

L'hormone thyroïdienne et ses récepteurs : la génétique de la souris clarifie-t-elle la situation ?

Frédéric Flamant et Laure Quignodon

Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon, École Normale Supérieure de Lyon, Université de Lyon, UMR INRA CNRS, 5242 IFR128, 46 allée d'Italie, 69364 Lyon Cedex 07, France

Auteur correspondant : Frédéric Flamant, frederic.flamant@ens-lyon.fr

Reçu le 12 avril 2007

Résumé – Chez les vertébrés, la forme active de l'hormone thyroïdienne (T3) agit directement sur la transcription en modifiant la conformation des récepteurs nucléaires TR (TR α 1, TR β 1 et TR β 2) encodés par les gènes THRA et THRB. Ces récepteurs sont fixés sur l'ADN au niveau d'éléments de réponse spécifiques indépendamment de la présence d'hormone. La génétique de la souris a clarifié la fonction respective de chaque isoforme, déterminée en grande partie par le mode d'expression des gènes THRA et THRB. Elle a aussi révélé l'importance de l'action négative des TR en absence de ligand non seulement dans les conditions pathologiques que physiologiques

Mots clés : Thyroïde / souris / endocrinologie / transcription

Abstract – **Thyroid hormone and its receptors: have mouse genetics clarified the situation?**

In vertebrates, the active form of thyroid hormone (T3) acts directly on transcription by changing the conformation of the TR nuclear receptors (TR α 1, TR β 1 et TR β 2) which are encoded by the THRA and THRB genes. These receptors are bound to DNA at specific response elements in a ligand independent manner. Mouse genetics have clarified the respective function of each receptor isoform, mainly reflecting THRA and THRB expression patterns. It also revealed the importance of negative regulation by unliganded receptors not only in pathological but also in physiological situations.

Key words: Thyroid / mice / endocrinology / transcription

La thyroïde sécrète principalement la thyroxine (T4), un précurseur de la 3,5,3'-tri-iodothyronine (T3) qui est la forme active des hormones thyroïdiennes (TH). La majorité de la T3 trouvée dans le sérum provient de la désiodation, principalement hépatique, de la T4. La sécrétion thyroïdienne est régulée par la sécrétion hypophysaire de TSH, elle-même sous le contrôle du facteur hypothalamique TRH. La régulation négative de la sécrétion de TSH et TRH par la T3 elle-même crée une boucle de régulation négative qui assure, dans des conditions normales, une grande stabilité du taux circulant d'hormone.

Il est aujourd'hui communément admis que la T3 agit principalement en activant des récepteurs nucléaires, qui sont des facteurs de transcription contrôlant l'expression de gènes cibles. Toutefois la

recherche de voies alternatives n'a jamais été abandonnée et plusieurs voies d'action rapide, dites non génomiques, ont été proposées, sans qu'aucun consensus ait été atteint. Ainsi, il a été proposé que la T3 agirait par le biais d'un récepteur membranaire constitué par l'intégrine α V β 3 (Davis *et al.*, 2004, Davis & Davis, 1996), ou par une autre voie insensible aux inhibiteurs des MAP kinases, mais sensible à un inhibiteur de la phosphatidylinositol-OH-3-kinase (PI3K) (Moeller *et al.*, 2005a; 2005b Storey *et al.*, 2006).

Récepteurs nucléaires de la T3

Toutefois, depuis la découverte initiale du gène aujourd'hui appelé THRA, homologue cellulaire de l'oncogène viral aviaire v-erbA (Sap *et al.*, 1986), puis du

deuxième gène apparenté *THRB* (Thompson *et al.*, 1987; Weinberger *et al.*, 1986) la plupart des études ont été consacrées à la voie d'activation directe de la transcription par la T3 (Yen, 2001), en raison de l'excellente corrélation qui existe entre l'activité biologique des dérivés iodés (T4, T3, reverse T3, Triac, etc.) et la mesure de leur affinité pour les récepteurs codés par *THRA* et *THRB*. *THRA* code pour sept protéines chez la souris, dont une seule, TR α 1, est un authentique récepteur nucléaire, capable de se fixer à l'ADN et de lier la T3. Certains des autres produits de *THRA* se comportent comme des antagonistes de la fonction de TR α 1. Les deux récepteurs TR β 1 et TR β 2 sont les seules protéines codées par *THRB* chez tous les mammifères. L'expression de *THRA* est pratiquement ubiquitaire, tandis que celle de *THRB* est plus restreinte. On la retrouve en particulier dans le foie, la rétine, l'oreille interne, l'hypophyse, et l'hypothalamus.

TR α 1, TR β 1 et TR β 2 (*i.e.* les TR) ont des structures modulaires très proches. Un domaine N-terminal, très similaire à celui des autres récepteurs nucléaires, assure la fixation à l'ADN, tandis qu'un domaine C-terminal assure la fixation du ligand T3, et la plupart des interactions protéiques décrites à ce jour. De nombreuses expériences d'expression transitoire indiquent que les TR agissent principalement sous forme d'hétérodimères avec un autre type de récepteur nucléaire, celui de l'acide rétinoïque RXR (RXR α , RXR β ou RXR γ). Il est communément admis que dans cette configuration l'acide rétinoïque 9-*cis* ne peut pas agir sur RXR, partenaire qui est dit « silencieux ». Des résultats récents ont remis en cause cette interprétation (Castillo *et al.*, 2004). Il existe cependant des exemples d'intervention de monomères, d'homodimères, d'autres partenaires d'hétérodimérisation, ou de recrutement indirect à la chromatine, par le biais d'interactions protéiques. Les hétérodimères TR/RXR peuvent se fixer sur divers types d'éléments de réponse TRE (*Thyroid hormone Response Element*).

Activation de la transcription par les récepteurs de la T3

Des progrès très importants ont été effectués récemment dans la compréhension des mécanismes moléculaires qui permettent aux récepteurs nucléaires en général, et aux TR en particulier, d'activer la transcription, lorsque la fixation de ligand modifie la conformation de la partie N-terminale (Hermanson *et al.*, 2002; Perissi & Rosenfeld, 2005; Rosenfeld *et al.*, 2006). En présence de T3, les hétérodimères recrutent des complexes multiprotéiques, dits coactivateurs, qui possèdent des capacités de remodelage de la chromatine et sont capables de modifier de façon covalente les queues des histones dans les nucléosomes voisins. On

trouve entre autres des histone-acétyl-acétylases et des histone-méthylases. Ceci aboutit finalement au recrutement de complexes pré-initiateurs de la transcription et de la RNA polymérase II. Il semble que les complexes coactivateurs soit recrutés de façon séquentielle et que la présence de tous les complexes soit nécessaire à l'activation de la transcription. L'une des particularités des TR est de fixer l'ADN avec la même affinité en absence de T3. Dans cette configuration, les TR recrutent des complexes dits corépresseurs, possédant souvent des activités opposées à celles des coactivateurs. Le cas le mieux caractérisé est celui des complexes corépresseurs dotés d'une activité histone désacétylase. Il est remarquable que le changement complet du répertoire d'interactions protéiques ne semble provenir que du changement de position de l'hélice 12 C-terminale, qui, en présence de T3, se replie sur la surface formée par les hélices 3, 4 et 5 du domaine de fixation au ligand (Marimuthu *et al.*, 2002).

Spécificité d'action de la T3

Cette question reste à éclaircir. Les TRE consensus les mieux caractérisés parmi ceux reconnus par les hétérodimères sont composés de l'assemblage de deux sites 5'AGGTCA3' associés en tandem dans un arrangement dit « DR4 » (*direct repeat 4* : 5'AGGT-CANNNAGGTCA3') « IR0 » (*Inverted repeat*, 0, 5'AGGTCATGACCT3') ou « ER6 » (*Everted repeat 6* : 5'TGACCTNNNNNAGGTCA3'). Or aucun de ces TRE (*Thyroid hormone Response Elements*) n'est strictement spécifique des hétérodimères TR/RXR et tous peuvent être activés *in vitro* par d'autres récepteurs nucléaires (LXR, PPAR etc.). Or les coactivateurs aujourd'hui connus ne sont pas non plus spécifiques des TR. L'absence de spécificité stricte des éléments de réponse et des coactivateurs entraîne la possibilité, parfois vérifiée, de régulations croisées entre les différentes voies de signalisation contrôlées par les récepteurs nucléaires et les TR, et pose la question des mécanismes assurant l'indépendance pourtant bien réelle de la signalisation de la T3.

Mutation des gènes codant les récepteurs à l'hormone thyroïdienne

Une des principales questions actuelles est de déterminer la contribution respective des divers récepteurs TR à la signalisation médiée par la T3 *in vivo*, dans des conditions normales ou pathologiques. Une meilleure compréhension de cette question relancerait sans aucun doute l'intérêt de l'industrie pharmaceutique pour les ligands de TR. On sait en effet depuis longtemps que l'administration de T4

ou de T3 peut avoir de nombreux effets potentiellement bénéfiques, mais déclenche de dangereuses crises de tachycardie. La synthèse récente d'agonistes artificiels sélectif pour TR β 1 et TR β 2 semblerait contourner ce problème (Baxter *et al.*, 2004). Ces dernières années, de nombreuses données obtenues sur des souris transgéniques porteuses de mutation des gènes *THRA* et *THRB* permettent d'éclaircir cette question. Les méthodes de manipulation génétique basée sur la recombinaison homologue dans les cellules souches embryonnaires permettent chez cette espèce de produire à volonté des mutations dirigées sur des gènes, et il existe désormais une collection publiée de 8 mutations pour *THRA*, et de 9 mutations pour *THRB* (revue dans Flamant *et al.*, 2007). Ces mutations peuvent être de type « knock-out » (élimination d'un ou plusieurs des transcrits produits par le locus *THRA* ou *THRB*) ou de type knock-in (mutations ponctuelles ou modification des trames de lectures et des propriétés des récepteurs). Dans certains cas, les deux effets sont combinés. L'interprétation des données est complexe, en raison de la grande variété des phénotypes décrits. D'une façon générale les conséquences des mutations sont, comme on s'y attendait, très pléiotropes, puisque l'hypothyroïdie a de très nombreuses conséquences sur le développement et le maintien de l'homéostasie. Le phénotype est cependant très variable d'un allèle à l'autre. On a décrit pour *THRA* des allèles létaux, et des allèles qui ne compromettent ni la survie, ni la reproduction des souris. Une deuxième conclusion est que la nature des altérations phénotypiques peut être prédite en observant le patron d'expression de *THRA* et *THRB*. Ainsi les conséquences des mutations de *THRA* touchent de très nombreux organes (intestin, cerveau, os, rate, cœur, etc.) dès les premières semaines de vie post-natale une période du développement qui correspond au développement fœtal chez l'homme. En revanche les mutations de *THRB* ont des conséquences sur le développement de l'oreille interne (surdité), de la rétine (daltonisme), du métabolisme hépatique, et du rétrocontrôle des sécrétions de TSH et TRH, ce qui augmente les niveaux de T4 et T3 circulantes. Ce dernier point complique l'interprétation des phénotypes des souris mutantes pour *THRB*, car il est difficile de distinguer les conséquences de l'absence du récepteur dans un tissu de celle de l'augmentation de T3 circulante.

Fonctionnement des récepteurs thyroïdiens en l'absence de ligands

L'analyse des souris mutantes pour les TR a mis en lumière le rôle important joué par les TR en absence de T3. D'une part le knock-out du gène *Pax8*, nécessaire à l'organog nese de la glande thyroïde, entraîne une hypothyroïdie congénitale très sévère

alors que, d'autre part, le knock-out de l'un des TR ou même de tous entraîne des altérations somme toute modérées. Ainsi les souris *Pax8*^{-/-} meurent généralement dans les 3 premières semaines de vie post-natale, alors que les souris sans récepteurs survivent. Ce paradoxe a été expliqué par combinaison des mutations *Pax8*^{-/-} et *THRA*^{-/-} : dans ces conditions, la survie s'améliore (Flamant *et al.*, 2002). Ceci suggère fortement que c'est le récepteur TR α 1 privé de T3 qui a un effet létal. En accord avec cette conclusion, les mutations « knock-in » qui empêchent soit le recrutement des coactivateurs, soit la fixation de T3, ont également des conséquences importantes sur la croissance et la survie post-natale des souris (Tinnikov *et al.*, 2002 ; Kaneshige *et al.*, 2001b). Des analyses phénotypiques plus précises aboutissent à la même conclusion. Ainsi, dans la couche granulaire externe du cervelet, l'hypothyroïdie entraîne un retard de la migration post-natale des neuroblastes vers la couche granulaire interne. Le signe le plus net de l'hypothyroïdie congénitale cérébelleuse est la persistance anormale de la couche granulaire externe au 21^e jour. Les souris *knock-out* pour *THRA* ne présentent pas ce phénotype. Cependant, l'administration d'une drogue go trog ne, capable d'inhiber la sécrétion d'hormone thyroïdienne (le propyl-thiouracyl), révèle une réponse anormale des souris *knock-out* : ce traitement n'induit pas la persistance de la couche granulaire externe. L'inhibition de cette migration neuronale résulte donc de l'effet négatif exercé par le récepteur TR α 1 en absence de T3. L'analyse des mutations knock-in le confirme (Venero *et al.*, 2005).

Dans quelle mesure le récepteur TR α 1 non lié à T3 est-il responsable de la pathogénie de l'hypothyroïdie congénitale ? La comparaison phénotypique détaillée des souris hypothyroïdiennes *Pax8*^{-/-} et des souris *THRA knock-in*, porteuses d'une mutation agissant soit sur l'affinité de TR α 1 pour la T3 (Tinnikov *et al.*, 2002 ; Kaneshige *et al.*, 2001a) soit sur le recrutement des coactivateurs (nos données non publiées), devrait répondre à cette question. TR α 1 non lié à T3 perturbe le développement de la plupart des tissus, exception faite de ceux qui expriment fortement *THRB*, comme l'hypophyse, la rétine, et le foie. Cette conclusion simple doit toutefois être tempérée : une quatrième mutation *knock-in* (Liu *et al.*, 2003) entraîne un phénotype très diff rent : une obésité en absence de signes squelettiques de nanisme. Cette discordance demeure inexpliquée, elle pourrait impliquer des régulations croisées avec d'autres récepteurs nucléaires, les PPAR (Liu *et al.*, 2006).

Si l'effet pathogène des TR non liés à T3 est clair, leur implication dans les processus physiologiques et développementaux commence juste être découverte. L'analyse de souris transgéniques porteuses d'un système rapporteur suggère qu'au sein du

système nerveux central, il existe des régions où la T3 est présente en très faible quantité (Quignodon *et al.*, 2004). L'analyse de souris knock-out pour *THRA* indique ainsi que la fréquence cardiaque est élevée chez les foetus mutants à un stade précoce, lorsque la T3 est absente du cœur, puis devient progressivement anormalement faible lorsque la concentration de T3 cardiaque augmente. Au cours du développement du cœur, TR α 1, d'abord privé de T3, ralentit la fréquence cardiaque en réprimant l'expression de canaux potassiques, puis, en présence de T3, l'augmente en activant leur expression (Mai *et al.*, 2004).

Conclusion

Finalement, si elle a permis des progrès importants, l'analyse génétique de la fonction des TR chez la souris doit maintenant permettre de trancher entre deux hypothèses :

- Soit les TR agissent de façon très limitée, sur un petit nombre de gènes, dans quelques types cellulaires seulement, et la multitude des effets observés ne sont que des conséquences indirectes ;
- Soit les TR agissent sur une fraction importante du génome dans les cellules qui expriment *THRA* ou *THRB*, c'est à dire tous les types cellulaires, et régulent directement les processus cellulaires impliqués dans le développement et le maintien de l'homéostasie chez les adultes.

C'est pour répondre à cette question que notre équipe utilise maintenant le système CRE/loxP qui permet de restreindre l'expression des mutations *knock-out* ou *knock-in* à des types cellulaires et des stades de développement prédéfinis.

Références

- Baxter J.D., Webb P., Grover G. & Scanlan T.S. Selective activation of thyroid hormone signaling pathways by GC-1 : a new approach to controlling cholesterol and body weight. *Trends Endocrinol. Metab.*, 2004, 15, 154-157.
- Castillo A.I., Sanchez-Martinez R., Moreno J.L., Martinez-Iglesias O.A., Palacios D. & Aranda A. A permissive retinoid X receptor/thyroid hormone receptor heterodimer allows stimulation of prolactin gene transcription by thyroid hormone and 9-cis-retinoic acid. *Mol. Cell. Biol.*, 2004, 24, 502-513.
- Davis F.B., Mousa S.A., O'Connor L., Mohamed S., Lin H.Y., Cao H.J. & Davis P.J. Proangiogenic action of thyroid hormone is fibroblast growth factor-dependent and is initiated at the cell surface. *Circ. Res.*, 2004, 94, 1500-1506.
- Davis P.J. & Davis F.B. Nongenomic actions of thyroid hormones. *Thyroid*, 1996, 6, 497-504.
- Flamant F., Gauthier K. & Samarut J. Thyroid hormones signaling is getting more complex: STORMs are coming. *Mol. Endocrinol.*, 2007, 21, 321-333.
- Flamant F., Poguet A.L., Plateroti M., Chassande O., Gauthier K., Streichenberger N., Mansouri A. & Samarut J. Congenital Hypothyroid Pax8(-/-) Mutant Mice Can Be Rescued by Inactivating the TR α Gene. *Mol. Endocrinol.*, 2002, 16, 24-32.
- Hermanson O., Glass C.K. & Rosenfeld M.G. Nuclear receptor coregulators : multiple modes of modification. *Trends Endocrinol. Metab.*, 2002, 13, 55-60.
- Kaneshige M., Suzuki H., Kaneshige K., Cheng J., Wimbrow H., Barlow C., Willingham M.C. & Cheng S. A targeted dominant negative mutation of the thyroid hormone alpha 1 receptor causes increased mortality, infertility, and dwarfism in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001a, 98, 15095-15100.
- Kaneshige M., Suzuki H., Kaneshige K., Cheng J., Wimbrow H., Barlow C., Willingham M.C. & Cheng S. A targeted dominant negative mutation of the thyroid hormone alpha 1 receptor causes increased mortality, infertility, and dwarfism in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001b, 4, 4.
- Liu Y.Y., Schultz J.J. & Brent G.A. A thyroid hormone receptor alpha gene mutation (P398H) is associated with visceral adiposity and impaired catecholamine-stimulated lipolysis in mice. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278, 38913-38920.
- Liu Y.Y., Heymann R.S., Moatamed F., Schultz J.J., Sobel D. & Brent G.A. A Mutant Thyroid Hormone Receptor α Antagonizes PPAR α -Signaling In Vivo and Impairs Fatty Acid Oxidation. *Endocrinology*, 2007, 148, 1206-1217.
- Mai W., Janier M.F., Allioli N., Quignodon L., Chuzel T., Flamant F. & Samarut J. Thyroid hormone receptor alpha is a molecular switch of cardiac function between fetal and postnatal life. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, 101, 10332-10337.
- Marimuthu A., Feng W., Tagami T., Nguyen H., Jameson J.L., Fletterick R.J., Baxter J.D. & West B.L. TR surfaces and conformations required to bind nuclear receptor corepressor. *Mol. Endocrinol.*, 2002, 16, 271-286.
- Moeller L.C., Dumitrescu A.M. & Refetoff S. Cytosolic Action of Thyroid Hormone Leads to Induction of HIF-1 α and Glycolytic Genes. *Mol. Endocrinol.*, 2005a, 19, 2955-2963.
- Moeller L.C., Dumitrescu A.M., Walker R.L., Meltzer P.S. & Refetoff S. Thyroid hormone responsive genes in cultured human fibroblasts. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2005b, 90, 936-943.
- Perissi V. & Rosenfeld M.G. Controlling nuclear receptors : the circular logic of cofactor cycles. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2005, 6, 542-554.
- Quignodon L., Legrand C., Allioli N., Guadano-Ferraz A., Bernal J., Samarut J. & Flamant F. Thyroid hormone signaling is highly heterogeneous during pre- and postnatal brain development. *J. Mol. Endocrinol.*, 2004, 33, 467-476.

- Rosenfeld M.G., Lunyak V.V. & Glass C.K. Sensors and signals : a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes. Dev.*, 2006, 20, 1405-1428.
- Sap J., Munoz A., Damm K., Goldberg Y., Ghysdael J., Leutz A., Beug H. & Vennstrom B. The c-erb-A protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone. *Nature*, 1986, 324, 635-640.
- Storey N.M., Gentile S., Ullah H., Russo A., Muessel M., Erxleben C. & Armstrong D.L. Rapid signaling at the plasma membrane by a nuclear receptor for thyroid hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, 103, 5197-5201.
- Thompson C.C., Weinberger C., Lebo R. & Evans R.M. Identification of a novel thyroid hormone receptor expressed in the mammalian central nervous system. *Science*, 1987, 237, 1610-1614.
- Tinnikov A., Nordstrom K., Thoren P., Kindblom J.M., Malin S., Rozell B., Adams M., Rajanayagam O., Pettersson S., Ohlsson C. *et al.* Retardation of post-natal development caused by a negatively acting thyroid hormone receptor alpha1. *Embo J.*, 2002, 21, 5079-5087.
- Venero C., Guadano-Ferraz A., Herrero A.I., Nordstrom K., Manzano J., de Escobar G.M., Bernal J. & Vennstrom B. Anxiety, memory impairment, and locomotor dysfunction caused by a mutant thyroid hormone receptor α 1 can be ameliorated by T3 treatment. *Genes. Dev.*, 2005, 19, 2152-2163.
- Weinberger C., Thompson C.C., Ong E.S., Lebo R., Gruol D.J. & Evans R.M. The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature*, 1986, 324, 641-646.
- Yen P.M. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol. Rev.*, 2001, 81, 1097-1142.