
Table des matières

I	Résultats	8
1	Comparaison des profils d'expressions entre l'épiderme caudal et les bourgeons de membres postérieurs	9
1.1	Comparaison globale des programmes transcriptionnels régulés par les hormones thyroïdiennes et les glucocorticoïdes	9
1.2	Vieillessement	13
1.3	Les modificateurs post-traductionnels des histones	15
1.4	La méthylation de l'ADN	17
1.5	Métabolisme et signalisation des hormones thyroïdiennes	19
II	Discussion	21
2	Profils d'expression des gènes régulés par les hormones thyroïdiennes et les glucocorticoïdes	23
2.1	Une diversité de profils d'expression	23
2.1.1	Tous les profils d'expression ne sont pas dans la nature .	23
2.1.2	Un programme commun entre les deux tissus	24
2.1.2.1	Des régulations croisées communes aux deux tissus	25

2.1.2.2	Des régulations croisées spécifiques de chaque tissu	25
2.1.3	Profils d'expression et compétence pour répondre aux hormones thyroïdiennes et aux glucocorticoïdes	26
2.1.3.1	Transporteurs cellulaires	27
2.1.3.2	Métabolisme intracellulaire	27
2.1.3.3	Récepteurs	29
2.2	Profils d'expression et mécanismes d'action des récepteurs aux hormones thyroïdiennes et aux corticostéroïdes	31
3	Fonction moléculaire des gènes régulés par les hormones thyroïdiennes et les glucocorticoïdes	35
3.1	Comparaison avec des données similaires	35
3.2	spécificité fonctionnelle de certains profils	37
3.2.1	Rôle sur le système immunitaire	37
3.2.2	Matrice extracellulaire	38
3.2.3	Possibles effets à l'échelle du tissu	40
4	Conséquences fonctionnelles dans l'interaction avec l'environnement	41
4.1	Conséquences en terme d'adaptation	41
4.2	Stress et épigénome	43
5	Conclusions et Perspectives	45
5.1	Conclusions	45
5.2	Perspectives	46
	Annexes	48

Liste des figures

1.1	Heatmap des profils d'expression des gènes différentiellement exprimés dans au moins une condition	12
1.2	Profils d'expression des gènes impliqués dans le vieillissement . .	13
1.3	Profils d'expression des gènes impliqués dans la modification d'histones	16
1.4	Profils d'expression des gènes impliqués dans la méthylation de l'ADN	17
1.5	Profils d'expression des gènes impliqués dans la signalisation et le métabolisme des hormones thyroïdiennes	19

Liste des tables

Première partie

Résultats

Comparaison des profils d'expressions entre l'épiderme caudal et les bourgeons de membres postérieurs

1.1 Comparaison globale des programmes transcriptionnels régulés par les hormones thyroïdiennes et les glucocorticoïdes

Dans le cadre de la caractérisation des programmes transcriptionnel spécifiques des HLBs (bourgeons de membres postérieurs, "hindlimb buds") et du TF (épiderme caudal, "tailfin"), j'ai partitionné les gènes différemment exprimé par rapport à la condition "contrôle" dans au moins une condition quelque soit le tissu selon leur profils d'expression. Cela représente un total de 5392 gènes. Le résultat de cette classification sous forme de "heatmap" est présenté Figure 1.1. Sur cette figure, il apparaît que la réponse aux deux signaux hormonaux étudiés est en grande partie spécifique de chaque tissus. En effet, le nombre de gènes régulés dans le TF et les HLBs est très différent (1363 et 4741 respectivement). L'intersection de ces deux jeux de données révèle 795 gènes en

1.1. COMPARAISON GLOBALE DES PROGRAMMES TRANSCRIPTIONNELS RÉGULÉS PAR LES HORMONES THYROÏDIENNES ET LES GLUCOCORTICOÏDES

commun.

En terme de proportions, 54,8 % des gènes sont différentiellement exprimés dans le TF alors qu'il ne représente que 4,3 % dans les HLBs. Pour les gènes "antagonistes" alors que leur nombre est similaire dans les deux tissus étudiés (une centaine), il représente 2,4 % dans les HLBs et 9,5 % dans le TF. Il ressort que 81 gènes ont un profil "antagoniste" ou "potentié" dans les deux tissus ce qui correspond à 9 % de ces gènes dans le TF (6 % du nombre de gènes différentiellement exprimés tous profils confondus) et 25 % dans les HLBs (1,7 % du nombre de gènes différentiellement exprimés tous profils confondus). Majoritairement ces gènes sont dans la catégorie des gènes "potentié" (8 "antagonistes" pour 61 "potentié"). Le comportement de certains gènes est particulier puisqu'ils sont "potentiés" dans un tissu et "antagonisés" dans l'autre (12 gènes) et inversement. Ceci est à mettre en perspective par rapport au nombre de gènes ne présentant qu'une réponse à la T₃ (3,5,3'-triiodothyronine) (358 dans le TF, 4394 dans les HLBs).

Les résultats présentés dans les deux chapitres précédents montrent que dans les pattes, la majeure partie de l'effet des hormones est tournée vers le métabolisme de lipides et des stéroïdes, le métabolisme des ARN (acide ribonucléique) et le système immunitaire. Dans ce tissu, les gènes présentant un profil d'expression dénotant une interaction entre les voies de signalisation HT (hormone thyroïdienne) et GC (glucocorticoïde) sont particulièrement enrichis en modulateurs de la réponse immunitaire innée. De même, dans le TF, la majorité de l'interaction entre les HTs et les GCs affecte la régulation de la prolifération cellulaire et de l'activation du système immunitaire. Il est intéressant de noter que dans les deux tissus, la majorité de l'enrichissement de termes associés au système immunitaire provient d'une même sous catégorie de profils d'expression, à savoir la potentiation de l'effet répresseur des HTs et des GCs dans le cadre d'un co-traitement.

Seuls deux gènes sont potentiés dans les HLBs et antagonisés dans le TF : EMILIN2 et FGFBP1, deux facteurs extra-cellulaires, le premier étant un

*CHAPITRE 1. COMPARAISON DES PROFILS D'EXPRESSIONS ENTRE
L'ÉPIDERME CAUDAL ET LES BOURGEONS DE MEMBRES
POSTÉRIEURS*

composant élastique de la matrice extra-cellulaire et le second se liant aux facteurs de croissance FGF pour potentialiser leur action. De même, 9 gènes sont “potentiés” dans le TF et “antagonisés” dans les HLBs. Ils couvrent des fonctions biologiques allant du contrôle du cycle cellulaire (MOB2, MCM2) au métabolisme des lipides (PNPLA2) en passant par le système immunitaire (NMI) ou encore le remodelage de la matrice extra-cellulaire (ADAMTSL5).

1.1. COMPARAISON GLOBALE DES PROGRAMMES TRANSCRIPTIONNELS RÉGULÉS PAR LES HORMONES THYROÏDIENNES ET LES GLUCOCORTICOÏDES

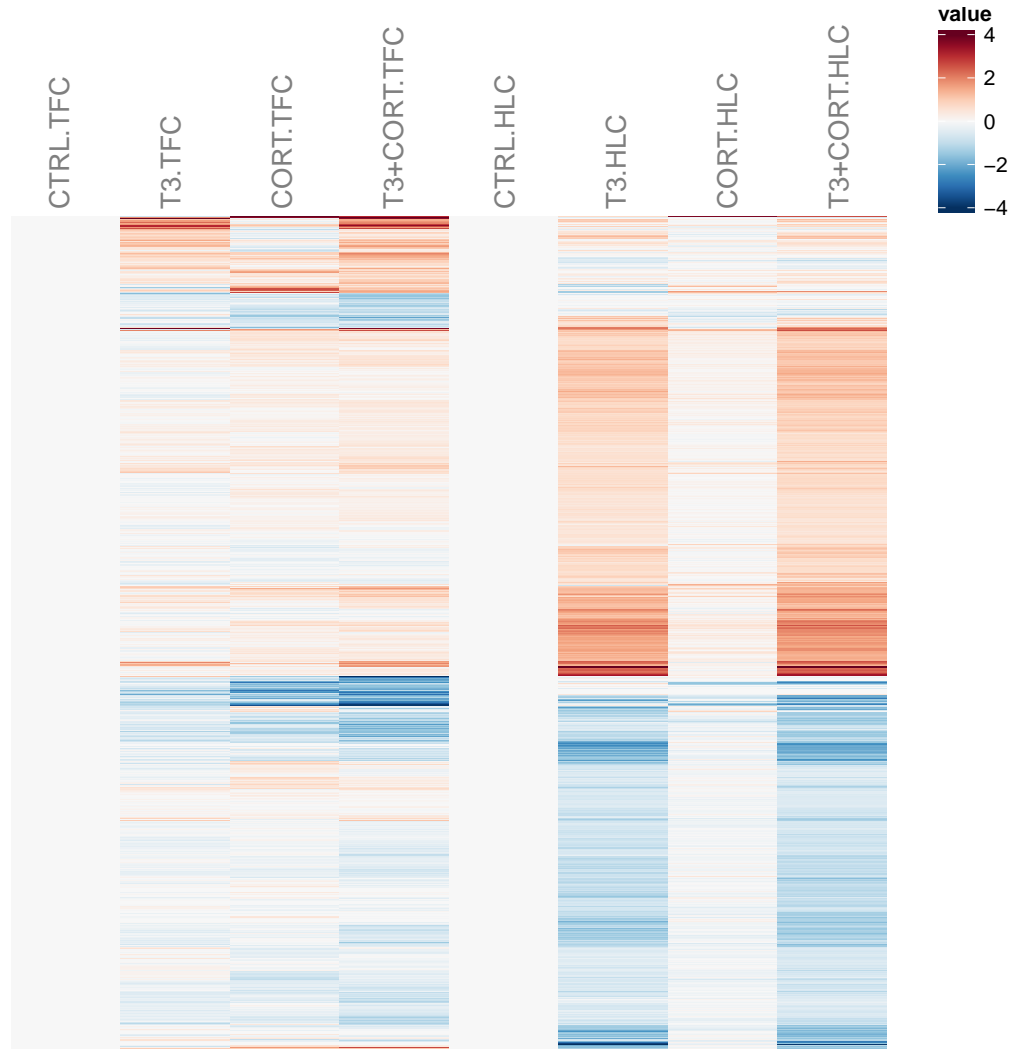


FIGURE 1.1 – Heatmap des profils d’expression des gènes différentiellement exprimés dans au moins une condition (pattes et queue confondues, 5392 gènes). Chaque ligne correspond à un gène. Chaque colonne correspond à un traitement dans les deux tissus considérés (TF : ".TFC" HLB : ".HLC"). L’intensité des couleurs rouge et bleues est proportionnelle au facteur d’induction de l’expression en \log_2 d’un gène donné dans un tissu donné et dans un traitement donné par rapport à la condition "contrôle" (CTRL.TFC et CTRL.HLC). Les facteurs d’induction ont été plafonnés à 4 afin que le contraste ne soit pas capturé par les gènes les plus fortement exprimés. La similarité des profils d’expression des gènes est exprimée en fonction de leur distance euclidienne. Cette mesure permet leur regroupement au sein de la figure. Le niveau d’expression des gènes qui ne sont pas exprimés dans un tissu est fixé à zéro et apparaissent en gris à travers les quatre traitements.

1.2 Vieillessement

Comme spécifié précédemment, une perturbation du signal thyroïdien durant la période périnatale ou la métamorphose peut avoir des conséquences délétères sur le long terme. J'ai donc sélectionné un ensemble de gènes impliqués dans un vieillissement prématuré des structures et fonctions biologiques à partir de la base de données HAGR (de Magalhães et al., 2005). Les profils d'expression de 222 orthologues (sur 289) sont présentés Figure 1.2a. Parmi les 222 gènes, 10 ont une expression spécifique du TFs ou des HLBs.

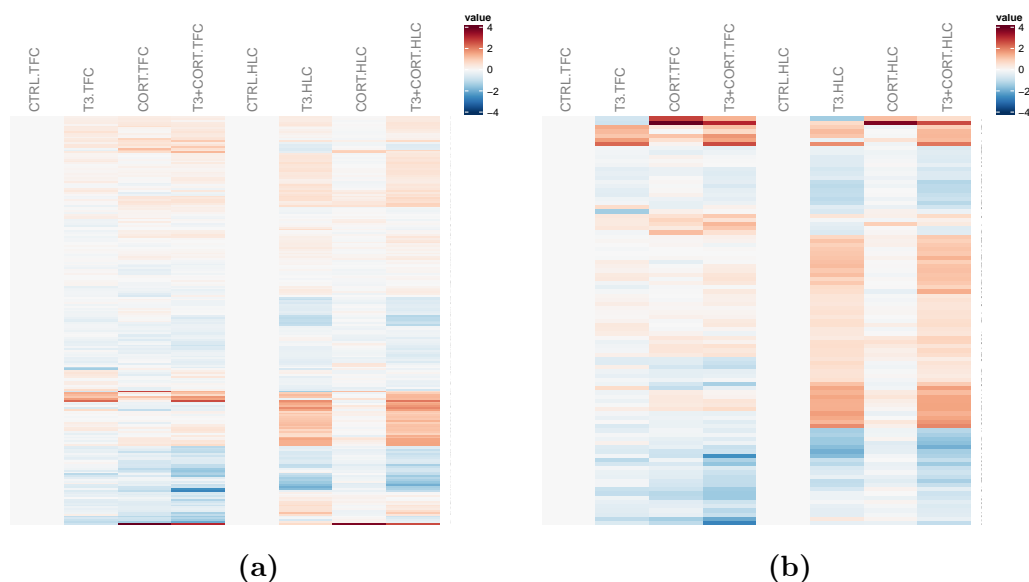


FIGURE 1.2 – Comparaison des profils d'expression, dans l'épiderme caudal et les bourgeons de membres postérieurs, des gènes impliqués dans le vieillissement. 1.2a Tous les gènes. 1.2b Sélection des gènes différentiellement exprimés dans au moins une condition (présentés Figure 1.1).

Après avoir filtré ce set de gène pour ne conserver que ceux qui sont différentiellement exprimés dans au moins une condition (97 gènes), il apparaît une dichotomie entre les deux tissus : Alors que dans les HLB 87 gènes sont affectés par au moins un des traitements hormonaux, seuls 25 le sont dans le TF (Figure 1.2b). Dans le TF, la 10 gènes sont spécifiques de ce tissu alors que 72 sont spécifiques des HLBs. De plus, tout tissu confondu, 72, 6 et 86 gènes sont régulés par la T_3 , la CORT (corticostérone) et le co-traitement avec les

deux hormones.

Parmi les gènes dont l'expression présente un profil d'“antagonisme” ou de “potentiation” HTs et les GCs, on trouve entre autres les orthologues de STAT-5 (transducteur du signal et activateur de la transcription 5, "signal transducer and activator of transcription 5")B ($\log_2(FC) = -0,11; 1,23; 0,66$ dans les traitements T_3 , CORT et T_3 +CORT respectivement), FOXO3 ($\log_2(FC) = 0,43; 0,61; 1,04$), IGF1R ($\log_2(FC) = 1,28; -0,03; 0,78$); GHR ($\log_2(FC) = -1,40; 0,20; 0,05$), RAD51 ($\log_2(FC) = -0,98; -1,12; -1,46$) dans le TF, CEBP α (protéine α de liaison à l'enhanceur/CCAAT, "CCAAT/enhancer-binding protein α ") ($\log_2(FC) = -0,25, 0,57, 1,24$), LEPR ($\log_2(FC) = -1,40, 1,23, 0,70$) dans les HLBs.

SOCS2 (supresseur de la signalisation des cytokines, 2, "suppressor of cytokine signaling 2") est induit par la T_3 dans les HLBs ($\log_2(FC) = 1,16, -0,20, 1,01$ dans les traitements T_3 , CORT et T_3 +CORT respectivement) et réprimé de façon “potentialisée” par les deux hormones dans le TF ($\log_2(FC) = -0,17, -0,72, -1,30$). Dans les deux tissus, l'induction de PCK1 CORT-dépendante ($\log_2(FC) = 3,74$ et $5,00$ dans les HLBs et le TF respectivement) est antagonisée par la T_3 ($\log_2(FC) = 2,67$ et $3,10$ respectivement).

1.3 Les modificateurs post-traductionnels des histones

Outre une action sur la mise en place des structures anatomiques et morphologiques, une perturbation de la signalisation thyroïdienne pourrait affecter la présence de modificateurs de la chromatine et influencer sur la spécificité spatiale et temporelle de déposition des marques. J'ai donc sélectionné sur la base de leur annotation GO (ontologie de gènes, "gene ontology"), les gènes impliqués dans la (dés)acétylation et la (dé)methylation des histones. La liste initiale comprend 241 gènes humains pour lesquels un orthologue chez le Xénope a pu être identifié. Dans le TF et les HLBs, 203 et 205 gènes respectivement sont exprimés (passent l'étape de "filtre indépendant", voir ??), pour un total de 209 gènes. La Figure 1.3a présente les profils d'expression de l'ensemble de ces gènes. Exceptés quelques sous ensembles de gènes et indépendamment de leur significativité d'expression différentielle, les profils d'expression entre le TF et les HLB restent similaires.

La Figure 1.3b présente uniquement les gènes différentiellement exprimés dans au moins une condition. Cela représente 17 gènes dans le TF et 73 gènes dans les HLB, pour un total de 80 gènes. Il ressort que la majorité des gènes ne sont différentiellement exprimés que dans les HLB. De façon intéressante, là encore le chevauchement entre les deux sous ensembles de gènes est restreint et souligne ici une spécificité tissulaire de la réponse. On notera par exemple que JHDM1D est, sous l'effet de la T_3 , réprimé dans les HLBs ($\log_2(FC) = -1,14; -0,17; -0,70$) mais induit dans le TF sous l'effet de la T_3 et de la CORT ($\log_2(FC) = 0,89; 1,35; 1,40$). NSD1 n'est induit par la T_3 dans les HLBs ($\log_2(FC) = 0,89; 1,35; 1,40$). NSD1 n'est induit par la T_3 dans les HLBs ($\log_2(FC) = 1,30; 0,17; 1,37$), de même que TRRAP ($\log_2(FC) = 1,14; 0,1; 1,19$).

Les gènes catégorisés comme cible d'une interaction entre HTs et GCs et impliqués dans la modification des histones incluent 6 gènes : CDK2 (potentié : $\log_2(FC) = -0,48; -0,66; -1,15$), GFI1B (induction CORT-

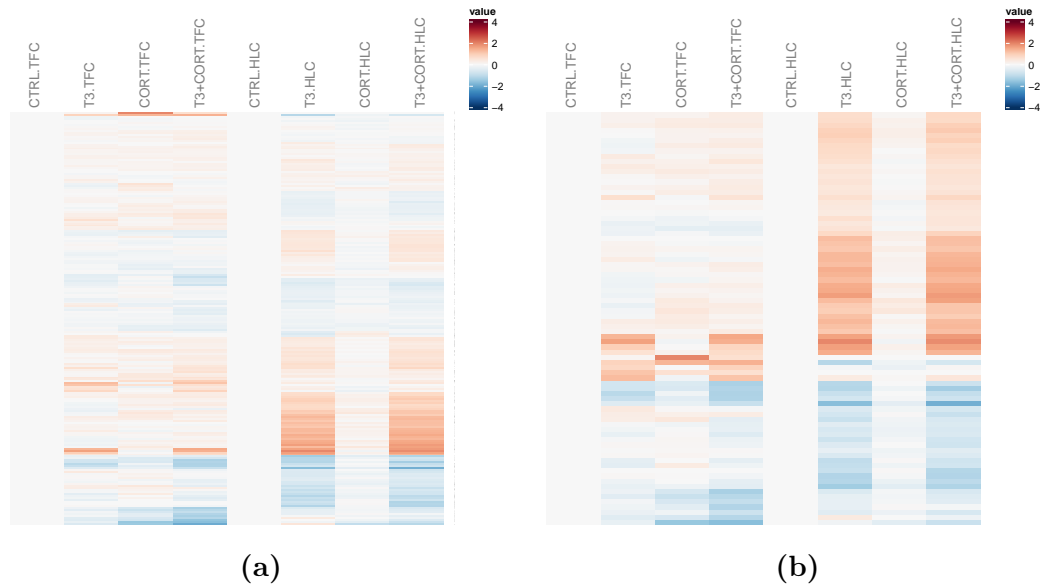


FIGURE 1.3 – Comparaison des profils d’expression, dans l’épiderme caudal et les bourgeons de membres postérieurs, des gènes impliqués dans les modifications post-traductionnelles d’histones. 1.3a : Tous les gènes. 1.3b : Sélection des gènes différentiellement exprimés dans au moins une condition.

dépendante antagonisée par la T_3 : $\log_2(FC) = 0,09; 1,97; 0,63$), PRKCB ($\log_2(FC) = -0,16; -0,42; -1,20$), PHF15 (réprimé de façon “potentiée” $\log_2(FC) = -0,76; -0,57; -1,28$), MECP2 ($\log_2(FC) = -0,92; -0,44; -1,22$), et SATB1 (réprimé de façon “potentiée” : $\log_2(FC) = -0,22; -0,69; -1,30$). Dans les HLB, aucun gène impliqué dans un effet croisé de la T_3 et de la CORT ne semble impliqué dans la modification des histones. Enfin, il est important de mentionner que certains gènes dans cette catégorie (et la suivante) paraissent au premier abord mal catégorisés. La raison est que les listes de gènes ont été obtenues programatiquement en utilisant la GO. Ainsi, MECP2, connu pour être essentiel dans la lecture de l’ADN (acide désoxyribonucléique) méthylé, n’est pas à strictement parlé impliqué dans les processus de méthylation. Il a été en revanche associé à la favorisation du dépôt de certaines modifications d’histones en fonction de l’état de méthylation d’un locus (Fuks et al., 2003).

1.4 La méthylation de l'ADN

La modification de l'épigénome peut aussi se traduire par la méthylation de l'ADN au niveau d'îlots CpG, en général associés à la répression de la transcription. De même que ce qui a été effectué dans la section précédente, j'ai sélectionné 43 gènes impliqués dans les processus de méthylation de l'ADN, dont 33 sont exprimés dans les tissus étudiés, avec 1 gène spécifiquement exprimé dans les HLBs. Leurs profils d'expression sont présentés Figure 1.4a.

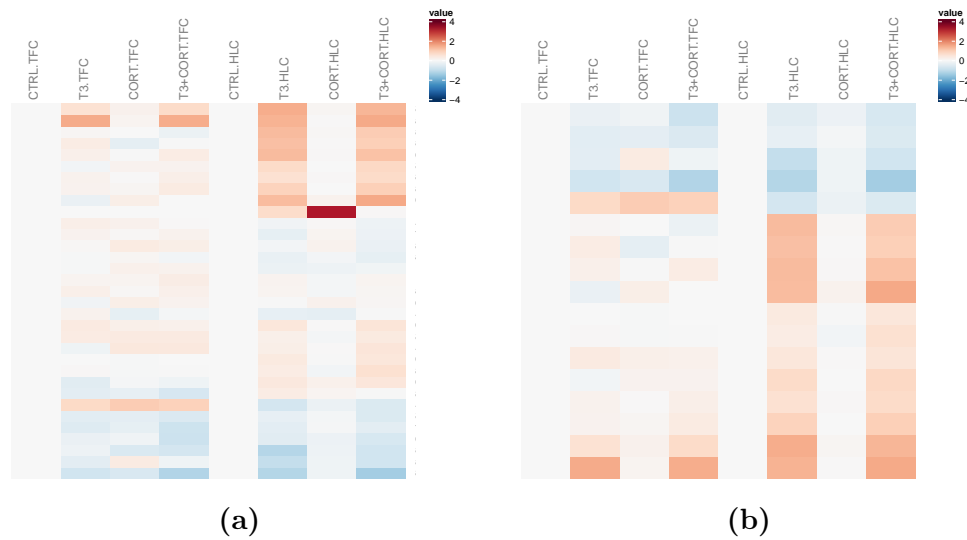


FIGURE 1.4 – Comparaison des profils d'expression, dans l'épiderme caudal et les bourgeons de membres postérieurs, des gènes impliqués dans la méthylation de l'ADN 1.4a Tous les gènes. 1.4b Sélection des gènes différentiellement exprimés dans au moins une condition.

On notera la présence d'un gène (TDRD9) pour lequel l'expression est très forte dans la condition CORT dans les HLBs. Celui-ci n'est pas inclu dans la Figure 1.3b car cette forte expression n'est validée que dans un seul des 3 répliquats biologiques. La variance importante associée à son expression dans ce tissu l'empêche donc de passer les seuils statistiques. Un total de 17 gènes sont différentiellement exprimés, dont 16 dans les HLBs. Seuls deux gènes sont en commun parmi les gènes différentiellement exprimés dans les deux tissus et leurs profils d'expression sont similaires. Il est intéressant de noter que sous l'action de la T₃ et de la CORT APOBEC2 est réprimé dans les HLBs mais

induit dans le TF. GSK3B est quant à lui induit par la T_3 spécifiquement dans les HLBs, de même que MGMT.

Aucun gène régulé de façon croisée par la T_3 et la CORT n'est retrouvé dans cette liste. En revanche, certains gènes montrent une tendance à une telle interaction entre les voies de signalisation. En particulier, UHRF1 (impliqué dans la maintenance de la méthylation de l'ADN), semble réprimé de façon "potentié" dans les deux tissus : $\log_2(FC) = -0,16; -0,03; -0,59$ dans les HLBs et $\log_2(FC) = -0,73; -0,76; -1,42$ dans le TF Enfin, il est important de préciser que MECP2 n'est pas inclu dans cette liste car il n'est pas impliqué dans la méthylation de l'ADN à proprement parler (voir section 1.3)

1.5 Métabolisme et signalisation des hormones thyroïdiennes

Enfin, je me suis intéressé à 17 gènes connus importants dans la signalisation, le métabolisme ou le transport des HTs afin de caractériser d'éventuelles interactions croisées à ce niveau. Les profils d'expression de 12 d'entre eux sont présentés Figure 1.5a.

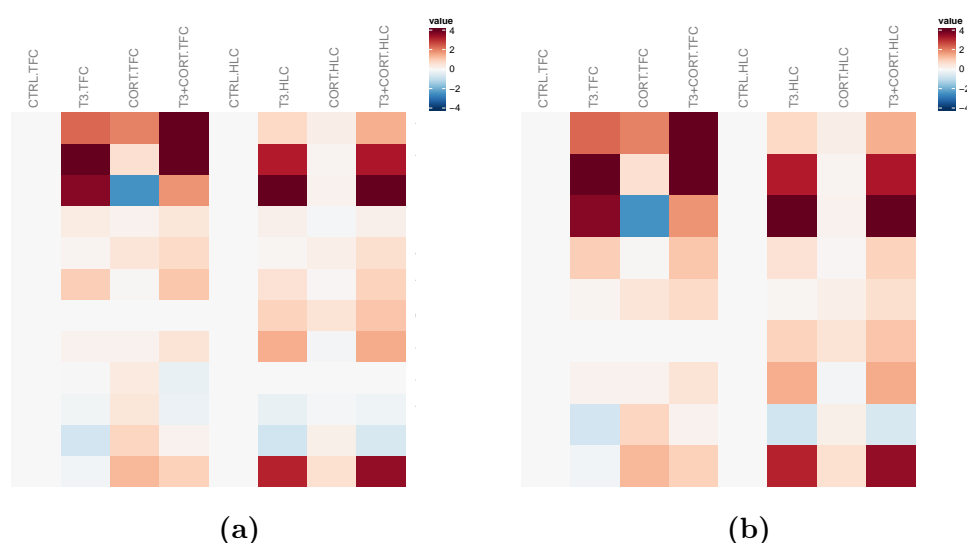


FIGURE 1.5 – Comparaison des profils d'expression, dans l'épiderme caudal et les bourgeons de membres postérieurs, des gènes impliqués dans la signlisation et le métabolisme des hormones thyroïdiennes. 1.5a Tous les gènes 1.5b Sélection des gènes différentiellement exprimés dans au moins une condition.

La majorité d'entre eux (9) sont différentiellement exprimés dans au moins un traitement (Figure 1.5b), dont 4 spécifiquement dans les HLBs. Il est intéressant de noter que l'expression d'un seul gène est fortement réprimée par les GCs, et uniquement dans le TF. Il s'agit de DIO3 (désiodase de type III), qui fait partie des gènes co-régulés par les deux hormones. Les autres gènes dont l'expression est potentialisée ou antagonisée par les HTs et les GCs incluent DIO2 (désiodase de type II) et MCT (transporteur d'ions monocarboxylate, "monocarboxylate transporter")⁸ dans le TF ; $TR\beta$ (TR, type β), RXR (récepteur à l'acide 9-*cis*-rétinoïque) β et RXR γ , DIO2 et DIO3 dans les HLBs. A noter que dans la

figure Figure 1.5, DIO3 dans les HLBs n'apparaît pas comme "antagonisé" car les facteurs d'induction ont été écrêtés à ± 4 afin de ne pas affecter le contraste pour les autres gènes.

L'expression de DIO2 est induite par la T_3 et la CORT dans le TF ($\log_2(FC) = 2.31$ respectivement) et dans une moindre mesure dans les HLBs. En présence des deux hormone, son expression est potentiée dans les deux tissus.

En ce qui concerne DIO3, elle est fortement induite par la T_3 dans le TF ($\log_2(FC) = 3.65$) et dans les HLBs ($\log_2(FC) = 5.76$). Alors que la CORT a peu d'effet sur sa transcription dans les HLBs, elle réprime fortement sa transcription dans le TF ($\log_2(FC) = -2.39$). Enfin, dans les deux tissus, le co-traitement induit une induction de la transcription moins forte que par la T_3 seule ($\log_2(FC) = 1.79$ dans le TF ; $\log_2(FC) = 4.52$ dans les HLBs).

les HTs induisent fortement la transcription de LAT (transporteur d'acides aminés de type L, "L-type amino-acid transporter")¹ dans les HLBs ($\log_2(FC) = 3.1$) mais pas dans le TF. Alors que MCT10 est légèrement induit par la T_3 dans les deux tissus, l'expression de MCT8 n'est pas affectée par la T_3 . Le traitement à la CORT induit marginalement la transcription de LAT1 et OATP (polypeptide transporteur d'anions organiques, "organic anions transporter polypeptide")^{1c1} dans les HLB et de MCT8 dans le TF, mais augmente de près d'un facteur 2.5 l'expression de LAT1 dans le TF. Enfin, le co-traitement induit la sur-expression de MCT8 et 10 dans les HLBs et le TF. L'expression de LAT1 lors du co-traitement suit les niveaux d'induction provoqués par la T_3 seule dans les HLBs et par la CORT seule dans le TF.

Deuxième partie

Discussion

Profils d'expression des gènes régulés par les hormones thyroïdiennes et les glucocorticoïdes

2.1 Une diversité de profils d'expression

2.1.1 Tous les profils d'expression ne sont pas dans la nature

La réponse de l'expression d'un gène en fonction d'un stimulus est processus finement régulé. Compte tenu de la multiplicité des actions des HTs et des GCs, nous aurions pu nous attendre à une combinatoire diversifiée et étendue. En ne considérant la modulation de l'expression d'un gène que comme un phénomène trinaire (pas d'effet, répression, induction), le traitement combiné avec les deux hormones pourrait donner lieu à 27 types de profils différents, et jusqu'à 125 si nous prenons en compte qualitativement les interactions possibles entre les deux hormones. Pourtant, au vu des données, la diversité d'action des HTs et des GCs est restreinte. En effet, en combinant les types de réponse dans les deux tissus, nous n'en comptons qu'à peine plus d'une quinzaine. Par exemple, des

profils correspondant à une répression de la transcription par chaque hormones et a une induction de la transcription lors d'un traitement combiné ne sont pas observés (le cas inverse non plus). De façon générale, il existe peu de profils pour lesquels le co-traitement induit une régulation de l'expression commune avec au moins un des traitements seuls.

Il est intéressant de noter que les deux tissus partagent essentiellement les mêmes types de profils (bien qu'en des proportions différentes). La seule exception concerne un type de profil propre au TF et correspondant à un antagonisme de la réponse à la CORT par la T_3 . Il est cependant important de relativiser ces observations car la tissu-spécificité que nous observons n'est pas liée à des profils spécifiques des tissus mais plutôt au nombre et à la composition en gènes régulés dans chacun des profils commun entre les deux tissus. Au niveau des proportions, nous avons mis en évidence que les gènes "potentiés" représentent plus de la moitié des gènes différentiellement exprimés dans le TF, ce qui contraste fortement avec les effectifs trouvés dans les HLBs. Les gènes présentant un profil d'expression d'"antagonisme" concernent environs le même nombre de gènes dans les deux tissus, mais correspondent à des proportion radicalement différente compte tenu des effectifs différents entre de gènes différentiellement exprimés dans au moins une condition.

2.1.2 Un programme commun entre les deux tissus

Cette section vise à discuter des gènes dont l'expression est affectée de façon similaire dans les deux tissus, et qui pourrait représenter le noyau dur de réseaux de régulation communs. Ces gènes pourraient ainsi faire partie d'une sorte de "caisse à outil" ubiquitaire répondant de façon stéréotypée aux régulations croisées par les deux hormones.

Toutefois, peu de gènes (81 gènes) sont sous l'effet des régulations croisées par les HTs et les GCs dans les deux tissus, quelque soit la nature des interactions. Ces gènes correspondent essentiellement au système immunitaire, à la biologie de la matrice extra-cellulaire, et au développement.

2.1.2.1 Des régulations croisées communes aux deux tissus

Parmi les gènes "potentiés" dans le TF et les HLBs, 61 sont en commun et participent à des processus immunitaires et l'inflammation. L'intersection des ensemble de gènes antagonisés dans un tissu mais pas dans le second se limitent à 8 gènes impliqués dans le métabolisme général et incluent DIO3 et MMP13L.

Il n'existe ainsi quasiment pas d'interactions croisées qui s'opposent dans les deux tissus ("potentiation" *vs* "antagonisme"). Malgré la forte hétérogénéité dans les différentes catégories (61 *vs* 8 gènes), ces gènes répondent à un même processus biologique, un remodelage accéléré des tissus. Les régulations croisées potentialise fortement l'expression de ces gènes, ce qui reflète un rôle "d'accélérateur" de la métamorphose. A l'inverse, les régulations croisées ne semble interférer qu'avec une minorité d ces gènes (seulement 8). Bien que cela ne présage pas des effets correspondants à plus long terme, cela suggère tout de même que les interactions croisées perturbent moins les processus développementaux qu'il ne les potentialise. Cela illustre peut être la robustesse des réseaux de régulation, qui sont connus pour jouer un rôle de tampon et/ou d'intégration de différent signaux.

2.1.2.2 Des régulations croisées spécifiques de chaque tissu

Alors que le changement (ou la conservation) du type d'interaction croisées entre les HLBs et le TF concerne une minorité de gènes, la majeure différence de régulation croisée entre les deux tissus concerne les gènes co-régulés dans un seul des deux tissus. On trouve ainsi que 795 gènes sont soumis à des régulations croisées dans le TF mais pas dans les HLBs. Ils correspondent essentiellement à des programmes développementaux. Ceci contraste avec les 236 gènes co-régulés dans les HLBs mais pas dans le TF. Ainsi, la régulation croisée de gènes par les deux hormones est majoritairement spécifique des tissus. Les effets transcriptionnels vont donc potentiellement sous-tendre des effets différents dans les deux tissus.

En conclusion, les interactions croisées affectent beaucoup plus les programmes transcriptionnel spécifiques de chaque tissu que les programmes transcriptionnels communs. Il est donc difficile d'avoir un pouvoir prédictif sur l'impact des régulations croisées à l'échelle de l'organisme, étant donné la forte tissu-spécificité de la réponse aux interactions croisées. Cette quasi absence de réponse "stéréotypée" aux régulations croisées par les HTs et les GCs à travers l'ensemble des tissus renforce l'importance de ne pas extrapoler les données d'un tissu à un autre.

La majorité des effets communs aux deux tissu concernent le système immunitaire et le remodelage de la matrice extracellulaire. Cependant, leur "implémentation" en terme de réseaux de gènes impliqués, peuvent avoir une forte composante tissu-spécifique.

Cette diversité de profils suggère l'existence d'un nombre limité de mécanismes moléculaires qui en sont à l'origine. Il est aussi intéressant de voir que certains gènes changent de catégories en fonction du tissu. Ceux-ci présentent une certaine complexité dans les mécanismes moléculaires impliqués dans ce type de comportement. Nous discuterons de deux niveaux où les deux signaux hormonaux peuvent interagir et ainsi affecter les niveaux d'expression de leurs gènes cibles.

- la compétence des tissus à répondre aux ligands
- le mécanisme d'action de leur récepteur respectif

2.1.3 Profils d'expression et compétence pour répondre aux hormones thyroïdiennes et aux glucocorticoïdes

La première étape pour qu'un signal hormonal agisse sur une cellule est l'entrée de ce signal dans la cellule. Pour les GCs, l'entrée suit un mécanisme passif qui ne représente donc pas un processus pouvant agir sur la concentration

en GCs dans la cellule. Nous nous concentrerons sur les HT qui elles ont besoin d'un transporteur.

2.1.3.1 Transporteurs cellulaires

Comme vu dans l'introduction, il existe plusieurs transporteurs. Dans la condition sans hormone, OATP1c1 n'est exprimé que dans les HLBs. Il n'y a pas de transporteur spécifiquement exprimé dans le TF. les HTs induisent fortement la transcription de LAT1 spécifiquement dans les HLBs. Au contraire, l'induction de son expression par la CORT est restreinte au TF. Il ne semble pas y avoir d'interaction croisée pour ce gène. Concernant MCT8 et MCT10, ils présentent tous deux un profil d'expression correspondant à une potentiation des effets d'une hormone par la seconde (additivité ou synergie).

Les transporteurs des hormones thyroïdiennes sont souvent impliquées aussi bien dans l'entrée et l'efflux des HTs. La potentiation de l'expression HT-dépendante (parfois tissu-spécifique) de transporteurs par la CORT suggère ainsi que les GCs vont favoriser le taux de renouvellement des HTs au sein de la cellule.

2.1.3.2 Métabolisme intracellulaire

Le second niveau de régulation de la disponibilité en ligand se fait au niveau de la métabolisation de précurseurs en facteurs actifs ou la conversion en des métabolites inactifs. Dans le cas des HTs, cette fonction est assurée par les désiodases. En ce qui concerne les GCs, les enzymes participant à la voie de biosynthèse des stéroïdes et les 11- β -HSD1 (11- β -hydroxystéroïde déhydrogenase/ Δ -5-4 isomérase, type 1) et 2 vont pouvoir assurer leur inter-conversion en d'autres métabolites stéroïdiens.

Métabolisme intracellulaire des hormones thyroïdiennes Comme mentionné dans l'introduction, les désiodase vont assurer l'activation et l'inactivation des HTs en jouant sur la désiodation d'atomes d'iodes a des

position spécifiques. La désiodase principalement activante, qui converti la T_4 (thyroxine) en T_3 , est la DIO2. La transcription de celle-ci est induite par les HTs et les GCs dans les deux tissus. Un co-traitement résulte en une expression plus forte qu'avec chaque hormone seule.

L'inactivation des HTs est principalement assurée par la DIO3. Dans les deux tissus, elle présente un profil d'expression de type antagonisme, ou les GCs semble inhiber en partie l'action des HTs sur son expression.

Ceci suggère que les GCs contribuent à l'augmentation de la forme majoritairement active T_3 dans les cellules. Il est cependant à noter, que les traitements hormonaux utilisés ici n'impliquent pas la T_4 . Les effet transcriptionnels sur la DIO2 sont donc, dans ce modèle, probablement le reflet de boucles de rétro-contrôle, mais ne vont pas participer à la potentiation de l'effet des HTs.

Métabolisme intracellulaire des glucocorticoïdes Concernant les GCs, leur quantité au sein des cellules est principalement régulée par les 11- β -HSD1 et 2. Compte tenu que les GCs peuvent agir *via* les MRs (récepteurs aux MCs), certains tissus comme les reins présentent une forte expression basale de 11- β -HSD2 (11- β -hydroxystéroïde déhydrogenase/ Δ -5-4 isomérase, type 2) afin de prévenir les effets de la corticostérone. Dans les HLB, son expression est réprimée par la T_3 et un co-traitement (la CORT seule n'a pas d'effet). Elle n'est pas exprimée dans le TF. La 11- β -HSD1 est principalement impliquée dans la conversion en corticostérone. Son expression n'est affectée par aucun traitement dans les HLBs, mais elle est fortement induite dans le TF par la CORT et dans une moindre mesure par la T_3 ($\log_2(FC) = 2.48$ et $\log_2(FC) = 0.95$ respectivement). Le co-traitement induit une expression moindre que lors du traitement à la CORT seule.

Ces résultats suggèrent des dynamiques de régulation de l'activation des GCs différentes selon les tissus : dans les HLBs, contrairement au TF, l'inactivation potentielle de la CORT va être empêchée par la T_3 , ce qui pourrait en partie expliquer l'effet très modeste de la CORT seule sur ce tissu.

Dans le TF mais pas dans les HLBs, la T_3 favorise l'expression de la 11- β -HSD1. Contrairement à DIO2 dont l'activité activatrice est unidirectionnelle, celle de la 11- β -HSD1 est bidirectionnelle, et cette dernière peut aussi présenter une activité réductase (inactivante). Il n'est par conséquent pas à exclure que l'augmentation de son expression dans le TF sous l'effet de la T_3 contribue à l'inactivation de la CORT et à une partie de l'"antagonisme" par les HTs des effets médiés par les GCs. En effet, dans le TF, un total de 63 gènes présentent un profil où l'effet de la CORT (inducteur ou répressif) est inhibé par le traitement à la T_3 .

2.1.3.3 Récepteurs

Enfin, dans le cadre des effets génomiques de ces deux hormones, les actions de ces dernières sur la transcription de gènes cibles nécessite la présence de leur récepteurs nucléaires respectifs.

Récepteurs aux hormones thyroïdiennes Les deux récepteurs aux HTs, $TR\alpha$ (TR, type α) et $TR\beta$ sont exprimés dans les deux tissus étudiés. Leur expression est fortement induite par la T_3 confirmant les résultats obtenus dans littérature. La CORT n'a que peu d'effet sur l'expression de ces deux gènes et n'affecte que marginalement l'expression de $TR\alpha$ dans les HLBs, suggérant que les effets des GCs sur la signalisation thyroïdienne ne passe par une régulation de la quantité de récepteurs, du moins dans les deux tissus étudiés ici.

Récepteurs aux corticostéroïdes GRs (récepteurs aux GCs) et MR sont exprimés dans les deux tissus. Son niveau d'expression de GR n'est cependant pas régulé, ni par la T_3 ni par la CORT. Au contraire, l'expression de MR est fortement induite dans les deux tissus par la T_3 ($\log_2(FC) = 2.32$ dans les HLBs et $\log_2(FC) = 1.97$ dans le TF). La CORT n'a cependant pas d'effet sur ses niveaux de transcrits.

Le fait que dans les HLBs la 11- β -HSD2 soit réprimée et que l'expression de MR soit induite par la T_3 suggère que dans ce tissu, la corticostérone pourrait

médier une partie de ses effets *via* MR. Des analyse complémentaire mériteraient d'être menées afin d'éclaircir ce point. En particulier, l'utilisation d'analogues des GCs ou des MCs (minéralocorticoïdes) spécifiques de chaque récepteur et des ChIPs (chromatin immunoprecipitations) dirigées contre MR ou GR pourraient renseigner sur la spécificité d'action de la corticostérone, de GR et de MR. Des anticorps gracieusement prêtés par R. Denver ne se sont pas révélé suffisamment spécifiques pour détecter un enrichissement de signal en ChIP-qPCR conventionnelle.

Pour conclure sur ces aspects, l'effet potentiateur des GC sur l'induction de la transcription HT-dépendante des transporteurs, ainsi que la répression relative de l'expression de DIO3 suggère une accumulation de d'HTs active au sein des cellules cible qui pourrait en partie expliquer les profils de type "potentiation". Dans les deux tissus les récepteurs spécifiques des différents ligands sont présent, renforçant l'idée que les tissus sont compétent pour répondre aux deux signaux hormonaux. Enfin, concernant spécifiquement les GC, il est interessant de noter que dans les HLBs, une partie des effets de la CORT pourrait être véhiiculée par MR. Cet aspet est d'autant plus intéressant qu'il est connu qu'en liant GR ou MR, la CORT ne va pas avoir le même répertoire de gènes cibles.

Un autre niveau où les deux signaux hormonaux peuvent interagir et ainsi affecter les niveaux d'expression de leurs gènes cibles est dans la manière dont les TRs (récepteurs aux HTs) et les GRs vont moduler l'expression d'un gène cible : leurs mécanismes d'action moléculaires.

2.2 Profils d'expression et mécanismes d'action des récepteurs aux hormones thyroïdiennes et aux corticostéroïdes

Il est très difficile d'établir un lien entre le mécanisme d'action des TRs ou GRs et les profils d'expression que nous avons mis en évidence. En effet, nous n'avons pas les informations permettant de distinguer les gènes cibles directs des gènes cibles indirects parmi les gènes des différents profils d'expression que nous avons observé. C'est à dire distinguer entre les gènes dont la régulation nécessite l'intervention des TRs ou des GRs directement sur leur niveau de transcription et les gènes dont la transcription est modulée par un autre facteur de transcription qui lui aura été préalablement sous le contrôle des TRs ou des GRs. Cependant, dans les différents profils d'expression que nous observons il est fortement probable qu'un certain nombre de gènes soit directement sous le contrôle des TRs et des GRs. En effet, même si leur nombre est faible, les gènes connus pour être régulés directement par les TRs ($TR\beta$, KLF9 (facteur similaire à krüppel 9, "krüppel-like factor 9") et TH/bZIP (facteur de transcription avec une glissière à leucine basique induit par les HTs, "thyroid hormone induced basic leucine zipper transcription factor")) et les GRs (KLF9, PEPCK (phosphoénolpyruvate carboxykinase)) le sont aussi dans nos travaux. De plus, les TRs et les GRs ont des effets versatiles. Ils sont capables à la fois d'activer ou de réprimer la transcription de gènes cibles en présence de leur ligand. Il y a donc des gènes cibles activés et des gènes cibles réprimés par le ligand lié à son récepteur. En général, le nombre de gènes associé à ce catégories reflète une action majoritairement activatrice des HTs (77 %) et répressive des GCs (57 %)

Il ne nous est pas possible de corrélér ces mécanismes d'action et les profils d'expression que nous observons. Mais, il ressort que le nombre de profils observés suggère plusieurs mécanismes différents pour expliquer qu'une hormone agisse

ce qui colle avec
...

2.2. PROFILS D'EXPRESSION ET MÉCANISMES D'ACTION DES RÉCEPTEURS AUX HORMONES THYROÏDIENNES ET AUX CORTICOSTÉROÏDES

sur l'expression d'un gène et que la seconde puisse affecter ce mécanisme. On peut subdiviser les types de profils correspondant à une "potentiation" ou à un "antagonisme" (indépendamment du sens des variations de niveau d'expression) sur la base du type de réponses aux hormones. Dans le cas de potentiation, le gène peut répondre à chaque hormone indépendamment, le co-traitement révélant un effet additif ou synergique. Le gène peut aussi ne répondre qu'à une seule des deux hormones seules, l'aspect potentiateur du co-traitement correspondant à une synergie d'action.

De la même manière, dans le cas d'antagonismes, deux scénarios apparaissent.

- dans le premier, l'effet d'une des deux hormones sur la transcription du gène cible est nullifié par la seconde sans que cette dernière n'ait d'effet par elle-même.
- dans le second scénario, la transcription du gène cible va être modulée par chaque hormone indépendamment et dans des sens opposés. En présence des deux hormones, la variation de transcrit sera le reflet d'une variation intermédiaire entre les effets de chaque hormone.

Pour les gènes activés par les ligands, il y a peu de mécanismes décrits dans la littérature : un mécanisme pour les TRs et trois pour les GRs (voir respectivement ?? et ?? *a*, *e* et *g*). Il existe aussi quelques variations autour de ces mécanismes permettant un niveau de finesse supérieure dans la régulation (vitesse de réponse, niveau de réponse). Pour les TRs, il a été observé que ces variations fines font intervenir, en fonction du gène cible, des différences de recrutement des récepteurs dépendant de la structure de la chromatine au niveau du site de fixation à l'ADN (Bilesimo et al., 2011) et des recrutements de co-régulateurs spécifiques (Havis et al., 2003). Un exemple bien connu de gène activé par les deux ligands est le gène KLF9 qui possède un élément régulateur composite permettant aussi bien la fixation de TR que celle de GR pour induire la transcription.

Quand le récepteur et son ligand sont des répresseurs de la transcription, il

il y a bien plus de mécanismes d'action proposés (voir respectivement pour TR et GR, ?? et ??) mais pour lesquels le détail est moins précis que pour la première catégorie (particulièrement pour les TRs).

Dans le cas des profils d'"antagonisation", on peut spéculer que des régulations opposées par chaque hormone s'annulant dans le cas d'un co-traitement pourrait avoir plusieurs origines :

- La compétition entre TR et GR pour un même élément de réponse, ou la régulation mutuellement exclusive de l'expression du gène par chaque récepteur activé.
- bla
- Enfin, on ne peut pas exclure la possibilité que des populations de cellules différentes pourraient n'être compétentes qu'à une seule de chaque hormones, la nullification des effets étant due au fait que la quantité de transcrits mesurée est une moyenne de l'état transcriptionnel de populations différentes.

De même, on peut attribuer aux HTs et aux GCs des mécanismes variés pour expliquer les effet de "potentiation" de leur action respective :

- bla
- bli

2.2. *PROFILS D'EXPRESSION ET MÉCANISMES D'ACTION DES
RÉCEPTEURS AUX HORMONES THYROÏDIENNES ET AUX
CORTICOSTÉROÏDES*

Fonction moléculaire des gènes régulés par les hormones thyroïdiennes et les glucocorticoïdes

3.1 Comparaison avec des données similaires

L'étude des effets des HTs et des GCs sur le transcriptome dans le contexte de la métamorphose présentés ici ne sont pas les premières publiées. (Kulkarni and Buchholz, 2012) ont étudié les effets de ces deux hormones sur le transcriptome de cultures de queues traitées ou non à la T_3 et / ou à la CORT. Il est à noter que les conditions expérimentales employées ne sont pas identiques à celles utilisées dans le cadre de cette thèse. En particulier, (Kulkarni and Buchholz, 2012) mesurent les variations de quantités de transcrits dans la queue entière, et pas seulement l'épiderme. Ils utilisent en outre des concentrations de T_3 5 fois supérieures à celles utilisées ici (50 nM vs 10 nM). Enfin, la technologie employée est différente (puce à ADN dans leur cas). L'ensemble de ces différences rend la comparaison directe de nos résultats avec les leurs délicate.

Dans cet article, les auteurs trouvent ~ 4500 gènes régulés par la T_3 et la CORT, comparé à ~ 3200 après traitement à la T_3 seule et ~ 1900 après un

traitement aux GCs seuls. Cela contraste fortement avec le nombre de gènes obtenus dans nos résultats (5 à 10 fois moins de gènes selon les conditions).

Les différence entre les deux études peuvent s'expliquer notamment par l'utilisation de plateformes et de démarche de traitement des données différentes :

- Les puces à ADN sont très bruitées comparé au RNA-Seq (séquençage des ARN, "RNA sequencing") (voir démarche expérimentale). De plus les corrélations des données de puces et de RNA-Seq sont de l'ordre de 0,7 à 0,8. Pour comparaison, la comparaison avec des données de RNA-Seq produites au laboratoire avec une technologie différente révèle une corrélation de 0,85 à 0.95. Ainsi, les biais propres à chaque technologie rend leur comparaison directe difficile.
- Dans l'article, les auteurs ne se sont basés que sur la p -value de l'analyse différentielle pour classer les gènes en fonction du type de profils d'expression. Nous avons vu que cette approche est discutable en raison du faible pouvoir statistique des données à haut débit (puces à ADN et NGS (nouvelle technologie de séquençage, "next-generation sequencing") confondues). Les catégories de gènes définies dans l'article sont donc bruitées et correspondent plus à une description 'technique' des résultats qu'à une description des différents profils d'expression des gènes.
- L'utilisation de tissus différents. (Kulkarni et al., 2011) utilisent la queue entière alors que nous nous sommes focalisés sur l'épiderme caudal. De plus, les traitements ont été effectués sur des culture de queues (ou de pattes) organotypiques, ce qui permet d'éliminer tout effet central possible.

3.2 spécificité fonctionnelle de certains profils

3.2.1 Rôle sur le système immunitaire

Aussi bien dans le TF que dans les HLBs, il est frappant de constater qu'une composante bien spécifique de la réponse immunitaire est affectée. Il est bien connu que les GCs ont une forte action anti-inflammatoire, et cet effet se retrouve à travers les gènes affectés par ce traitement hormonal. C'est le cas notamment de NF- κ B (facteur nucléaire κ B), NCF-1 (facteur cytosolique 1 des neutrophiles, "neutrophil cytosolic factor 1"), CD40 (CD40, membre 5 de la superfamille des récepteurs aux facteurs de nécrose tumorale, "CD40, tumor necrosis factor receptor superfamily, member 5"), ou IRF-7 (facteur de régulation des interférons 7, "interferon regulatory factor 7"). L'annotation manuelle et l'annotation automatisée des catégories fonctionnelles convergent toutes deux vers une action additive ou synergique des HTs et des GCs sur la répression de gènes du système immunitaire. Il est intéressant de noter que durant la métamorphose, le têtard va subir un remodelage du système immunitaire. Dans le contexte des travaux présentés ici, il semblerait que la perturbation de la signalisation thyroïdienne en réponse à un stress favorise un processus déjà initié par les HT et visant à "éteindre" le système immunitaire innée. Certaines interleukines comme IL8 ou IL1B sont en effet induites par les HTs (uniquement dans les HLBs), mais cet effet est antagonisé par les GCs.

Dans des modèles de tissu nerveux mammaliens, les HTs ont également été rapportée comme pro-inflammatoire (Tamura et al., 1999; Montesinos et al., 2012) (bien que passant par IL12, un gène n'ayant pas d'orthologue chez le xénope). Cette action pro-inflammatoire des HTs peut également passer par l'interaction avec STAT4, dont l'expression est réprimée par lors d'un co-traitement, suggérant que les GCs pourraient agir à ce niveau. Il est connu que les GCs sont aussi capable d'interférer avec le rôle immunostimulant des HTs, notamment via l'augmentation de cytokine pro-résolutives comme IL10. Cet effet n'est cependant pas observé dans notre modèle, suggérant que ce mécanisme

de balance entre HTs et GCs n'a pas lieu chez le Xénope ou que les acteurs moléculaires qui le sous-tendent n'ont pas été caractérisés. Toutefois, parmi les cytokines annotées chez le Xénope, aucune ne présente de profil d'expression correspondant à une induction forte par les GCs (IL10 n'est quasiment pas exprimé dans les deux tissus étudiés).

D'autres facteurs impliqués dans la réponse immunitaire innée sont affectés. En particulier, CD40, réprimé par les HTs et les GCs indépendamment, l'est fortement lors d'un co-traitement. La répression forte de ce récepteur lors d'un co-traitement suggère que l'interaction entre les deux voies de signalisation étudiées contribue à une désensibilisation à ce facteur. Il est à noter que le ligand correspondant (CD40lg) n'est pas exprimé, mais cela peut provenir d'une mauvaise définition des modèles de gènes dans l'annotation utilisée.

Enfin, on notera que SOCS2 est régulé de façon très différente selon les tissus. Dans les HLBs, son expression est induite par les HT, alors que dans le TF, son expression est réprimée par les GCs, et de façon potentialisée lors d'un co-traitement. Le produit de ce gène est impliqué dans le rétrocontrôle négatif qui régule la transduction du signal des cytokines. Il semblerait en particulier qu'il soit un régulateur négatif de la voie IGF (facteur de croissance similaires à l'insuline, "insulin-like growth factor")¹. Ses profils d'expression dans les deux tissus peut laisser penser que dans les HLBs, son induction par les HTs va contribuer à un contrôle de l'inflammation. En revanche dans le TF, où son expression est fortement réprimée par les HTs et les GCs, pourrait contribuer à l'emballement de l'inflammation dans un tissu en cours de résorption. Cet exemple illustre parfaitement la composante tissu-spécifique de l'action des GCs sur les processus d'inflammation.

3.2.2 Matrice extracellulaire

La régression de la queue et la pousse des pattes postérieures sont des processus qui font appel à des mécanismes cellulaires communs. En particulier, une réorganisation profonde de la structure fine de ces organes a lieu, notamment

via le remodelage de la matrice extracellulaire, et l'établissement de nouvelles structures keratineuses. Ce dernier point est appuyé par le fait que la structure de l'épiderme est un autre aspect à être profondément remodelé au cours de la métamorphose. De nombreux travaux ont déjà pointé le rôle important des HTs dans la régulation de gènes codant pour des métalloprotéinases et des collagénases . Les données présentées ici confirment le rôle des HTs dans l'induction de la transcription de nombreux membres de ces familles, notamment MMP3, MMP13, KRT17 (impliquée dans la modulation de $\text{TNF}\alpha$ (facteur α de nécrose tumorale, "tumor necrosis factor α ") *via* les voies Akt/mTOR; son expression est potentiée lors d'un co-traitement dans les HLBs) , KRT15 (fortement réprimée par les HTs) , KRT79 (fortement exprimée dans les HLBs et associée à un profil d'expression de type "potentiation", mais pas exprimée dans le TF) , et PAPPA2 (impliquée dans le remodelage de la matrice et régulée de manière opposée par les HTs et les GCs). Ces quelques cibles spécifiques d'un tissu ou sous l'effet d'une régulation croisée entre les deux hormones permet déjà de mettre en avant un rôle terminal hautement tissu spécifique des HTs. De plus, comme illustré dans le cas de PAPPA2, la régulation de la balance entre HTs et GCs pourrait avoir des conséquences locales sur la structure de la matrice.

ht et remodelage
matrice

L'importance de l'intégrité de la matrice extra-cellulaire ne se limite cependant pas uniquement à un rôle structural. En effet, la matrice va au moins en partie déterminer un certain nombre d'interaction entre cellules, orientant ces dernières vers des phases précises du cycle cellulaire. Un facteur en particulier, $\text{CEBP}\alpha$ semble impliqué dans le lien entre structure de la matrice et cyclage des cellules (Rana et al., 1994). Les auteurs suggerent dans cet article que la contribution de l'intégrité de la matrice sur l'entrée des cellules en G0 et sur les processus d'arrêt de croissance et de différenciation en général nécessitaient des niveaux élevés de $\text{CEBP}\alpha$. De façon intéressante, le gène codant pour ce facteur est fortement induit dans le TF et les HLBs sous l'effet de la T_3 . Additionnellement, dans les HLBs mais pas dans le TF, l'induction

T₃-dépendante est potentiée par la CORT. L'expression accrue de ce facteur lorsque les deux hormones sont présentes dans les HLBs pourrait donc contribuer à la différenciation précoce des structures et à la longueur finale réduite des membres postérieurs classiquement observée lors d'une métamorphose accélérée ou induite chez le Xénope et d'autres espèces d'amphibiens (Gomez-Mestre et al., 2013). Ceci concorderait également avec les résultats obtenus au niveau de l'ossification prématurée du squelette suite à un traitement combiné avec les deux hormones.

rappel phénotype skel, thyrotoxicose, s'en distingue par antago.

3.2.3 Possibles effets à l'échelle du tissu

Le travail conduit dans le cadre a été réalisé dans le contexte des effets génomiques de HTs et des GCs. Les effets non-génomiques, historiquement associés à des effets à court terme, peuvent cependant avoir des conséquences importantes dans la mise en place de structures biologiques. Il est frappant de constater que la fonction biologique de nombreux gènes co-régulés par les HTs et les GCs partage beaucoup de points communs avec les effets tissulaires des HTs passant par une voie non-génomique. En particulier, l'action sur le cytosquelette, la motilité cellulaire et des processus développementaux comme l'angiogenèse laisse penser qu'une partie de ces effets pourraient être véhiculés par l'interaction entre des mécanismes d'action génomiques et non-génomiques.

Conséquences fonctionnelles dans l'interaction avec l'environnement

4.1 Conséquences en terme d'adaptation

Jusqu'à présent, l'étude des régulations croisées entre HTs et GCs ont essentiellement été menées d'un point de vu biochimique (Kikuyama et al., 1982; Galton, 1990), moléculaire à l'échelle de quelques gènes (Bagamasbad et al., 2008; Krain and Denver, 2004) et histologique (Denver, 1993). Ce n'est que très récemment que ce sujet d'étude à commencé à bénéficier des techniques de mesure de l'expression de gènes à grande échelle. La littérature reste cependant sommaire à ce sujet, et les liens entre les interactions moléculaires, les fonctions des gènes associés et leurs conséquences phénotypiques n'est pas pleinement abordé.

Le travail présenté dans ce manuscrit peut être interprété dans le contexte des conséquences d'un stress sur le développement post-embryonnaire. Les données présentées ici montrent qu'une partie des gènes régulés par les HTs le sont également par les GCs lors d'un co-traitement. Mais il ressort aussi que certains gènes régulé par les HTs subissent un effet antagoniste des GCs. Les conséquences fonctionnelles sont potentiellement importantes, puisque l'action des GCs ne

va pas simplement potentialiser la signalisation thyroïdienne (expliquant en partie l'accélération de la métamorphose), mais va également interférer avec celle-ci. C'est une illustration typique de la robustesse des réseaux biologiques où un processus biologique suit son cours malgré des conditions adverses (Kitano, 2004). De plus, certains gènes régulés par les GCs sont antagonisés par les HTs, suggérant que la réponse physiologique à un stress va potentiellement différer selon le statut thyroïdien de l'individu ou son stade de développement post-embryonnaire.

Les fonctions physiologiques intégratives et en particulier la voie GCs de réponse au stress peuvent jouer un rôle essentiel dans la capacité des vertébrés à faire face aux changements globaux et aux environnements adverses tout en maintenant leur homéostasie (Angelier and Wingfield, 2013). Dans ce cas, la survie immédiate peut avoir lieu au détriment d'autres fonctions biologiques comme par exemple la reproduction. Ces mécanismes adaptatifs sont malgré tout flexible et leur rapport coût/bénéfice peut être ajusté par un rhéostat physiologique. Par exemple ce phénomène a déjà été observé chez le Xénope où la combinaison de stress de nature différente (variations de température et accessibilité réduite à la nourriture) entraine des variations dans le minutage de l'ossification, produisant ainsi des juvéniles de petite taille et dont le squelette est soit prématurément ossifié (Gomez-Mestre et al., 2010). Dans le cadre des traitements que nous avons réalisés sur l'animal entier, nous avons aussi pu observer une ossification prématurée qui reflète les altérations du transcriptome que nous avons caractérisées.

Il est tentant de faire le parallèle entre la balance coût/bénéfice des phénomènes adaptatifs au niveau écologique et les réponses moléculaires obtenues en laboratoire. Ils se placent à des niveaux de résolution et des échelles très différentes qui rendent toutes comparaisons hasardeuses. Tout au plus nous proposons des pistes qui permettraient de décrire des réponses moléculaires à certains stress (que nous ne connaissons pas).

4.2 Stress et épigénome

Il a été montré que les effets délétères d'un stress appliqué durant le développement post-embryonnaire pouvaient se manifester sous la forme de pathologies à l'âge adulte (par la reprogrammation métabolique ou la reprogrammation du rhéostat de la réponse aux stress). Nous avons pu mettre en évidence que l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le dépôt et la lecture de modifications de la chromatine (aussi bien la méthylation de l'ADN que la modification post-traductionnelle des queues d'histone) pouvait être régulée par les HTs, les GCs.

Parallèlement, l'expression de MECP2 (impliquée dans la lecture de l'ADN méthylé, Zou et al., 2012) est réprimée par la T_3 et la CORT et présente un légère potentialisation de cet effet lorsque les deux hormones sont présentes. La biologie de ce facteur est complexe, et il est difficile de tirer des conclusions sur sa fonction fine à l'échelle de l'organisme sur la base de son profil d'expression. On sait cependant que sa mutation provoque le syndrome de Rett. De plus, UHRF1 (impliqué dans la maintenance de la méthylation de l'ADN, Bostick et al., 2007; Liu et al., 2013) voit son expression réprimée par la T_3 et la CORT. Son expression est fortement réprimée lorsque les deux hormones sont présentes. On notera enfin que APOBEC2 (impliqué dans les processus de démethylation, Guo et al., 2011), est induit par la T_3 dans le TF mais pas dans les HLBs. Ceci suggère une différence tissu-spécifique de la dynamique de méthylation de l'ADN, avec une démethylation de l'ADN accrue dans la queue.

L'ensemble de ces résultats, suggère une caractéristique fondamentale de la métamorphose. Les HTs – et de façon plus marquée, le co-traitement des HTs et des GCs – contribue à diminuer l'expression de deux facteurs impliqués respectivement dans la lecture l'ADN méthylé et la maintenance de sa méthylation. Par simple effet statistique (et si la diminution de l'expression de ces gènes se traduit bien par une diminution de la quantité de protéine correspondante dans la cellule), ceci pourrait introduire une stochasticité accrue

dans les profils de méthylation de l'ADN Xie et al. (2011); Landan et al. (2012), et par extension une perte de fidélité dans le maintien de la méthylation de l'ADN. Malgré un "lissage" de la réponse lié à l'intégration au niveau des tissus de la variabilité de la réponse par chaque cellule, cette stochasticité moléculaire a des conséquences profondes au niveau des tissus et de l'organisme dans son ensemble. On observe en effet chez des grenouilles juvéniles issues de têtards traités aux GCs une grande variabilité dans l'amplitude du phénotype squelettique.

Enfin, il est bien caractérisé que la méthylation est indispensable au cours du développement précoce, et de la différenciation cellulaire (Monk et al., 1987; Meissner et al., 2008). Une altération ponctuelle des niveaux de méthylation pourraient ainsi participer à la modulation des balances entre types cellulaires au sein d'un tissu, induisant potentiellement une fonctionnalité altérée. Des études complémentaires dans d'autres organes sont nécessaires pour éclaircir ce point.

Bien que les niveaux d'expression de ces trois gènes ne deviennent pas nuls suite à un traitement hormonal, on peut spéculer que la déficience du maintien et de la lecture de la méthylation de l'ADN pourrait contribuer à une sensibilité accrue aux signaux environnementaux et à la re-programmation du génome.

Deux sources de variabilité : génétique (ctrl par hsp) adaptation

perspectives : certains tissus spécifiques non abordés (métabo etc ...) skel facile à observer.

Conclusions et Perspectives

5.1 Conclusions

En conclusion, ma thèse à consisté à mettre en évidence les interactions croisées entre les HTs et les GCs dans deux tissus au devenir différent.

Grande tissu spé de l'implémentation de fonctions bio affectées par les crosstalk, quels qu'ils soient.

Inclue des processus inattendus comme le système immun.

5.2 Perspectives

Annexes

Bibliographie

- Angelier, F. and Wingfield, J. C. (2013). Importance of the glucocorticoid stress response in a changing world : Theory, hypotheses and perspectives. *General and comparative endocrinology*, 190 :118–28.
- Bagamasbad, P., Howdeshell, K. L., Sachs, L. M., Demeneix, B. a., and Denver, R. J. (2008). A role for basic transcription element-binding protein 1 (BTEB1) in the autoinduction of thyroid hormone receptor beta. *The Journal of biological chemistry*, 283(4) :2275–85.
- Bilesimo, P., Jolivet, P., Alfama, G., Buisine, N., Le Mevel, S., Havis, E., Demeneix, B. a., and Sachs, L. M. (2011). Specific histone lysine 4 methylation patterns define TR-binding capacity and differentiate direct T3 responses. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 25(2) :225–37.
- Bostick, M., Kim, J. K., Estève, P.-O., Clark, A., Pradhan, S., and Jacobsen, S. E. (2007). UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science (New York, N.Y.)*, 317(5845) :1760–4.
- de Magalhães, J. a. P., Costa, J., and Toussaint, O. (2005). HAGR : the Human Ageing Genomic Resources. *Nucleic acids research*, 33(Database issue) :D537–43.
- Denver, R. J. (1993). Acceleration of anuran amphibian metamorphosis by corticotropin-releasing hormone-like peptides. *General and comparative endocrinology*, 91(1) :38–51.
- Fuks, F., Hurd, P. J., Wolf, D., Nan, X., Bird, A. P., and Kouzarides, T. (2003). The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *The Journal of biological chemistry*, 278(6) :4035–40.
- Galton, V. A. (1990). Mechanisms underlying the acceleration of thyroid hormone-induced tadpole metamorphosis by corticosterone. *Endocrinology*, 127(6) :2997–3002.

- Gomez-Mestre, I., Kulkarni, S., and Buchholz, D. R. (2013). Mechanisms and consequences of developmental acceleration in tadpoles responding to pond drying. *PloS one*, 8(12) :e84266.
- Gomez-Mestre, I., Saccoccio, V. L., Iijima, T., Collins, E. M., Rosenthal, G. G., and Warkentin, K. M. (2010). The shape of things to come : linking developmental plasticity to post-metamorphic morphology in anurans. *Journal of evolutionary biology*, 23(7) :1364–73.
- Guo, J. U., Su, Y., Zhong, C., Ming, G.-l., and Song, H. (2011). Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell*, 145(3) :423–34.
- Havis, E., Sachs, L. M., and Demeneix, B. a. (2003). Metamorphic T3-response genes have specific co-regulator requirements. *EMBO reports*, 4(9) :883–8.
- Kikuyama, S., Niki, K., Mayumi, M., and Kawamura, K. (1982). Retardation of thyroxine-induced metamorphosis by Amphenone B in toad tadpoles. *Endocrinologia japonica*, 29(5) :659–62.
- Kitano, H. (2004). Biological robustness. *Nature reviews. Genetics*, 5(11) :826–37.
- Krain, L. P. and Denver, R. J. (2004). Developmental expression and hormonal regulation of glucocorticoid and thyroid hormone receptors during metamorphosis in *Xenopus laevis*. *The Journal of endocrinology*, 181(1) :91–104.
- Kulkarni, S. S. and Buchholz, D. R. (2012). Beyond synergy : corticosterone and thyroid hormone have numerous interaction effects on gene regulation in *Xenopus tropicalis* tadpoles. *Endocrinology*, 153(11) :5309–24.
- Kulkarni, S. S., Gomez-Mestre, I., Moskalik, C. L., Storz, B. L., and Buchholz, D. R. (2011). Evolutionary reduction of developmental plasticity in desert spadefoot toads. *Journal of Evolutionary Biology*, 24 :no–no.
- Landan, G., Cohen, N. M., Mukamel, Z., Bar, A., Molchadsky, A., Brosh, R., Horn-Saban, S., Zalcenstein, D. A., Goldfinger, N., Zundelovich, A., Gal-Yam, E. N., Rotter, V., and Tanay, A. (2012). Epigenetic polymorphism and the stochastic formation of differentially methylated regions in normal and cancerous tissues. *Nature genetics*, 44(11) :1207–14.
- Liu, X., Gao, Q., Li, P., Zhao, Q., Zhang, J., Li, J., Koseki, H., and Wong, J. (2013). UHRF1 targets DNMT1 for DNA methylation through cooperative binding of hemi-methylated DNA and methylated H3K9. *Nature communications*, 4 :1563.
- Meissner, A., Mikkelsen, T. S., Gu, H., Wernig, M., Hanna, J., Sivachenko, A., Zhang, X., Bernstein, B. E., Nusbaum, C., Jaffe, D. B., Gnirke, A., Jaenisch,

- R., and Lander, E. S. (2008). Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature*, 454(7205) :766–70.
- Monk, M., Boubelik, M., and Lehnert, S. (1987). Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development. *Development (Cambridge, England)*, 99(3) :371–82.
- Montesinos, M. M., Alamino, V. a., Mascanfroni, I. D., Susperreguy, S., Gigena, N., Masini-Repiso, A. M., Rabinovich, G. a., and Pellizas, C. G. (2012). Dexamethasone counteracts the immunostimulatory effects of triiodothyronine (T3) on dendritic cells. *Steroids*, 77(1-2) :67–76.
- Rana, B., Mischoulon, D., Xie, Y., Bucher, N. L., and Farmer, S. R. (1994). Cell-extracellular matrix interactions can regulate the switch between growth and differentiation in rat hepatocytes : reciprocal expression of C/EBP alpha and immediate-early growth response transcription factors. *Molecular and cellular biology*, 14(9) :5858–69.
- Tamura, M., Matsuura, B., Miyauchi, S., and Onji, M. (1999). Dendritic cells produce interleukin-12 in hyperthyroid mice. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, 141(6) :625–9.
- Xie, H., Wang, M., de Andrade, A., Bonaldo, M. d. F., Galat, V., Arndt, K., Rajaram, V., Goldman, S., Tomita, T., and Soares, M. B. (2011). Genome-wide quantitative assessment of variation in DNA methylation patterns. *Nucleic acids research*, 39(10) :4099–108.
- Zou, X., Ma, W., Solov'yov, I. A., Chipot, C., and Schulten, K. (2012). Recognition of methylated DNA through methyl-CpG binding domain proteins. *Nucleic acids research*, 40(6) :2747–58.