250His	het	mother	rs114944116	0.0024	deleterious	possibly damaging	tolerated	17.93
14	KMT2D	12:49424111G>A	His4651Tyr	het	father	rs767232021	4.406e-05	deleterious	benign	tolerated	23
	TPO	2:1497783C>G	Gln660Glu	het	father	rs121908088	0.0003	deleterious	damaging	deleterious	53
16	JAG1	20:10620426A>G	Phe1126Ser	het	mother	-	-	deleterious	damaging	deleterious	28.3
18	KMT2D	12:49432365G>A	Ala2925Val	het	mother	rs199547661	0.0017	deleterious	benign	tolerated	17.15
19	IYD	6:150716673G>A	Cys257Tyr	het	mother	rs115446362	0.0024	deleterious	benign	tolerated	10.42
20	ELN	7:73482987G>A	Gly711Asp	het	mother	rs41511151	0.003	tolerated	damaging	tolerated	26.3
24	TG	8:133895162G>C	Gln331His	het	father	rs61745783	0.0003	deleterious	damaging	tolerated	19.45
	TG	8:133984047A>G	Glu1995Gly	het	mother	rs190914906	0.0007	deleterious	damaging	tolerated	27.7
	URB1	21:33697576G>A	Ser 1695Leu	het	father	rs187640762	0.0069	tolerated	damaging	tolerated	39
	KMT2D	12:49424759C>T	Asp4530Asn	het	mother	rs768143170	3.249e-05	deleterious	possibly damaging	tolerated	27.7
27	TG	8:133883643A>G	Ile109Val	het	mother	rs35301433	0.004	deleterious	benign	tolerated	13.35
28	DUOX2	15:45393425TGAAC>T	Ser965fsX994	het	mother	rs530719719	0.003	-	-	-	-
30	NKX2-5	5:172659915G>A	Pro211Leu	het	father	rs3729754	0.0002	tolerated	possibly damaging	tolerated	18.77
	KMT2D	12:49428694T>C	Asp3419Gly	het	mother	rs146044282	0.0016	deleterious	damaging	deleterious	29.2

	TG	8:133894816G>A	Arg283Leu	het	mother	rs146926250	0.0008	deleterious	damaging	deleterious	31
33	TG	8:133953740A>C	Asp1729Ala	het	father	rs61744749	0.0061	deleterious	benign	tolerated	23

Moreover, 28% of cases (10/36) have at least one variant in dysmorphogenesis-related genes (Figure 4b). Of note, when we compared TSH and T₄, cases with variants in those genes did not have more severe hypothyroidism than cases without (Table 2 and Table S2). Finally, we assessed if patients with variants in more than one gene (oligogenic group) had a more severe phenotype than cases with variants in only one gene (monogenic group), as shown by Yamagushi *et al* (38). However, no difference was observed in the biochemical severity of CH between our oligogenic and monogenic groups (Table 3 and Table S2).

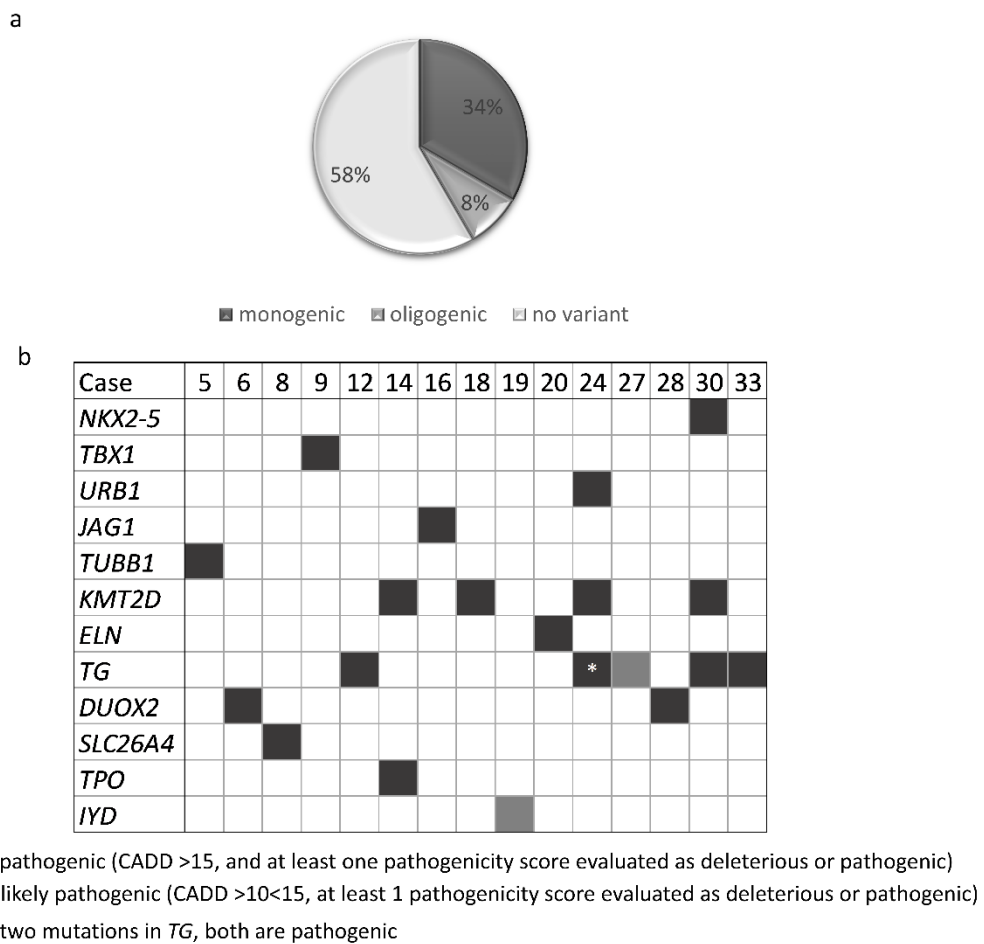


Figure 4: Burden of rare pathogenic or likely pathogenic variants detected in CHTD cases. a. Rare pathogenic or likely pathogenic variants in CH-related genes were detected in 15 of 36 cases

(42%). In these patients, three of them (8%) have at least one variant in more than one gene. b. Rare pathogenic or likely pathogenic variants in CH-related genes per case.

Table 2: Comparison of CH severity between cases with variant in dyshormonogenesis (D)-related genes and cases without variant in D-related genes

	cases with variants in D-related genes (N=9)		cases without variants in D-related genes (N=22)		P value
NBS-TSH (mU/L)	138	(21-217)	133	(21-281)	0.7627
NBS-TT ₄ (nmol/L)	114.5	(47-263)	74	(16-194)	0.3246
Diagnostic-TSH (mU/L)	51.12	(14.09-310)	257.8	(5-714.1)	0.1516
Diagnostic-ft ₄ (pmol/L)	8.16	(2.9-23.16)	6.61	(0.4-15.58)	0.4327
Diagnostic-T ₃ (nmol/L)	2.3	(1.2-3.1)	1.55	(0.3-3.1)	0.2348

ft₄: free thyroxine, NBS: new born screening, T₃: triiodothyronine, TT₄: total thyroxine, TSH: thyroid stimulating hormone, N: number of cases

Table 3: Comparison of CH severity between monogenic and oligogenic groups

	Monogenic (N=10)		Oligogenic (N=3)		P value
NBS-TSH (mU/L)	93.5	(22-211)	140	(21-217)	0.8112
NBS-TT ₄ (nmol/L)	111	(27-263)	85	(62-144)	>0.9999
Diagnostic-TSH (mU/L)	186.95	(14.09-444)	100	(22.5-157.61)	0.4818
Diagnostic-ft ₄ (pmol/L)	6.78	(2.9-23.16)	8.16	(3.24-12.4)	>0.9999
Diagnostic-T ₃ (nmol/L)	1.6	(0.3-3.1)	2.3	(1.2-2.8)	0.5545

ft₄: free thyroxine, NBS: new born screening, T₃: triiodothyronine, TT₄: total thyroxine, TSH: thyroid stimulating hormone, N: number of cases

Discussion

The molecular cause of NS-CHDT with ectopic thyroid or athyreosis remains elusive. To our knowledge, this is the first WES study performed on well-characterized thyroid dysgenesis patients (specifically ectopic thyroid or athyreosis documented by technetium scintigraphy). We evaluated the burden of rare protein-altering variants in NS-CHTD using a case-control design (26). As shown in figure 2, NS-CHTD cases are not enriched in rare missense and nonsense variants compared to a control population of similar ethnicity.

We used an unbiased approach to identify new potential predisposing genes. After correction for misalignment and validation with Sanger sequencing, no gene was identified. In addition, we looked for rare variants in genes known to be associated with CH. The percentage of cases and controls who had at least one pathogenic or likely pathogenic variant identified by WES was similar. This confirms that heterozygous variants are not sufficient to cause CHTD. Validated pathogenic or likely pathogenic variants in CH-related genes were identified in 42% of our CHTD cases, which is comparable to the literature (Table S3-S4) (39). Thus, it suggests that unraveling the genetic component of CHTD would require more than increasing the number of genes assessed. Of note, most other studies did not report scintigraphy to identify an ectopic thyroid. One study, in a Saudi Arabian cohort, identified causative variants in 44% (11/25) of the cases with thyroid dysgenesis (40). However, in that study, when cases with *TSHR* variants, a gene associated with hypoplasia or apparent athyreosis but neither with ectopy nor with true athyreosis (41, 42), were excluded, the discovery rate drops to 16%. Two other studies used targeted NGS to identify variants in CH-related genes in cases with CHTD (38) (43). In the Japanese cohort (38), 18/32 (56%) of CHTD cases had a variant in genes associated with CHTD and dysmorphogenesis, but only 7/32 (22%) had a pathogenic or likely pathogenic variant, the majority being of unknown significance (38). In the Italian cohort (43), 83 out of 177 (46.9%) were diagnosed as CHTD (43). Thirty-nine CHTD cases (47%) had a variant that passed the author's pathogenicity criteria. However, after removing the syndromic cases, to compare with our non-syndromic cohort, the discovery rate in the Italian NS-CHTD cases is 21%. Almost all variants

identified in our study were heterozygous and inherited from a healthy parent, which suggests these variants have only a predisposing role and supports our two-hit model.

Studies have recently shown that patients with thyroid dysgenesis have variants in genes related to dysmorphogenesis, contributing to their hypothyroidism. In our cohort, patients with variants in dysmorphogenesis-related genes were not more severely affected than those without such variants (Table 2). It is important to mention that even though such variants may affect the severity of CH, they cannot explain the thyroid dysgenesis.

Oligogenicity has been proposed as a model to explain CHTD, although it is not compatible with the observed discordance between MZ twins. Eight percent of our cases had oligogenic variants, consistent with recent studies (Table S3) (38, 43). Yamaguchi et al. suggested that oligogenic cases have a more severe hypothyroidism than monogenic cases, since they had a higher TSH level at the first visit (38), but this was not observed in our cohort (Table 3).

As observed in other studies, variants identified in CHTD cases do not always segregate with the phenotype (38, 41, 43). For instance, one case has two variants shared by her healthy father (case 14) and another has two variants shared by her healthy mother (case 30). Moreover, one patient has four variants, two inherited from the unaffected mother and two from the unaffected father. Finally, one case with a *KMT2D* variant is an MZ twin whose unaffected twin and mother also carry this variant (case 18). These results support the incomplete penetrance proposed by others to explain CHTD (5). They could also support our two-hit hypothesis, suggesting that the occurrence of CHTD requires a genetic predisposition but also either an epigenetic mechanism, monoallelic expression, or an early post-zygotic mutation, as proposed by others (44).

In summary, this is the first study assessing the burden of rare protein-altering variants in well-defined NS-CHTD cases. We did not observe an enrichment in rare protein-altering variants in cases compared to controls. This might be due to several reasons: the small number of cases

in our cohort limits our statistical power. For non-syndromic complex diseases, the number of patients needed to identify candidate genes with sufficient statistical power needs to be much higher, probably more than a thousand cases (45-47). Alternatively, causal variants for CHTD might, for mechanistic reasons, lie preferentially in non-protein coding genomic regions, such as transcriptional regulatory sequences, which are not assessed in exome sequencing studies. Finally, it might also mean that in non-consanguineous NS-CHTD patients, genetics is not a major factor contributing to CHTD, although this leaves the issue of the observed 40-fold increase in relative risk in first-degree relatives unresolved. Important unidentified environmental factors may possibly be involved. Recently, Wassner (48) suggested that broad-based testing of thyroid-related genes in CH cases is probably not efficient and clinically useful, particularly for NS-CHTD.

On the other hand, we identified pathogenic or likely pathogenic variants in CH-related genes in 42% of the cases. This is comparable to what is found in other studies (38, 40, 43). Nonetheless, considering the absence of segregation between the genotype and the phenotype in many cases, those results are unlikely to be useful for patient counselling, as suggested by Wassner for several variants identified in CH patients (48). Moreover, even though variants in genes related to dysmorphogenesis can explain the CH, they cannot explain the thyroid dysgenesis, as CH and TD are two distinct phenotypes. Thus to identify “thyroid dysgenesis-specific” genes, we might need cases with thyroid dysgenesis but without CH, which is an extremely rare occurrence considering that most TD cases are identified through screening for CH. Other diseases with stronger evidence for a genetic component, such as autism spectrum disorder (ASD) encountered several challenges to identify ASD-specific genes in spite of having access to larger cohorts than for NS-CHTD (49, 50). Therefore, identifying the genetic component will require much larger and well-phenotyped cohorts, an elusive task considering the relatively low incidence of CHTD.

One option to unravel TD etiology might be to sequence a higher number (than what was already attempted (24)) of monozygotic twin discordant for CHTD, hoping to find a genetic explanation for their phenotypic difference. Omics studies (genomic, epigenomic and

transcriptomic studies) on several ectopic thyroid tissues is another promising approach. However, many tissues would be required since, to date, studies that attempted these approaches have been unsuccessful (22, 23, 51, 52).

In conclusion, a major role for genetics in CHTD remains unproven. Alternative approaches, such as whole genome sequencing and epigenomics might allow for a better understanding of the causes of thyroid dysgenesis, if sufficiently large case cohorts can be analyzed to have adequate statistical power. Alternatively, basic research to identify the mechanisms underlying thyroid relocalization during embryogenesis (53) might lead to the identification of new genes implicated in this process. Variants in these genes could then be assessed in existing CHTD cohorts.

Acknowledgments

The authors thank the patients and their parents for their contribution to this study.

Author Contribution: Helen Bui, Guy Van Vliet, Johnny Deladoëy, and Guy A. Rouleau collected patients' data; Stéphanie Larrivée-Vanier, Fabien Magne, Dan Spiegelman, Martineau Jean-Louis, Mark E. Samuels, and Johnny Deladoëy carried out data analysis; Stéphanie Larrivée-Vanier wrote the manuscript; Stéphanie Larrivée-Vanier, Martineau Jean-Louis, Mark E. Samuels, Zoha Kibar, Guy Van Vliet, Johnny Deladoëy contributed to the discussion and interpretation of the results, and to the refinement of the manuscript. All authors approved the final manuscript.

Author Disclosure statement: The authors have nothing to disclose.

Financial support: This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (to Johnny Deladoëy), by the Fonds de Recherche du Québec-Santé (to Johnny Deladoëy and Stéphanie Larrivée-Vanier) and by the Girafonds / Fondation du CHU Sainte-Justine (to Stéphanie Larrivée-Vanier, Guy Van Vliet, and Johnny Deladoëy).

Correspondence: Johnny Deladoëy, M.D. Ph.D.;

Facoltà di scienze biomediche

Universtà della Svizzera Italiana, Campus Est, 6900 Lugano, Switzerland

phone: +41 27 722 00 55; fax: +41 27 722 00 54

e-mail: j.deladoey@hin.ch

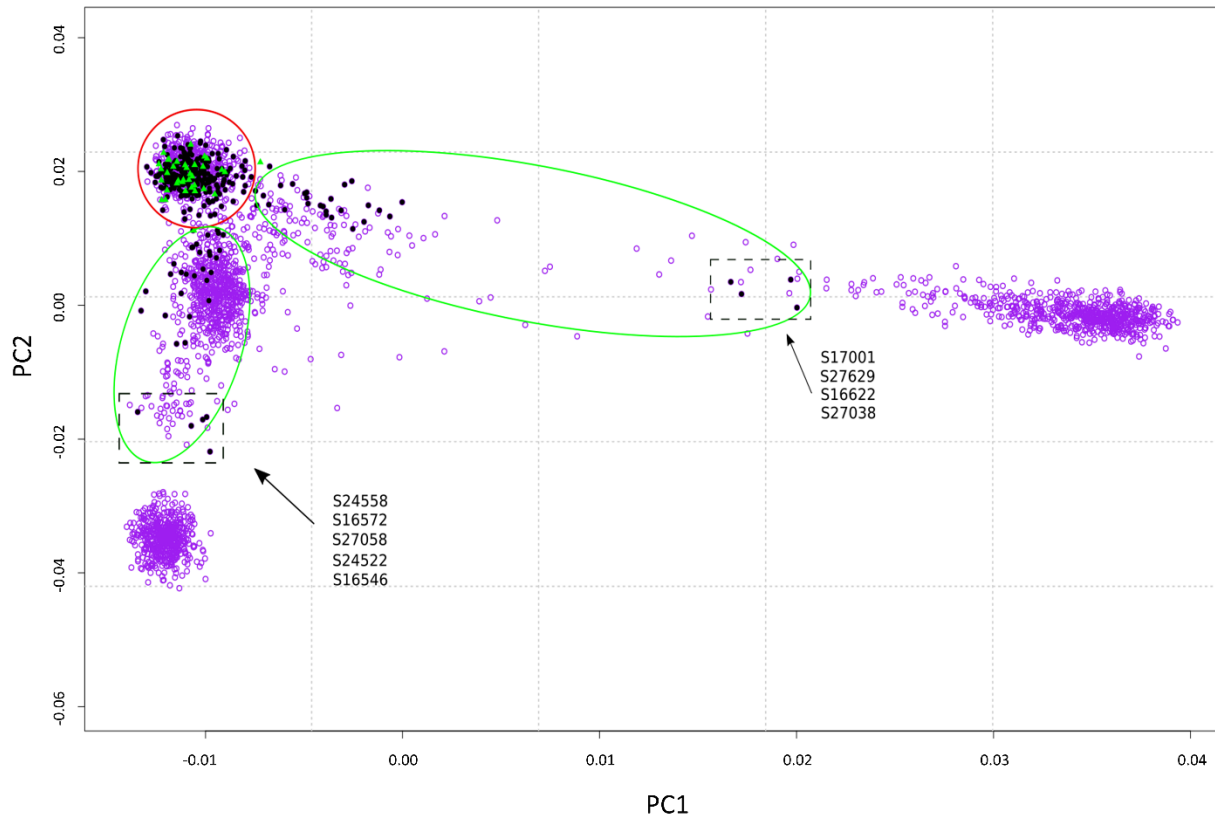


Figure S1: PCA plot of eigenvalues comparing the cases, controls, and 1000genome samples. Comparison of the eigen-value PCA plot of the cases data versus the controls and the general population of 1000genome's (1KG) data. Most cases and controls belong to the Caucasian ancestry cluster (red circle) or the admixed Americans ancestry clusters (green ellipses). We have removed nine controls out of 310 according to the stratification analysis. The 1KG population samples are represented by a purple empty circle, our control samples by a black full circle and the cases by a green full triangle. The removed samples are indicated in the dash-lined boxes.

Table S1: List of CH-related genes

gene name	gene ID
<i>FOXE1/TTF2</i>	2304
<i>GLIS3</i>	169792
<i>NKX2-1/TTF1</i>	7080
<i>NKX2-5</i>	1482
<i>PAX8</i>	7849
<i>SALL1</i>	6299
<i>TBX1</i>	6899
<i>URB1</i>	9875
<i>NTN1</i>	9423
<i>JAG1</i>	182
<i>CDCA8/BOREALIN</i>	101738843
<i>TUBB1</i>	81027
<i>DYRK1A</i>	1859
<i>ELN</i>	2006
<i>KMT2D/MLL2</i>	8085
<i>KDM6A</i>	7403
<i>KAT6B</i>	23522
<i>GNAS</i>	2778
<i>TSHR</i>	7253
<i>SLC5A5/NIS</i>	6528
<i>TPO</i>	7173
<i>DUOX2</i>	50506
<i>DUOXA2</i>	405753
<i>SLC26A4 (Pendrin)</i>	5172
<i>TG</i>	7038
<i>IYD/DEHAL1</i>	389434
<i>SLC26A7</i>	115111

CH: congenital hypothyroidism

Table S2: Clinical description of NS-CHTD cases

Patients	Sex	Phenotype	Age at screening (days)	Screening		Age at diagnosis	Diagnosis		
				TSH (mU/L)	Tot T ₄ (nmol/L)		TSH (mU/L)	fT ₄ (pmol/L)	T ₃ (nmol/L)
1	F	E	NA	NA	NA	14 days	261	NA	3.1
2	M	E	1	21	112	14 days	28.89	11.66	1.5
3*	F	E	3	37	112	8 years	6.61	8.47	NA
4	M	A	2	154	16	10 days	714.07	3.54	1.1
5	F	E	2	24	136	20 days	52.69	9.17	NA
6	F	E	2	54	263	7 days	14.09	23.16	2.3
7	F	E	1	104	88	13 days	181.21	6.97	1.6
8	M	E	1	48	151	10 days	51.12	12.34	2.2
9	F	E	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
10	F	E	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
11	F	E	NA	150	NA	8 days	257.75	4.38	1.3
12	F	E	2	29	190	33 days	23.01	10.59	3.1
13	F	E	2	138	142	13 days	112.21	7.98	2.8
14	F	E	1	217	62	8 days	>100	3.24	1.2
15	F	A	1	281	27	9 days	>100	<1.9	0.9
16	M	E	1	171	111	13 days	186.95	6.25	1.6
17	F	E	2	28	74	16 days	333.98	2.44	1.0
18	M	A	4	22	71	15 days	444	NA	<0.3
19	F	A	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
20	F	E	2	133	48	10 days	414.00	3.66	1.0
21	F	E	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
22	F	E	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
23	F	E	2	237	70	42 days	442.71	5.9	1.8
24	F	E	3	140	85	10 days	157.61	8.16	2.3
25	F	E	NA	NA	NA	NA	5.0	9.24	2.3
26	F	E	1	34	194	10 days	9.26	15.58	2.5
27	F	E	NA	211	57	15 days	>100	2,9	1,3

28	M	E	NA	141	47	14 days	310	3,4	1,3
29	F	E	2	65	102	10 days	177.00	9,78	2.6
30	F	E	3	21	144	14 days	22.5	12,4	2.8
31	F	E	2	149	63	18 days	284	12.6	1,6
32	F	E	NA	81	NA	NA	NA	NA	NA
33	F	E	NA	138	NA	14 days	253	6.78	2.3
34	F	E	2	236	NA	12 days	592	2,6	1,4
35	M	E	NA	177	NA	10 days	>100	2,7	1,3
36	F	E	NA	103	38	16 days	295	0,4	NA

A: athyreosis, E: ectopy, F: female, fT₄: free thyroxine, M: male, T₃: triiodothyronine, Tot T₄: total thyroxine, TSH: thyroid stimulating hormone, TG: thyroglobulin, NA: not available, * patient's details in Stoppa-Vaucher et al., JCEM, 2010 (25)

Table S3: Literature review of articles that include CHTD cases

	de Filippis, Hum Mol Genet, 2017 (43)	Zou, JCEM, 2018 (40)	Yamaguchi, JCEM, 2020 (38)
Sequencing approach	TNGS	WES	TNGS
Genes studied	<i>NKX2-1, PAX8, FOXE1, GLIS3, JAG1, TSHR, SLC26A4, TG, TPO, DUOX2, DUOXA2</i> (11 in total)	NA	<i>NKX2-1, NKX2-5, FOXE1, HHEX, GLIS3, TSHR, JAG1, TG, TPO, DUOX2, DUOXA2, DUOX1, DUOXA1, SLC5A5, SLC26A4, IYD, SLC16A2, SECISBP2, GNAS, DIO1, DIO2, DIO3, CDCA8</i> (24 in total)
Number of CHTD patients	83	25	32
Ectopic thyroid	30	NA	NA
Athyreosis	23	NA	NA
Type of variants assessed	nonsense, frameshift, splice site, missense; disruptive variant: deleterious in 5/7 algorithms of the dbSNP database	VUS: considered mutations if <0.01, damaging or disease causing in 3/4 prediction tools, strict segregation; diseases causing mutation: biallelic variants	variants called benign or likely benign were excluded
<i>In silico</i> prediction tools	SIFT, Polyphen2, Mutation Taster, Mutation Assessor, LRT, FATHMM; for intronic variants: NetGene2v.2.4 ESEfinder2.0, BDGP	Mutation Taster, PolyPhen-2, SIFT, PROVEAN	ACMG guidelines
% of variants identified in CHTD cases	47% for all CHTD cases 21% after removing syndromic cases	44% for all CHTD cases 20% after removing cases with <i>TSHR</i> variant:	56% for all variant, 22% for pathogenic or likely pathogenic variants
% of CHTD cases in oligogenic group	10%	12.5%	NA

CHTD: congenital hypothyroidism due to thyroid dysgenesis, TNGS: targeted next-generation sequencing, WES: whole exome sequencing, NA: Not available

Table S4: Comparison between the percentage of cases with variants in CH-related genes of our NS-CHTD cohort and in published cohorts

	Percentage of cases with a variant in CH-related genes (cases/total cases)	Two-tailed Fisher exact test, p-value	95% Confidence interval	
			Lower limit	Upper limit
Present cohort	42 (15/36)			
de Flippis, 2017	21 (17/83)	0.0934	0.02061	1.882
Zou, 2018	16 (4/25)	0.1719	0.0838	1.4164
Yamaguchi, 2020	22 (7/32)	0.2285	0.1609	1.5917

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. De Felice M, Di Lauro R 2004 Thyroid Development and Its Disorders: Genetics and Molecular Mechanisms. *Endocr Rev* **25**:722-746.
4. Eugene D, Djemli A, Van Vliet G 2005 Sexual dimorphism of thyroid function in newborns with congenital hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* **90**:2696-2700.
5. Castanet M, Polak M, Bonaiti-Pellie C, Lyonnet S, Czernichow P, Leger J 2001 Nineteen years of national screening for congenital hypothyroidism: familial cases with thyroid dysgenesis suggest the involvement of genetic factors. *J Clin Endocrinol Metab* **86**:2009-2014.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. Dentice M, Cordeddu V, Rosica A, Ferrara AM, Santarpia L, Salvatore D, Chiovato L, Perri A, Moschini L, Fazzini C, Olivieri A, Costa P, Stoppioni V, Baserga M, De Felice M, Sorcini M, Fenzi G, Di Lauro R, Tartaglia M, Macchia PE 2006 Missense mutation in the transcription factor NKX2-5: a novel molecular event in the pathogenesis of thyroid dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab* **91**:1428-1433.
10. Breedveld GJ, van Dongen JW, Danesino C, Guala A, Percy AK, Dure LS, Harper P, Lazarou LP, van der Linde H, Joosse M, Gruters A, MacDonald ME, de Vries BB, Arts WF, Oostra BA, Krude H, Heutink P 2002 Mutations in TTF-1 are associated with benign hereditary chorea. *Hum Mol Genet* **11**:971-979.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.

15. Senee V, Chelala C, Duchatelet S, Feng D, Blanc H, Cossec JC, Charon C, Nicolino M, Boileau P, Cavener DR, Bougneres P, Taha D, Julier C 2006 Mutations in GLIS3 are responsible for a rare syndrome with neonatal diabetes mellitus and congenital hypothyroidism. *Nat Genet* **38**:682-687.
16. Opitz R, Hitz MP, Vandernoot I, Trubiroha A, Abu-Khudir R, Samuels M, Desilets V, Costagliola S, Andelfinger G, Deladoey J 2015 Functional zebrafish studies based on human genotyping point to netrin-1 as a link between aberrant cardiovascular development and thyroid dysgenesis. *Endocrinology* **156**:377-388.
17. de Filippis T, Marelli F, Nebbia G, Porazzi P, Corbetta S, Fugazzola L, Gastaldi R, Vigone MC, Biffanti R, Frizziero D, Mandara L, Prontera P, Salerno M, Maghnie M, Tiso N, Radetti G, Weber G, Persani L 2016 JAG1 Loss-Of-Function Variations as a Novel Predisposing Event in the Pathogenesis of Congenital Thyroid Defects. *J Clin Endocrinol Metab* **101**:861-870.
18. Carre A, Stoupa A, Kariyawasam D, Gueriouz M, Ramond C, Monus T, Leger J, Gaujoux S, Sebag F, Glaser N, Zenaty D, Nitschke P, Bole-Feysot C, Hubert L, Lyonnet S, Scharfmann R, Munnich A, Besmond C, Taylor W, Polak M 2017 Mutations in BOREALIN cause thyroid dysgenesis. *Hum Mol Genet* **26**:599-610.
19. Stoupa A, Adam F, Kariyawasam D, Strassel C, Gawade S, Szinnai G, Kauskot A, Lasne D, Janke C, Natarajan K, Schmitt A, Bole-Feysot C, Nitschke P, Leger J, Jabot-Hanin F, Tores F, Michel A, Munnich A, Besmond C, Scharfmann R, Lanza F, Borgel D, Polak M, Carre A 2018 TUBB1 mutations cause thyroid dysgenesis associated with abnormal platelet physiology. *EMBO molecular medicine* **10**.
20. Pohlenz J, Dumitrescu A, Zundel D, Martiné U, Schönberger W, Koo E, Weiss RE, Cohen RN, Kimura S, Refetoff S 2002 Partial deficiency of thyroid transcription factor 1 produces predominantly neurological defects in humans and mice. *J Clin Invest* **109**:469-473.
21. Deladoey J, Vassart G, Van Vliet G 2007 Possible non-mendelian mechanisms of thyroid dysgenesis. *Endocr Dev* **10**:29-42.
22. 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.
23. Magne F, Ge B, Larrivee-Vanier S, Van Vliet G, Samuels ME, Pastinen T, Deladoey J 2016 Demonstration of Autosomal Monoallelic Expression in Thyroid Tissue Assessed by Whole-Exome and Bulk RNA Sequencing. *Thyroid* **26**:852-859.
24. 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.
25. 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.
26. Sifrim A, Hitz MP, Wilsdon A, Breckpot J, Turki SH, Thienpont B, McRae J, Fitzgerald TW, Singh T, Swaminathan GJ, Prigmore E, Rajan D, Abdul-Khaliq H, Banka S, Bauer UM, Bentham J, Berger F, Bhattacharya S, Bu'Lock F, Canham N, Colgiu IG, Cosgrove C, Cox H, Daehnert I, Daly A, Danesh J, Fryer A, Gewillig M, Hobson E, Hoff K, Homfray T, Study I, Kahlert AK, Ketley A, Kramer HH, Lachlan K, Lampe AK, Louw JJ, Manickara AK, Manase D, McCarthy KP, Metcalfe K, Moore C, Newbury-Ecob R, Omer SO, Ouwehand WH, Park SM, Parker MJ,

- Pickardt T, Pollard MO, Robert L, Roberts DJ, Sambrook J, Setchfield K, Stiller B, Thornborough C, Toka O, Watkins H, Williams D, Wright M, Mital S, Daubeney PE, Keavney B, Goodship J, Consortium UK, Abu-Sulaiman RM, Klaassen S, Wright CF, Firth HV, Barrett JC, Devriendt K, FitzPatrick DR, Brook JD, Deciphering Developmental Disorders S, Hurles ME 2016 Distinct genetic architectures for syndromic and nonsyndromic congenital heart defects identified by exome sequencing. *Nat Genet* **48**:1060-1065.
27. 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.
 28. Bolger AM, Lohse M, Usadel B 2014 Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics (Oxford, England)* **30**:2114-2120.
 29. Van der Auwera GA, Carneiro MO, Hartl C, Poplin R, Del Angel G, Levy-Moonshine A, Jordan T, Shakir K, Roazen D, Thibault J, Banks E, Garimella KV, Altshuler D, Gabriel S, DePristo MA 2013 From FastQ data to high confidence variant calls: the Genome Analysis Toolkit best practices pipeline. *Curr Protoc Bioinformatics* **43**:11 10 11-33.
 30. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, Daly M, DePristo MA 2010 The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res* **20**:1297-1303.
 31. Wang K, Li M, Hakonarson H 2010 ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res* **38**:e164.
 32. Yang H, Wang K 2015 Genomic variant annotation and prioritization with ANNOVAR and wANNOVAR. *Nat Protoc* **10**:1556-1566.
 33. Authors V 2015 Python 3.5 Language Reference. Samurai Media Limited.
 34. Sarkar D 2008 Lattice: Multivariate Data Visualization with R.
 35. Wickham H 2009 Ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Vol 16.
 36. McDonald JH 2014 Handbook of Biological Statistics, 3rd ed. Sparky House Publishing, Baltimore, Maryland.
 37. Abu-Khudir R, Larrivee-Vanier S, Wasserman JD, Deladoey J 2017 Disorders of thyroid morphogenesis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **31**:143-159.
 38. Yamaguchi T, Nakamura A, Nakayama K, Hishimura N, Morikawa S, Ishizu K, Tajima T 2020 Targeted Next-Generation Sequencing for Congenital Hypothyroidism With Positive Neonatal TSH Screening. *J Clin Endocrinol Metab* **105**.
 39. Stoupa A, Al Hage Chehade G, Chaabane R, Kariyawasam D, Szinnai G, Hanein S, Bole-Feysot C, Fourrage C, Nitschke P, Thalassinos C, Pinto G, Mnif M, Baron S, De Kerdanet M, Reynaud R, Barat P, Hachicha M, Belguith N, Polak M, Carré A 2020 High Diagnostic Yield of Targeted Next-Generation Sequencing in a Cohort of Patients With Congenital Hypothyroidism Due to Dyshormonogenesis. *Front Endocrinol (Lausanne)* **11**:545339.
 40. Zou M, Alzahrani AS, Al-Odaib A, Alqahtani MA, Babiker O, Al-Rijjal RA, BinEssa HA, Kattan WE, Al-Enezi AF, Al Qarni A, Al-Faham MSA, Baitei EY, Alsagheir A, Meyer BF, Shi Y 2018 Molecular Analysis of Congenital Hypothyroidism in Saudi Arabia: SLC26A7 Mutation Is a Novel Defect in Thyroid Dyshormonogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* **103**:1889-1898.

41. Gagné N, Parma J, Deal C, Vassart G, Van Vliet G 1998 Apparent congenital athyreosis contrasting with normal plasma thyroglobulin levels and associated with inactivating mutations in the thyrotropin receptor gene: are athyreosis and ectopic thyroid distinct entities? *J Clin Endocrinol Metab* **83**:1771-1775.
42. Larrivière-Vanier S, Magne F, Hamdoun E, Petryk A, Kibar Z, Van Vliet G, Deladoëy J 2021 Severe Congenital Hypothyroidism Due to a Novel Deep Intronic Mutation in the TSH Receptor Gene Causing Intron Retention. *J Endocr Soc* **5**:bvaa183.
43. de Filippis T, Gelmini G, Paraboschi E, Vigone MC, Di Frenna M, Marelli F, Bonomi M, Cassio A, Larizza D, Moro M, Radetti G, Salerno M, Ardissino D, Weber G, Gentilini D, Guizzard F, Duga S, Persani L 2017 A frequent oligogenic involvement in congenital hypothyroidism. *Hum Mol Genet* **26**:2507-2514.
44. Vassart G, Dumont JE 2005 Thyroid dysgenesis: multigenic or epigenetic ... or both? *Endocrinology* **146**:5035-5037.
45. Guo MH, Dauber A, Lippincott MF, Chan YM, Salem RM, Hirschhorn JN 2016 Determinants of Power in Gene-Based Burden Testing for Monogenic Disorders. *Am J Hum Genet* **99**:527-539.
46. Kiezun A, Garimella K, Do R, Stitzel NO, Neale BM, McLaren PJ, Gupta N, Sklar P, Sullivan PF, Moran JL, Hultman CM, Lichtenstein P, Magnusson P, Lehner T, Shugart YY, Price AL, de Bakker PI, Purcell SM, Sunyaev SR 2012 Exome sequencing and the genetic basis of complex traits. *Nat Genet* **44**:623-630.
47. Petersen BS, Fredrich B, Hoepfner MP, Ellinghaus D, Franke A 2017 Opportunities and challenges of whole-genome and -exome sequencing. *BMC Genet* **18**:14.
48. Wassner AJ 2020 Unraveling the Genetics of Congenital Hypothyroidism: Challenges and Opportunities. *J Clin Endocrinol Metab* **105**.
49. Myers SM, Challman TD, Bernier R, Bourgeron T, Chung WK, Constantino JN, Eichler EE, Jacquemont S, Miller DT, Mitchell KJ, Zoghbi HY, Martin CL, Ledbetter DH 2020 Insufficient Evidence for “Autism-Specific” Genes. *The American Journal of Human Genetics* **106**:587-595.
50. Buxbaum JD, Cutler DJ, Daly MJ, Devlin B, Roeder K, Sanders SJ 2020 Not All Autism Genes Are Created Equal: A Response to Myers et al. *The American Journal of Human Genetics* **107**:1000-1003.
51. Narumi S, Matsubara K, Ishii T, Hasegawa T 2018 Methylome analysis of thyroid ectopy shows no disease-specific DNA methylation signature. *Clin Pediatr Endocrinol* **27**:235-238.
52. Abu-Khudir R, Magne F, Chanoine JP, Deal C, Van Vliet G, Deladoëy J 2014 Role for tissue-dependent methylation differences in the expression of FOXE1 in nontumoral thyroid glands. *J Clin Endocrinol Metab* **99**:E1120-1129.
53. Fagman H, Nilsson M 2011 Morphogenetics of early thyroid development. *J Mol Endocrinol* **46**:R33-42.

3.5 discussion relative à l'article 2

Notre étude est la première ayant effectué de l'exome complet chez des cas (36) avec une HCDT-NS bien caractérisée (ectopie ou athyréose). Pour ce projet, nous avons utilisé une approche non biaisée par comparaison de cohorte, soit le *gene-based burden test* et une approche biaisée par gènes candidats.

3.5.1 Approche non-biaisée (*gene-base burden test*)

Suivant les différentes étapes de validation de la qualité des données brutes et de filtration nécessaires pour obtenir des données de qualité (237), le PCA (*principle component analysis*) nous a permis de confirmer que nous avons deux cohortes d'ethnicité similaire. Le *gene-based burden test* a été réalisé sur les 8,201 gènes qui respectaient les critères d'inclusion. Cette analyse a initialement identifié *PRR23A* comme un gène candidat. Par contre, les quatre variants identifiés dans ce gène se retrouvent dans la même région et cette région est dupliquée dans l'exome, puisqu'elle est présente dans deux gènes paralogues de *PRR23A* (*PRR23B* et *PRR23C*). Par conséquent, ces variants sont dus à un mauvais alignement. Un autre gène, *COA7*, a été identifié comme gène candidat mais la validation du variant par séquençage Sanger a montré que ce variant était un faux-positif. Par conséquent, après correction, Le *gene-based burden* n'a pas permis d'identifier de nouveaux gènes candidats. La petite taille de l'échantillon peut expliquer l'absence de résultats positifs (241, 242, 244). Les ectopies et les athyréoses sont deux sous-types d'HCDT, qui est une maladie rare (1/4,000), donc le nombre d'échantillons disponibles est faible. Par conséquent, la puissance statistique pour permettre d'identifier des gènes candidats est difficile à atteindre surtout pour des maladies rares et complexes (102, 246, 247). L'atteinte d'un nombre suffisant de cas prendrait des années. Par exemple, au Québec, considérant le nombre de naissances par année (environ 80,000) et la prévalence des HCDT (1/4000), 50 ans de recrutement seraient requis pour avoir 1000 patients avec une HCDT, en assumant qu'ils ont tous une HCDT isolée. À l'échelle nationale, cela prendrait une dizaine d'année de recrutement. Les pays comme la Chine, l'Inde ou les États-Unis avec plusieurs millions de naissances par an pourraient atteindre un nombre suffisant, mais l'investissement monétaire pour bien caractériser les patients et réaliser l'exome complet demeure un obstacle important. Une collaboration à

l'échelle internationale pourrait permettre d'identifier de nouveaux gènes de prédisposition, mais pour cela un consensus sur l'étiologie de l'HCDT devra préalablement être obtenu.

Un autre point important à considérer est l'hétérogénéité génétique qui augmente la difficulté d'identifier des facteurs génétiques prédisposant à l'HCDT. Plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans les différentes étapes du développement de la thyroïde, tel que présenté dans l'introduction, donc les chances d'identifier des gènes communs, prédisposant les cas à avoir une HCDT, dans une petite cohorte sont faibles. Pour qu'un gène ressorte de l'analyse, il aurait fallu que la majorité des cas possèdent un variant dans ce dernier. À cause de ces limitations, nos résultats suggèrent que le séquençage de l'exome complet n'était pas informatif pour identifier des gènes de prédisposition chez une petite cohorte d'HCDT-NS bien caractérisée. Nos résultats peuvent aussi suggérer une autre hypothèse, soit que la génétique n'est pas un facteur important dans les HCDT-NS. Comme certains l'ont proposé, la découverte des causes des HCDT ne se trouvera pas nécessairement dans le séquençage de l'exome des patients, considérant la complexité de cette maladie et sa nature non-Mendélienne (100).

De plus, le séquençage de l'exome entier réalisé sur de l'ADN leucocytaire ne permet d'identifier qu'un des deux hits de notre hypothèse. D'autres études, telles que celles que nous avons réalisées précédemment (études sur du tissu thyroïdien ectopique) (75, 82), sont nécessaires afin d'identifier le deuxième hit. Par contre, la taille de l'échantillon est un enjeu majeur pour ce genre d'expérience, puisque les thyroïdes ectopiques sont rarement réséquées.

3.5.2 Approche biaisée

L'approche biaisée permet de se concentrer sur des ensembles de gènes. Les différentes voies de signalisation impliquées dans le développement embryonnaire (WNT, BMP, Notch, SHH, FGF, Nodal, PDGF, VEGF, TGFB) ont été étudiées puisque dans chacune de ces voies, des gènes ont déjà été associés au développement de la thyroïde (cette étude n'a pas été insérée dans l'article). Avec cette approche biaisée, le nombre de gènes testés était moindre, ce qui diminuait la valeur de p seuil du FDR, augmentant ainsi les chances d'obtenir des gènes significativement associés avec le phénotype. Par contre, aucun gène n'est sorti significatif. Ceci suggère que, même

avec cette approche, le nombre de cas dans notre étude était trop faible pour repérer des gènes de prédisposition ou encore que la génétique n'est pas fortement impliquée dans l'HCDT.

Les variants présents dans des gènes liés aux hypothyroïdies congénitales ont été répertoriés à partir des données de l'exome complet. Le pourcentage de cas et de contrôle avec des variants rares pathogéniques ou probablement pathogéniques est similaire, renforçant l'hypothèse du double-hit pour expliquer les HCDT. Des variants rares pathogéniques ou probablement pathogéniques, validés par séquençage Sanger, ont été trouvés chez 42% des cas avec HCDT-NS (15/36), ce qui est similaire à la littérature. Il est à noter que, dans les trois articles répertoriés (54, 93, 134), le phénotype pour chacun des patients n'est pas mentionné, ce qui rend la comparaison difficile. De plus, l'évaluation de la pathogénicité est différente d'une analyse à l'autre et les variants ne sont pas tous hétérozygotes, contrairement à ceux identifiés dans notre analyse. L'utilisation de l'exome entier nous a aussi probablement permis d'identifier davantage de variants dans les gènes de prédisposition. Malgré tout, il n'y a pas de différence significative entre nos résultats et ceux de la littérature, ce qui suggère que l'exome n'est probablement pas l'outil idéal pour identifier les causes de l'HCDT. Le gène le plus souvent muté dans notre cohorte est la *thyroglobuline (TG)*, ce qui était attendu puisque ce gène est fréquemment muté dans les études réalisées chez des cas d'HC Caucasiens (92, 133).

Certains cas (25%) possèdent un variant délétère dans des gènes de dyshormonogénèse. Tel que mentionné précédemment, puisque le diagnostic de l'HC est basé sur des valeurs seuils de niveaux d'hormones (TSH et T₄), il n'est pas surprenant de retrouver certains patients avec des variants dans des gènes impliqués dans la fonction thyroïdienne. Par contre, ces variants n'expliquent pas le défaut de migration de la thyroïde. Dans un autre ordre d'idée, la grande variabilité dans la sévérité de l'hypothyroïdie chez les cas avec HCDT aurait pu être due à la présence de variants dans des gènes de dyshormonogénèse, mais il n'y a pas de différence significative dans les valeurs biochimiques entre les cas qui possèdent des variants dans des gènes de dyshormonogénèse et ceux qui n'en possèdent pas. Puisque les thyroïdes ectopiques sont généralement plus petites, sans lobes latéraux et sans isthme, peut-être que la taille de la thyroïde est proportionnelle à la sévérité de l'HC. Par contre, il ne semble pas y avoir de

corrélation entre la quantité de tissu thyroïdien, évaluée à l'aide d'une scintigraphie au technétium, et la sévérité de l'HC (communication informelle entre les Drs Guy Van Vliet et Juliane Léger). La présence de l'HC chez des patients avec une dysgénésie thyroïdienne ne semble pas liée à la taille de cette dernière ni à la présence de variant dans des gènes de dyshormonogénèse, elle semble plutôt liée intrinsèquement au problème lors du développement de la thyroïde.

Finalement, une hypothèse multigénique a déjà été avancée pour expliquer les cas d'HCDT. Huit % des cas (3/36) avait plus d'un variant dans un gène lié à l'HC, ce qui est similaire à ce qui est observé dans la littérature (9% et 8% dans les articles de Yamaguchi et de de Filippis, respectivement) (54, 93). Par contre, le génotype ne co-ségrègue que rarement avec le phénotype, que ce soit dans notre analyse ou celles déjà publiées (54, 93). Malgré tout, ce résultat concorde avec une hypothèse multigénique, mais aussi avec notre hypothèse de double-hit, qui stipule que l'HCDT requiert une prédisposition génétique associée à une composante épigénétique ou un évènement post-zygotique précoce. Par contre, ces cas multigéniques ne présentent pas une hypothyroïdie plus sévère que les cas monogéniques, contrairement à ce qui été observé par Yamaguchi et al., (93). L'étendue des valeurs biochimiques est beaucoup plus grande chez nos cas que chez ceux présentés dans l'article de Yamaguchi, ce qui pourrait expliquer l'absence de différence significative entre les cas monogéniques et multigéniques de notre cohorte. Nous avons montré que l'analyse du séquençage de l'exome complet, à défaut d'identifier de nouveaux des gènes de prédisposition impliqués dans les dysgénésies thyroïdiennes, est en mesure d'identifier des variants rares pathogéniques ou probablement pathogéniques, hérités d'un parent sain, dans des gènes de prédisposition chez 42% des cas avec HCDT, ce qui concorde avec notre hypothèse de double-hit.

Chapitre 4 – 3^e publication

Investigation of the NF- κ B pathway in the underlying etiology of congenital hypothyroidism due to thyroid dysgenesis

(en préparation)

Stéphanie Larrivée-Vanier¹, Martineau Jean-Louis¹, Fabien Magne¹, Helen Bui²,
Guy A. Rouleau³, Dan Spiegelman³, Mark E. Samuels^{1,4}, Zoha Kibar^{1,5},
Guy Van Vliet^{1,6}, Johnny Deladoëy^{1,6,7,8}

¹Research Center of Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine, Université de Montréal, Montréal, Québec H3T 1C5, Canada

²McGill University Health Center, Montréal, Québec H4A 3J1, Canada

³Montreal Neurological Institute, McGill University, Montréal, Québec H3A 2B4, Canada

Departments of ⁴Medicine, ⁵Neurosciences, and ⁶Pediatrics, Université de Montréal, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada

⁷Pediatric Institute of Southern Switzerland, 6500 Bellinzona, Switzerland.

⁸Faculty of Biomedical Sciences, University of Southern Switzerland, 6900 Lugano, Switzerland.

Abbreviated Title: embryonic development of the thyroid and vessels

Key terms: non-syndromic congenital hypothyroidism; birth defects; thyroid ectopy; athyreosis.

Address all correspondence and requests for reprints to:

Stéphanie Larrivée Vanier

CHU Sainte-Justine

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

phone: 438-881-5119

e-mail: stephanie.larrivee-vanier.hsj@ssss.gouv.qc.ca

Grants' support: This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (to J.D.), by the Fonds de Recherche du Québec-Santé (to J.D. and S.L.V.) and by the Girafonds / Fondation du CHU Sainte-Justine (to S.L.V., G.V.V. and J.D.)

Disclosure statement: All authors have nothing to disclose.

4.1 Contributions des auteurs

Stéphanie Larrivée Vanier : J'ai participé à la conception du projet en m'occupant de toute la partie poisson-zèbre. J'ai effectué toutes les expériences sur le poisson-zèbre. J'ai rédigé et corrigé le manuscrit.

Fabien Magne : Le Dr Magne a réalisé les analyses préliminaires de l'exome et identifié le gène *IKBKE*.

Martineau Jean-Louis : M. Jean-Louis a donné son avis scientifique sur certains résultats et à participé à la correction du manuscrit.

Mark E. Samuels : Le Dr Samuels a participé à la correction du manuscrit. Il a partagé son expertise en génétique.

Zoha Kibar : La Dre Kibar a donné son avis scientifique sur le projet et partagé son expertise sur le poisson-zèbre. Elle a aussi corrigé le manuscrit.

Guy Van Vliet : Le Dr Van Vliet a participé à la conception du projet et à la correction du manuscrit.

Johnny Delaodëy : Le Dr Deladoëy a conceptualisé le projet et corrigé l'article.

4.2 Résumé

Introduction : L'hypothyroïdie congénitale par dysgénésie thyroïdienne (l'HCDT) est la maladie endocrinienne congénitale la plus fréquente avec une prévalence de 1 :4000 naissances vivantes. L'HCDT est une maladie complexe non-mendélienne et une hypothèse de double-hit combinant une prédisposition génétique (variant hérité ou *de novo*) à un évènement post-zygotique a été proposée pour rendre compte des différentes observations épidémiologiques. Ces dernières sont une sporadicité élevée (seulement 1% de cas familiaux), une prédominance ethnique et une discordance élevée entre les jumeaux monozygotiques. Les causes demeurent largement inconnues (plus de 95%), spécialement pour les ectopies thyroïdiennes. Les gènes connus impliqués dans le développement thyroïdien ont été largement étudiés mais n'expliquent que très peu de cas, ce qui suggère que des recherches plus élargies, sur différents gènes ou voies de signalisation doivent être poursuivies. La voie NF-κB est une des voies intéressantes à explorer car elle est associée à d'autres maladies endocriniennes et elle a récemment été directement associée à la morphogenèse et à la fonction de la thyroïde.

Objectif : Identifier de nouveaux gènes de prédisposition associée à la voie NF-κB et étudier le rôle de ces derniers lors du développement de la thyroïde.

Méthodes : Le séquençage de l'exome entier de 37 patients avec une HCDT a été comparé à celui d'une cohorte contrôle de 310 patients. Uniquement les gènes liés à la voie NF-κB ont été étudiés. Ensuite, le rôle d'*ikbke* lors du développement de la thyroïde a été étudié chez le poisson-zèbre.

Résultats : Aucun gène n'est ressorti avec une valeur de p significative, mais le gène *ikbke* était un des gènes de la voie NF-κB avec une valeur de p le plus près de la significativité. Des études préliminaires réalisées dans une lignée cellulaire thyroïdienne humaine suggéraient qu'*IKBKE* était impliqué dans la migration des cellules thyroïdiennes. Chez le poisson-zèbre, la diminution d'*ikbke* à l'aide d'un morpholino induit un arrêt de la migration rostrale de la thyroïde de même qu'un défaut de positionnement de l'arc aortique. Le phénotype thyroïdien est partiellement restauré suite à l'injection d'ARNm humain d'*IKBKE*. Un modèle déficient pour *ikbke* (*ikbke*^{-/-}) ne reproduit pas le phénotype observé chez le morphant, de même qu'une inhibition transitoire à l'aide de CRISPR interférant ou d'une molécule inhibitrice, l'amlexanox.

Conclusion : L'inhibition d'*ikbke* à l'aide d'un morpholino induit un défaut de migration rostrale de la thyroïde, mais ce défaut de migration n'a pu être confirmé par une technique alternative. D'autres recherches sont nécessaires afin de valider le rôle d'*ikbke* lors de la migration thyroïdienne.

4.3 Introduction spécifique

L'identification de gènes candidats par séquençage de l'exome complet n'est que la première étape pour déterminer si un gène peut être considéré comme un gène de prédisposition pour une maladie, une validation dans un modèle animal est nécessaire pour confirmer son implication. J'ai donc mis au point le modèle de poisson-zèbre afin d'étudier des gènes de prédisposition potentiels identifiés par notre analyse d'exome. Les raisons justifiant le choix de ce modèle sont multiples (exemple: facilité à modifier le génome et nombre élevé d'embryons par croisement) et ont été expliquées en détail dans l'introduction et dans l'article de revue que j'ai publiée et qui se retrouve en annexe. De plus, le modèle double transgénique marquant la thyroïde (*tg*: thyroglobuline) et les vaisseaux sanguins (*kdr1*: récepteur du vegf) *tg(tg :mCherry);tg(kdr1 :GFP)* étant déjà disponible (3), cela nous a permis d'étudier le lien entre la thyroïde et les vaisseaux sanguins.

4.3.1 Justification du choix de gène

IKBKE a initialement été sélectionnée suite à une première analyse du séquençage de l'exome entier chez 37 cas d'HCDT. De plus, des variants rares dans *ikbke* ont été identifiés chez une cohorte avec HCDT indépendante. Nous avons, dans un premier temps, évalué le rôle d'*IKBKE* dans la migration des cellules thyroïdiennes humaines. Nos résultats préliminaires suggéraient qu'*IKBKE* augmentait la migration des cellules thyroïdiennes (Figure 16). Suites à ce résultat nous avons décidé de poursuivre les études sur les rôles d'*ikbke* dans la migration thyroïdienne chez le poisson-zèbre.

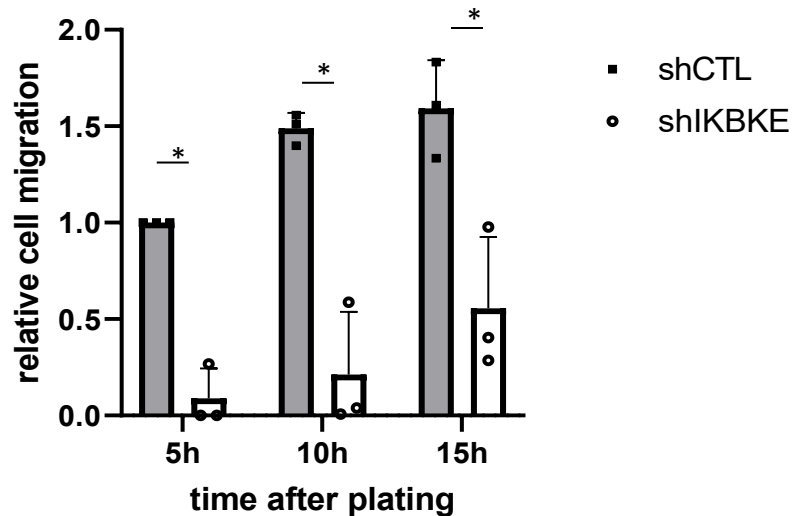


Figure 16. – Migration en temps réels de cellules thyroïdiennes déficientes pour *IKBKE*. À 5h, 10h, et 15h, la migration cellulaire est significativement diminuée comparée à des cellules infectées avec un sh-contrôle (shCTRL). n=3, test T de Student, * valeur de $p < 0.05$, h : heure après le début de l'expérience

En cours de route, nous avons réalisé que l'analyse des exomes entiers comportait des biais (au niveau des contrôles sélectionnés et des filtres utilisés) qui ont nécessité une nouvelle analyse. Malheureusement, dans la dernière analyse, *IKBKE* n'est pas ressorti avec une valeur de p significative, que ce soit dans l'approche non biaisée ou dans l'approche biaisée (par voie de signalisation). Par contre, il était un des gènes de la voie NF- κ B avec une valeur de p le plus près de la significativité. *IKBKE* fait partie de la voie non-canonique de NF- κ B et est impliqué dans la migration de différentes cellules (269, 270). Puisque nos résultats avec un morpholino contre *ikbke* montrait un défaut de migration rostrale des cellules thyroïdiennes significatif comparé au contrôle, nous avons donc poursuivi nos recherches sur ce gène. Les résultats de ce chapitre sont présentés sous forme de manuscrit en préparation afin de voir le potentiel de publication et de pratiquer la rédaction d'article scientifique, tout en sachant pertinemment que le manuscrit n'est pas prêt pour soumission.

4.4 Article

Abstract

Context: Congenital hypothyroidism due to thyroid dysgenesis (CHTD) is the most common congenital endocrine disease with a prevalence of 1:4,000 live births. A two-hit hypothesis combining a genetic predisposition consisting in an inherited or *de novo* variant with a post-zygotic event has been suggested to explain CHTD. This model is compatible with the sporadic occurrence of the disease (only 1% of familial cases) but also with the variation in the incidence by ethnicity and the high discordance rate between monozygotic twins. More than 95% of CHTD cases are unexplained, especially those with a sublingual thyroid ectopy. This suggests that research on genes and/or pathways not previously associated with thyroid development need to be pursued. The non-canonical NF- κ B has been associated with endocrine defects such as DAVID syndrome and more recently it was shown to directly modulate thyroid development.

Objective: To evaluate if rare variants in genes related to the NF- κ B pathway are enriched in CHTD cases and to study the role of candidate genes during thyroid development.

Method: The whole exome dataset of a CHTD cohort of 37 cases was analyzed to identify variants in genes related to the NF- κ B pathway. Functional validation of the candidate gene *IKBKE* was done using a knockdown (morpholino oligonucleotides and CRISPR interference) and a knockout approach as well as chemical inhibition in a zebrafish model.

Result: Four patients had a rare pathogenic variant in *IKBKE* that was prioritized for further validation using the zebrafish model. Knockdown of *ikbke* using morpholino oligonucleotides impaired the rostral migration of the thyroid follicles and the formation of the aortic arch. The thyroid phenotype was partially rescued by injection of human *IKBKE* mRNA. The CRISPR knock out model, the CRISPR interference and the inhibitor approach did not confirm the results obtained with the morpholino.

Conclusion: Our morpholino approach suggests that *ikbke* might affect thyroid migration and aortic arch formation in zebrafish. These results need to be validated by other approaches.

Introduction

Congenital hypothyroidism (CH) due to thyroid dysgenesis (CHTD) is the commonest neonatal endocrine disease with a prevalence of 1/4,000 live births (1, 2). It is mostly sporadic (only 1 % have an affected first-degree relative) and monozygotic (MZ) twins are typically discordant. TD results from a failure in at least one of the thyroid developmental stages including thyroid specification, budding, migration, or proliferation (3). Ectopic thyroid (lingual or sublingual thyroid) is the most common phenotype, followed by athyreosis (complete absence of thyroid tissue) and by hypoplasia of an orthotopic thyroid. TD is usually associated with CH, a deficiency in thyroid hormone production at birth, which leads to irreversible intellectual disability unless it is treated early (4). On the other hand, the pathogenesis of CHTD is still unclear and the majority of the cases have no identified cause.

To explain the non-Mendelian nature of CHTD, we previously proposed a two-hit hypothesis combining a predisposing inherited or *de novo* variant with a post-zygotic mechanism. The latter could be (i) early somatic mutations, (ii) tissue-specific mutation or epigenetic variation or (iii) tissue-specific autosomal monoallelic expression of thyroid-specific genes (5). Mutation in some genes associated to thyroid development have been identified in CHTD patients including *NKX2.1*, *PAX8*, *TSHR*, *FOXE1*, *HHEX*, and *GLIS3* (6-11). More recently, mutation in *NTN1*, *JAG1*, *CDCA8*, and *TUBB1* have also been identified (12-15). However, most of the mutations were found in patients with orthotopic thyroid or athyreosis but only exceptionally in those with an ectopic gland. Interestingly those genes are not all expressed in thyroid, confirming the contribution of extrinsic factors to thyroid development (16).

Thyroid development is a complex process with several molecular mechanisms that remain to be determined. It begins with thyroid specification, in which a thickening of epithelial cells in foregut endoderm is observed at embryonic day (E)20-22 in human, E8.5 in mice and 24 hours post-fertilization (hpf) in zebrafish (17). These precursor thyroid cells (PTC) have a specific signature, co-expressing the following human transcription factors or their orthologues: *NKX2.1*, *PAX8*, *HHEX*, and *FOXE1* (18). These genes are essential for proper thyroid development and maintenance. The specification is followed by thyroid budding and separation from the

pharyngeal endoderm during which PTCs still express E-cadherin, suggesting a collective cell migration process (19-21). On the other hand, the thyroid bud stays in close relationship with the aortic sac (22, 23). In mice, migration of the thyroid primordium appears to be the only migration process (E10.5-E13.5), while in zebrafish thyroid primordium migration (35-45hpf) is the first of two migration events (3): around 55 hpf, the thyroid primordium loses contact with the aortic sac and starts to migrate rostrally (23). As mentioned earlier, studies in mice show that intrinsic and extrinsic factors are implicated in thyroid migration; indeed, *Foxe1* is involved in migration in a cell-autonomous manner (24); on the other hand, arteries define the relocalization of the thyroid during embryogenesis (12, 25). Finally, proliferation and folliculogenesis occur after migration in mice but already during migration in zebrafish (22, 26, 27).

The main embryonic pathways, such as Wnt, BMP, Notch, Nodal, FGF, and Shh, are involved in thyroid development (3, 28). However, mutations in genes associated with these pathways have only been identified in few cases of CHTD (Notch: *JAG1* (29), Shh: *NTN1* (12), *GLIS3* (30)). This suggests that research on genes and/or pathways not previously associated with thyroid development needs to be pursued. The NF- κ B pathway is implicated in immunity, differentiation, cell growth, tumorigenesis (31-34). This pathway was shown to be defective in congenital endocrine defects at the level of the pituitary (DAVID syndrome) and of the thyroid (35-38). Ikky/NF- κ B essential modulator (NEMO) is critical for thyroid function in mice (37). More recently, a mutation in *TRPC4AP*, a gene linked to NF- κ B and TNF activation, was identified in a patient with CHTD, and impaired thyroid proliferation was observed in a *Xenopus Trpc4ap* knock down model (38). These data represent the NF- κ B pathway as a novel candidate pathway contributing to the complex etiology of CHTD.

In this study, we first evaluated if rare pathogenic variants in genes that form part of or are associated with the NF- κ B pathway were enriched in our cohort of CHTD patients, thereby contributing to the first genetic lesion in our two hit model for this disease. Considering the many advantages of the zebrafish model (external development, easy genetic manipulation, optical transparency, high fecundity, small size, and rapid development), we next used this model to validate the role of one candidate gene identified in this study, *ikbke*, in thyroid migration.

Materials and methods

CHTD cohort, whole-exome sequencing and NF- κ B pathway screening

The characteristics of the CHTD patient and control cohort were published elsewhere (Larrivée-Vanier et al., accepted by *Thyroid*). Briefly, whole exome sequencing of 36 CHTD patients (33 with ectopy and 3 with athyreosis) was performed. One syndromic CHTD patient was added to this cohort. Cases were mostly females (26 patients), as expected for CHTD. Blood was obtained from patients, parents and controls using peripheral venipuncture. DNA extraction was carried out using standard methods. Whole-exome sequencing (WES) and bioinformatics alignment was performed as previously described (Larrivée-Vanier et al., in preparation). A total of 108 genes (Table S1) associated with the NF- κ B pathway were chosen based on the PANTHER Classification System (<http://www.pantherdb.org/>) and BIOCARTA (<https://maayanlab.cloud/Harmonizome/dataset/Biocarta+Pathways>). We performed an enrichment analysis by comparing the number of cases and controls with rare protein-altering variant in NF- κ B-related genes using a fisher exact test.

Zebrafish

Transgenic zebrafish (*tg(tg:mCherry);tg(kdrl:GFP)*) were obtained from Dr Sabine Costagliola, Université Libre de Bruxelles, Belgium, and were maintained in standard conditions in accordance with the guidelines of the institutional ethics committee (CIPBAR) and of the Canadian Council on Animal Care (CCAC). mCherry labels thyroglobulin, which is expressed specifically in thyroid cells and GFP labels kdrl, a vegf receptor expressed in blood vessels. Zebrafish eggs, obtained by natural spawning, were raised at 28.5°C under standard condition (39) and staged by hour post fertilization (hpf) as described (40). To prevent pigmentation when necessary, 0.003% 1-phenyl-2-thiourea (PTU, Sigma) was add to the E3 medium starting at 24hpf.

Live imaging

For live imaging, embryos were anesthetized in 0.016% tricaine (Sigma) and immobilized in 0.5% low melt agar (Sigma) in a 35mm dish filled with water containing 0.016% tricaine. Images were acquired using a M165 FC fluorescent stereomicroscope (Leica).

Probe synthesis and whole mount in situ hybridization (WISH)

To synthesize *thyroglobulin (tg)* and *myl7* antisense riboprobes, templates were generated by reverse-transcription PCR (RT-PCR) of total RNA extracted from 20 embryos at 48hpf. The following primers were used: *tg*, F 5'-TAATTGTAGTGACGGCCAGTTTTA-3' and R 5'-TTTTCTCCTTGTAGCTGAAGAGGT-3'; *myl7*, F 5'-CTCTGGGTGTCCATGTAGGG-3' and R 5'-GGATGGTCTTCTCTTAAGCTCAGTCA-3'. T7 promoter sequence (TAATACGACTCACTATAGG) was added to the reverse primers to synthesize the probe. Dioxigenin (DIG) riboprobes were synthesized by *in vitro* transcription using DIG RNA labeling mix (Roche) and T7 RNA polymerase (Promega).

WISH was performed according to the protocol described by Thisse and Thisse (41). Embryos were dechorionated by hand if necessary before fixation with 4% paraformaldehyde/PBST for 4h at room temperature. DIG antisense riboprobes were detected using antidioxigenin (anti-DIG) antibody conjugated to alkaline phosphatase (1:5,000, Roche). Embryos were stained using NBT/BCIP (Roche). Embryos were washed in PBS and embedded in 80% glycerol for imaging using a M165 FC stereomicroscope (Leica). WISH was used to evaluate the presence of ectopic thyroid cell at 4 days post-fertilization since fish autofluorescence did not allowed us to clearly identify those cells by live imaging.

Morpholino injection and rescue experiments

To inhibit *ikbke* expression, morpholino antisense oligos (MO) (Genetool) were developed and injected in one-cell stage embryos. The amount of MO to use was chosen following a dose-response experiment (between one and seven ng). The final concentration and MO sequence used were as follows; 5ng of splice-blocking MO against *ikbke* (ik_3-MO was designed at the junction between intron 2 and exon 3: 5'-TGCACTAGAGATCACAAAGAACAAA-3'; ik_4-MO was designed at the junction between exon 4 and intron 4: 5'-AAACCACATCAGATACATACCTCCT-3') 5ng of translation-blocking MO against *ikbke* (tbMO-ik; 5'-ACGTTTTATTCTGAACCTAACACT-3') (Fig.1A). A standard control MO was also used (ctl-MO: 5'-CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA-3'). The working solution for MO injection consisted in RNA free distilled water containing 0.2% of

phenol red. One nL of MO solution was injected. The effect of MO-ik on *ikbke* expression was assessed by the polymerase chain reaction (PCR) using Phusion High-Fidelity DNA polymerase (Life Technologies) when possible and by real-time PCR (qPCR) using SensiFAST™ SYBR® No-ROX kit (Bioline) of reverse-transcribed RNA extracted from embryos. Human *IKBKE* (*hIKBKE*) mRNA was produced by in vitro transcription using mMessage mMachine T7 transcription kit (Invitrogen) of pcDNA3 IKKe flag vector (Addgene #26201). *hIKBKE* mRNA (100ng) was co-injected with the MO when needed. Embryos were collected at 96hpf for live imaging or RNA extraction.

Generation of CRISPR-induced ikbke knockout line

The CRISPR approach was used to create knock-out *ikbke* lines. Guide-RNA (gRNA) were designed using CRISPRscan (<https://www.crisprscan.org/>). gRNA for *ikbke* (target sequence: AGGATATTCTTGGTCAGG) was synthesized using a PCR-based approach and the universal primers as described by Vejnar et al. (42). The following changes were made: Phusion (Life technologies) was used as the polymerase to produce PCR products and the *in vitro* transcription was performed using the megashort script T7 Transcription kit (Invitrogen) following the manufacturer recommendations. Moreover, gRNA was purified using the megaclear transcription clean-up kit (Invitrogen). Cas9 mRNA was produced following the same protocol as mentioned before (42) using pT3TS-nCas9n plasmid, and the megaclear transcription clean-up kit (Invitrogen) was used to purify Cas9 mRNA. Cas9 (100ng/μl) and gRNA (30ng/μl) were co-injected in one-cell stage embryos. Confirmation of an insertion or deletion (indel) and genotyping of the mutant line was carried out using the high resolution melting point technique (HRM0 (Forward primer: 5'-AAAATGACAAGTACAGCAAACCTACC-3'; reverse primer: 5'-GCTTTATAGACGTTTGCTGTCG-3') according to the protocol described by Samarut *et al.* (43).

CRISPR interference

CRISPR interference (CRISPRi) was used to confirm the morphants' results. Five target-specific gRNAs (ts-gRNAs) which recognize non-template DNA strand coding region downstream of the *ikbke* transcription start site, as suggested by Long *et al.* (44), were designed using crispra (<http://crispr-era.stanford.edu/CalculateAction.action>). Ts-gRNAs were synthesized using the

same protocol as for the standard gRNAs and target sequences are shown in Table S2. dCas9 mRNA was synthesized following the same protocol as described previously for the standard Cas9 mRNA using pT3TS-dCas9. All five tg-gRNAs (20ng/ μ l) were co-injected with dCas9 (130ng/ μ l) in one-cell stage embryos. Embryos were collected at 96hpf for live imaging or RNA extraction.

Inhibitor treatment

Amlexanox was resuspended in DMSO at a concentration of 30mM. Treatment with 10, 20, or 30 μ M of Amlexanox was performed starting after egg spawning (0 hpf) or 4 hpf. The compound was directly added to the water and 50 eggs per 100mm dishes were used. Amlexanox was changed every day and treatment was performed for 96h. Embryos were fixed at 96hpf in 4% PFA for WISH study.

RNA extraction and qPCR

Twenty embryos were pooled to extract RNA using Trizol reagent (Invitrogen). The RevertAid H Minus reverse transcriptase (Life technologies) was used for reverse transcription of 2 μ g of RNA per sample. Real-time PCR (qPCR) was carried out using the Sensifast (Bioline) and the LightCycler 96 device (Roche).

Results

Screening of the NF- κ B pathway genes

The burden analysis with genes-related to NF- κ B pathway did not identified genes with a FDR p-value below 0.05. The two genes with a FDR p-value closest to 0.05 were *CCL4L1* and *IKBKE*. We performed a literature review to evaluate which gene to chose and since *IKBKE* play a role in cell migration (32, 34, 45-49), we further investigated is role in thyroid development using several techniques (Figure 5). *IKBKE* (I κ B kinase ϵ) is a serine-threonine kinase belonging to the non-canonical NF- κ B that can directly phosphorylate NF- κ B or canonical IKKs (IKK α and IKK β) (31). It can also activate other genes independently of NF- κ B such as IRF3 (50). Three rare missense variants in *IKBKE* were identified in four patients out of 37 (Table 1). These variants, which were confirmed by Sanger sequencing, were heterozygous and inherited from healthy parents. Three

of the four patients were non-syndromic. The variants were predicted to be damaging by at least one prediction score (SIFT, Polyphen2 HDIV, or CADD). Two mutations were found in the kinase domain (KD) and one in the TBK1-CCD1 domain (Figure 1A).

Table 1: IKBKE variants identified in our cohort

Case	Gene	Mutation/GRCh37	RS number	ExAc MAF	Polyphen2 score	SIFT score	CADD score
35 (M), (NS)	<i>IKBKE</i>	1:206647725C>T; p.Arg47Trp	rs367771392	9.899e-05	Probably damaging	deleterious	24.4
13 (F), 4 (M) (NS)	<i>IKBKE</i>	1:206650040G>A; p.Arg187Gln	rs145501152	0.001481	Benign	deleterious	28.7
37 (M), (S)	<i>IKBKE</i>	1:206653798G>A; p.Val449Met	rs150772428	5.36e-04	Benign	deleterious	11.26

M: male, F: female, NS: non syndromic, S: syndromic

ikbke knockdown and rescue in zebrafish

A splice site-blocking morpholino, *ik_3*-MO, targeting *ikbke*, induced skipping of exon 3, which is the first coding exon, and a decrease in *ikbke* expression of almost 80% (Figure 1B-D). This skipping of exon 3 removes the protein start codon, suggesting that *ikbke* protein might not be expressed. However, no antibody specific for zebrafish *ikbke* was available to test this hypothesis. The general development of zebrafish embryos injected with *ik_3*-MO (*ikbke* morphant) seems unaffected (Figure S1A). However, two abnormal thyroid phenotypes were observed: (1) arrested migration, with the thyroid cells located along the hypobranchial artery but more rostrally, and (2) complete absence of thyroid migration, characterized by a cluster of thyroid cells that remained close to the cardiac outflow tract (OFT) (Figure 1E). Moreover, important defects in pharyngeal vessel structure were observed in all *ikbke* morphants that have a thyroid phenotype (Figure 1E). These results suggested a role for *ikbke* in vessel development and confirmed the importance of these vessels for the proper relocalization of the thyroid (23, 25). An absence of thyroid migration was observed in 33.7% of *ikbke* morphant embryos compared to 2% of control non injected embryos (Figure 1F). Of note, only embryos with a normal development were kept for further analyses. Embryos with even mild cardiac edema were not

included, since this is known to be a side effect of MOs and the closeness of the thyroid and the heart could bias our interpretation. The defect in vessel structure seems to be specific to the pharyngeal region, since no defect was observed in the vessels located in the tail (Figure S1B).

A rescue experiment was performed by co-injecting 100ng of *hIKBKE* mRNA and *ik_3*-MO. The thyroid migration defect was partially rescued, as shown by a decrease of the proportion of *ikbke* morphants without thyroid migration from 33 to 22% of (Figure 1F). However, rescued embryos showed mainly an arrested thyroid migration instead of a normal migration. Moreover, pharyngeal vessels were still abnormally positioned, suggesting an incomplete rescue (Figure 1G). To confirm these results, a second splicing site blocking -MO (*ik_4*-MO) and a translation-blocking MO were used, but these morphants developed neither thyroid nor vascular defects (Figure 1). The decreased *ikbke* expression in *ik_4*-MO morphant seem less important than in *ik_3*-MO and might explain why no phenotype was observed in the *ik_4*-MO morphant (Figure 1C).

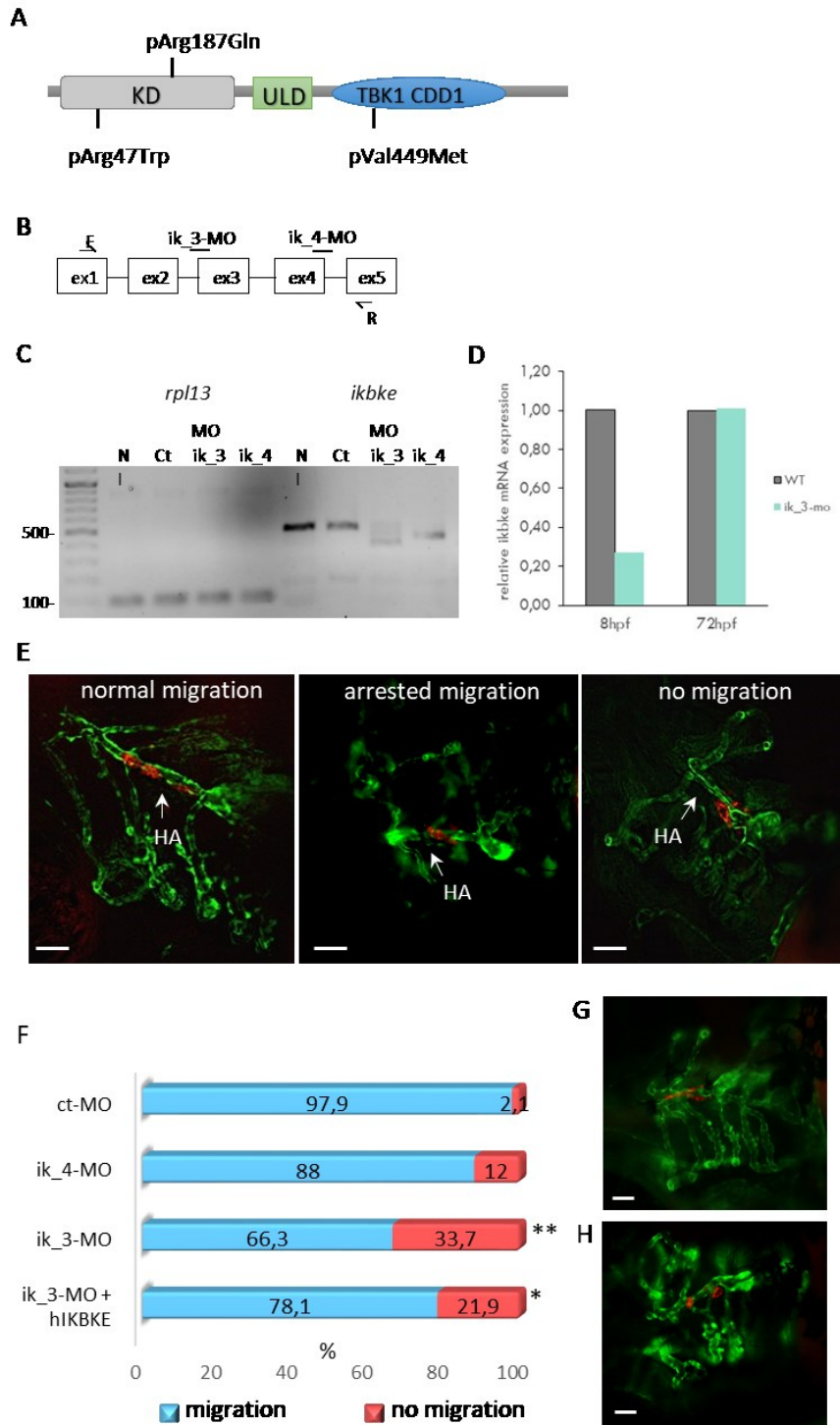


Figure 1 *Ikbke* morphants show impaired thyroid rostral migration and pharyngeal blood vessels anomalies. A, representation of IKBKE protein and position of the variants. B, position of the splice-blocking MOs and primers for PCR reaction. C, PCR at 24hpf of embryos injected with sb-MOs or control MO and non-injected embryos. D, expression of *ikbke* assessed by qPCR at 8hpf

and 72hpf by qPCR showing that *ikbke* expression is downregulated by almost 80% with *ik_3*-MO (one experiment). E, ventral view (anterior left) of 96hpf transgenic embryos (*tg(tg:mCherry; kdrl:EGFP)*) injected with *ik_3*-MO. F, Quantification of embryos presenting a defect in thyroid migration at 96hpf. ct-MO: n=193 (5 experiments), *ik_4*-MO: n=141 (4 experiments), *ik_3*-MO: n=249 (9 experiments), *ik_3*-MO + hmRNA *IKBKE*; n=151 (4 experiments). Chi-square and proportion Z score between ct-MO and *ik*-MO $**p<0.0001$. Chi-square between *ik*-MO and *ik*-MO + hIKBKE $*p=0.011$, proportion Z score $p=0.019$. G, ventral view (anterior left) of transgenic embryos (*tg(tg:mCherry; kdrl:EGFP)*) at 96hpf, after injection with *ik_4*-MO showing no defect neither for thyroid migration nor blood vessel structure. H, ventral view (anterior left) of transgenic embryos (*tg(tg:mCherry; kdrl:EGFP)*) at 96hpf, after injection with *ik_3*-MO + hIKBKE mRNA showing that some defects in blood vessel structure are still observed even if thyroid migration is normal. Scale bar: 50 μ m. KD: kinase domain, TBK1 CCD1: TBK1 coiled-coil domain 1, N: non-injected embryos, MO: morpholino, ct: control, hpf: hour post-fertilization

Generation of ikbke knockout zebrafish line

An *ikbke* knockout line was created using the CRISPR-Cas9 approach (Figure 2A). Deletion of seven nucleotides (Figure 2B) at the ATP binding site was created, inducing a frameshift and the insertion of a premature stop codon 19 amino acids after the deletion. However, the relative mRNA expression was decreased by only 40%, suggesting that the deletion might have caused the recognition of a downstream starting site and the creation of a shorter isoform, as may happen when the first exon is targeted (Figure 2C) (51, 52). *ikbke* mutant embryos did not have a thyroid migration defect and, even though 11% of the *ikbke* mutant showed an arrested migration, it was not significantly different from controls (Figure 2D-E). The expression of two downstream genes related to NF- κ B pathway, *mmp9* and *bcl2a* (32, 46), was assessed by qPCR and only one gene, *bcl2a*, was downregulated (Figure 2F).

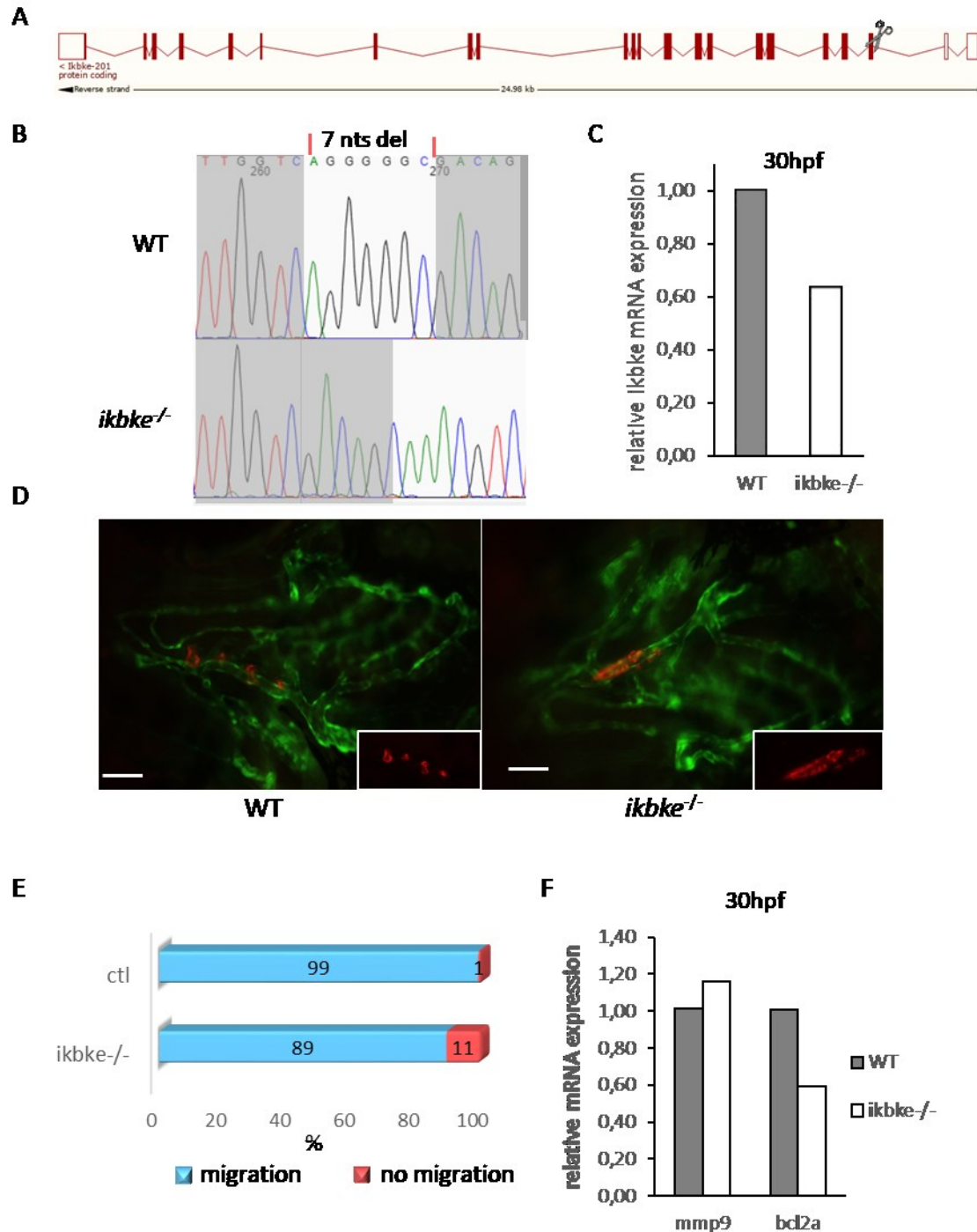


Figure 2 *ikbke*^{-/-} CRISPR mutants do not exhibit the morphant phenotype of a defective thyroid migration. A, gRNA was designed to target the first coding exon *ikbke*. B, Chromatogram showing the seven nucleotides deletion in *ikbke*^{-/-}. C, qPCR of embryos at 30hpf showed a mild decrease in *ikbke* expression in the mutant line compared to the WT (one experiment). D, ventral view (anterior left) of wild-type and mutant embryos at 96hpf, showing that mutant embryos have

neither a thyroid nor a vascular phenotype. E, Quantification of embryos presenting a defect in thyroid migration at 96hpf. WT: n=136, *ikbke*^{-/-}: n=75 (3 experiments). Scale bar: 50μm. nts: nucleotides, del: deletion, WT: wild-type, hpf: hour post-fertilization

Alternative techniques to inhibit ikbke expression: CRISPRi and small molecule inhibitor

Considering the absence of a thyroid migration defect in the *ikbke*^{-/-} line, we tested two other approaches to decrease *ikbke* expression, CRISPRi and the *ikbke*/*tbk1* inhibitor amlexanox. The use of an inactivated (dead) Cas9 (dCas9) and five tg-gRNAs induced a transient knockdown of *ikbke* of almost 50% (Figure 3B). However, thyroid migration and vessels remodeling was not impaired during embryo development (Figure 3C, D). Downstream genes were downregulated, especially *bcl2a*, showing that the decrease in *ikbke* expression induces a response at the cellular level, but does not affect the thyroid migration.

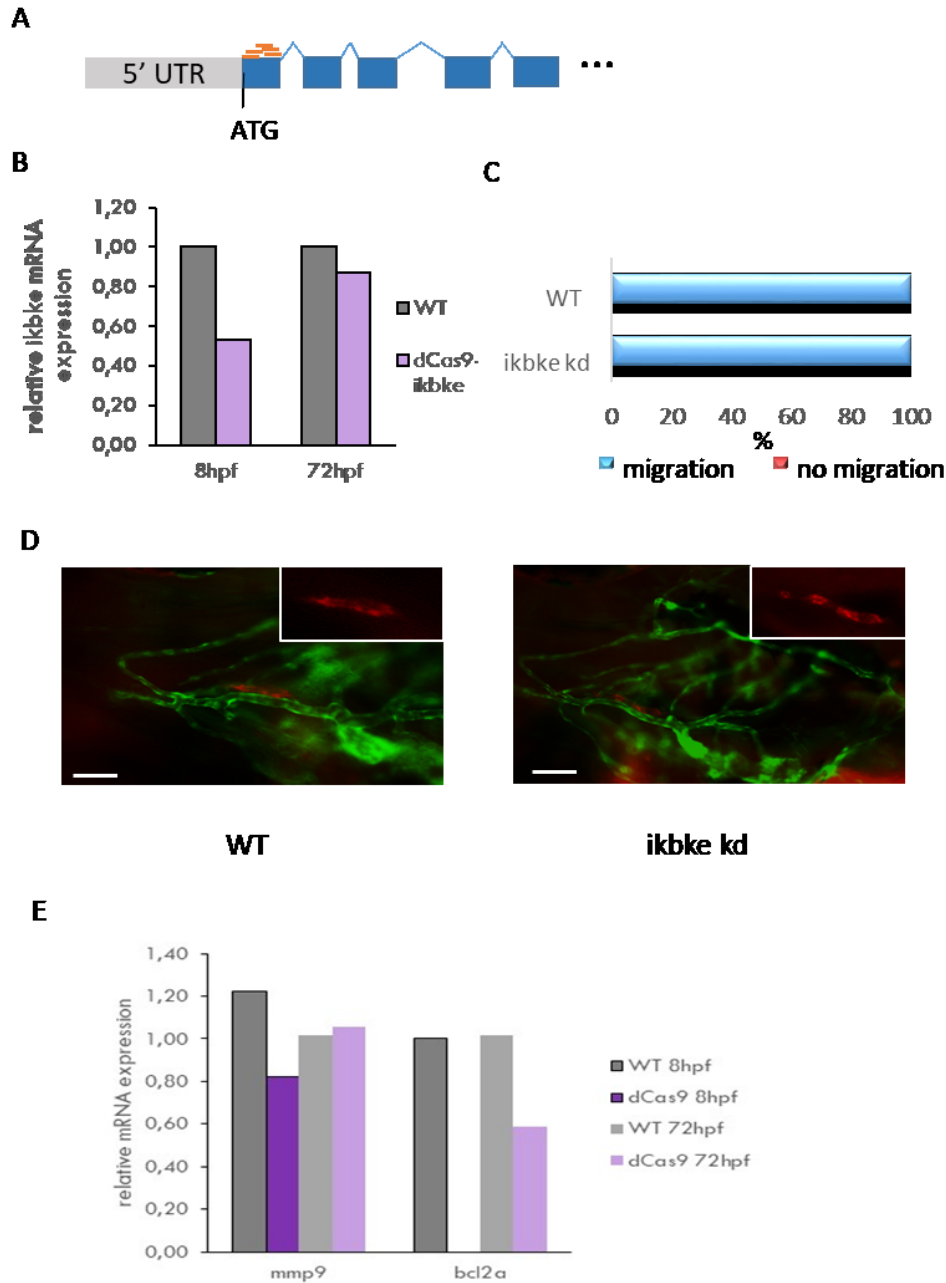


Figure 3 CRISPRi using dCas9 and five tg-gRNA did not affect thyroid migration. A, All five tg-gRNA were designed in the first 400 bp downstream of ATG start site. The first five exons and part of the 5' UTR are illustrated. B, CRISPRi induced a transient downregulation of *ikbke* expression at 8hpf, as evaluated by qPCR, while at 72hpf, *ikbke* expression is similar to WT (one experiment). C, Quantification of embryos injected with Cas9 and tg-gRNA showed that no embryos had a defect in thyroid migration. WT: n=10, *ikbke* kd: n=13 (one experiment). D, ventral view (anterior left) of WT and *ikbke* kd embryos at 96 hpf, showing normal thyroid and vessels. E, qPCR of WT

and *ikbke* kd of *mmp9* and *bcl2a* showed an important decrease in *bcl2a* expression that is still present at 72hpf while *mmp9* is not affected (one experiment). Scale bar: 50 μ m. WT: wild type, kd: knockdown, dCas9: dead Cas9, hpf: hour post-fertilization.

Finally, we tested amlexanox, an *ikbke/tbk1* inhibitor, currently in investigation as a potential anti-cancer molecule (31, 34). A role of amlexanox in inhibiting cell migration and proliferation has been shown in several studies (32, 53-55). Embryos treated with amlexanox from 1h-96hpf or 4h-96hpf had a normal thyroid migration. Since thyroid migration was normal, the vessels were not assessed in this experiment. Moreover, no ectopic thyroid tissue was visible in the most anterior part of the embryo (Figure 4). It has previously been shown, that when the thyroid bud does not detach from the pharyngeal floor in the first migration step, ectopic tissue can be seen in the anterior part of the embryos, near the floor of the pharynx (56).

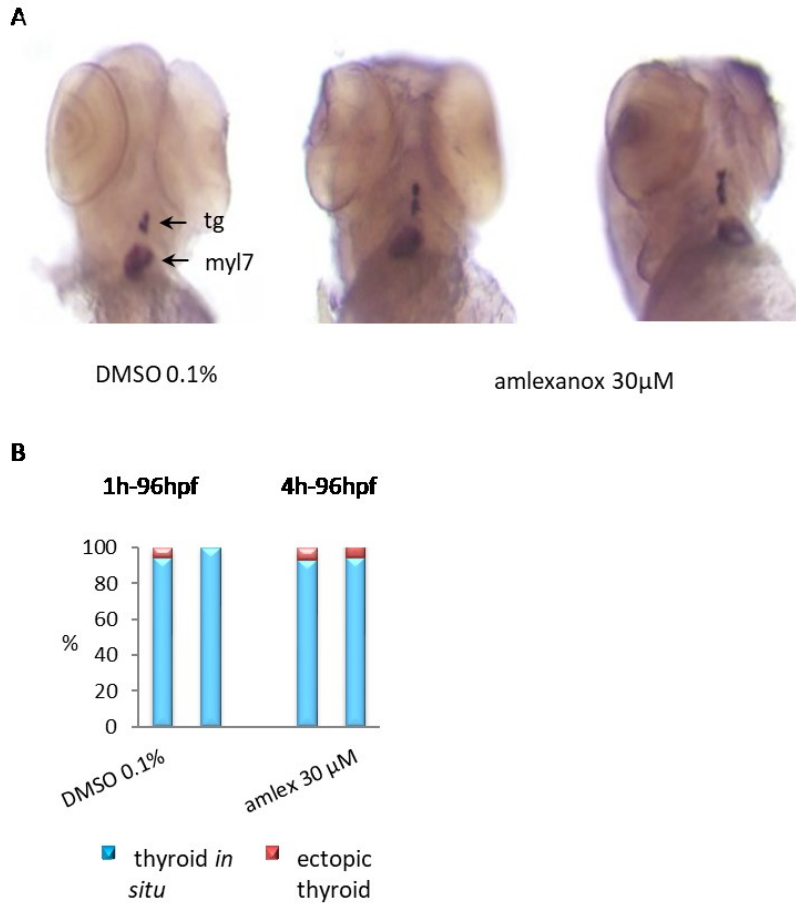


Figure 4 Amlexanox treatment did not impair thyroid migration. A, Whole mount *in situ* hybridization using thyroglobulin (*tg*) and myosin light chain 7 (*myl7*) probes allowed to visualize the thyroid and the heart, respectively. 30µM Amlexanox was added to the water starting after spawning (1hpf) or at 4hpf until 96 hpf. DMSO 0.1% was used as control. No ectopic thyroid was visible in the most anterior part of the embryo. B, Quantification of embryos presenting an ectopic thyroid at 96hpf evaluated by WISH. DMSO 0.01%: n= 17 (1h-96hpf), 14 (4h-96hpf), amlexanox 30µM: n= 16 (1h-96hpf), 18 (4h-96hpf) (one experiment). amlex: amlexanox, hpf: hour post-fertilisation

Discussion

The cause of most CHTD cases remains unknown. The advent of NGS and specifically of exome sequencing has allowed to identify the responsible gene in several congenital diseases (57-

59). However, CHTD is a complex disease probably explained by a two-hit model combining a predisposing inherited or *de novo* variant with a post-zygotic mechanism (5). To identify novel genes predisposing to CHTD, we performed exome sequencing in a well-defined CHTD cohort and screened for variants in genes related to the NF- κ B pathway, which was associated with other congenital endocrine disorders. The burden analysis did not identify a gene with a significant FDR-corrected p-value. *CCL4L1* and *IKBKE* were the first two genes. *IKBKE* was selected for further investigation due to its role in cell migration (32, 34, 45-49).

The injection of a splice-blocking MO targeting *ikbke* (ik_3-MO) induced the most important decreased in *ikbke* expression with a knockdown of about 70% and impaired rostral thyroid migration, with thyroid cells remaining in a compact group close to the cardiac OFT or blocked along the hypobranchial artery at a more rostral position, leading to an arrested migration. These phenotypes were always associated with impaired blood vessel structures, confirming the importance of proper guidance by the pharyngeal vessels during thyroid migration (23, 25). Indeed, it was shown by Opitz et al (23), that thyroid cell migration stops at the hypobranchial artery branching point (23). However, it remains unknown if the mechanism involved in this guidance is due to direct contact with vessels or also implicates secreted signaling molecules. Injection of human *IKBKE* mRNA results in significantly fewer embryos with absent thyroid migration, indicating a partial rescue. However, slight defects in blood vessel structure (causing arrested migration phenotype only) were still observed in most of the morphants injected with human *IKBKE* mRNA, suggesting that part of the effect on the vessels' structure might be due to non-specific effect of the morpholino. Conversely, vessels in the tail of the *ikbke* morphants were unaffected, suggesting a specific effect of the morpholino on pharyngeal vessels. To confirm this result, we used a second splice-blocking MO (ik_4-MO) and a translation-blocking MO. Both MO did not reproduce the phenotype seen in ik_3-MO morphants. For ik_4-MO, it might be due to the smaller effect on *ikbke* expression as seen with the PCR gel (Figure 1C).

Because morpholinos are prone to non-specific effects (60, 61), we used several other approaches to confirm the MO results, including the creation of a CRISPR knockout line. However, mutant embryos had neither a defect in thyroid migration nor in vessels structure. One of the

reasons identified for a discrepancy between morphant and mutant line phenotypes (60, 62) was that a deleterious mutation may trigger genetic compensation (62), possibly by mutant mRNA degradation (63). Transcriptomic experiments to identify which gene might compensate for the loss of *ikbke* are needed to validate this hypothesis. Nonetheless, considering the relative high expression of *ikbke* in the mutant line (about 70%), the best explanation for our results is the recognition by the transcription machinery of a start codon downstream of the normal start codon, a phenomenon often seen when gRNA is designed in the first exon (51, 52).

Two other approaches of knocking down or inhibiting *ikbke* did not confirm the morphant phenotype of a defective thyroid migration. Embryos injected with a dCas9 or treated with an *ikbke* inhibitor (amlexanox) had neither a thyroid migration defect nor vascular anomalies, even though *bcl2a* expression, a gene downstream of *ikbke* which is expressed in the thyroid (<https://sumeet.shinyapps.io/zfthyroid/>), was downregulated in the embryos in both experiments. This suggests that the decrease in *ikbke* expression induced a cellular response but was not sufficient to induce a thyroid migration defect. The decrease in *ikbke* expression in the morphant (about 70%) was much more significant than the one observed with the three other approaches (40-50%), and this may account for our observation of a defective thyroid migration phenotype only the morphant.

Conclusions

Our morpholino results suggest that IKBKE may play a role in the embryonic development of the thyroid and of the pharyngeal vessels. However, this result was not validated by a second technique (Figure 5); therefore, we cannot confirm the role of IKBKE in thyroid development. Additional experiments are need to validate the role of IKBKE in thyroid development. Nonetheless, we have confirmed the link between vascular and thyroid development.

step 1: identification of a candidate gene using Whole exome sequencing

step 2: assessment of the role of the candidate gene using at least two tools

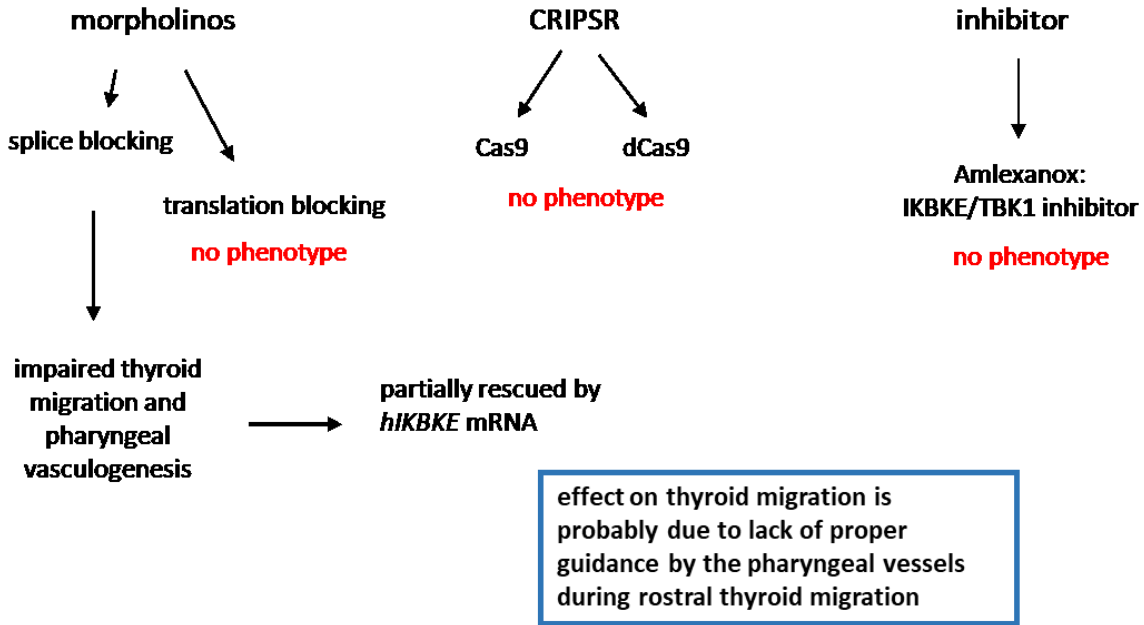
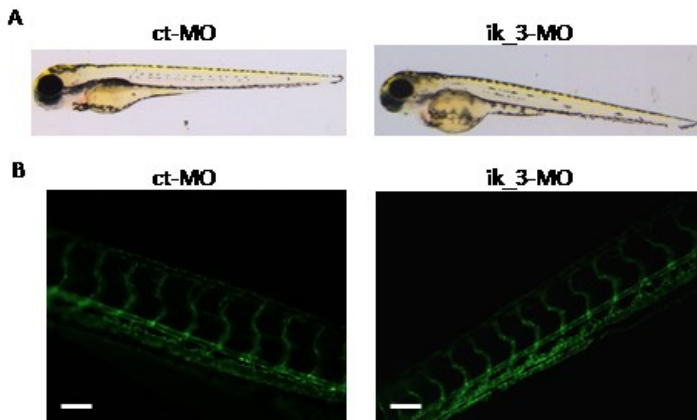


Figure 5 Summary of the experiments performed to study the role of *ikbke* during thyroid migration in zebrafish.



Supplemental Figure 1A live images of 96hpf embryos injected with 5ng of ct-MO or ik_3-MO. B, live images of the tail of embryos at 96 hpf after injection of 5ng of ct-MO or ik_3-MO. In contrast to the structure of the pharyngeal vessels, that of the vessels of the tail was normal. GFP is expressed in vessels expressing *kdr1*. Scale bar: 50 μ m. ct: control, MO: morpholino

Table S1: Genes related to the NF- κ B pathway

LCK	IRAK1	TLR4	TNFRSF13C	TNFAIP3	PARP1
ZAP70	IRAK4	LY96	IKBKG	PTGS2	GADD45B
LAT	TRAF6	TIRAP	CHUK	CCL4	FADD
PLCG1	TNF	TICAM2	IKBKB	CCL4L2	IL1A
PRKCQ	TNFRSF1A	TICAM1	PIAS4	CCL4L1	MAP3K1
IGH	RIPK1	CD40LG	UBE2I	CXCL1	MAP4K4
SYK	TRADD	CD40	ATM	CXCL2	IKBKE
LYN	TRAF2	TRAF3	PIDD1	CXCL3	TBK1
BLNK	TRAF5	TNFSF11	ERC1	VCAM1	TANK
BTK	BIRC2	TNFRSF11A	NFKBIA	PLAU	
PLCG2	BIRC3	LTA	NFKB1	CSNK2A1	
PRKCB	EDA	LTB	RELA	CSNK2A2	
CARD10	EDAR	TNFSF14	CFLAR	CSNK2A3	
CARD11	EDARADD	LTBR	XIAP	CSNK2B	
CARD14	CYLD	MAP3K14	BCL2L1	RELB	
BCL10	EDA2R	MAP3K7	BCL2	CCL13	
MALT1	DDX58	TAB1	TRAF1	CCL19	
IL1B	TRIM25	TAB2	BCL2A1	CCL21	
IL1R1	LBP	TAB3	NFKB2	CXCL12	
MYD88	CD14	TNFSF13B	CXCL8	ICAM1	

Table S2: tg-gRNAs for CRISPRi

primer name	primer sequence
tg-gRNA-ik_1	TAATACGACTCACTATAGGGGTCGCCATCAAACACACAAAGTTTTAGAGCTAGAA
tg-gRNA-ik_2	TAATACGACTCACTATAGGGTAACTCAGTTTGGATTGAAGGTTTTAGAGCTAGAA
tg-gRNA-ik_3	TAATACGACTCACTATAGGGTACTTCAGTCTGAGGACTGCGTTTTAGAGCTAGAA
tg-gRNA-ik_4	TAATACGACTCACTATAGGGGCTCTCTTTACTTCAGTCTGGTTTTAGAGCTAGAA
tg-gRNA-ik_5	TAATACGACTCACTATAGGGGTTTGTACAATAACTCAGTTGTTTTAGAGCTAGAA

References

1. Deladoëy J, Bélanger N, Van Vliet G. Random Variability in Congenital Hypothyroidism from Thyroid Dysgenesis over 16 Years in Québec. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2007;92(8):3158-61.
2. Deladoëy 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. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011;96(8):2422-9.
3. Fagman H, Nilsson M. Morphogenesis of the thyroid gland. *Molecular and cellular endocrinology*. 2010;323(1):35-54.
4. Aleksander PE, Bruckner-Spieler M, Stoehr AM, Lankes E, Kuhnen P, Schnabel D, et al. Mean High-Dose L-Thyroxine Treatment Is Efficient and Safe to Achieve a Normal IQ in Young Adult Patients With Congenital Hypothyroidism. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2018;103(4):1459-69.
5. Deladoëy J, Vassart G, Van Vliet G. Possible non-Mendelian mechanisms of thyroid dysgenesis. *Endocrine development*. 2007;10:29-42.
6. Abu-Khudir R, Larrivee-Vanier S, Wasserman JD, Deladoëy J. Disorders of thyroid morphogenesis. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2017;31(2):143-59.
7. Mio C, Grani G, Durante C, Damante G. Molecular defects in thyroid dysgenesis. *Clin Genet*. 2020;97(1):222-31.
8. Krude H, Schutz B, Biebermann H, von Moers A, Schnabel D, Neitzel H, et al. Choreoathetosis, hypothyroidism, and pulmonary alterations due to human NKX2-1 haploinsufficiency. *J Clin Invest*. 2002;109(4):475-80.
9. Macchia PE, Lapi P, Krude H, Pirro MT, Missero C, Chiovato L, et al. PAX8 mutations associated with congenital hypothyroidism caused by thyroid dysgenesis. *Nature genetics*. 1998;19(1):83-6.
10. Clifton-Bligh RJ, Wentworth JM, Heinz P, Crisp MS, John R, Lazarus JH, et al. Mutation of the gene encoding human TTF-2 associated with thyroid agenesis, cleft palate and choanal atresia. *Nature genetics*. 1998;19(4):399-401.

11. Senee V, Chelala C, Duchatelet S, Feng D, Blanc H, Cossec JC, et al. Mutations in GLIS3 are responsible for a rare syndrome with neonatal diabetes mellitus and congenital hypothyroidism. *Nature genetics*. 2006;38(6):682-7.
12. Opitz R, Hitz MP, Vandernoot I, Trubiroha A, Abu-Khudir R, Samuels M, et al. 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):377-88.
13. Porazzi P, Marelli F, Benato F, de Filippis T, Calebiro D, Argenton F, et al. Disruptions of global and JAGGED1-mediated notch signaling affect thyroid morphogenesis in the zebrafish. *Endocrinology*. 2012;153(11):5645-58.
14. Carre A, Stoupa A, Kariyawasam D, Gueriouz M, Ramond C, Monus T, et al. Mutations in BOREALIN cause thyroid dysgenesis. *Hum Mol Genet*. 2017;26(3):599-610.
15. Stoupa A, Adam F, Kariyawasam D, Strassel C, Gawade S, Szinnai G, et al. TUBB1 mutations cause thyroid dysgenesis associated with abnormal platelet physiology. *EMBO molecular medicine*. 2018;10(12).
16. De Felice M, Di Lauro R. Minireview: Intrinsic and extrinsic factors in thyroid gland development: an update. *Endocrinology*. 2011;152(8):2948-56.
17. Nilsson M, Fagman H. Development of the thyroid gland. *Development (Cambridge, England)*. 2017;144(12):2123-40.
18. Parlato R, Rosica A, Rodriguez-Mallon A, Affuso A, Postiglione MP, Arra C, et al. An integrated regulatory network controlling survival and migration in thyroid organogenesis. *Developmental biology*. 2004;276(2):464-75.
19. Fagman H, Grände M, Edsbagge J, Semb H, Nilsson M. Expression of Classical Cadherins in Thyroid Development: Maintenance of an Epithelial Phenotype throughout Organogenesis. *Endocrinology*. 2003;144(8):3618-24.
20. 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;106:123-70.
21. Rørth P. Collective guidance of collective cell migration. *Trends Cell Biol*. 2007;17(12):575-9.

22. Fagman H, Andersson L, Nilsson M. The developing mouse thyroid: embryonic vessel contacts and parenchymal growth pattern during specification, budding, migration, and lobulation. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists.* 2006;235(2):444-55.
23. Opitz R, Maquet E, Huisken J, Antonica F, Trubiroha A, Pottier G, et al. Transgenic zebrafish illuminate the dynamics of thyroid morphogenesis and its relationship to cardiovascular development. *Developmental biology.* 2012;372(2):203-16.
24. De Felice M, Ovitt C, Biffali E, Rodriguez-Mallon A, Arra C, Anastassiadis K, et al. A mouse model for hereditary thyroid dysgenesis and cleft palate. *Nature genetics.* 1998;19(4):395-8.
25. Alt B, Elsalini OA, Schrupf P, Haufs N, Lawson ND, Schwabe GC, et al. Arteries define the position of the thyroid gland during its developmental relocalisation. *Development (Cambridge, England).* 2006;133(19):3797-804.
26. Alt B, Reibe S, Feitosa NM, Elsalini OA, Wendl T, Rohr KB. Analysis of origin and growth of the thyroid gland in zebrafish. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists.* 2006;235(7):1872-83.
27. Larrivé-Vanier S, Deladoëy J. Zebrafish embryo: A new model for studying thyroid morphogenesis. *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research.* 2018;2:3-9.
28. Haerlingen B, Opitz R, Vandernoot I, Trubiroha A, Gillotay P, Giusti N, et al. Small-Molecule Screening in Zebrafish Embryos Identifies Signaling Pathways Regulating Early Thyroid Development. *Thyroid.* 2019;29(11):1683-703.
29. de Filippis T, Marelli F, Nebbia G, Porazzi P, Corbetta S, Fugazzola L, et al. JAG1 Loss-Of-Function Variations as a Novel Predisposing Event in the Pathogenesis of Congenital Thyroid Defects. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2016;101(3):861-70.
30. Rurale G, Marelli F, Duminuco P, Persani L. Glis3 as a Critical Regulator of Thyroid Primordium Specification. *Thyroid.* 2020;30(2):277-89.
31. Verhelst K, Verstrepen L, Carpentier I, Beyaert R. I κ B kinase ϵ (IKK ϵ): a therapeutic target in inflammation and cancer. *Biochem Pharmacol.* 2013;85(7):873-80.
32. Boehm JS, Zhao JJ, Yao J, Kim SY, Firestein R, Dunn IF, et al. Integrative genomic approaches identify IKBKE as a breast cancer oncogene. *Cell.* 2007;129(6):1065-79.

33. Guo JP, Shu SK, He L, Lee YC, Kruk PA, Grenman S, et al. Deregulation of IKBKE is associated with tumor progression, poor prognosis, and cisplatin resistance in ovarian cancer. *Am J Pathol.* 2009;175(1):324-33.
34. Yin M, Wang X, Lu J. Advances in IKBKE as a potential target for cancer therapy. *Cancer Med.* 2020;9(1):247-58.
35. Brue T, Quantien MH, Khetchoumian K, Bensa M, Capo-Chichi JM, Delemer B, et al. Mutations in NFKB2 and potential genetic heterogeneity in patients with DAVID syndrome, having variable endocrine and immune deficiencies. *BMC Med Genet.* 2014;15:139.
36. Lindsley AW, Qian Y, Valencia CA, Shah K, Zhang K, Assa'ad A. Combined immune deficiency in a patient with a novel NFKB2 mutation. *J Clin Immunol.* 2014;34(8):910-5.
37. Reale C, Iervolino A, Scudiero I, Ferravante A, D'Andrea LE, Mazzone P, et al. NF- κ B Essential Modulator (NEMO) Is Critical for Thyroid Function. *The Journal of biological chemistry.* 2016;291(11):5765-73.
38. Choukair D, Eberle B, Vick P, Hermanns P, Weiss B, Paramasivam N, et al. Identification of Transient Receptor Potential Channel 4-Associated Protein as a Novel Candidate Gene Causing Congenital Primary Hypothyroidism. *Horm Res Paediatr.* 2020;93(1):16-29.
39. Westerfield M. *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio).* 4th ed. Oregon: University of Oregon Press 2000.
40. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists.* 1995;203(3):253-310.
41. Thisse C, Thisse B. High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nature protocols.* 2008;3(1):59-69.
42. Vejnar CE, Moreno-Mateos MA, Cifuentes D, Bazzini AA, Giraldez AJ. Optimized CRISPR-Cas9 System for Genome Editing in Zebrafish. *Cold Spring Harb Protoc.* 2016;2016(10).
43. Samarut E, Lissouba A, Drapeau P. A simplified method for identifying early CRISPR-induced indels in zebrafish embryos using High Resolution Melting analysis. *BMC genomics.* 2016;17:547.

44. Long L, Guo H, Yao D, Xiong K, Li Y, Liu P, et al. Regulation of transcriptionally active genes via the catalytically inactive Cas9 in *C. elegans* and *D. rerio*. *Cell Res.* 2015;25(5):638-41.
45. Shen RR, Zhou AY, Kim E, Lim E, Habelhah H, Hahn WC. I κ B kinase ϵ phosphorylates TRAF2 to promote mammary epithelial cell transformation. *Molecular and cellular biology.* 2012;32(23):4756-68.
46. Lu J, Yang Y, Guo G, Liu Y, Zhang Z, Dong S, et al. IKBKE regulates cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition of human malignant glioma via the Hippo pathway. *Oncotarget.* 2017;8(30):49502-14.
47. Hutti JE, Shen RR, Abbott DW, Zhou AY, Sprott KM, Asara JM, et al. Phosphorylation of the tumor suppressor CYLD by the breast cancer oncogene IKKepsilon promotes cell transformation. *Mol Cell.* 2009;34(4):461-72.
48. Hsu S, Kim M, Hernandez L, Grajales V, Noonan A, Anver M, et al. IKK- ϵ coordinates invasion and metastasis of ovarian cancer. *Cancer Res.* 2012;72(21):5494-504.
49. Shen RR, Hahn WC. Emerging roles for the non-canonical IKKs in cancer. *Oncogene.* 2011;30(6):631-41.
50. Vervoordeldonk MJ, Aalbers CJ, Tak PP. Interferon beta for rheumatoid arthritis: new clothes for an old kid on the block. *Ann Rheum Dis.* 2009;68(2):157-8.
51. Makino S, Fukumura R, Gondo Y. Illegitimate translation causes unexpected gene expression from on-target out-of-frame alleles created by CRISPR-Cas9. *Scientific reports.* 2016;6:39608.
52. Labun K, Montague TG, Krause M, Torres Cleuren YN, Tjeldnes H, Valen E. CHOPCHOP v3: expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(W1):W171-w4.
53. Cheng C, Ji Z, Sheng Y, Wang J, Sun Y, Zhao H, et al. Aphthous ulcer drug inhibits prostate tumor metastasis by targeting IKK ϵ /TBK1/NF- κ B signaling. *Theranostics.* 2018;8(17):4633-48.
54. Liu Y, Lu J, Zhang Z, Zhu L, Dong S, Guo G, et al. Amlexanox, a selective inhibitor of IKBKE, generates anti-tumoral effects by disrupting the Hippo pathway in human glioblastoma cell lines. *Cell Death Dis.* 2017;8(8):e3022.

55. Challa S, Guo JP, Ding X, Xu CX, Li Y, Kim D, et al. IKBKE Is a Substrate of EGFR and a Therapeutic Target in Non-Small Cell Lung Cancer with Activating Mutations of EGFR. *Cancer Res.* 2016;76(15):4418-29.
56. Opitz R, Maquet E, Zoenen M, Dadhich R, Costagliola S. TSH receptor function is required for normal thyroid differentiation in zebrafish. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md).* 2011;25(9):1579-99.
57. Kiezun A, Garimella K, Do R, Stitzel NO, Neale BM, McLaren PJ, et al. Exome sequencing and the genetic basis of complex traits. *Nature genetics.* 2012;44(6):623-30.
58. Xuan J, Yu Y, Qing T, Guo L, Shi L. Next-generation sequencing in the clinic: Promises and challenges. *Cancer Letters.* 2013;340(2):284-95.
59. Park MH, Rhee H, Park JH, Woo HM, Choi BO, Kim BY, et al. Comprehensive analysis to improve the validation rate for single nucleotide variants detected by next-generation sequencing. *PLoS One.* 2014;9(1):e86664.
60. Stainier DY, Kontarakis Z, Rossi A. Making sense of anti-sense data. *Developmental cell.* 2015;32(1):7-8.
61. Blum M, De Robertis EM, Wallingford JB, Niehrs C. Morpholinos: Antisense and Sensibility. *Developmental cell.* 2015;35(2):145-9.
62. Rossi A, Kontarakis Z, Gerri C, Nolte H, Holper S, Kruger M, et al. Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns. *Nature.* 2015;524(7564):230-3.
63. El-Brolosy MA, Kontarakis Z, Rossi A, Kuenne C, Günther S, Fukuda N, et al. Genetic compensation triggered by mutant mRNA degradation. *Nature.* 2019;568(7751):193-7.
64. 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? *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2012;97(6):E978-81.

4.5 Discussion relative à l'article 3

Les résultats obtenus suite à l'utilisation d'un morpholino contre *ikbke* chez le poisson-zèbre suggèrent un effet sur la migration tardive, c'est-à-dire sur la migration rostrale. Trente-quatre pourcent des morphants (les embryons ayant été injectés avec un morpholino) ont un arrêt de migration ou une absence complète de migration de la thyroïde associée à des défauts importants dans la structure des vaisseaux sanguins adjacents. Cette étude concorde avec les résultats de la littérature qui montrent l'importance des vaisseaux dans la migration tardive de la thyroïde chez le poisson-zèbre (3, 122, 170). De plus, l'injection d'ARNm humain d'*IKBKE* permet de diminuer le nombre d'embryons avec un défaut de migration de la thyroïde, et ce de manière significative. Par contre, aucune des techniques alternatives utilisées pour confirmer ces résultats n'a été concluante.

Premièrement, l'utilisation d'un second morpholino bloquant l'épissage d'un deuxième exon et d'un morpholino bloquant la traduction d'*ikbke* n'ont pas montré de phénotype thyroïdien ou vasculaire. Deuxièmement, le modèle KO pour *ikbke* n'a aucun phénotype thyroïdien. Malgré une délétion de sept nucléotides dans le premier exon codant, changeant ainsi le cadre de lecture et induisant donc probablement l'expression d'un isoforme tronqué, l'expression d'*ikbke* dans ce modèle n'est diminuée que de 30%. Il est bien connu que la modification de la séquence nucléotidique d'un gène à l'aide de CRIPSR peut engendrer une compensation génique, soit l'expression de certains gènes qui ne sont pas normalement impliqués dans la voie du gène d'intérêt mais qui peuvent compenser la perte de ce dernier (300-302). L'analyse du transcriptome du modèle mutant comparé au modèle sauvage permettrait d'identifier les gènes qui sont activés uniquement dans le mutant (300). Malheureusement, cette hypothèse n'a pas été investiguée par manque de temps et de ressources. D'un autre côté, considérant la faible diminution de l'expression d'*ikbke*, une autre hypothèse plausible est l'utilisation d'un autre site d'activation de la traduction en aval de la délétion créé par l'ARNg, un phénomène qui peut être observé lorsque l'ARNg utilisé cible le début de la séquence du gène (303, 304). Cette explication concorderait davantage avec les résultats d'expression obtenus. Une délétion complète du gène serait une bonne alternative afin d'éviter les effets indésirables de la

modification de la séquence du gène et pourrait permettre de confirmer si *ikbke* est impliqué dans le développement thyroïdien.

Troisièmement, une autre approche utilisant la technique CRISPR a été essayée, mais cette fois-ci en utilisant une Cas9 inactivée (dCas9), qui permet l'inhibition de la transcription sans modification de la séquence du gène (287). Cette technique, qui est transitoire, a induit une diminution de 40% de l'expression d'*ikbke*, mais aucun défaut dans la migration de la thyroïde n'a été constaté à quatre jours post-fertilisation. Considérant que la diminution de l'expression d'*ikbke* chez le morphant est d'environ 70%, il est possible qu'avec la technique dCas9, l'inhibition du gène ne soit pas suffisante pour observer un phénotype. Quatrièmement, un inhibiteur du complexe IKBKE/TBK1, l'amlexanox, a été testé. Il a été récemment montré que l'utilisation de composés, directement dans l'eau des embryons, était une bonne technique pour évaluer le rôle de plusieurs voies de signalisation dans le développement de la thyroïde chez le poisson-zèbre (156). L'amlexanox était initialement utilisé pour traiter des ulcères buccaux, sans que le mécanisme de son effet ne soit connu (305). Des études ont montré qu'il inhibait le complexe IKBKE/TBK1 dans des cultures cellulaires et chez la souris (295, 296). Aucun phénotype thyroïdien ou vasculaire n'a été observé à la suite du traitement avec ce composé.

Au regard de cette incapacité à confirmer, à l'aide d'une autre technique, les résultats observés chez les morphants, il n'est pas possible d'affirmer qu'*IKBKE* est un nouveau gène de prédisposition pour les HCDT.

Finalement, le phénotype observé est un défaut de la migration tardive de la thyroïde chez le poisson-zèbre, une étape qui pourrait être comparée à l'expansion latérale de la thyroïde chez l'humain et non à l'étape de migration de la thyroïde. La présence de tissu ectopique n'a pu être observée dans le modèle morphant, dû à la déformation importante des vaisseaux. Du tissu ectopique n'a pas été observé plus fréquemment chez les larves traitées (Cas9 inactivée, *ikbke*^{-/-}, inhibiteur) que chez les larves non traitées. Une autre option pour étudier la migration du bourgeon thyroïdien aurait été d'étudier les larves à un stade plus précoce, soit 55hpf, mais à ce

stade, le sac vitellin rend la visualisation de la relation spatiale entre la thyroïde et le cœur plus difficile.

Ce projet a permis de confirmer l'importance des vaisseaux sanguins dans la migration tardive de la thyroïde chez le poisson-zèbre et l'importance d'une technique complémentaire pour confirmer des résultats obtenus avec des morpholinos, mais n'a pu confirmer l'implication d'*ikbke* dans la migration thyroïdienne chez le poisson-zèbre. L'utilisation des morpholinos seuls était initialement suffisante pour convaincre la communauté scientifique du rôle de certains gènes dans une maladie, mais ces dernières années, les effets non-spécifiques observés ont encouragé la communauté à demander une autre technique pour confirmer les résultats obtenus à l'aide de morpholinos (298, 299, 306). Les morpholinos demeurent une technique pouvant apporter des réponses, mais uniquement lorsque les résultats peuvent être confirmés à l'aide d'une autre technique (307, 308).

4.5.1 Migration de la glande thyroïde

Les facteurs impliqués dans la migration thyroïdienne sont peu connus, et pour l'instant, il n'y a que des observations tels un gradient de FGF au sein du bourgeon thyroïdien et une polarisation des cellules thyroïdiennes, deux signes associés à un processus de migration collective, qui suggèrent une réelle migration. L'étude des chimiokines, des cytokines régulant la migration cellulaire, pourrait peut-être permettre de confirmer un phénomène de migration, s'il est démontré qu'elles sont impliquées dans le développement de la thyroïde (309). C'est ce qui a été montré pour les gonades. En effet, il a été montré qu'un gradient SDF-1/CXCL12 (*stromal cell-derived factor-1*) guide la migration des cellules germinales mâles autant chez le poisson-zèbre que chez la souris (309-312). Considérant l'importance des vaisseaux et du cœur dans le bon positionnement de la thyroïde, les facteurs extrinsèques jouent certainement un rôle important dans la migration de la thyroïde, comme il a été démontré pour d'autres maladies endocriniennes. En effet, un facteur extrinsèque est impliqué dans le syndrome de Kallmann, une autre maladie endocrinienne due à un défaut de migration de cellules productrices d'hormones (313, 314). Certains cas (Kallmann à transmission liée à l'X) sont dus à une mutation dans une molécule d'adhésion, qui n'est pas exprimée dans les neurones qui produisent le GnRH, mais qui guide la

migration de ces derniers (313). Par conséquent, l'étude des facteurs extrinsèques est une voie à poursuivre pour mieux comprendre les étapes de la migration thyroïdienne.

Nos résultats sur le poisson-zèbre confirment ce qui a été montré dans la littérature, soit que la migration de la thyroïde est fortement influencée par la structure des vaisseaux sanguins. Par contre, nous n'avons pas été en mesure de montrer un défaut dans la première étape de migration de la thyroïde chez le poisson-zèbre. À ma connaissance, tous les modèles de poisson-zèbre présentant un défaut dans cette première étape de migration, avaient aussi des défauts dans le développement global (72, 122, 156, 170, 177, 206, 213). Il n'existe donc pas de bon modèle d'ectopie thyroïdienne isolée, c'est-à-dire sans phénotype extra-thyroïdien, chez le poisson-zèbre. Chez la souris, le constat est similaire (70, 124). La création d'un modèle animal avec une thyroïde ectopique mais sans autre phénotype associé nous permettrait de faire des analyses transcriptomiques durant la migration thyroïdienne et ainsi comparer les voies de signalisation modulées lors d'une migration normale et anormale. Le seul modèle existant qui pourrait potentiellement convenir est le modèle de souris *Foxe1^{-/-}*, dont la moitié des fœtus à E11.5 présentent une ectopie, mais plusieurs questions demeurent concernant ce modèle (127). Par conséquent, un modèle mieux défini d'ectopie thyroïdienne devrait être créé afin de mieux comprendre le processus de migration de la thyroïde.

Chapitre 5- Perspectives

Le WES n'a pas permis d'identifier de nouveaux gènes de prédisposition dans une petite cohorte de cas avec HCDDT-NS bien caractérisée. Afin d'identifier des gènes candidats avec une puissance statistique suffisante pour une maladie telle l'HCDDT, une maladie complexe non-monogénique, certaines études suggèrent que la taille de l'échantillon devrait être dans les milliers (241, 242, 246), ce qui sera difficilement atteignable. À défaut d'avoir un nombre de cas suffisant, il serait possible d'étudier certaines familles avec transmission directe, qui pourrait peut-être permettre d'identifier la cause chez les individus atteints en espérant que la cause de la maladie soit la même pour chacun des membres de la famille. L'étude des jumeaux monozygotiques discordants demeurent aussi une alternative pertinente afin d'essayer d'identifier des différences entre ces derniers. Une autre option, lorsque les systèmes d'exploitation permettront une meilleure prise en charge des métadonnées, est le génome complet (WGS) qui pourra peut-être nous permettre d'identifier des gènes de prédisposition. Le WGS peut séquencer l'ADN non-codant et donc les variants introniques et structuraux (ex: inversion ou grande délétion), augmentant les chances de découvrir une cause génétique. De plus, certains avantages sont liés à la technique de WGS, tels l'absence d'une étape d'enrichissement et une couverture plus uniforme des exons (149). Finalement, des études « omiques » (génomique, transcriptomique, épigénomique) des tissus thyroïdiens ectopiques est probablement ce qui pourrait permettre de découvrir réellement ce qui se passe au niveau tissulaire. Par contre, le nombre d'échantillon demeurera toujours un enjeu car peu de thyroïde ectopique sont réséquées.

Si la génétique n'est pas un facteur important dans le développement de l'HCDDT, comme le laissent croire nos résultats, il serait plus judicieux d'essayer de développer un bon modèle animal avec une thyroïde ectopique isolée et d'étudier, à l'aide du transcriptome, les voies de signalisation qui sont modifiées dans ce modèle lors du développement de la thyroïde en réalisant l'expérience à différents temps précis. Pour ce faire le poisson-zèbre est un modèle de choix, considérant tous les outils disponibles. Par exemple, il est assez simple de créer des lignées transgéniques permettant l'inhibition ou l'activation de certains gènes de manière tissu-

spécifique. Cela pourrait peut-être permettre de créer une lignée avec une dysgénésie thyroïdienne isolée, comme c'est le cas chez la majorité des patients avec HCDT, et donc d'avoir un modèle qui concorde davantage avec ce qui est observé chez l'humain. Présentement, la majorité des modèles disponibles ont des phénotypes extra-thyroïdiens en plus d'un phénotype thyroïdien. Ces outils sont utilisés pour d'autres domaines telle la régénération cardiaque, il serait bénéfique de les transposer pour l'étude de la thyroïde (315). Tel que mentionné précédemment, un projet intéressant serait d'étudier le rôle de diverses chimiokines (ex. SDF-1) dans la migration de la thyroïde en bloquant leurs récepteurs spécifiquement dans les cellules thyroïdiennes, ce qui nous permettrait de confirmer la présence d'une migration active. L'étude des chimiokines dans la migration thyroïdienne pourrait même être transposée au cancer thyroïdien, c'est-à-dire à savoir si des chimiokines sont responsables de la migration des cellules cancéreuses dans les cancers folliculaires, comme il a été observé dans d'autres cancers (316). Finalement, étudier les facteurs angiocrines, donc les facteurs sécrétés par les vaisseaux pourraient nous aider à mieux comprendre leurs rôles dans la migration de la thyroïde, sachant que les vaisseaux sanguins semblent y jouer un rôle important. Une meilleure connaissance des facteurs impliqués dans la migration de la thyroïde permettrait aussi d'augmenter le nombre de gènes candidats à tester chez les patients avec une HCDT.

En ce qui concerne les études sur *ikbke*, la création d'une lignée mutante où tout le gène est éliminé serait le meilleur moyen de confirmer le rôle de ce dernier dans le développement de la thyroïde.

Chapitre 6 – Conclusions

Les premiers écrits décrivant des cas d'HC remontent au 17^e siècle et les premiers dépistages néonataux, pour cette maladie, ont été réalisés en 1972 par Dussault et Laberge au Québec (317). Depuis ce jour, les recherches pour identifier les causes de l'HC se poursuivent. Pour les cas de dysgénésie thyroïdienne, les causes demeurent largement inconnues, tandis que pour les dyshormonogénèses, les causes sont souvent connues et le mode de transmission est principalement autosomique récessif.

Les études afin de mieux comprendre les différentes étapes du développement de la thyroïde ont commencé dans les années 90, donc de nombreuses années après l'isolation de la thyroxine (T₄) en 1914 (318). Depuis, certaines étapes ont été identifiées et sont mieux comprises. Par contre, plusieurs facteurs influencent ces étapes et l'interaction entre ces facteurs n'est pas toujours claire. La migration de la thyroïde demeure l'étape la moins bien comprise. Certains résultats suggèrent une réelle migration, mais cela reste à confirmer. Le présent doctorat comprenait différents projets, tous reliés à l'hypothyroïdie congénitale.

Le séquençage de l'exome entier (WES) a permis d'identifier rapidement un variant candidat qui co-ségrégait parfaitement avec le phénotype dans une forme familiale d'HC sévère. Des études *in vitro* ont permis de confirmer la causalité du variant et de montrer pour la première fois, dans les HC, un mécanisme d'épissage alternatif causé par un intron loin des sites d'épissage traditionnels de *TSHR*. Toutefois, une connaissance approfondie de la maladie et des isoformes du gène d'intérêt s'est avérée essentielle afin de bien analyser les données d'exome. Par contre, l'utilisation du séquençage de l'exome entier, n'a pas permis d'identifier de nouveaux gènes de prédisposition impliqués dans l'HCDT non-syndromique en utilisant une approche biaisée (*gene-based burden*) et une non biaisée (voie de signalisation). La taille de la cohorte peut expliquer l'absence de résultat positif (241, 242, 244, 246). D'un autre côté, ces résultats soulèvent la question de l'importance de la génétique dans les dysgénésies thyroïdiennes. Le WES a aussi permis de répertorier les variants dans les gènes associés à l'HC, chez les cas. Ces derniers pourraient être un des deux hits de notre modèle double hit, mais le second hit demeure inconnu.

J'ai développé le modèle du poisson-zèbre dans le laboratoire afin de tester *in vivo* le rôle des gènes candidats identifié par WES et j'ai débuté par *IKBKE*. *Ikbke* semble avoir un effet sur le développement des vaisseaux sanguins pharyngiens et sur la migration tardive de la thyroïde chez les larves injectées avec des morpholinos. Par contre, ces résultats n'ont pu être confirmés à l'aide de techniques alternatives. La création d'un modèle de poisson-zèbre avec une dysgénésie thyroïdienne isolée serait très pertinent pour étudier les voies de signalisations impliquées lors du développement normal et anormal de la thyroïde. De plus, les gènes identifiés à l'aide de ce modèle pourraient être étudiés chez des patients avec HCDT afin d'évaluer leur implication dans les dysgénésies thyroïdiennes chez l'humain.

Finalement, une des raisons d'étudier le développement thyroïdien est d'accroître nos connaissances dans ce domaine, mais une autre raison importante est le bénéfice éventuellement apporté aux patients et à leurs familles. Même si l'hypothyroïdie congénitale est une maladie sans complication lorsque diagnostiquée et traitée suffisamment tôt, en connaître les causes aide toujours à la compréhension du diagnostic et à l'adhérence au traitement, qui consiste en la prise quotidienne de thyroxine par voie orale pendant toute la vie.

Références bibliographiques

1. Nilsson M, Fagman H. Mechanisms of thyroid development and dysgenesis: an analysis based on developmental stages and concurrent embryonic anatomy. *Curr Top Dev Biol.* 2013;106:123-70.
2. Alt B, Reibe S, Feitosa NM, Elsalini OA, Wendl T, Rohr KB. Analysis of origin and growth of the thyroid gland in zebrafish. *Dev Dyn.* 2006;235(7):1872-83.
3. Opitz R, Maquet E, Huisken J, Antonica F, Trubiroha A, Pottier G, et al. Transgenic zebrafish illuminate the dynamics of thyroid morphogenesis and its relationship to cardiovascular development. *Dev Biol.* 2012;372(2):203-16.
4. Hoyes AD, Kershaw DR. Anatomy and development of the thyroid gland. *Ear Nose Throat J.* 1985;64(7):318-33.
5. Johansson E, Andersson L, Ornros J, Carlsson T, Ingesson-Carlsson C, Liang S, et al. Revising the embryonic origin of thyroid C cells in mice and humans. *Development.* 2015;142(20):3519-28.
6. Dow CJ, Dumont JE, Ketelbant P. [Percentage of epithelial cells, fibroblasts and endothelial cells in the dog thyroid]. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1986;180(6):629-32.
7. Van Vliet G. Development of the thyroid gland: lessons from congenitally hypothyroid mice and men. *Clin Genet.* 2003;63(6):445-55.
8. Lin J-D, Tang K-T, Cheng C-W. Effects of exogenous melatonin on clinical and pathological features of a human thyroglobulin-induced experimental autoimmune thyroiditis mouse model. *Scientific Reports.* 2019;9.
9. Manley NR, Capecchi MR. Hox group 3 paralogs regulate the development and migration of the thymus, thyroid, and parathyroid glands. *Dev Biol.* 1998;195(1):1-15.
10. Manley NR, Capecchi MR. The role of Hoxa-3 in mouse thymus and thyroid development. *Development.* 1995;121(7):1989-2003.
11. Nilsson M, Fagman H. Development of the thyroid gland. *Development.* 2017;144(12):2123-40.
12. De Felice M, Di Lauro R. Thyroid development and its disorders: genetics and molecular mechanisms. *Endocr Rev.* 2004;25(5):722-46.
13. 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):951-6.
14. Fagman H, Nilsson M. Morphogenesis of the thyroid gland. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;323(1):35-54.
15. López-Márquez A, Carrasco-López C, Fernández-Méndez C, Santisteban P. Unraveling the Complex Interplay Between Transcription Factors and Signaling Molecules in Thyroid Differentiation and Function, From Embryos to Adults. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021;12:654569.
16. Parlato R, Rosica A, Rodriguez-Mallon A, Affuso A, Postiglione MP, Arra C, et al. An integrated regulatory network controlling survival and migration in thyroid organogenesis. *Dev Biol.* 2004;276(2):464-75.

17. 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. *Dev Biol.* 2003;263(1):67-80.
18. Szinnai G, Lacroix L, Carré A, Guimiot F, Talbot M, Martinovic J, et al. Sodium/iodide symporter (NIS) gene expression is the limiting step for the onset of thyroid function in the human fetus. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(1):70-6.
19. De Felice M, Di Lauro R. Minireview: Intrinsic and extrinsic factors in thyroid gland development: an update. *Endocrinology.* 2011;152(8):2948-56.
20. Deladoëy J, von Oettingen JE, Van Vliet G. Disorders of the Thyroid in the Newborn and Infant. In: Mark A. Sperling M, editor. *Pediatric endocrinology.* fifth edition ed: Elsevier; 2021. p. 202-19.
21. Feldt-Rasmussen U, Efferimidis G, Klose M. The hypothalamus-pituitary-thyroid (HPT)-axis and its role in physiology and pathophysiology of other hypothalamus-pituitary functions. *Mol Cell Endocrinol.* 2021;525:111173.
22. Kopp P. Thyroid hormone synthesis. In: Braverman L, Cooper D, Kopp P, editors. *The Thyroid.* 11th ed: Wolters Kluwer; 2021. p. 59-85.
23. Dai G, Levy O, Carrasco N. Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature.* 1996;379(6564):458-60.
24. Völzke H, Caron P, Dahl L, de Castro JJ, Erlund I, Gaberšček S, et al. Ensuring Effective Prevention of Iodine Deficiency Disorders. *Thyroid.* 2016;26(2):189-96.
25. Damante G, Di Lauro R. Thyroid-specific gene expression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression.* 1994;1218(3):255-66.
26. Jang D, Marcus-Samuels B, Morgan SJ, Klubo-Gwiedzinska J, Neumann S, Gershengorn MC. Thyrotropin regulation of differentiated gene transcription in adult human thyrocytes in primary culture. *Mol Cell Endocrinol.* 2020;518:111032.
27. Deladoëy 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):2422-9.
28. Van Vliet G. Treatment of congenital hypothyroidism. *Lancet.* 2001;358(9276):86-7.
29. Grosse SD, Van Vliet G. Prevention of intellectual disability through screening for congenital hypothyroidism: how much and at what level? *Arch Dis Child.* 2011;96(4):374-9.
30. Dussault JH. Screening for congenital hypothyroidism. *Clin Obstet Gynecol.* 1997;40(1):117-23.
31. Dimitropoulos A, Molinari L, Etter K, Torresani T, Lang-Muritano M, Jenni OG, et al. Children with congenital hypothyroidism: long-term intellectual outcome after early high-dose treatment. *Pediatr Res.* 2009;65(2):242-8.
32. Hauri-Hohl A, Dusoczky N, Dimitropoulos A, Leuchter RH, Molinari L, Caflisch J, et al. Impaired neuromotor outcome in school-age children with congenital hypothyroidism receiving early high-dose substitution treatment. *Pediatr Res.* 2011;70(6):614-8.
33. Naafs JC, Vendrig LM, Limpens J, van der Lee HJ, Duijnhoven RG, Marchal JP, et al. Cognitive outcome in congenital central hypothyroidism: a systematic review with meta-analysis of individual patient data. *Eur J Endocrinol.* 2020;182(3):351-61.

34. Huang SA, Tu HM, Harney JW, Venihaki M, Butte AJ, Kozakewich HP, et al. Severe hypothyroidism caused by type 3 iodothyronine deiodinase in infantile hemangiomas. *N Engl J Med.* 2000;343(3):185-9.
35. Konrad D, Ellis G, Perlman K. Spontaneous regression of severe acquired infantile hypothyroidism associated with multiple liver hemangiomas. *Pediatrics.* 2003;112(6 Pt 1):1424-6.
36. Friesema EC, Grueters A, Biebermann H, Krude H, von Moers A, Reeser M, et al. Association between mutations in a thyroid hormone transporter and severe X-linked psychomotor retardation. *Lancet.* 2004;364(9443):1435-7.
37. Dumitrescu AM, Liao XH, Best TB, Brockmann K, Refetoff S. A novel syndrome combining thyroid and neurological abnormalities is associated with mutations in a monocarboxylate transporter gene. *Am J Hum Genet.* 2004;74(1):168-75.
38. Vella KR, Ramadoss P, Costa ESRH, Astapova I, Ye FD, Holtz KA, et al. Thyroid hormone signaling in vivo requires a balance between coactivators and corepressors. *Mol Cell Biol.* 2014;34(9):1564-75.
39. Mendoza A, Hollenberg AN. New insights into thyroid hormone action. *Pharmacol Ther.* 2017;173:135-45.
40. 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):13-8.
41. Hinton CF, Harris KB, Borgfeld L, Drummond-Borg M, Eaton R, Lorey F, et al. Trends in incidence rates of congenital hypothyroidism related to select demographic factors: data from the United States, California, Massachusetts, New York, and Texas. *Pediatrics.* 2010;125 Suppl 2:S37-47.
42. Camargo RY, Kanamura CT, Friguglietti CU, Nogueira CR, Iorcansky S, Tincani AJ, et al. Histopathological Characterization and Whole Exome Sequencing of Ectopic Thyroid: Fetal Architecture in a Functional Ectopic Gland from Adult Patient. *Int J Endocrinol.* 2018;2018:4682876.
43. Deladoey J, Vassart G, Van Vliet G. Possible non-Mendelian mechanisms of thyroid dysgenesis. *Endocr Dev.* 2007;10:29-42.
44. Arey LB. *Developmental anatomy.* Philadelphia: W. B. Saunders Company; 1941. 612 p.
45. 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):E978-81.
46. Gillotay P, Shankar M, Haerlingen B, Sema Elif E, Pozo-Morales M, Garteizgogeoasca I, et al. Single-cell transcriptome analysis reveals thyrocyte diversity in the zebrafish thyroid gland. *EMBO Rep.* 2020;21(12):e50612.
47. Haerlingen B, Opitz R, Vandernoot I, Molinaro A, Shankar M, Gillotay P, et al. Timed mesodermal FGF and BMP govern the multi-step thyroid specification. *bioRxiv.* 2020:2020.08.13.249540.
48. Devos H, Rodd C, Gagne N, Laframboise R, Van Vliet G. A search for the possible molecular mechanisms of thyroid dysgenesis: sex ratios and associated malformations. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(7):2502-6.

49. 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):3158-61.
50. McNally RJQ, Jones JH, Shaikh MG, Donaldson MDC, Blakey K, Cheetham TD. Congenital Hypothyroidism: Space–Time Clustering of Thyroid Dysgenesis Indicates a Role for Environmental Factors in Disease Etiology. *Thyroid.* 2020.
51. 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):2009-14.
52. Szinnai G. Genetics of normal and abnormal thyroid development in humans. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2014;28(2):133-50.
53. de Filippis T, Gelmini G, Paraboschi E, Vigone MC, Di Frenna M, Marelli F, et al. A frequent oligogenic involvement in congenital hypothyroidism. *Hum Mol Genet.* 2017;26(13):2507-14.
54. Abu-Khudir R, Larrivee-Vanier S, Wasserman JD, Deladoey J. Disorders of thyroid morphogenesis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2017;31(2):143-59.
55. Stoupa A, Kariyawasam D, Muzza M, de Filippis T, Fugazzola L, Polak M, et al. New genetics in congenital hypothyroidism. *Endocrine.* 2021;71(3):696-705.
56. Grasberger H, Refetoff S. Genetic causes of congenital hypothyroidism due to dysmorphogenesis. *Curr Opin Pediatr.* 2011;23(4):421-8.
57. Van Vliet G, Deladoey J. Hypothyroidism in infants and children: Congenital hypothyroidism. *Werner & Ingbar's the Thyroid: A Fundamental and Clinical Text.* 2012:790-802.
58. Peters C, van Trotsenburg ASP, Schoenmakers N. DIAGNOSIS OF ENDOCRINE DISEASE: Congenital hypothyroidism: update and perspectives. *Eur J Endocrinol.* 2018;179(6):R297-r317.
59. Deladoey J, Pfarr N, Vuissoz JM, Parma J, Vassart G, Biesterfeld S, et al. Pseudodominant inheritance of goitrous congenital hypothyroidism caused by TPO mutations: molecular and in silico studies. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(2):627-33.
60. Castanet M, Mallya U, Agostini M, Schoenmakers E, Mitchell C, Demuth S, et al. Maternal isodisomy for chromosome 9 causing homozygosity for a novel FOXE1 mutation in syndromic congenital hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(8):4031-6.
61. Eugène D, Djemli A, Van Vliet G. Sexual dimorphism of thyroid function in newborns with congenital hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(5):2696-700.
62. Perry R, Heinrichs C, Bourdoux P, Khoury K, Szots F, Dussault JH, et al. Discordance of monozygotic twins for thyroid dysgenesis: implications for screening and for molecular pathophysiology. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(9):4072-7.
63. McLean R, Howard N, Murray IP. Thyroid dysgenesis in monozygotic twins: variants identified by scintigraphy. *Eur J Nucl Med.* 1985;10(7-8):346-8.
64. 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):441-2.
65. Castanet M, Marinovic D, Polak M, Leger J. Epidemiology of thyroid dysgenesis: the familial component. *Horm Res Paediatr.* 2010;73(4):231-7.
66. Olivieri A, Stazi MA, Mastroiacovo P, Fazzini C, Medda E, Spagnolo A, et al. A population-based study on the frequency of additional congenital malformations in infants with

- congenital hypothyroidism: data from the Italian Registry for Congenital Hypothyroidism (1991-1998). *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(2):557-62.
67. Macchia PE, Lapi P, Krude H, Pirro MT, Missero C, Chiovato L, et al. PAX8 mutations associated with congenital hypothyroidism caused by thyroid dysgenesis. *Nat Genet.* 1998;19(1):83-6.
 68. Bamforth JS, Hughes IA, Lazarus JH, Weaver CM, Harper PS. Congenital hypothyroidism, spiky hair, and cleft palate. *J Med Genet.* 1989;26(1):49-51.
 69. Fagman H, Liao J, Westerlund J, Andersson L, Morrow BE, Nilsson M. The 22q11 deletion syndrome candidate gene *Tbx1* determines thyroid size and positioning. *Hum Mol Genet.* 2007;16(3):276-85.
 70. Krude H, Schutz B, Biebermann H, von Moers A, Schnabel D, Neitzel H, et al. Choreoathetosis, hypothyroidism, and pulmonary alterations due to human *NKX2-1* haploinsufficiency. *J Clin Invest.* 2002;109(4):475-80.
 71. de Filippis T, Marelli F, Nebbia G, Porazzi P, Corbetta S, Fugazzola L, et al. *JAG1* Loss-Of-Function Variations as a Novel Predisposing Event in the Pathogenesis of Congenital Thyroid Defects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101(3):861-70.
 72. Zenker M, Mayerle J, Lerch MM, Tagariello A, Zerres K, Durie PR, 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):1345-50.
 73. Amendola E, De Luca P, Macchia PE, Terracciano D, Rosica A, Chiappetta G, et al. A mouse model demonstrates a multigenic origin of congenital hypothyroidism. *Endocrinology.* 2005;146(12):5038-47.
 74. Abu-Khudir R, Paquette J, Lefort A, Libert F, Chanoine JP, Vassart G, et al. Transcriptome, methylome and genomic variations analysis of ectopic thyroid glands. *PLoS ONE.* 2010;5(10):e13420.
 75. Narumi S, Matsubara K, Ishii T, Hasegawa T. Methylome analysis of thyroid ectopy shows no disease-specific DNA methylation signature. *Clin Pediatr Endocrinol.* 2018;27(4):235-8.
 76. Magne F, Serpa R, Van Vliet G, Samuels ME, Deladoey J. 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.* 2015;83(2):79-85.
 77. Thorwarth A, Mueller I, Biebermann H, Ropers HH, Grueters A, Krude H, et al. Screening chromosomal aberrations by array comparative genomic hybridization in 80 patients with congenital hypothyroidism and thyroid dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(7):3446-52.
 78. Medda E, Vigone MC, Cassio A, Calaciura F, Costa P, Weber G, et al. Neonatal Screening for Congenital Hypothyroidism: What Can We Learn From Discordant Twins? *J Clin Endocrinol Metab.* 2019;104(12):5765-79.
 79. Jin M, Zhu S, Hu P, Liu D, Li Q, Li Z, et al. Genomic and epigenomic analyses of monozygotic twins discordant for congenital renal agenesis. *Am J Kidney Dis.* 2014;64(1):119-22.
 80. Baranzini SE, Mudge J, van Velkinburgh JC, Khankhanian P, Khrebtukova I, Miller NA, et al. Genome, epigenome and RNA sequences of monozygotic twins discordant for multiple sclerosis. *Nature.* 2010;464(7293):1351-6.

81. Magne F, Ge B, Larrivee-Vanier S, Van Vliet G, Samuels ME, Pastinen T, et al. Demonstration of Autosomal Monoallelic Expression in Thyroid Tissue Assessed by Whole-Exome and Bulk RNA Sequencing. *Thyroid*. 2016;26(6):852-9.
82. Ismail D, Smith VV, de Lonlay P, Ribeiro M-J, Rahier J, Blankenstein O, et al. Familial focal congenital hyperinsulinism. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011;96(1):24-8.
83. Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, et al. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(30):10604-9.
84. Giurgea I, Bellanné-Chantelot C, Ribeiro M, Hubert L, Sempoux C, Robert JJ, et al. Molecular mechanisms of neonatal hyperinsulinism. *Horm Res*. 2006;66(6):289-96.
85. Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971;68(4):820-3.
86. Wang LH, Wu CF, Rajasekaran N, Shin YK. Loss of Tumor Suppressor Gene Function in Human Cancer: An Overview. *Cell Physiol Biochem*. 2018;51(6):2647-93.
87. Girirajan S, Rosenfeld JA, Cooper GM, Antonacci F, Siswara P, Itsara A, et al. A recurrent 16p12.1 microdeletion supports a two-hit model for severe developmental delay. *Nat Genet*. 2010;42(3):203-9.
88. Schuster SC, Miller W, Ratan A, Tomsho LP, Giardine B, Kasson LR, et al. Complete Khoisan and Bantu genomes from southern Africa. *Nature*. 2010;463(7283):943-7.
89. Lohmueller KE, Indap AR, Schmidt S, Boyko AR, Hernandez RD, Hubisz MJ, et al. Proportionally more deleterious genetic variation in European than in African populations. *Nature*. 2008;451(7181):994-7.
90. Lehtovirta M, Pietiläinen KH, Levälahti E, Heikkilä K, Groop L, Silventoinen K, et al. Evidence that BMI and type 2 diabetes share only a minor fraction of genetic variance: a follow-up study of 23,585 monozygotic and dizygotic twins from the Finnish Twin Cohort Study. *Diabetologia*. 2010;53(7):1314-21.
91. Nicholas AK, Serra EG, Cangul H, Alyaarubi S, Ullah I, Schoenmakers E, et al. Comprehensive Screening of Eight Known Causative Genes in Congenital Hypothyroidism With Gland-in-Situ. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(12):4521-31.
92. Yamaguchi T, Nakamura A, Nakayama K, Hishimura N, Morikawa S, Ishizu K, et al. Targeted Next-Generation Sequencing for Congenital Hypothyroidism With Positive Neonatal TSH Screening. *J Clin Endocrinol Metab*. 2020;105(8).
93. Amendola E, Sanges R, Galvan A, Dathan N, Manenti G, Ferrandino G, et al. A locus on mouse chromosome 2 is involved in susceptibility to congenital hypothyroidism and contains an essential gene expressed in thyroid. *Endocrinology*. 2010;151(4):1948-58.
94. Sun F, Zhang J-X, Yang C-Y, Gao G-Q, Zhu W-B, Han B, et al. The genetic characteristics of congenital hypothyroidism in China by comprehensive screening of 21 candidate genes. *Eur J Endocrinol*. 2018;178(6):623-33.
95. Yu B, Long W, Yang Y, Wang Y, Jiang L, Cai Z, et al. Newborn Screening and Molecular Profile of Congenital Hypothyroidism in a Chinese Population. *Front Genet*. 2018;9:509-.
96. Gagné N, Parma J, Deal C, Vassart G, Van Vliet G. Apparent congenital athyreosis contrasting with normal plasma thyroglobulin levels and associated with inactivating mutations in the

- thyrotropin receptor gene: are athyreosis and ectopic thyroid distinct entities? *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(5):1771-5.
97. 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):E977-81.
 98. van Engelen K, Mommersteeg MT, Baars MJ, Lam J, Ilgun A, van Trotsenburg AS, et al. The ambiguous role of NKX2-5 mutations in thyroid dysgenesis. *PLoS ONE.* 2012;7(12):e52685.
 99. Wassner AJ. Unraveling the Genetics of Congenital Hypothyroidism: Challenges and Opportunities. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020;105(9).
 100. Fahed AC, Wang M, Homburger JR, Patel AP, Bick AG, Neben CL, et al. Polygenic background modifies penetrance of monogenic variants for tier 1 genomic conditions. *Nat Commun.* 2020;11(1):3635.
 101. Sifrim A, Hitz MP, Wilsdon A, Breckpot J, Turki SH, Thienpont B, et al. Distinct genetic architectures for syndromic and nonsyndromic congenital heart defects identified by exome sequencing. *Nat Genet.* 2016;48(9):1060-5.
 102. Camats N, Baz-Redón N, Fernández-Cancio M, Clemente M, Campos-Martorell A, Jaimes N, et al. Phenotypic Variability of Patients With PAX8 Variants Presenting With Congenital Hypothyroidism and Eutopic Thyroid. *J Clin Endocrinol Metab.* 2021;106(1):e152-e70.
 103. Nettore IC, Cacace V, De Fusco C, Colao A, Macchia PE. The molecular causes of thyroid dysgenesis: A systematic review. *J Endocrinol Invest.* 2013;36(8):654-64.
 104. Mio C, Grani G, Durante C, Damante G. Molecular defects in thyroid dysgenesis. *Clin Genet.* 2020;97(1):222-31.
 105. Clifton-Bligh RJ, Wentworth JM, Heinz P, Crisp MS, John R, Lazarus JH, et al. Mutation of the gene encoding human TTF-2 associated with thyroid agenesis, cleft palate and choanal atresia. *Nat Genet.* 1998;19(4):399-401.
 106. Alcántara-Ortigoza MA, Sánchez-Verdiguel I, Fernández-Hernández L, Enríquez-Flores S, González-Núñez A, Hernández-Martínez NL, et al. Further Evidence That Defects in Main Thyroid Dysgenesis-Related Genes Are an Uncommon Etiology for Primary Congenital Hypothyroidism in Mexican Patients: Report of Rare Variants in FOXE1, NKX2-5 and TSHR. *Children (Basel).* 2021;8(6).
 107. Carré A, Castanet M, Sura-Trueba S, Szinnai G, Van Vliet G, Trochet D, et al. Polymorphic length of FOXE1 alanine stretch: evidence for genetic susceptibility to thyroid dysgenesis. *Hum Genet.* 2007;122(5):467-76.
 108. Maquet E, Costagliola S, Parma J, Christophe-Hobertus C, Oligny LL, Fournet JC, et al. Lethal respiratory failure and mild primary hypothyroidism in a term girl with a de novo heterozygous mutation in the TTF1/NKX2.1 gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(1):197-203.
 109. Guillot L, Carre A, Szinnai G, Castanet M, Tron E, Jaubert F, et al. NKX2-1 mutations leading to surfactant protein promoter dysregulation cause interstitial lung disease in "Brain-Lung-Thyroid Syndrome". *Hum Mutat.* 2010;31(2):E1146-62.
 110. Carré A, Szinnai G, Castanet M, Sura-Trueba S, Tron E, Broutin-L'Hermite I, et al. Five new TTF1/NKX2.1 mutations in brain-lung-thyroid syndrome: rescue by PAX8 synergism in one case. *Hum Mol Genet.* 2009;18(12):2266-76.

111. 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):3962-7.
112. Ramos HE, Carré A, Chevrier L, Szinnai G, Tron E, Cerqueira TL, et al. Extreme phenotypic variability of thyroid dysgenesis in six new cases of congenital hypothyroidism due to PAX8 gene loss-of-function mutations. *Eur J Endocrinol.* 2014;171(4):499-507.
113. Dentice M, Cordeddu V, Rosica A, Ferrara AM, Santarpia L, Salvatore D, 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):1428-33.
114. Sunthornthepvarakul T, Gottschalk ME, Hayashi Y, Refetoff S. Brief report: resistance to thyrotropin caused by mutations in the thyrotropin-receptor gene. *N Engl J Med.* 1995;332(3):155-60.
115. Grasberger H, Refetoff S. Resistance to thyrotropin. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2017;31(2):183-94.
116. Larrivé-Vanier S, Magne F, Hamdoun E, Petryk A, Kibar Z, Van Vliet G, et al. Severe Congenital Hypothyroidism Due to a Novel Deep Intronic Mutation in the TSH Receptor Gene Causing Intron Retention. *J Endocr Soc.* 2021;5(3):bvaa183.
117. 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):1981-5.
118. Breedveld GJ, van Dongen JW, Danesino C, Guala A, Percy AK, Dure LS, et al. Mutations in TITF-1 are associated with benign hereditary chorea. *Hum Mol Genet.* 2002;11(8):971-9.
119. Castanet M, Park SM, Smith A, Bost M, Léger J, Lyonnet S, et al. A novel loss-of-function mutation in TTF-2 is associated with congenital hypothyroidism, thyroid agenesis and cleft palate. *Hum Mol Genet.* 2002;11(17):2051-9.
120. Senée V, Chelala C, Duchatelet S, Feng D, Blanc H, Cossec JC, et al. Mutations in GLIS3 are responsible for a rare syndrome with neonatal diabetes mellitus and congenital hypothyroidism. *Nat Genet.* 2006;38(6):682-7.
121. Opitz R, Hitz MP, Vandernoot I, Trubiroha A, Abu-Khudir R, Samuels M, et al. 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):377-88.
122. Carré A, Stoupa A, Kariyawasam D, Gueriouz M, Ramond C, Monus T, et al. Mutations in BOREALIN cause thyroid dysgenesis. *Hum Mol Genet.* 2017;26(3):599-610.
123. Stoupa A, Adam F, Kariyawasam D, Strassel C, Gawade S, Szinnai G, et al. TUBB1 mutations cause thyroid dysgenesis associated with abnormal platelet physiology. *EMBO Mol Med.* 2018;10(12).
124. Kimura S, Hara Y, Pineau T, Fernandez-Salguero P, Fox CH, Ward JM, et al. The T/ebp null mouse: thyroid-specific enhancer-binding protein is essential for the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain, and pituitary. *Genes Dev.* 1996;10(1):60-9.
125. Mansouri A, Chowdhury K, Gruss P. Follicular cells of the thyroid gland require Pax8 gene function. *Nat Genet.* 1998;19(1):87-90.
126. De Felice M, Ovitt C, Biffali E, Rodriguez-Mallon A, Arra C, Anastassiadis K, et al. A mouse model for hereditary thyroid dysgenesis and cleft palate. *Nat Genet.* 1998;19(4):395-8.

127. Fagman H, Grände M, Gritli-Linde A, Nilsson M. Genetic deletion of sonic hedgehog causes hemiagenesis and ectopic development of the thyroid in mouse. *Am J Pathol.* 2004;164(5):1865-72.
128. Carré A, Rachdi L, Tron E, Richard B, Castanet M, Schlumberger M, et al. Hes1 is required for appropriate morphogenesis and differentiation during mouse thyroid gland development. *PLoS ONE.* 2011;6(2):e16752.
129. Elsalini OA, Rohr KB. Phenylthiourea disrupts thyroid function in developing zebrafish. *Dev Genes Evol.* 2003;212(12):593-8.
130. Deladoey J. *Congenital Hypothyroidism Due to Thyroid Dysgenesis: From Epidemiology to Molecular Mechanisms: IntechOpen; 2012.*
131. El Kholy M, Fahmi ME, Nassar AE, Selim S, Elsedfy HH. Prevalence of minor musculoskeletal anomalies in children with congenital hypothyroidism. *Horm Res.* 2007;68(6):272-5.
132. Stoupa A, Al Hage Chehade G, Chaabane R, Kariyawasam D, Szinnai G, Hanein S, et al. High Diagnostic Yield of Targeted Next-Generation Sequencing in a Cohort of Patients With Congenital Hypothyroidism Due to Dysmorphogenesis. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020;11:545339.
133. Zou M, Alzahrani AS, Al-Odaib A, Alqahtani MA, Babiker O, Al-Rijjal RA, et al. Molecular Analysis of Congenital Hypothyroidism in Saudi Arabia: SLC26A7 Mutation Is a Novel Defect in Thyroid Dysmorphogenesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2018;103(5):1889-98.
134. Cangul H, Liao XH, Schoenmakers E, Kero J, Barone S, Srichomkwun P, et al. Homozygous loss-of-function mutations in SLC26A7 cause goitrous congenital hypothyroidism. *JCI Insight.* 2018;3(20).
135. Abramowicz MJ, Targovnik HM, Varela V, Cochaux P, Krawiec L, Pisarev MA, et al. Identification of a mutation in the coding sequence of the human thyroid peroxidase gene causing congenital goiter. *J Clin Invest.* 1992;90(4):1200-4.
136. Ris-Stalpers C, Bikker H. Genetics and phenomics of hypothyroidism and goiter due to TPO mutations. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;322(1-2):38-43.
137. Moreno JC, Bikker H, Kempers MJ, van Trotsenburg AS, Baas F, de Vijlder JJ, et al. Inactivating mutations in the gene for thyroid oxidase 2 (THOX2) and congenital hypothyroidism. *N Engl J Med.* 2002;347(2):95-102.
138. Zamproni I, Grasberger H, Cortinovis F, Vigone MC, Chiumello G, Mora S, et al. Biallelic inactivation of the dual oxidase maturation factor 2 (DUOX2) gene as a novel cause of congenital hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(2):605-10.
139. Everett LA, Glaser B, Beck JC, Idol JR, Buchs A, Heyman M, et al. Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS). *Nat Genet.* 1997;17(4):411-22.
140. Ieiri T, Cochaux P, Targovnik HM, Suzuki M, Shimoda S, Perret J, et al. A 3' splice site mutation in the thyroglobulin gene responsible for congenital goiter with hypothyroidism. *J Clin Invest.* 1991;88(6):1901-5.
141. Moreno JC, Klootwijk W, van Toor H, Pinto G, D'Alessandro M, Lèger A, et al. Mutations in the iodotyrosine deiodinase gene and hypothyroidism. *N Engl J Med.* 2008;358(17):1811-8.
142. Afink G, Kulik W, Overmars H, de Randamie J, Veenboer T, van Cruchten A, et al. Molecular characterization of iodotyrosine dehalogenase deficiency in patients with hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(12):4894-901.

143. Jin HY, Heo SH, Kim YM, Kim GH, Choi JH, Lee BH, et al. High Frequency of *DUOX2* Mutations in Transient or Permanent Congenital Hypothyroidism with Eutopic Thyroid Glands. *Hormone Research in Paediatrics*. 2014;82(4):252-60.
144. Avbelj M, Tahirovic H, Debeljak M, Kusekova M, Toromanovic A, Krzisk C, et al. High prevalence of thyroid peroxidase gene mutations in patients with thyroid dysmorphogenesis. *Eur J Endocrinol*. 2007;156(5):511-9.
145. Bakker B, Bikker H, Vulsma T, de Randamie JSE, Wiedijk BM, de Vijlder JJM. Two Decades of Screening for Congenital Hypothyroidism in the Netherlands: TPO Gene Mutations in Total Iodide Organification Defects (an Update). *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2000;85(10):3708-12.
146. Dufort G, Larrivée-Vanier S, Eugène D, De Deken X, Seebauer B, Heinemann K, et al. Wide Spectrum of *DUOX2* Deficiency: From Life-Threatening Compressive Goiter in Infancy to Lifelong Euthyroidism. *Thyroid*. 2019;29(7):1018-22.
147. Alberti L, Proverbio MC, Costagliola S, Romoli R, Boldrighini B, Vigone MC, et al. Germline mutations of TSH receptor gene as cause of nonautoimmune subclinical hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(6):2549-55.
148. Chinn IK, Chan AY, Chen K, Chou J, Dorsey MJ, Hajjar J, et al. Diagnostic interpretation of genetic studies in patients with primary immunodeficiency diseases: A working group report of the Primary Immunodeficiency Diseases Committee of the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. *J Allergy Clin Immunol*. 2020;145(1):46-69.
149. Fagman H, Andersson L, Nilsson M. The developing mouse thyroid: embryonic vessel contacts and parenchymal growth pattern during specification, budding, migration, and lobulation. *Dev Dyn*. 2006;235(2):444-55.
150. Rohr KB, Concha ML. Expression of nk2.1a during early development of the thyroid gland in zebrafish. *Mech Dev*. 2000;95(1-2):267-70.
151. Martinez Barbera JP, Clements M, Thomas P, Rodriguez T, Meloy D, Kioussis D, et al. The homeobox gene *Hex* is required in definitive endodermal tissues for normal forebrain, liver and thyroid formation. *Development*. 2000;127(11):2433-45.
152. Nakada C, Iida A, Tabata Y, Watanabe S. Forkhead transcription factor *foxe1* regulates chondrogenesis in zebrafish. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*. 2009;312(8):827-40.
153. Jovanovic L, Delahunt B, McIver B, Eberhardt NL, Grebe SK. Thyroid gland clonality revisited: the embryonal patch size of the normal human thyroid gland is very large, suggesting X-chromosome inactivation tumor clonality studies of thyroid tumors have to be interpreted with caution. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(7):3284-91.
154. Trubiroha A, Gillotay P, Giusti N, Gacquer D, Libert F, Lefort A, et al. A Rapid CRISPR/Cas-based Mutagenesis Assay in Zebrafish for Identification of Genes Involved in Thyroid Morphogenesis and Function. *Sci Rep*. 2018;8(1):5647.
155. Haerlingen B, Opitz R, Vandernoot I, Trubiroha A, Gillotay P, Giusti N, et al. Small-Molecule Screening in Zebrafish Embryos Identifies Signaling Pathways Regulating Early Thyroid Development. *Thyroid*. 2019;29(11):1683-703.
156. Revest JM, Spencer-Dene B, Kerr K, De Moerlooze L, Rosewell I, Dickson C. Fibroblast growth factor receptor 2-IIIb acts upstream of *Shh* and *Fgf4* and is required for limb bud maintenance but not for the induction of *Fgf8*, *Fgf10*, *Msx1*, or *Bmp4*. *Dev Biol*. 2001;231(1):47-62.

157. Ohuchi H, Hori Y, Yamasaki M, Harada H, Sekine K, Kato S, et al. FGF10 acts as a major ligand for FGF receptor 2 IIIb in mouse multi-organ development. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;277(3):643-9.
158. Wendl T, Adzic D, Schoenebeck JJ, Scholpp S, Brand M, Yelon D, et al. Early developmental specification of the thyroid gland depends on hox-expressing surrounding tissue and on FGF signals. *Development.* 2007;134(15):2871-9.
159. Longmire TA, Ikonomou L, Hawkins F, Christodoulou C, Cao Y, Jean JC, et al. Efficient derivation of purified lung and thyroid progenitors from embryonic stem cells. *Cell Stem Cell.* 2012;10(4):398-411.
160. Kurmann AA, Serra M, Hawkins F, Rankin SA, Mori M, Astapova I, et al. Regeneration of thyroid function by transplantation of differentiated pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 2015;17(5):527-42.
161. Fagman H, Grande M, Edsbacke J, Semb H, Nilsson M. Expression of classical cadherins in thyroid development: maintenance of an epithelial phenotype throughout organogenesis. *Endocrinology.* 2003;144(8):3618-24.
162. Rørth P. Collective guidance of collective cell migration. *Trends Cell Biol.* 2007;17(12):575-9.
163. Friedl P, Gilmour D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(7):445-57.
164. Loebel DA, Plageman TF, Jr., Tang TL, Jones VJ, Muccioli M, Tam PP. Thyroid bud morphogenesis requires CDC42- and SHROOM3-dependent apical constriction. *Biol Open.* 2016;5(2):130-9.
165. Plutoni C, Bazellieres E, Le Borgne-Rochet M, Comunale F, Bruges A, Séveno M, et al. P-cadherin promotes collective cell migration via a Cdc42-mediated increase in mechanical forces. *J Cell Biol.* 2016;212(2):199-217.
166. Ernst S, Liu K, Agarwala S, Moratscheck N, Avci ME, Dalle Nogare D, et al. Shroom3 is required downstream of FGF signalling to mediate proneuromast assembly in zebrafish. *Development.* 2012;139(24):4571-81.
167. Rørth P. Collective cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2009;25:407-29.
168. Haeger A, Wolf K, Zegers MM, Friedl P. Collective cell migration: guidance principles and hierarchies. *Trends Cell Biol.* 2015;25(9):556-66.
169. Alt B, Elsalini OA, Schrupf P, Haufs N, Lawson ND, Schwabe GC, et al. Arteries define the position of the thyroid gland during its developmental relocalisation. *Development.* 2006;133(19):3797-804.
170. Larrivé-Vanier S, Deladoëy J. Zebrafish embryo: A new model for studying thyroid morphogenesis. *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research.* 2018;2:3-9.
171. Porazzi P, Calebiro D, Benato F, Tiso N, Persani L. Thyroid gland development and function in the zebrafish model. *Mol Cell Endocrinol.* 2009;312(1-2):14-23.
172. Postiglione MP, Parlato R, Rodriguez-Mallon A, Rosica A, Mithbaokar P, Maresca M, et al. Role of the thyroid-stimulating hormone receptor signaling in development and differentiation of the thyroid gland. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(24):15462-7.
173. Opitz R, Maquet E, Zoenen M, Dadhich R, Costagliola S. TSH receptor function is required for normal thyroid differentiation in zebrafish. *Mol Endocrinol.* 2011;25(9):1579-99.

174. Liang S, Johansson E, Barila G, Altschuler DL, Fagman H, Nilsson M. A branching morphogenesis program governs embryonic growth of the thyroid gland. *Development*. 2018;145(2).
175. Xu PX, Zheng W, Laclef C, Maire P, Maas RL, Peters H, et al. *Eya1* is required for the morphogenesis of mammalian thymus, parathyroid and thyroid. *Development*. 2002;129(13):3033-44.
176. Pappalardo A, Porreca I, Caputi L, De Felice E, Schulte-Merker S, Zannini M, et al. Thyroid development in zebrafish lacking *Taz*. *Mech Dev*. 2015;138 Pt 3:268-78.
177. Macchia PE. Recent advances in understanding the molecular basis of primary congenital hypothyroidism. *Mol Med Today*. 2000;6(1):36-42.
178. Wendl T, Lun K, Mione M, Favor J, Brand M, Wilson SW, et al. *Pax2.1* is required for the development of thyroid follicles in zebrafish. *Development*. 2002;129(15):3751-60.
179. Lazzaro D, Price M, de Felice M, Di Lauro R. The transcription factor TTF-1 is expressed at the onset of thyroid and lung morphogenesis and in restricted regions of the foetal brain. *Development*. 1991;113(4):1093-104.
180. Dohán O, De la Vieja A, Paroder V, Riedel C, Artani M, Reed M, et al. The sodium/iodide Symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance. *Endocr Rev*. 2003;24(1):48-77.
181. Milenkovic M, De Deken X, Jin L, De Felice M, Di Lauro R, Dumont JE, et al. *Duox* expression and related H₂O₂ measurement in mouse thyroid: onset in embryonic development and regulation by TSH in adult. *J Endocrinol*. 2007;192(3):615-26.
182. Silberschmidt D, Rodriguez-Mallon A, Mithboakar P, Calì G, Amendola E, Sanges R, et al. In vivo role of different domains and of phosphorylation in the transcription factor *Nkx2-1*. *BMC Dev Biol*. 2011;11(1):9.
183. Koumariou P, Gómez-López G, Santisteban P. *Pax8* controls thyroid follicular polarity through *cadherin-16*. *J Cell Sci*. 2017;130(1):219-31.
184. Antonica F, Kasprzyk DF, Opitz R, Iacovino M, Liao XH, Dumitrescu AM, et al. Generation of functional thyroid from embryonic stem cells. *Nature*. 2012;491(7422):66-71.
185. Villacorte M, Delmarcelle AS, Lernoux M, Bouquet M, Lemoine P, Bolsée J, et al. Thyroid follicle development requires *Smad1/5*- and endothelial cell-dependent basement membrane assembly. *Development*. 2016;143(11):1958-70.
186. Degosserie J, Heymans C, Spourquet C, Halbout M, D'Auria L, Van Der Smissen P, et al. Extracellular vesicles from endothelial progenitor cells promote thyroid follicle formation. *J Extracell Vesicles*. 2018;7(1):1487250.
187. Hick AC, Delmarcelle AS, Bouquet M, Klotz S, Copetti T, Forez C, et al. Reciprocal epithelial:endothelial paracrine interactions during thyroid development govern follicular organization and C-cells differentiation. *Dev Biol*. 2013;381(1):227-40.
188. 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. *Dev Dyn*. 2000;219(1):84-9.
189. Bort R, Signore M, Tremblay K, Martinez Barbera JP, Zaret KS. *Hex* homeobox gene controls the transition of the endoderm to a pseudostratified, cell emergent epithelium for liver bud development. *Dev Biol*. 2006;290(1):44-56.

190. Civitareale D, Lonigro R, Sinclair AJ, Di Lauro R. A thyroid-specific nuclear protein essential for tissue-specific expression of the thyroglobulin promoter. *EMBO J.* 1989;8(9):2537-42.
191. Francis-Lang H, Price M, Polycarpou-Schwarz M, Di Lauro R. Cell-type-specific expression of the rat thyroperoxidase promoter indicates common mechanisms for thyroid-specific gene expression. *Mol Cell Biol.* 1992;12(2):576-88.
192. Endo T, Kaneshige M, Nakazato M, Ohmori M, Harii N, Onaya T. Thyroid transcription factor-1 activates the promoter activity of rat thyroid Na⁺/I⁻ symporter gene. *Mol Endocrinol.* 1997;11(11):1747-55.
193. 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):643-51.
194. Friedrichsen S, Christ S, Heuer H, Schäfer MK, Parlow AF, Visser TJ, et al. Expression of pituitary hormones in the Pax8^{-/-} mouse model of congenital hypothyroidism. *Endocrinology.* 2004;145(3):1276-83.
195. Fagman H, Amendola E, Parrillo L, Zoppoli P, Marotta P, Scarfò M, et al. Gene expression profiling at early organogenesis reveals both common and diverse mechanisms in foregut patterning. *Dev Biol.* 2011;359(2):163-75.
196. Porreca I, De Felice E, Fagman H, Di Lauro R, Sordino P. Zebrafish bcl2l is a survival factor in thyroid development. *Dev Biol.* 2012;366(2):142-52.
197. Ma R, Latif R, Davies TF. Thyroid follicle formation and thyroglobulin expression in multipotent endodermal stem cells. *Thyroid.* 2013;23(4):385-91.
198. Costamagna E, García B, Santisteban P. The functional interaction between the paired domain transcription factor Pax8 and Smad3 is involved in transforming growth factor-beta repression of the sodium/iodide symporter gene. *J Biol Chem.* 2004;279(5):3439-46.
199. Zannini M, Avantaggiato V, Biffali E, Arnone MI, Sato K, Pischetola M, et al. TTF-2, a new forkhead protein, shows a temporal expression in the developing thyroid which is consistent with a role in controlling the onset of differentiation. *EMBO J.* 1997;16(11):3185-97.
200. Hiruta J, Mazet F, Yasui K, Zhang P, Ogasawara M. Comparative expression analysis of transcription factor genes in the endostyle of invertebrate chordates. *Dev Dyn.* 2005;233(3):1031-7.
201. Venza I, Visalli M, Parrillo L, De Felice M, Teti D, Venza M. MSX1 and TGF-beta3 are novel target genes functionally regulated by FOXE1. *Hum Mol Genet.* 2011;20(5):1016-25.
202. Abler LL, Mansour SL, Sun X. Conditional gene inactivation reveals roles for Fgf10 and Fgfr2 in establishing a normal pattern of epithelial branching in the mouse lung. *Dev Dyn.* 2009;238(8):1999-2013.
203. Serra M, Alysandratos KD, Hawkins F, McCauley KB, Jacob A, Choi J, et al. Pluripotent stem cell differentiation reveals distinct developmental pathways regulating lung- versus thyroid-lineage specification. *Development.* 2017;144(21):3879-93.
204. Ferretti E, Tosi E, Po A, Scipioni A, Morisi R, Espinola MS, et al. Notch Signaling Is Involved in Expression of Thyrocyte Differentiation Markers and Is Down-Regulated in Thyroid Tumors. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2008;93(10):4080-7.

205. Porazzi P, Marelli F, Benato F, de Filippis T, Calebiro D, Argenton F, et al. Disruptions of global and JAGGED1-mediated notch signaling affect thyroid morphogenesis in the zebrafish. *Endocrinology*. 2012;153(11):5645-58.
206. Marelli F, Persani L. Role of Jagged1-Notch pathway in thyroid development. *J Endocrinol Invest*. 2018;41(1):75-81.
207. Lania G, Zhang Z, Huynh T, Caprio C, Moon AM, Vitelli F, et al. Early thyroid development requires a Tbx1-Fgf8 pathway. *Dev Biol*. 2009;328(1):109-17.
208. Zhang Z, Huynh T, Baldini A. Mesodermal expression of Tbx1 is necessary and sufficient for pharyngeal arch and cardiac outflow tract development. *Development*. 2006;133(18):3587-95.
209. Stagi S, Lapi E, Gambineri E, Salti R, Genuardi M, Colarusso G, et al. Thyroid function and morphology in subjects with microdeletion of chromosome 22q11 (del(22)(q11)). *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2010;72(6):839-44.
210. Dame K, Cincotta S, Lang AH, Sanghrajka RM, Zhang L, Choi J, et al. Thyroid Progenitors Are Robustly Derived from Embryonic Stem Cells through Transient, Developmental Stage-Specific Overexpression of Nkx2-1. *Stem Cell Reports*. 2017;8(2):216-25.
211. Jessica W, Louise A, Therese C, Henrik F, Mikael N. Misguided Migration of C Cell Precursors to Extra-Thyroidal Locations Related to Defective Pharyngeal Pouch Development in Shh Deficient Mice. *Cell & Developmental Biology*. 2013.
212. Rurale G, Marelli F, Duminuco P, Persani L. Glis3 as a Critical Regulator of Thyroid Primordium Specification. *Thyroid*. 2020;30(2):277-89.
213. Kang HS, Kumar D, Liao G, Lichti-Kaiser K, Gerrish K, Liao XH, et al. GLIS3 is indispensable for TSH/TSHR-dependent thyroid hormone biosynthesis and follicular cell proliferation. *J Clin Invest*. 2017;127(12):4326-37.
214. Dimitri P, Warner JT, Minton JA, Patch AM, Ellard S, Hattersley AT, et al. Novel GLIS3 mutations demonstrate an extended multisystem phenotype. *Eur J Endocrinol*. 2011;164(3):437-43.
215. Utrilla JC, Gordillo-Martínez F, Gómez-Pascual A, Fernández-Santos JM, Garnacho C, Vázquez-Román V, et al. Comparative study of the primary cilia in thyrocytes of adult mammals. *J Anat*. 2015;227(4):550-60.
216. Chojnowski JL, Trau HA, Masuda K, Manley NR. Temporal and spatial requirements for Hoxa3 in mouse embryonic development. *Dev Biol*. 2016;415(1):33-45.
217. Meunier D, Aubin J, Jeannotte L. Perturbed thyroid morphology and transient hypothyroidism symptoms in Hoxa5 mutant mice. *Dev Dyn*. 2003;227(3):367-78.
218. Jeannotte L, Gotti F, Landry-Truchon K. Hoxa5: A Key Player in Development and Disease. *J Dev Biol*. 2016;4(2).
219. Di Palma T, D'Andrea B, Liguori GL, Liguoro A, de Cristofaro T, Del Prete D, et al. TAZ is a coactivator for Pax8 and TTF-1, two transcription factors involved in thyroid differentiation. *Exp Cell Res*. 2009;315(2):162-75.
220. Ma R, Morshed SA, Latif R, Davies TF. TAZ Induction Directs Differentiation of Thyroid Follicular Cells from Human Embryonic Stem Cells. *Thyroid*. 2017;27(2):292-9.
221. Cai CL, Liang X, Shi Y, Chu PH, Pfaff SL, Chen J, et al. Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev Cell*. 2003;5(6):877-89.

222. Le Lièvre CS, Le Douarin NM. Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos. *J Embryol Exp Morphol.* 1975;34(1):125-54.
223. Bockman DE, Kirby ML. Dependence of thymus development on derivatives of the neural crest. *Science.* 1984;223(4635):498-500.
224. Maeda K, Asai R, Maruyama K, Kurihara Y, Nakanishi T, Kurihara H, et al. Postotic and preotic cranial neural crest cells differently contribute to thyroid development. *Dev Biol.* 2016;409(1):72-83.
225. Postlethwait JH, Woods IG, Ngo-Hazelett P, Yan YL, Kelly PD, Chu F, et al. Zebrafish comparative genomics and the origins of vertebrate chromosomes. *Genome Res.* 2000;10(12):1890-902.
226. Pyati UJ, Look AT, Hammerschmidt M. Zebrafish as a powerful vertebrate model system for in vivo studies of cell death. *Semin Cancer Biol.* 2007;17(2):154-65.
227. Opitz R, Antonica F, Costagliola S. New model systems to illuminate thyroid organogenesis. Part I: an update on the zebrafish toolbox. *European thyroid journal.* 2013;2(4):229-42.
228. Chopra K, Ishibashi S, Amaya E. Zebrafish duox mutations provide a model for human congenital hypothyroidism. *Biol Open.* 2019;8(2).
229. Ji C, Jin X, He J, Yin Z. Use of TSH β :EGFP transgenic zebrafish as a rapid in vivo model for assessing thyroid-disrupting chemicals. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2012;262(2):149-55.
230. Suzuki SC, Bleckert A, Williams PR, Takechi M, Kawamura S, Wong RO. Cone photoreceptor types in zebrafish are generated by symmetric terminal divisions of dedicated precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(37):15109-14.
231. Zhang RJ, Yang L, Sun F, Fang Y, Ye XP, Song HD, et al. Three-dimensional microscopy and image fusion reconstruction analysis of the thyroid gland during morphogenesis. *FEBS Open Bio.* 2021;11(5):1417-27.
232. Vaz-Drago R, Custodio N, Carmo-Fonseca M. Deep intronic mutations and human disease. *Hum Genet.* 2017;136(9):1093-111.
233. Samuels ME, Hasselmann C, Deal CL, Deladoey J, Vliet GV. Whole-exome sequencing: opportunities in pediatric endocrinology. *Per Med.* 2014;11(1):63-78.
234. Bartha Á, Györffy B. Comprehensive Outline of Whole Exome Sequencing Data Analysis Tools Available in Clinical Oncology. *Cancers (Basel).* 2019;11(11).
235. Laurie S, Fernandez-Callejo M, Marco-Sola S, Trotta JR, Camps J, Chacón A, et al. From Wet-Lab to Variations: Concordance and Speed of Bioinformatics Pipelines for Whole Genome and Whole Exome Sequencing. *Hum Mutat.* 2016;37(12):1263-71.
236. Xuan J, Yu Y, Qing T, Guo L, Shi L. Next-generation sequencing in the clinic: Promises and challenges. *Cancer Lett.* 2013;340(2):284-95.
237. Zuk O, Schaffner SF, Samocha K, Do R, Hechter E, Kathiresan S, et al. Searching for missing heritability: designing rare variant association studies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(4):E455-64.
238. Guo MH, Dauber A, Lippincott MF, Chan YM, Salem RM, Hirschhorn JN. Determinants of Power in Gene-Based Burden Testing for Monogenic Disorders. *Am J Hum Genet.* 2016;99(3):527-39.
239. Petersen BS, Fredrich B, Hoepfner MP, Ellinghaus D, Franke A. Opportunities and challenges of whole-genome and -exome sequencing. *BMC Genet.* 2017;18(1):14.

240. Choi M, Scholl UI, Ji W, Liu T, Tikhonova IR, Zumbo P, et al. Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(45):19096-101.
241. Kosmicki JA, Churchhouse CL, Rivas MA, Neale BM. Discovery of rare variants for complex phenotypes. *Hum Genet*. 2016;135(6):625-34.
242. Park MH, Rhee H, Park JH, Woo HM, Choi BO, Kim BY, et al. Comprehensive analysis to improve the validation rate for single nucleotide variants detected by next-generation sequencing. *PLoS ONE*. 2014;9(1):e86664.
243. Kiezun A, Garimella K, Do R, Stitzel NO, Neale BM, McLaren PJ, et al. Exome sequencing and the genetic basis of complex traits. *Nat Genet*. 2012;44(6):623-30.
244. Lee S, Abecasis GR, Boehnke M, Lin X. Rare-variant association analysis: study designs and statistical tests. *Am J Hum Genet*. 2014;95(1):5-23.
245. McDonald JH. *Handbook of Biological Statistics*, 3rd ed. Baltimore, Maryland: Sparky House Publishing; 2014.
246. Bartok B, Hammaker D, Firestein GS. Phosphoinositide 3-kinase delta regulates migration and invasion of synoviocytes in rheumatoid arthritis. *J Immunol*. 2014;192(5):2063-70.
247. Mangiafico SS. *An R Companion for the Handbook of Biological Statistics*, version 1.3.3.2015.
248. Hutti JE, Shen RR, Abbott DW, Zhou AY, Sprott KM, Asara JM, et al. Phosphorylation of the tumor suppressor CYLD by the breast cancer oncogene IKKepsilon promotes cell transformation. *Mol Cell*. 2009;34(4):461-72.
249. Verhelst K, Verstrepen L, Carpentier I, Beyaert R. IkappaB kinase epsilon (IKKepsilon): a therapeutic target in inflammation and cancer. *Biochem Pharmacol*. 2013;85(7):873-80.
250. Rossi A, Kontarakis Z, Gerri C, Nolte H, Holper S, Kruger M, et al. Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns. *Nature*. 2015;524(7564):230-3.
251. Sztal TE, Stainier DYR. Transcriptional adaptation: a mechanism underlying genetic robustness. *Development*. 2020;147(15).
252. El-Brolosy MA, Kontarakis Z, Rossi A, Kuenne C, Günther S, Fukuda N, et al. Genetic compensation triggered by mutant mRNA degradation. *Nature*. 2019;568(7751):193-7.
253. Makino S, Fukumura R, Gondo Y. Illegitimate translation causes unexpected gene expression from on-target out-of-frame alleles created by CRISPR-Cas9. *Scientific Reports*. 2016;6(1):39608.
254. Labun K, Montague TG, Krause M, Torres Cleuren YN, Tjeldnes H, Valen E. CHOPCHOP v3: expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(W1):W171-W4.
255. Long L, Guo H, Yao D, Xiong K, Li Y, Liu P, et al. Regulation of transcriptionally active genes via the catalytically inactive Cas9 in *C. elegans* and *D. rerio*. *Cell Res*. 2015;25(5):638-41.
256. Bell J. Amlexanox for the treatment of recurrent aphthous ulcers. *Clin Drug Investig*. 2005;25(9):555-66.
257. Cheng C, Ji Z, Sheng Y, Wang J, Sun Y, Zhao H, et al. Aphthous ulcer drug inhibits prostate tumor metastasis by targeting IKK ϵ /TBK1/NF- κ B signaling. *Theranostics*. 2018;8(17):4633-48.

258. Liu Y, Lu J, Zhang Z, Zhu L, Dong S, Guo G, et al. Amlexanox, a selective inhibitor of IKBKE, generates anti-tumoral effects by disrupting the Hippo pathway in human glioblastoma cell lines. *Cell Death Dis.* 2017;8(8):e3022.
259. Stainier DY, Kontarakis Z, Rossi A. Making sense of anti-sense data. *Dev Cell.* 2015;32(1):7-8.
260. Blum M, De Robertis EM, Wallingford JB, Niehrs C. Morpholinos: Antisense and Sensibility. *Dev Cell.* 2015;35(2):145-9.
261. Kok FO, Shin M, Ni CW, Gupta A, Grosse AS, van Impel A, et al. Reverse genetic screening reveals poor correlation between morpholino-induced and mutant phenotypes in zebrafish. *Dev Cell.* 2015;32(1):97-108.
262. Eisen JS, Smith JC. Controlling morpholino experiments: don't stop making antisense. *Development.* 2008;135(10):1735-43.
263. Stainier DYR, Raz E, Lawson ND, Ekker SC, Burdine RD, Eisen JS, et al. Guidelines for morpholino use in zebrafish. *PLoS Genet.* 2017;13(10):e1007000.
264. Heckmann L, Pock T, Tröndle I, Neuhaus N. The C-X-C signalling system in the rodent vs primate testis: impact on germ cell niche interaction. *Reproduction.* 2018;155(5):R211-r9.
265. Richardson B, Lehmann R. Mechanisms guiding primordial germ cell migration: strategies from different organisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2010;11:37-49.
266. Molyneaux KA, Zinszner H, Kunwar PS, Schaible K, Stebler J, Sunshine MJ, et al. The chemokine SDF1/CXCL12 and its receptor CXCR4 regulate mouse germ cell migration and survival. *Development.* 2003;130(18):4279-86.
267. Doitsidou M, Reichman-Fried M, Stebler J, Köprunner M, Dörries J, Meyer D, et al. Guidance of primordial germ cell migration by the chemokine SDF-1. *Cell.* 2002;111(5):647-59.
268. Legouis R, Hardelin JP, Levilliers J, Claverie JM, Compain S, Wunderle V, et al. The candidate gene for the X-linked Kallmann syndrome encodes a protein related to adhesion molecules. *Cell.* 1991;67(2):423-35.
269. Van Vliet G, Deladoey J. Sublingual thyroid ectopy: similarities and differences with Kallmann syndrome. *F1000prime reports.* 2015;7:20.
270. Dussault JH, Letarte J, Guyda H, Laberge C. Thyroid function in neonatal hypothyroidism. *J Pediatr.* 1976;89(4):541-4.
271. Kendall EC. The isolation in crystalline form of the compound containing iodine, which occurs in the thyroid: its chemical nature and physiologic activity. *Journal of the American Medical Association.* 1915;LXIV(25):2042-3.
272. Beffagna G. Zebrafish as a Smart Model to Understand Regeneration After Heart Injury: How Fish Could Help Humans. *Frontiers in Cardiovascular Medicine.* 2019;6(107).
273. Shi Y, Riese DJ, 2nd, Shen J. The Role of the CXCL12/CXCR4/CXCR7 Chemokine Axis in Cancer. *Front Pharmacol.* 2020;11:574667.

Annexe 1 – 4^e publication

Zebrafish embryo: a new model for studying thyroid morphogenesis

(publié dans COEMR, février 2018)

Stéphanie Larrivée-Vanier¹, Johnny Deladoëy¹

¹Endocrinology Service and Research Center of the Sainte-Justine Hospital and Department of Pediatrics, Université de Montreal, Montreal, Quebec, Canada (stephanie.larrivee-vanier@recherche-ste-justine.qc.ca; johnny.deladoey@recherche-ste-justine.qc.ca)

Word count: 2370 main text + 66 references + 1 table + 2 figures

Disclosure: the authors have no disclosure relevant to this study

Funding: Research in pediatric thyroid diseases at the CHU Ste-Justine is supported by private donations to JD (Girafonds, CHU Ste-Justine Foundation).

Corresponding author:

Stéphanie Larrivée-Vanier, Research Center of the Sainte-Justine Hospital, 3175 Ste-Catherine Road, Montreal H3t1C5, Quebec, Canada

Phone: 514-345-4931 ext 6206

Email: stephanie.larrivee-vanier@recherche-ste-justine.qc.ca

Contributions des auteurs

Stéphanie Larrivée-Vanier : J'ai effectué la revue de la littérature, écrit et corrigé le manuscrit

Johnny Deladoëy : Dr Deladoëy a corrigé le manuscrit

Article

Abstract

Thyroid development anomalies, known as thyroid dysgenesis, are the commonest cause of congenital hypothyroidism, which leads to intellectual disabilities if treated late. It is mostly sporadic, but the relative risk in first-degree relatives is increased 40-fold. Ectopic gland is the main etiology, followed by athyreosis. Most of the cases remain unexplained, although the occurrence of familial cases strongly suggests a genetic contribution. To validate a genetic implication in thyroid development, animal models are required. Mice are the standard model but recently zebrafish has become extensively used. Its rapid development, optical clarity, and easy genetic manipulation are important advantages. Moreover, thyroid development is similar in zebrafish and in human. Even if zebrafish is a great model, caution is advised when analyzing results from this species. It is important to keep in mind that phenotype is often divergent from the human when knocking out/down a gene. Moreover, when a phenotype is observed, it is often accompanied by a vascular phenotype, so maybe it is the vascular anomalies that lead to thyroid disorganization.

Key words: congenital hypothyroidism, thyroid dysgenesis, zebrafish, thyroid development

1. Introduction

Congenital hypothyroidism (CH) is estimated to affect one in 2,500 live newborns among Caucasians, making it the most common neonatal endocrine disease [1]. CH can lead to irreversible intellectual disabilities if left untreated. Fortunately, neonatal screening for thyroid function, established four decades ago, has had a dramatic impact on intellectual prognosis. Nonetheless, even with early treatment, a slight reduction of the intellectual quotient (but within the normal range) is still observed in some patients [2]. Defects in thyroid hormone synthesis (thyroid dyshormonogenesis) are seen in up to 15% of the cases and are usually explained by mutations in genes implicated in thyroid hormone production such as *NIS*, *DUOX2*, *TPO*, *TG* or *DEHAL* [3]. A defect in thyroid development during embryogenesis, referred to as thyroid dysgenesis (CHTD), is the commonest etiology of CH. A round, oval, or dumbbell-shaped ectopic sublingual gland is most frequently observed in patients with CHTD [4, 5]. Less common are complete absence of thyroid (athyreosis), hypoplasia of a normally located gland or hemiagenesis. The cause of CHDT is unknown in most cases. The main pathways and key steps of thyroid morphogenesis are known, but the molecular mechanisms driving thyroid migration and the implication of intrinsic and/or extrinsic factors in this process remain incompletely understood to date [6, 7**].

Most discoveries on thyroid morphogenesis were made in mice. For instance, crosstalk between *Hhex*, *Pax8*, *Foxe1*, and *Nkx2.1* during thyroid embryogenesis was first shown in mice [8]. However, despite their important roles, mutations in these transcription factors explained only a small percentage of CHDT cases (about 3%) [9]. Furthermore, these mutation-carrying patients usually have athyreosis or orthotopic hypoplasia but not ectopy, the most common phenotype observed in the clinic [10, 11*]. Thus, the reasons why the thyroid does not reach its final destination in about one in 4,000 humans remains unknown in the vast majority of cases. The migration defect may be due to multiple germline and/or somatic mutations combined with epigenetic factors. Considering the prevalence of 1% in first-degree relatives (a 40-fold increase in relative risk), the different prevalence between ethnic groups (one in 30,000 newborns of Black-African descent compared to one in 4,000 in Caucasians), and the link with well-defined syndromes, a genetic predisposition to CHTD is clear [10, 12-14].

Zebrafish emerged in the 2000s as a good model for studying developmental biology [15]. Accordingly, it is now also increasingly used for studying thyroid development and diseases [16-20*]. Easy genome manipulation, simple housing and breeding, and embryo transparency are some of the advantages of zebrafish. In this review, we highlight the similarities in thyroid morphogenesis between human and zebrafish and we describe several genetic tools used in this model and their limitations. Moreover, we underscore the latest discoveries regarding thyroid development using zebrafish.

2. Thyroid morphogenesis

Thyroid is the first glandular tissue to appear during embryogenesis [21]. In mammals, such as human and mice, it originates from two endodermal regions; the thyroid diverticulum and the ultimobranchial bodies (UBB) [7, 22]. The diverticulum originates from the midline of the pharyngeal floor and the UBB, the most important source of calcitonin-producing cells (C cells), derives from the lateral thyroid anlagen. Both fuse to form a composite gland in higher vertebrates [7, 23]. In non-mammalian vertebrates such as fish, the UBB do not fuse with the diverticulum-derived cells. The thyroid has a wide variety of shapes among vertebrates and non-vertebrates. In most mammals, it presents as a compact gland embedded in connective tissue, with two lobes connected by an isthmus. In zebrafish, the follicles are separated and loosely dispersed along the ventral aorta (figure1) [24]. Nonetheless, zebrafish is a suitable model to study thyroid development since the main signalling pathways of thyroid organogenesis are conserved through vertebrates [7, 25] (figure 2).

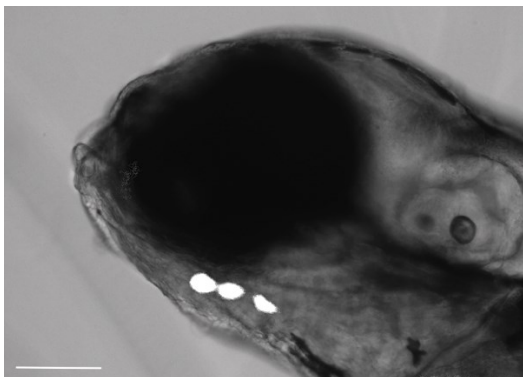


Figure 1. Transgenic zebrafish expressing the fluorescent mCherry protein specifically in thyroid. Lateral view of a live *tg(tg:mCherry)* zebrafish larvae at 5 days post fertilisation. Contrarily to the human thyroid, the zebrafish thyroid is not embedded in connective tissue but loosely dispersed along the aorta. At this stage, the thyroid is separate in small individual follicles. Scale bar: 100µm

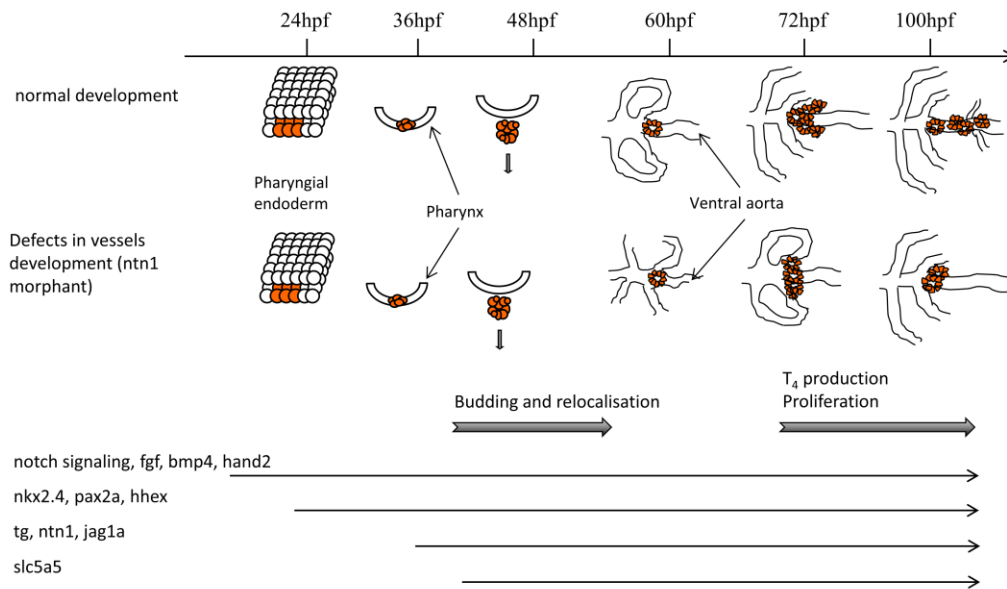


Figure 2. Schematic illustration of normal and abnormal thyroid development in zebrafish. Vessels development anomalies are associated with ectopic thyroid (*ntn1* morphant) or athyreosis (*han* mutant), confirming the importance of cardiac mesoderm in proper thyroid embryogenesis. Extrinsic factors (*bmp*, *fgf*, *notch signalling*) are important for thyroid fate and, at 24 hpf, thyroid cells have acquired a specific molecular signature (expression of *nkx2.4b*, *pax2a*, and *hhex*). Other important genes are expressed later during development (*tg*, *ntn1*, *slc5a5*, *jag1*). Budding and relocalization occur between 40 and 50 hpf, while proliferation and T4 production start around 72 hpf.

Three primary germ layers (endoderm, mesoderm, and ectoderm) differentiate early during embryogenesis and the thyroid originates from the foregut endoderm. Fibroblast growth factors (*fgf*) and bone morphogenic protein (*bmp*) are important for thyroid fate [7]. For instance, *fgf1*, *fgf2*, and *fgf8* rescue the thyroid in a *hand2* mutant zebrafish in which the thyroid is absent [26].

It has also been shown that Fgf2 and Bmp4 are necessary and sufficient to differentiate human and mouse embryonic stem cells into functional thyrocytes [27, 28]. The Notch pathway, which is expressed in the endoderm, is also implicated in thyroid fate [25, 29]. Lastly, the cardiac mesoderm and vessel signalling are probably implicated in early thyroid development [7].

Thyroid development starts as a thickening of the endodermal epithelium on the pharyngeal floor, the *foramen caecum* in humans. This placode is visible around 24hpf in zebrafish, E8-8.5 in mice, and E20-22 in humans [30]. At this stage, primitive thyroid cells have acquired a thyroid signature: expression of HHEX, FOXE1, NKX2.1, PAX8 in humans and *hhex*, *nkx2.4b*, *pax2a* (PAX8 functional human ortholog) in zebrafish [8, 29]. Even if those markers are expressed in other tissues, their co-expression is specific to thyroid follicular cells. After placode formation, there is a budding phase, where primitive thyroid cells separate from the pharyngeal endoderm, followed by displacement and proliferation. In humans and mice, proliferation occurs during thyroid displacement whereas in zebrafish the proliferation seems to follow it [25]. The thyroid reaches its final destination after 50 hpf in zebrafish, E13.5 in mice, and 7 embryonic weeks in humans [8, 31].

3. Animal models used to study thyroid development

Mice have been most widely used to study thyroid development. The mouse thyroid is mostly similar to its human counterpart [7, 30]. On the other hand, zebrafish have been proved to be a good model to study developmental biology [15]. Even though there are some important morphologic differences between zebrafish and human thyroid, key steps and main signalling pathways implicated in thyroid morphogenesis are conserved between mammals and fish [25]. For instance, *pax2a*, *nkx2.4b*, and *hhex* have the same roles as their human ortholog even if their expression pattern differs slightly [29]. Moreover, zebrafish follicles have the same functions as human follicles: they produce thyroglobulin, and concentrate and organify iodine to form thyroid hormones (T_4 and T_3) [25].

In the last decade, many groups have published zebrafish models of CH. However, there is only one zebrafish model with ectopy published: in *netrin1a*-deficient embryos, the morphogenesis of

the aortic arch and of the thyroid is abnormal due to improper guidance by the dysplastic vasculature, supporting the concept that cardiovascular and thyroid development are linked [7, 11]. Likewise, in mice, only the *Foxe1* knock out is associated with ectopy [32]. Half of the *Foxe1* knock out embryos has ectopy and the other half has athyreosis, but all newborn pups have athyreosis. Thus, although ectopy is the commonest phenotype observed in human newborns, there is no corresponding murine model. *foxe1* knock down in zebrafish is not associated with any defect in thyroid development[33]. There are other discrepancies between human and zebrafish thyroid phenotype when knock out/down is used (table 1).

Table 1. Zebrafish genes associated with a human thyroid dysgenesis phenotype (for other mutant lines/morphants see Fagman and Nilsson, 2010[30])

Genes^{ref}	Protein class	Human main thyroid phenotype	Additional human phenotype	Zebrafish thyroid phenotype	Additional zebrafish phenotype
<i>nkx2.4b</i> [29]	Homeodomain transcription factor	Thyroid in situ with primary hypothyroidism	Respiratory failure, choreoathetosis	Athyreosis	Forebrain defect
<i>pax2.1</i> (hPAX8)[65]	Paired-box transcription factor	Orthotopic hypoplasia	Unilateral renal agenesis	Athyreosis	Abnormal development of midbrain-hindbrain boundary, kidneys
<i>foxe1</i> [33]	Forkhead transcription factor	athyreosis	Clef palate, choanal atresia	No phenotype	Abnormal craniofacial development, pharyngeal skeleton anomalies
<i>glis3</i> [66]	Zinc finger transcription factor	Orthotopic hypoplasia	Neonatal diabetes, cystic kidneys, cholestasis	Hypoplasia	

<i>jag1</i> [47]	Jagged 1 protein: Notch receptor ligand	Thyroid in situ with primary hypothyroidism	Alagille syndrome type 1	hypoplasia and athyreosis	Craniofacial and notochord defects
<i>ntn1</i> [11]	Laminin-related secretion protein	Thyroid ectopy	arthrogryposis	thyroid ectopy	Vascular anomalies

3.1 The advantages of the zebrafish model

The large number of embryos laid by one female during breeding, the external maturation of embryos and their transparency during early embryogenesis make the zebrafish model an interesting tool to study developmental biology [15]. Sexual maturity is reached, as in mice, within three months, but one couple can give over 100 hundred eggs every week. Moreover, genetic manipulation and imaging are easily done in zebrafish. Finally, the similarity between zebrafish and human gene functions makes discoveries in zebrafish of great relevance for human disorders [34].

Thyroid development and function have been described in several transgenic zebrafish lines [16]. Using the *tol2* transposase method two transgenic models were generated, by the same group, to visualize the thyroid. One expresses a membrane mCherry and the other a nuclear green fluorescent protein (GFP) under the control of the thyroglobulin promoter which is exclusively expressed in thyroid cells [16, 35]. Using the same method, another group used TdTomato as the fluorophore to mark thyroid cells [36]. TR β 2 and TSH β zebrafish lines were also generated [37, 38*]. Transgenic lines are important to study gene function. Several techniques are used to generate them, including *tol2* transposase, gene-trap, and Gal4-UAS systems [39*-41]. New genetic tools such as the clustered regularly interspaced palindromic repeats (CRISPR)-Cas9 system, coupled with the ease of genome editing in zebrafish, should greatly facilitate the study of biological processes.

4. Tools used in zebrafish model

4.1 Genetic tools

One of the most widely used techniques to disrupt gene expression in zebrafish is morpholinos (MO) [42**]. These synthetic oligonucleotides hybridize to RNA transcripts and knockdown gene expression by blocking translation. The morpholino ring is not sensitive to nucleases, so MO are very stable [43]. Off-target effects are one of the main disadvantages of MO, making it sometimes hard to determine if the results are due to inhibition of the gene of interest or to a non-specific effect [44]. Strict controls are therefore needed, such as splice junction MOs to permit a read out of efficiency and rescue by mRNA modified to not be targeted by the MO. Even with these controls, the results are sometimes not reproducible and the efficiency is hard to measure [43]. Moreover, discrepancy between knockdown (MO) and knockout (CRISPR) results is frequent [45, 46]. This can be due to non-specific effects of the MO or, conversely, to compensation in the knockouts not seen in the knockdowns. Nonetheless, many gene functions have been elucidated using MO. For instance, *nkx2.4b* and *hhx* knock down mediated by MO affect thyroid formation, diminution of *tshr* expression is associated with hypofunctional tissue, and knock down of *Jag1a/b* results in hypoplasia or athyreosis [16, 47].

Another option for disrupting gene expression is gene inactivation. Transcription activator-like effector nucleases (TALENs) were mostly used until the CRISPR technology was developed [45]. TALENs are DNA-binding domains linked to the endonuclease *fok1*. Zinc finger nuclease (ZFN), another DNA-binding domain linked to *fok1*, has also been successfully used in zebrafish [16, 48]. Both TALENS and ZFN share the same principle, are very time consuming, require a lot of expertise, and have their limitations [49, 50].

By contrast, CRISPR-Cas9 technology is the simplest method and is being increasingly used [48, 51**]. It consists of a small guide RNA (gRNA) specific to a gene associated with a nuclease protein (the most common is Cas9). This active complex recognizes the DNA sequence complementary to the gRNA and cut both DNA strands at a specific point [52]. Cut DNA can be repaired by two methods: non-homologous end joining that will induce insertions or deletions (indels) or homologous repair if a DNA template is added to the complex [50]. There are numerous

possibilities for CRISPR delivery and for its complex components (gRNA, Cas9, and DNA template) (see Harrison et al., 2014 [53] for review).

Alongside gene knockout, several applications are possible with CRISPR-Cas9 or CRISPR-dCas9 (dead Cas9). Knock in, gene silencing, fluorescent tagging and gene regulation are a few examples [54]. One of the first papers showing that CRISPR-Cas9 is suitable for zebrafish was published in 2013 and was followed soon after by a paper proving that multiplex gene targeting is also possible [48, 55]. Moreover, knock in has also been shown to work in zebrafish [56, 57].

CRISPR-Cas9 has revolutionised the world of genome editing but, despite the ease of its use and good efficiency, there are limitations with this system as with all genome-editing tools [54]. Off-target effects can still be seen, even with the best gRNA design. Some alternatives have been developed to try to avoid these [58, 59] but zebrafish lines can simply be outcrossed to eliminate off-target mutations. Another important disadvantage when disrupting a gene is a possible rescue of the loss of function by another gene [45].

4.2 Chemical Compounds

Genetic determinants of thyroid embryogenesis are important but another field in which zebrafish are increasingly used is the study of endocrine disruptors [60-62]. This field is of public health importance given that many endocrine disruptors are found in the environment and that their implication on endocrine functions is poorly understood. As an example, exposure to polybrominated diphenylethers and bisphenol S during larval development disrupts thyroid function [63, 64]. Zebrafish is a good model to conduct large screening studies, considering the large number of eggs laid at the same time, the ease of dissolving test compounds in the same water with the larvae, and their small size permits the use of multi-well plates that allow for scaling. It allows multiple exposures to be studied at the same time and diminishes the potential bias seen when comparing data taken at different times.

5. Limitations of the zebrafish model

Some limitations need to be considered when using this model. For instance, zebrafish thyroid anatomy is different compare to the human gland, as mentioned earlier. Therefore, some pathways cannot be studied with zebrafish like follicle organization in a tight gland. Regarding the genetic tools used in zebrafish, off-target effects, discrepancy between knockout and knockdown model results, and genetic compensation have been observed. Concerns regarding the use of morpholinos, one of the main techniques used with zebrafish have also been raised in recent years. Furthermore, some genes have numerous orthologs and drug metabolism may be different in zebrafish than in human, that might complicate experiments and analysis. Finally, it is also important to mention that some human thyroid phenotypes have not been replicated in zebrafish (for example *foxe1* morphant have normal thyroid) [33].

6. Conclusion

Mice have been the main model used to study thyroid development. Despite the fact that it remains an important model, first because its thyroid is very similar to the human gland, and second because it is a higher vertebrate, a new interesting model has emerged as a powerful tool to study thyroid morphogenesis, the zebrafish.

There are many genetic tools and transgenic lines available for the zebrafish that greatly facilitate gene study. The many advantages of this model explain why it is now increasingly used to study thyroid development but also thyroid function. However, some important differences exist when comparing to human regarding (1) thyroid anatomy and (2) phenotypes obtained when disrupting genes. So even if it is a great model, it is important to keep in mind that information derived from zebrafish must be interpreted with caution, as with every animal model.

Acknowledgments

We thank Dr. Guy Van Vliet and Dr Pierre Drapeau for the revision of the manuscript. We thank the support of the Girafonds/Fondation du CHU Sainte-Justine.

References

1. Deladoey, J., et al., *Is the incidence of congenital hypothyroidism really increasing? A 20-year retrospective population-based study in Quebec.* J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(8): p. 2422-9.
2. Dimitropoulos, A., et al., *Children with congenital hypothyroidism: long-term intellectual outcome after early high-dose treatment.* Pediatr Res, 2009. **65**(2): p. 242-8.
3. Targovnik, H.M., C.E. Citterio, and C.M. Rivolta, *Iodide handling disorders (NIS, TPO, TG, IYD).* Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2017. **31**(2): p. 195-212.
4. Van Vliet, G. and J. Deladoey, *Sublingual thyroid ectopy: similarities and differences with Kallmann syndrome.* F1000Prime Rep, 2015. **7**: p. 20.
5. Wildi-Runge, S., et al., *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): p. E978-81.
6. De Felice, M. and R. Di Lauro, *Minireview: Intrinsic and extrinsic factors in thyroid gland development: an update.* Endocrinology, 2011. **152**(8): p. 2948-56.
7. Nilsson, M. and H. Fagman, *Development of the thyroid gland.* Development, 2017. **144**(12): p. 2123-2140.
- ** The latest review published by these two authors renowned for their detailed work on thyroid development focused on thyroid organogenesis and functional differentiation throughout evolution. They compared thyroid formation between vertebrate and non-vertebrate species. They also reviewed known genes associated with thyroid embryogenesis and discuss the new genes found to be implicated in this process.
8. Parlato, R., et al., *An integrated regulatory network controlling survival and migration in thyroid organogenesis.* Dev Biol, 2004. **276**(2): p. 464-75.
9. Narumi, S. and T. Hasegawa, *TSH resistance revisited.* Endocr J, 2015. **62**(5): p. 393-8.
10. Abu-Khudir, R., et al., *Disorders of thyroid morphogenesis.* Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2017. **31**(2): p. 143-159.
11. Opitz, R., et al., *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): p. 377-88.
- * The only study showing ectopic thyroid in zebrafish after gene disruption. Using morpholinos against netrin1a, a defect in thyroid morphogenesis was observed. This defect is probably associated with the disorganized vasculature observed, arguing for an implication of the cardiovascular system in thyroid development.
12. Stoppa-Vaucher, S., G. Van Vliet, and J. Deladoey, *Variation by ethnicity in the prevalence of congenital hypothyroidism due to thyroid dysgenesis.* Thyroid, 2011. **21**(1): p. 13-8.
13. Castanet, M., et al., *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): p. 2009-14.

14. Castanet, M., et al., *Familial forms of thyroid dysgenesis among infants with congenital hypothyroidism*. N Engl J Med, 2000. **343**(6): p. 441-2.
15. Pyati, U.J., A.T. Look, and M. Hammerschmidt, *Zebrafish as a powerful vertebrate model system for in vivo studies of cell death*. Seminars in Cancer Biology, 2007. **17**(2): p. 154-165.
16. Opitz, R., F. Antonica, and S. Costagliola, *New model systems to illuminate thyroid organogenesis. Part I: an update on the zebrafish toolbox*. Eur Thyroid J, 2013. **2**(4): p. 229-42.
17. McMenamin, S.K., M.N. Chandless, and D.M. Parichy, *Working with zebrafish at postembryonic stages*. Methods Cell Biol, 2016. **134**: p. 587-607.
18. Darras, V.M., A.M. Houbrechts, and S.L. Van Herck, *Intracellular thyroid hormone metabolism as a local regulator of nuclear thyroid hormone receptor-mediated impact on vertebrate development*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1849**(2): p. 130-41.
19. Zada, D., E. Blitz, and L. Appelbaum, *Zebrafish - An emerging model to explore thyroid hormone transporters and psychomotor retardation*. Mol Cell Endocrinol, 2017.
20. Vitale, G., et al., *Animal models of medullary thyroid cancer: state of the art and view to the future*. Endocr Relat Cancer, 2017. **24**(1): p. R1-r12.
- * This review focus on animal model for medullary thyroid cancer. Even if a numerous of mouse models have been developped for this type of cancer, zebrafish model can also be used to investigate cancer pathogenesis and progression pathway of this disease. Some disadvantages of using this model are also mentioned.
21. Manley, N.R. and M.R. Capecchi, *Hox group 3 paralogs regulate the development and migration of the thymus, thyroid, and parathyroid glands*. Dev Biol, 1998. **195**(1): p. 1-15.
22. De Felice, M. and R. Di Lauro, *Thyroid development and its disorders: genetics and molecular mechanisms*. Endocr Rev, 2004. **25**(5): p. 722-46.
23. Johansson, E., et al., *Revising the embryonic origin of thyroid C cells in mice and humans*. Development, 2015. **142**(20): p. 3519-28.
24. Alt, B., et al., *Analysis of origin and growth of the thyroid gland in zebrafish*. Dev Dyn, 2006. **235**(7): p. 1872-83.
25. Porazzi, P., et al., *Thyroid gland development and function in the zebrafish model*. Mol Cell Endocrinol, 2009. **312**(1-2): p. 14-23.
26. Wendl, T., et al., *Early developmental specification of the thyroid gland depends on hox-expressing surrounding tissue and on FGF signals*. Development, 2007. **134**(15): p. 2871-9.
27. Kurmann, A.A., et al., *Regeneration of thyroid function by transplantation of differentiated pluripotent stem cells*. Cell stem cell, 2015. **17**(5): p. 527-542.
28. Longmire, T.A., et al., *Efficient derivation of purified lung and thyroid progenitors from embryonic stem cells*. Cell Stem Cell, 2012. **10**(4): p. 398-411.
29. Elsalini, O.A., et al., *Zebrafish *hhx*, *nk2.1a*, and *pax2.1* regulate thyroid growth and differentiation downstream of Nodal-dependent transcription factors*. Dev Biol, 2003. **263**(1): p. 67-80.
30. Fagman, H. and M. Nilsson, *Morphogenesis of the thyroid gland*. Mol Cell Endocrinol, 2010. **323**(1): p. 35-54.

31. Rohr, K.B. and M.L. Concha, *Expression of nk2.1a during early development of the thyroid gland in zebrafish*. Mech Dev, 2000. **95**(1-2): p. 267-70.
32. De Felice, M., et al., *A mouse model for hereditary thyroid dysgenesis and cleft palate*. Nat Genet, 1998. **19**(4): p. 395-8.
33. Nakada, C., et al., *Forkhead transcription factor foxe1 regulates chondrogenesis in zebrafish*. J Exp Zool B Mol Dev Evol, 2009. **312**(8): p. 827-40.
34. Postlethwait, J.H., et al., *Zebrafish comparative genomics and the origins of vertebrate chromosomes*. Genome Res, 2000. **10**(12): p. 1890-902.
35. Opitz, R., et al., *Transgenic zebrafish illuminate the dynamics of thyroid morphogenesis and its relationship to cardiovascular development*. Dev Biol, 2012. **372**(2): p. 203-16.
36. Anelli, V., et al., *Oncogenic BRAF disrupts thyroid morphogenesis and function via twist expression*. Elife, 2017. **6**.
37. Ji, C., et al., *Use of TSH β :EGFP transgenic zebrafish as a rapid in vivo model for assessing thyroid-disrupting chemicals*. Toxicology and Applied Pharmacology, 2012. **262**(2): p. 149-155.
38. Suzuki, S.C., et al., *Cone photoreceptor types in zebrafish are generated by symmetric terminal divisions of dedicated precursors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(37): p. 15109-14.
- * This study demonstrated the possibility to coexpress the Cas9 with GFP or Cre recombinase, allowing the visualisation of mutant cells. This technique enables phenotypic characterization of mutant cells specifically, something that was not possible before.
39. Kawakami, K., et al., *Gal4 Driver Transgenic Zebrafish: Powerful Tools to Study Developmental Biology, Organogenesis, and Neuroscience*. Adv Genet, 2016. **95**: p. 65-87.
- * In this review, the authors want to convince the scientific community to continue using morpholinos (MO) for loss-of-function studies in the zebrafish. It is in response to the article et Kok et al., 2015 [46] which suggested that MO should not be the generic approach anymore. After reviewing the advantages of MO, the authors suggest to use both MO and genetic editing tools if possible. Otherwise, they specify that adequately controlled MO should be accepted as generic loss-of-function approach.
40. Tanabe, H., et al., *Fluorescence-Activated Cell Sorting and Gene Expression Profiling of GFP-Positive Cells from Transgenic Zebrafish Lines*. Methods Mol Biol, 2016. **1451**: p. 93-106.
41. Di Donato, V., et al., *2C-Cas9: a versatile tool for clonal analysis of gene function*. Genome Res, 2016. **26**(5): p. 681-92.
42. Blum, M., et al., *Morpholinos: Antisense and Sensibility*. Dev Cell, 2015. **35**(2): p. 145-9.
- ** To identify why mutants and knockdown animals often have a different phenotype, this group used morpholino and CRISPR to disrupt 2 genes and compared the zebrafish larvae. They show that there is a compensatory network activation in mutants but not in morphants, that protect the embryos against deleterious mutations.
43. Eisen, J.S. and J.C. Smith, *Controlling morpholino experiments: don't stop making antisense*. Development, 2008. **135**(10): p. 1735-43.
44. Stainier, D.Y., Z. Kontarakis, and A. Rossi, *Making sense of anti-sense data*. Dev Cell, 2015. **32**(1): p. 7-8.

45. Rossi, A., et al., *Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns*. Nature, 2015. **524**(7564): p. 230-3.
46. Kok, F.O., et al., *Reverse genetic screening reveals poor correlation between morpholino-induced and mutant phenotypes in zebrafish*. Dev Cell, 2015. **32**(1): p. 97-108.
47. de Filippis, T., et al., *JAG1 Loss-Of-Function Variations as a Novel Predisposing Event in the Pathogenesis of Congenital Thyroid Defects*. J Clin Endocrinol Metab, 2016. **101**(3): p. 861-70.
48. Hwang, W.Y., et al., *Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system*. Nat Biotechnol, 2013. **31**(3): p. 227-9.
49. Kim, H. and J.S. Kim, *A guide to genome engineering with programmable nucleases*. Nat Rev Genet, 2014. **15**(5): p. 321-34.
50. Lee, J., et al., *Designed nucleases for targeted genome editing*. Plant Biotechnol J, 2016. **14**(2): p. 448-62.
51. Jinek, M., et al., *A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity*. Science, 2012. **337**(6096): p. 816-21.
- ** This extensive review reported almost all that is known about CRISPR-Cas9 system beginning with its discovery and finishing with several applications possible with this tool for gene editing, regulation, imaging and more. It also discusses the structural and biochemical studies that support the current Cas9 function and the many advantages of this system.
52. Wiedenheft, B., S.H. Sternberg, and J.A. Doudna, *RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea*. Nature, 2012. **482**(7385): p. 331-8.
53. Harrison, M.M., et al., *A CRISPR view of development*. Genes Dev, 2014. **28**(17): p. 1859-72.
54. Wang, H., M. La Russa, and L.S. Qi, *CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond*. Annu Rev Biochem, 2016. **85**: p. 227-64.
55. Jao, L.E., S.R. Wentz, and W. Chen, *Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(34): p. 13904-9.
56. Armstrong, G.A., et al., *Homology Directed Knockin of Point Mutations in the Zebrafish *tardbp* and *fus* Genes in ALS Using the CRISPR/Cas9 System*. PLoS One, 2016. **11**(3): p. e0150188.
57. Hoshijima, K., M.J. Jurynek, and D.J. Grunwald, *Precise genome editing by homologous recombination*. Methods Cell Biol, 2016. **135**: p. 121-47.
58. Fu, Y., et al., *Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs*. Nat Biotechnol, 2014. **32**(3): p. 279-84.
59. Larson, M.H., et al., *CRISPR interference (CRISPRi) for sequence-specific control of gene expression*. Nat Protoc, 2013. **8**(11): p. 2180-96.
60. Kinch, C.D., D.M. Kurrasch, and H.R. Habibi, *Adverse morphological development in embryonic zebrafish exposed to environmental concentrations of contaminants individually and in mixture*. Aquat Toxicol, 2016. **175**: p. 286-98.
61. Kwon, B., et al., *Thyroid endocrine disruption in male zebrafish following exposure to binary mixture of bisphenol AF and sulfamethoxazole*. Environ Toxicol Pharmacol, 2016. **48**: p. 168-174.

62. Liu, Z., et al., *Effects of exposure to microcystin-LR at environmentally relevant concentrations on the metabolism of thyroid hormones in adult zebrafish (Danio rerio)*. *Toxicol*, 2016. **124**: p. 15-25.
63. Zhao, X., et al., *Life-cycle exposure to BDE-47 results in thyroid endocrine disruption to adults and offsprings of zebrafish (Danio rerio)*. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2016. **48**: p. 157-167.
64. Zhang, D.H., E.X. Zhou, and Z.L. Yang, *Waterborne exposure to BPS causes thyroid endocrine disruption in zebrafish larvae*. *PLoS One*, 2017. **12**(5): p. e0176927.
65. Wendl, T., et al., *Pax2.1 is required for the development of thyroid follicles in zebrafish*. *Development*, 2002. **129**(15): p. 3751-60.
66. Dimitri, P., *The role of GLIS3 in thyroid disease as part of a multisystem disorder*. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2017. **31**(2): p. 175-182.