

COMPARAISON DES MARQUEURS HORMONAUX ET HISTOMORPHOMETRIQUES CHEZ LA SOURIS DANS UN MODELE D'HYPOTHYROIDIE APRES 28 JOURS DE TRAITEMENT AU PTU PAR VOIE ALIMENTAIRE

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Lise MIALON

Née, le 05/11/1994 à LONGJUMEAU (91)

et

Thibaud BANQUET

Né, le 11/10/1995 à BEZIERS (34)

Directrice de thèse : Mme Nathalie BOURGES-ABELLA

JURY

PRESIDENTE :

Mme Frédérique SAVAGNER

Professeure à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSEESSEURS :

Mme Nathalie BOURGES-ABELLA

Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Mme Martine KOLF-CLAUW

Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Membre invitée

Mme Catherine VIGUIE

Directrice de Recherche UMR Toxalim INRAE

**Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

Directeur : Professeur Pierre SANS

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Pharmacologie - Thérapeutique*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 1° CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie Vétérinaire*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- Mme **HAGEN-PICARD, Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

PROFESSEURS 2° CLASSE

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
- M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*

PROFESSEURS CERTIFIÉS DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
- M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAÎTRES DE CONFÉRENCES HORS CLASSE

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*

- Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
 M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
 M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
 M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
 Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
 Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
 M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
 Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
 Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
 Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
 M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
 M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
 Mme **DANIELS Hélène**, *Immunologie- Bactériologie-Pathologie infectieuse*
 Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et Industrie des aliments*
 Mme **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
 M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
 Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
 Mme **GRANAT Fanny**, *Biologie médicale animale*
 Mme **JOURDAN Géraldine**, *Anesthésie - Analgésie*
 Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*
 Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
 M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
 M. **LHERMIE Guillaume**, *Economie de la santé animale*
 M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
 Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
 Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
 M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
 Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
 Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
 M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire – Maladies animales règlementées*
 Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT CONTRACTUELS

- M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et Industrie des aliments*
 M. **LEYNAUD Vincent**, *Médecine interne*
 Mme **ROBIN Marie-Claire**, *Ophthalmologie*
 Mme **ROMANOS Lola**, *Pathologie des ruminants*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mme **BLONDEL Margaux**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
 M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie-Imagerie médicale*
 M. **COMBARROS-GARCIA Daniel**, *Dermatologie vétérinaire*
 M. **GAIDE Nicolas**, *Histologie, Anatomie Pathologique*
 M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
 M. **LESUEUR Jérémy**, *Gestion de la santé des ruminants – Médecine collective de précision*
 M. **TOUITOU Florian**, *Alimentation animale*

REMERCIEMENTS

A Madame le Professeur Frédérique Savagner

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

Biochimie et Biologie moléculaire Toulouse Purpan

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse. Hommages respectueux.

A Madame le Professeur Nathalie Bourgès-Abella

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Histologie

Qui nous a fait l'honneur d'accepter de diriger notre thèse. Pour nous avoir guidé tout au long de ce projet et pour le temps consacré. Qu'elle trouve ici l'expression de notre sincère reconnaissance. Merci.

A Madame le Professeur Martine Kolf-Clauw

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pharmacie-Toxicologie

Qui nous a fait l'honneur d'accepter de faire partie du jury de thèse. Sincères remerciements.

A Madame le Docteur Catherine Viguié

Docteur vétérinaire

Directrice de recherche de l'INRAE

Qui nous a fait l'honneur d'accepter de faire partie du jury de thèse. Sincères remerciements.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ANNEXES	9
TABLE DES FIGURES	10
TABLE DES TABLEAUX	12
LISTE DES ABREVIATIONS	13
INTRODUCTION.....	15
CHAPITRE 1 : LA GLANDE THYROÏDE CHEZ LA SOURIS	17
A. Embryologie	17
B. Anatomie	18
1. Topologie	18
2. Vascularisation et innervation	19
C. Histologie	20
1. Le follicule thyroïdien.....	22
2. Cellules C ou cellules parafolliculaires.....	25
D. Physiologie de la fonction thyroïdienne.....	26
1. Synthèse des hormones thyroïdiennes iodées	26
2. Régulation de la synthèse des hormones thyroïdiennes iodées.....	30
a. TRH acteur central de la régulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire thyroïdien	30
b. La TSH, hormone activatrice de la synthèse des hormones thyroïdiennes iodées	31
3. Métabolisme des hormones thyroïdiennes.....	32
a. Déiodination des hormones thyroïdiennes.....	32
b. Glucuroconjugaison des hormones thyroïdiennes	33
c. Sulfonation des hormones thyroïdiennes	34
d. Désamination et décarboxylation des hormones thyroïdiennes.....	34
e. Oxydation des hormones thyroïdiennes.....	35
CHAPITRE 2 – Le 6-n-Propylthiouracile, un antithyroïdien	36
A. Propriétés physiques et chimiques du PTU	36
1. Propriétés pharmacocinétiques	36
2. Propriétés pharmacodynamiques	37
a. Action intra-thyroïdienne du PTU.....	37
b. Action extra-thyroïdienne du PTU.....	37
B. Effets sur la fonction thyroïdienne chez le rat et la souris	39

1.	Effets sur la fonction thyroïdienne chez le rat	39
a.	Effets sur les concentrations des hormones thyroïdiennes du rat	39
b.	Effets sur la structure histologique de la thyroïde du rat	40
2.	Effets sur la fonction thyroïdienne chez la souris	41
a.	Effets sur les concentrations des hormones thyroïdiennes de la souris.....	41
b.	Effets sur la structure histologique de la thyroïde de la souris.....	42
CHAPITRE 3 – Etude expérimentale		43
A.	Matériels & méthodes	43
1.	Animaux.....	43
2.	Aliment	44
3.	Méthodologie expérimentale.....	45
a.	Plan expérimental	45
b.	Procédures expérimentales	45
i.	Modalités de collecte des spécimens sanguins et tissulaires.....	45
ii.	Modalités de traitement des échantillons	46
4.	Modalités d’analyse des échantillons.....	47
a.	Analyse des dosages hormonaux	47
i.	Dosages HPLC des hormones thyroïdiennes T3, T4 (et rT3).....	47
ii.	Dosage ELISA de TSH	48
b.	Analyses histologique et histomorphométrie.....	49
5.	Analyse des résultats.....	51
B.	Résultats	51
1.	Animaux.....	51
2.	Poids et consommation alimentaire	51
3.	Concentrations hormonales.....	52
a.	Concentration hormonale en T4	52
b.	Concentration hormonale en T3	54
c.	Concentration hormonale en TSH.....	55
4.	Analyse histologique.....	55
a.	Groupe contrôle	57
b.	Groupe traité 1 ppm	57
c.	Groupe traité 5 ppm	58
d.	Groupe traité 10 ppm	59
e.	Groupe traité 100 ppm	60

5.	Analyse morphométrique.....	62
a.	Mesure macroscopique des lobes thyroïdiens.....	62
b.	Surface de coupe, nombre total de follicules et densité folliculaire	62
c.	Surface folliculaire totale, surface colloïde, surface épithéliale et indice d'activité	65
6.	Corrélation entre données hormonales et histologiques	68
a.	Corrélation entre concentration hormonale en T4 à J28 et surface moyenne de la colloïde des follicules thyroïdiens.....	68
b.	Corrélation entre concentration hormonale en T4 à J28 et surface moyenne épithéliale des follicules thyroïdiens	69
c.	Corrélation entre concentration hormonale en T4 à J28 et indice d'activité des follicules thyroïdiens	70
d.	Corrélation entre concentration hormonale en T4 à J28 et densité folliculaire	71
C.	Discussion	72
1.	Le modèle souris.....	72
2.	Diminution de T4 dose-dépendante	73
3.	Lésion d'hyperplasie folliculaire diffuse de la thyroïde.....	75
4.	Indice d'activité, densité folliculaire et corrélations avec la baisse de T4	76
5.	Bilan et Perspectives	78
	CONCLUSION	80
	BIBLIOGRAPHIE	81
	ANNEXES	86

TABLE DES ANNEXES

Annexe 1 - Recommandation de l'OECD (TG 407) pour l'évaluation réglementaire in vivo des perturbateurs endocriniens.....	86
Annexe 2 - Protocole dosage TSH Kit ELISA Cloud-Clone Corp.....	87
Annexe 3 – Mesure de la densité folliculaire de la coupe médiane du lobe droit d'une souris du groupe contrôle	89
Annexe 4 – Mesure de l'indice d'activité de follicules thyroïdiens.....	90
Annexe 5 – Analyse histologique conventionnelle des coupes de thyroïdes en microscopie photonique	91

TABLE DES FIGURES

Figure 1 - Anatomie topographique des glandes thyroïdes chez la Souris	19
Figure 2 - Vascularisation de la tête et du cou chez la souris	20
Figure 3 - Coupe transversale en région cervicale chez la souris CD1	21
Figure 4 - Histologie topographique d'un lobule de glande thyroïde de Mammifère.....	21
Figure 5 - Follicules thyroïdiens chez la souris CD1 (Hémalun-éosine)	22
Figure 6 - Structure histologique d'un follicule thyroïdien de mammifère	22
Figure 7 - Thyroïde de souris âgée, présence de nombreux grands follicules au repos (coloration hémalun-éosine).....	23
Figure 8 - Ultrastructure des cellules thyroïdiennes.....	24
Figure 9 - Révélation de la calcitonine présente dans les cellules C par Immunohistochimie	25
Figure 10 - Synthèse des hormones thyroïdiennes à l'échelle du thyrocyte	27
Figure 11 - Structure chimique des précurseurs d'hormones thyroïdiennes.....	28
Figure 12 - Structure chimique des hormones thyroïdiennes T4 (thyroxine) et T3 (triiodothyronine)	28
Figure 13 - Biosynthèse des hormones thyroïdiennes iodées à l'échelle du follicule thyroïdien	29
Figure 14 - Mécanisme de régulation de la synthèse de thyrotropine (ou TSH) par la TRH.	30
Figure 15 - Mécanisme cellulaire résultant de l'activation par la TSH sur les follicules thyroïdiens.....	32
Figure 16 - Structure chimique de la thyroxine et localisation du site d'action des déiodinases	33
Figure 17 - Métabolisme des hormones thyroïdiennes	35
Figure 18 - Structure chimique du 6-n-PropylThiouracil (PTU)	36
Figure 19 - Mécanisme de régulation de la fonction thyroïdienne lors d'un traitement au PTU	37
Figure 20 - Synthèse des effets du 6-n-PropylThiouracil (PTU) sur le métabolisme thyroïdien	38
Figure 21 - Frise chronologique situant les différentes phases de l'expérimentation.....	45
Figure 22 - Ensemble thyroïde-trachée-œsophage avant recoupe	46
Figure 23 - Représentation des niveaux de coupes histologiques (N1 à N5) sur le bloc « trachée -lobes thyroïdiens » observé en vue ventrale.....	47
Figure 24 - Illustration de la méthode de mesure manuelle de l'indice d'activité.....	50
Figure 25 - Représentation schématique des mesures réalisées sur la thyroïde.....	50
Figure 26 - Evolution de la concentration moyenne en hormone thyroïdienne T4 circulante mesurée par méthode HPLC pour les groupes contrôle et traités au PTU en début d'étude puis 14 et 28 jours après le début de l'exposition.....	52
Figure 27 - Evolution de la concentration moyenne en hormone thyroïdienne T3 circulante mesurée par méthode HPLC pour les groupes contrôles et traités au PTU en début d'étude puis 14 et 28 jours après le début de l'exposition	54
Figure 28 - Concentration moyenne en TSH plasmatique mesurée par dosage ELISA à J28 en fonction de la dose de PTU administrée.....	55

Figure 29 - Photographies à des faibles grossissements de la coupe histologique de la lésion de dysplasie folliculaire de l'animal du groupe 5 ppm (Hémalun-éosine).....	56
Figure 30 - Photographie d'une coupe histologique de glande thyroïde d'une souris du groupe contrôle.....	57
Figure 31 - Photographie d'une coupe histologique de glande thyroïde d'une souris du groupe 1 ppm	58
Figure 32 - Photographie d'une coupe histologique de glande thyroïde d'une souris du groupe 5 ppm.....	58
Figure 33 - Photographie d'une coupe histologique de glande thyroïde d'une souris du groupe 10 ppm.....	59
Figure 34 - Photographie d'une coupe histologique de glande thyroïde d'une souris du groupe 100 ppm.....	60
Figure 35 - Représentation de l'évolution graduelle des modifications histologiques de la thyroïde observées aux différentes doses de PTU	61
Figure 36 - Taille moyenne des lobes thyroïdiens en fonction de la dose de PTU	62
Figure 37 - Surface moyenne des lobes thyroïdiens des coupes histologiques médianes en fonction de la dose de PTU	63
Figure 38 - Nombre moyen de follicules des coupes histologiques médianes en fonction de la dose de PTU	63
Figure 39 - Densité folliculaire moyenne de la coupe histologique médiane en fonction de la dose de PTU	64
Figure 40 - Surface moyenne des follicules thyroïdiens en fonction de la dose de PTU.....	65
Figure 41 - Surface moyenne de la colloïde des follicules thyroïdiens en fonction de la dose de PTU.....	65
Figure 42 - Surface moyenne épithéliale des follicules thyroïdiens en fonction de la dose de PTU	66
Figure 43 - Indice d'activité moyen des follicules thyroïdiens en fonction de la dose de PTU	67
Figure 44 - Evolution de la surface moyenne de colloïde en fonction de la concentration en T4 à J28.....	68
Figure 45 - Evolution de la surface moyenne épithéliale en fonction de la concentration en T4 à J28.....	69
Figure 46 - Evolution de l'indice d'activité des follicules thyroïdiens et de la concentration hormonale en T4 à J28 en fonction de la dose de PTU	70
Figure 47 - Evolution de l'indice d'activité des follicules thyroïdiens en fonction de la concentration en T4 à J28.....	70
Figure 48 - Evolution de la densité folliculaire en C3 et de la concentration hormonale en T4 à J28 en fonction de la dose en PTU	71
Figure 49 - Evolution de la densité folliculaire moyenne en C3 en fonction de la concentration en T4 à J28	71

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Consommation moyenne de PTU.....	52
Tableau 2 : Comparaison des concentrations plasmatiques en T4	53

LISTE DES ABREVIATIONS

AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique
APS : Acide Périodique-Schiff
ATP : Adénosine TriPhosphate
CQ : Contrôle Qualité
DAG : DiAcylGlycerol
DIO : Déiodinase
DIT : di-iodo-tyrosine
ELISA : Enzyme Linked Immuno Assay
GDP : Guanosine DiPhosphate
GTP : Guanosine TriPhosphate
H₂O₂ : eau oxygénée
HE : Hémalun-Eosine
HPLC : High Performance Liquid Chromatography
I⁻ : Iodure
I₂ : Diiode
IA : Indice d'Activité
IARC : International Agency for Research on Cancer
IP₃ : inositol trisphosphate
LAT : Large Amino-acid Transporter
MCT : MonoCarboxylate Transporter
MDR : MultiDrug Resistance
MIT : mono-iodo-tyrosine
NIS : Na/I Symporter
NTCP : Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide
OATP : Organic Anion Transporting Polypeptide
PIP₂ : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PTU : PropylThioUracile
RIA : Radio Immuno Assay

rT3 : reverse T3

RXR : Récepteur X Rétinoïde

SI : Standard Interne

T2 : 3,5-Diiodo-L-Thyronine

T3 : triiodothyronine

T3G : forme glucuronoconjuguée de la T3

T3S : forme sulfonoconjuguée de la T3

T4 : thyroxine

T4G : forme glucuronoconjuguée de la T4

T4S : forme sulfonoconjuguée de la T3

TBG : Thyroxine Binding Globulin

TBPA : Thyroxine Binding Pre-Albumine

Tetrac : tétraiodothyroacétique

Tetram : tétraiodothyronamine

Tg : Thyroglobuline

TPO : ThyroPerOxydase

TR : Thyroid Receptor (récepteurs des hormones thyroïdiennes)

TRH : Thyroïd Releasing Hormone ou hormone thyroïdienne

Triac : triiodothyroacétique

Triam : triiodothyronamine

TSH : Thyroïd Stimulating Hormone ou Thyroestimuline ou Thyroïdostimuline

INTRODUCTION

L'utilisation des produits phytosanitaires tient aujourd'hui une place prépondérante dans les pratiques agricoles bien que celle-ci soit de plus en plus controversée. En effet, outre leur impact sur la biodiversité, leur persistance dans l'eau et les aliments implique une contamination de l'homme via son alimentation. Nombre de ces produits se retrouvent ainsi systématiquement dans la circulation sanguine des populations occidentales non professionnellement exposées comme le montrent plusieurs études (INSERM, 2007). La question des conséquences possibles de ces résidus sur la santé humaine se pose donc inévitablement.

Face à la recrudescence d'études sur les effets des pesticides sur les voies endocrines majeures, une grande majorité d'entre eux sont classés perturbateurs endocriniens (Leemans et al., 2019). L'Organisation Mondiale de la Santé (2002) définit les perturbateurs endocriniens comme des « substances chimiques d'origine naturelle ou artificielle étrangères à l'organisme qui peuvent interférer avec le fonctionnement du système endocrinien et induire ainsi des effets délétères sur cet organisme ou sur ses descendants ». Ainsi, les perturbateurs endocriniens ne peuvent être considérés comme une substance « toxique » à proprement parler car une relation dose-effet répétable ne peut être établie. De même, un seuil de toxicité ne peut être déterminé. L'effet cocktail est également particulièrement incriminé dans la complexité de la perturbation endocrinienne, bien que très peu d'études aient évalué les effets synergiques à faible doses de ces produits. La notion de vulnérabilité est importante, puisqu'une exposition (même minime) sur une fenêtre clé du développement d'un organisme telle que la gestation ou la puberté peut être lourde de répercussion sur les fonctions endocrines.

Les perturbateurs endocriniens constituent aujourd'hui un nouveau défi à la fois de santé publique et d'effet sur l'environnement face auxquels les instances d'évaluation et de régulation sont mal armées. Actuellement, les méthodes d'évaluation réglementaires *in vivo* des perturbateurs endocriniens s'effectuent selon les recommandations non spécifiques de l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OCDE, 2008, TG 407), et en particulier des études de toxicité orale à doses répétées sur 28 jours chez les rongeurs. En ce qui concerne plus particulièrement les perturbateurs thyroïdiens, les paramètres recommandés de l'évaluation de la fonction thyroïdienne sont le dosage des hormones de l'axe thyroïdien (T4, T3 et TSH) et l'évaluation histopathologique de la glande thyroïde (Annexe 1). Cependant, les

hormones sont dépendantes de nombreux facteurs de variation environnementaux et physiologiques (stade du cycle œstral, stress, etc...) complexifiant l'interprétation des résultats des dosages hormonaux. L'analyse histopathologique est majoritairement qualitative, avec parfois l'établissement d'un score lésionnel semi-quantitatif réalisé par l'expertise d'un pathologiste sur une unique coupe histologique médiane. Même si l'analyse morphométrique est conseillée (Bianco et al., 2014), celle-ci est limitée à une coupe médiane de thyroïde et n'est pas systématiquement réalisée en routine. Face à l'enjeu des perturbateurs endocriniens en santé humaine aujourd'hui, de nouvelles méthodes sont à l'étude dans le but de réaliser une meilleure évaluation de la fonction thyroïdienne. Même si, l'étude de toxicité conventionnelle à dose répétée sur 28 jours de l'OCDE TG 407 indique que l'identification définitive des substances chimiques actives pour la thyroïde est plus fiable par une analyse histopathologique que par les concentrations d'hormones, des recommandations précises sur l'évaluation histologique de la thyroïde ne sont pas rapportées.

L'objectif de cette étude expérimentale est donc de comparer les paramètres histomorphométriques de la thyroïde aux dosages hormonaux thyroïdiens dans une étude de toxicité orale à doses répétées de propylthiouracile (PTU) sur 28 jours chez la souris, afin de déterminer si les deux paramètres sont corrélés et quelle est l'approche la plus sensible dans le but d'identifier des modifications subtiles de l'homéostasie thyroïdienne telles que celles pouvant être induites par des contaminants environnementaux à faible dose.

Dans un premier chapitre, l'anatomie et la structure histologique de la glande thyroïde de la souris sera décrite afin de pouvoir aborder la physiologie de la fonction thyroïdienne. Un second chapitre précisera le mode d'action et les effets du PTU sur la fonction thyroïdienne ainsi que la justification de son utilisation dans cette étude. Quelques exemples de son utilisation en toxicologie chez le rongeur seront présentés. Le dernier chapitre sera consacré à l'étude expérimentale réalisée en 2019 dans le cadre du projet GePeTho (Gestation Pesticide Thyroïde) dans les laboratoires de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

CHAPITRE 1 : LA GLANDE THYROÏDE CHEZ LA SOURIS

La thyroïde est une glande endocrine, paire, située en partie crâniale du cou de part et d'autre de la trachée, en dessous du larynx. Elle contient deux types de populations de cellules endocrines à l'origine de la production de deux types d'hormones différents : les cellules folliculaires produisent les hormones thyroïdiennes majoritairement la L-tétra iodothyronine (L-thyroxine ou T4) et, dans une moindre mesure de la triiodo thyronine (T3) ; les cellules C synthétisent la calcitonine une hormone intervenant dans l'homéostasie phosphocalcique. Les hormones thyroïdiennes, jouent un rôle fondamental dans la croissance, le développement et l'homéostasie de l'organisme.

A. Embryologie

La glande thyroïde est la première des glandes endocrines à se développer au sein de l'embryon de la souris. Elle résulte de l'association de deux ébauches distinctes : le diverticule thyroïdien, précurseur des follicules thyroïdiens et les corps ultimobranchiaux, précurseurs des cellules C. Son développement embryonnaire commence au 8ème jour de gestation (J8) et se déroule en plusieurs phases (Hardisty & Boorman, 1999; Scudamore, 2014) :

- Epaissement de l'endoderme issu de l'intestin primitif en région pharyngée pour former un bourgeon : le diverticule thyroïdien,
- Migration de l'ébauche thyroïdienne dans le mésoderme sous-jacent en avant de l'intestin pharyngien,
- Allongement et invagination du diverticule thyroïdien pour former le canal thyroglosse,
- Destruction du canal thyroglosse et migration de l'ébauche thyroïdienne au contact de l'ébauche trachéale,
- Séparation de l'ébauche thyroïdienne en deux entités : les lobes thyroïdiens droit et gauche,
- Adjonction des ébauches des glandes parathyroïdes issues des troisième et quatrième poches branchiales endodermiques et des corps ultimobranchiaux émanant des cinquièmes poches branchiales.

A l'échelle histologique, l'ébauche de la thyroïde est principalement constituée de massifs de cellules indifférenciées provenant du tubercule thyroïdien. Ces cellules se regroupent ensuite en cordons cellulaires. A J12, les cordons cellulaires se regroupent à leur tour pour former des vésicules. A J15, les cellules du tubercule thyroïdien sont colonisées par les cellules des corps ultimobranchiaux. L'histologie de l'ébauche de la thyroïde a alors l'aspect de multiples sphères accolées les unes aux autres et entourées d'amas de cellules parafolliculaires (ou cellules claires ou cellules C). Dès J18, les follicules se creusent d'une cavité et l'activité sécrétrice de l'organe débute à J19 (Hardisty & Boorman, 1999; Scudamore, 2014). Des vestiges des corps ultimobranchiaux, caractérisés par la présence de cellules épithéliales ciliées dans les follicules, sont parfois visibles sur la structure histologique de thyroïde adulte (Brändli-baiocco et al., 2018).

B. Anatomie

1. Topologie

La glande thyroïde est formée de deux lobes allongés de forme ovale, chacun en position latérale de la trachée, symétriquement. Ces deux lobes se rejoignent à proximité de leur pôle postérieur par un isthme fin qui traverse la trachée ventralement (Hardisty & Boorman, 1999).

Les deux lobes apparaissent de couleur rosée, enfouis sous les muscles sternothyroïdiens du cou (Figure 1). Ils s'étendent crânialement jusqu'au cartilage cricoïde du larynx et caudalement sur les trois ou quatre premiers anneaux trachéaux (Hummel et al., 1975). Chaque lobe est entouré par une capsule fibreuse.

A l'âge adulte, le poids de la thyroïde de la souris est compris entre 1.5 et 2.6 mg et chaque lobe mesure environ 2 mm de long, 1 mm de large et 0.5 mm d'épaisseur. Les variations de taille, d'étendue et de position sont néanmoins courantes, notamment entre deux lobes d'une même glande (La Perle & Jordan, 2012).

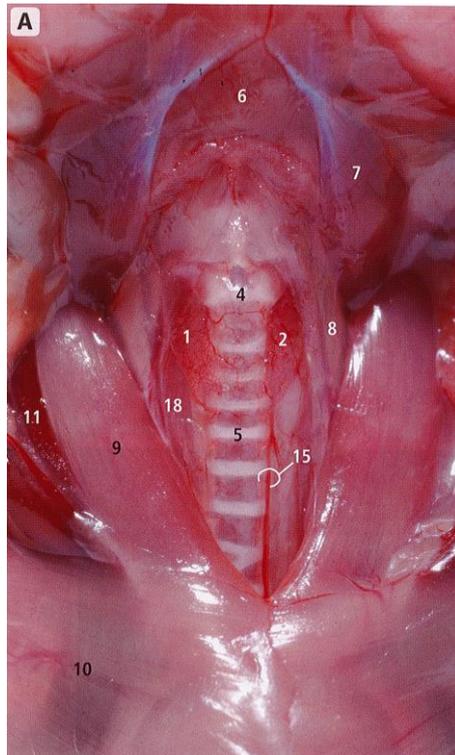


Figure 1 - Anatomie topographique des glandes thyroïdes chez la Souris (Ruberte et al.,2017)

1 : lobe thyroïdien droit ; 2 : lobe thyroïdien gauche ; 4 : cartilage cricoïde ; 5 : trachée ; 6 : muscle mylohyoïdien ; 7 : muscle digastrique ; 8 : muscle omo-hyoïdien ; 9 : muscle sterno-cléido-mastoïdien ; 10 : muscle pectoral superficiel ; 11 : veine jugulaire externe ; 15 : artère carotide commune et veine jugulaire interne ; 18 : muscle long de la tête

La souris possède une seule paire de glandes parathyroïdes, de localisation sous-capsulaire près du bord dorsolatéral de chaque lobe thyroïdien (La Perle & Jordan, 2012). Les parathyroïdes des deux lobes sont rarement au même niveau antéropostérieur. L'une ou les deux peuvent parfois être postérieures à la thyroïde ou bien être plus profondément ancrées dans le parenchyme thyroïdien (Hummel et al., 1975).

2. Vascularisation et innervation

Les données concernant la vascularisation de la glande thyroïde de la souris sont limitées. La Figure 2 illustre la vascularisation de la tête et du cou de la souris où figure l'artère thyroïdienne caudale.

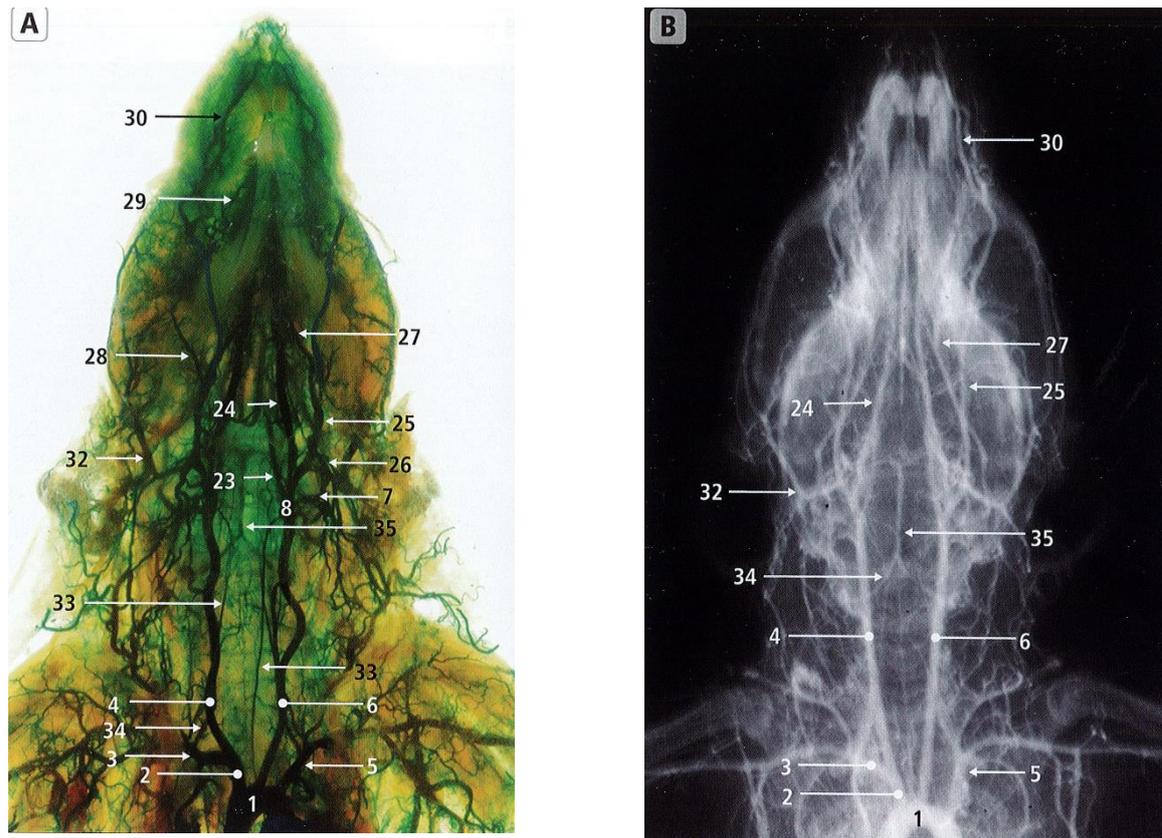


Figure 2 - Vascularisation de la tête et du cou chez la souris (Ruberte et al., 2017)

A : Injection de latex liquide (vert), vue ventrale ; B : artériographie ventrodorsale, injection de barium sulfate ;
 1 : arc aortique ; 2 : tronc brachiocéphalique ; 3 : artère sous-clavière droite ; 4 : artère carotide commune droite ; 5 : artère sous-clavière gauche ; 6 : artère carotide commune gauche ; 7 : artère carotide interne ; 8 : artère carotide externe ; 23 : artère palatine ascendante ; 24 : artère linguale ; 25 : artère faciale ; 26 : branche glandulaire (glandes mandibulaire et sublinguale) ; 27 : artère sublinguale ; 28 : branche du muscle digastrique ; 29 : artère labiale inférieure ; 30 : artère labiale supérieure ; 32 : artère temporale superficielle ; 33 : artère thyroïdienne caudale ; 34 : artère vertébrale ; 35 : artère basilaire

La capsule conjonctive des lobes thyroïdiens contient les vaisseaux sanguins et lymphatiques et les nerfs dont le nombre augmente au voisinage des pôles ainsi qu'à la frontière entre les lobes et l'isthme (Hummel et al., 1975).

C. Histologie

La glande thyroïde est limitée par une mince capsule conjonctive constituée essentiellement de fibres de collagène, d'où émanent des cloisons grêles (également appelées septa) qui divisent le parenchyme thyroïdien en lobules (La Perle & Jordan, 2012) (Figure 3). Chaque lobule comprendrait 20 à 40 follicules, unités fonctionnelles de base de la glande thyroïde (Figure 4)

(Bianco et al., 2014). Cette organisation en follicules, unique pour une glande endocrine, va lui permettre d'assurer une fonction de synthèse finale et de stockage extracellulaire des hormones.

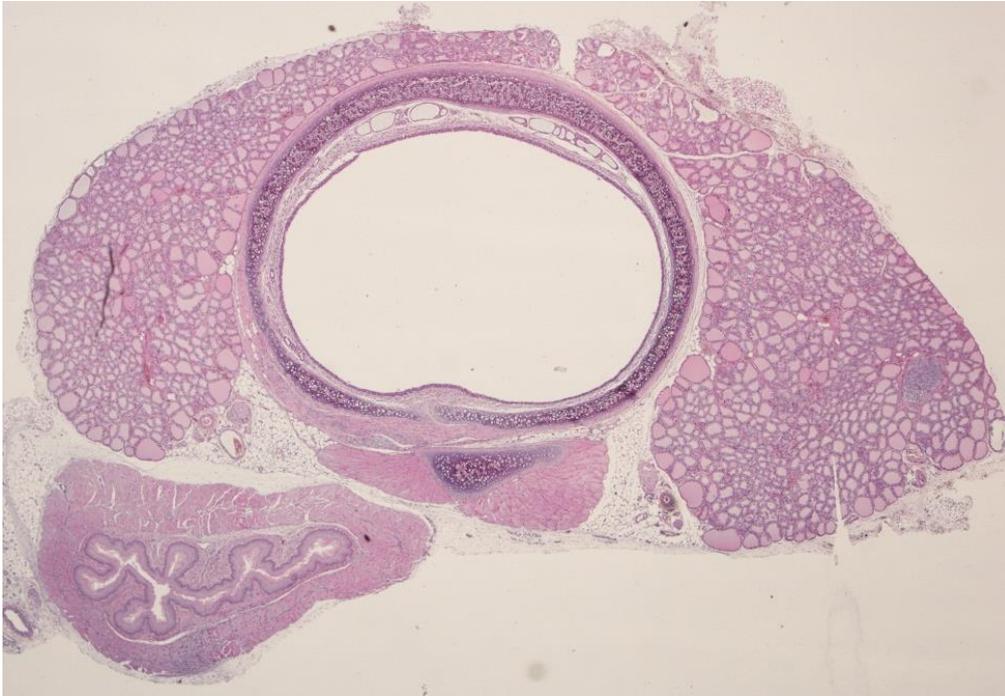


Figure 3 - Coupe transversale en région cervicale chez la souris CD1 (Hémalun-éosine).
La trachée au centre de l'image présente une lumière ovoïde béante. Elle est entourée par les lobes thyroïdiens droit et gauche réunis en région ventrale par un isthme ; l'œsophage est visible en région dorsale, en bas à gauche sur l'image. (Illustration personnelle, N.Bourgès-Abella, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse)

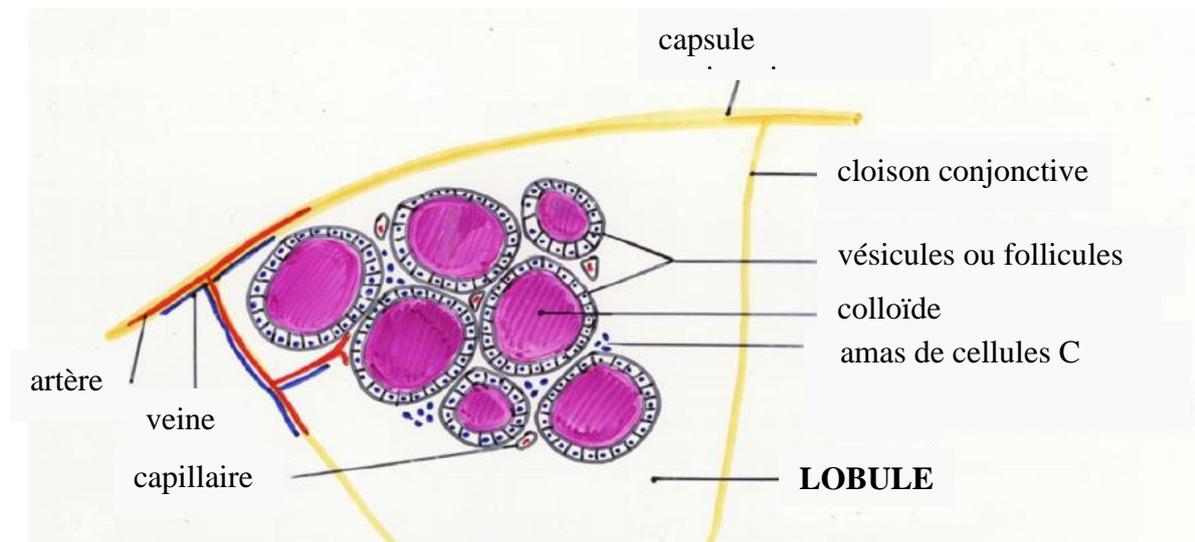


Figure 4 Histologie topographique d'un lobule de glande thyroïde de Mammifère
(Illustration N.Bourgès-Abella, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse)

1. Le follicule thyroïdien

Le follicule est une structure creuse, ronde ou allongée dont la lumière est remplie de colloïde, forme de stockage des hormones thyroïdiennes iodées. Le follicule est bordé d'une couche unique de cellules épithéliales folliculaires polarisées, cuboïdes ou aplaties, appelées thyrocytes (Figures 5 et 6). Leur taille peut fortement varier au sein d'un même lobe : les follicules situés en périphérie sont souvent les plus gros (Denef et al., 1979).

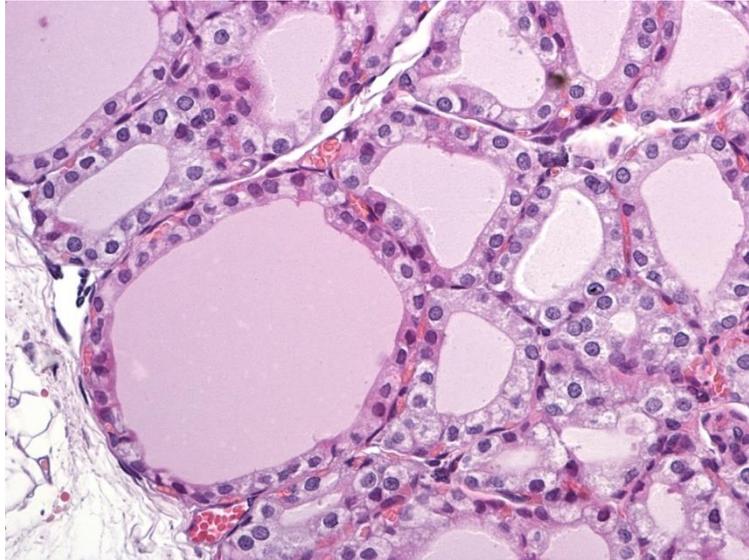


Figure 5 - Follicules thyroïdiens chez la souris CD1 (Hémalun-éosine)
(Illustration N.Bourgès-Abella, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse)

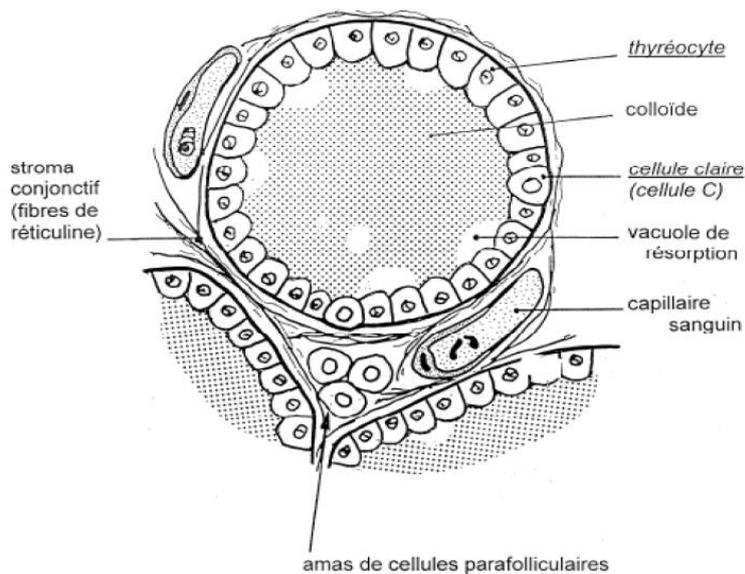


Figure 6 - Structure histologique d'un follicule thyroïdien de mammifère
(Illustration N. Bourgès-Abella, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse)

La hauteur des thyrocytes varie en fonction de l'état fonctionnel de la glande tout comme la quantité et l'éosinophilie de la colloïde (Hummel et al., 1975). Quand la glande est inactive, les follicules sont distendus par une grande quantité de colloïde et présentent un épithélium aplati alors qu'en activité, ils sont de plus petite taille et l'épithélium apparaît cubique à cylindrique avec présence de vésicules de résorption (Nève & Rondeaux, 1991). Les deux types morphologiques de follicules coexistent dans une même thyroïde, on parle de follicules actifs et de follicules inactifs, follicules au repos ou follicules « froids » (« cold follicles » dans la littérature anglosaxonne) (Hardisty & Boorman, 1999).

Un autre facteur de variation histologique du follicule thyroïdien est l'âge de la souris. En effet, chez les individus de moins de 4 semaines, les follicules sont de taille uniforme avec un épithélium cubique et leur colloïde est légèrement éosinophile et homogène. Par la suite (entre 1 et 3 mois) on note un rapide aplatissement de leur épithélium associé à une augmentation du diamètre du follicule. On obtient ainsi des follicules plus larges, de taille variable avec une colloïde plus éosinophile à l'âge adulte (Hardisty & Boorman, 1999). Au fur et à mesure que la souris vieillit, on note une nette augmentation du nombre de follicules au repos. Il s'agit de follicules de grande taille, limités par un épithélium aplati, accumulant une grande quantité de colloïde (Figure 7). Ils apparaissent à l'âge de 5 mois et peuvent représenter 80% de l'ensemble des follicules thyroïdiens chez la souris de 13 mois (Studer et al., 1978). L'augmentation progressive de ces follicules inactifs peut s'expliquer par un défaut d'endocytose qui ne répond plus à une stimulation de TSH normale.

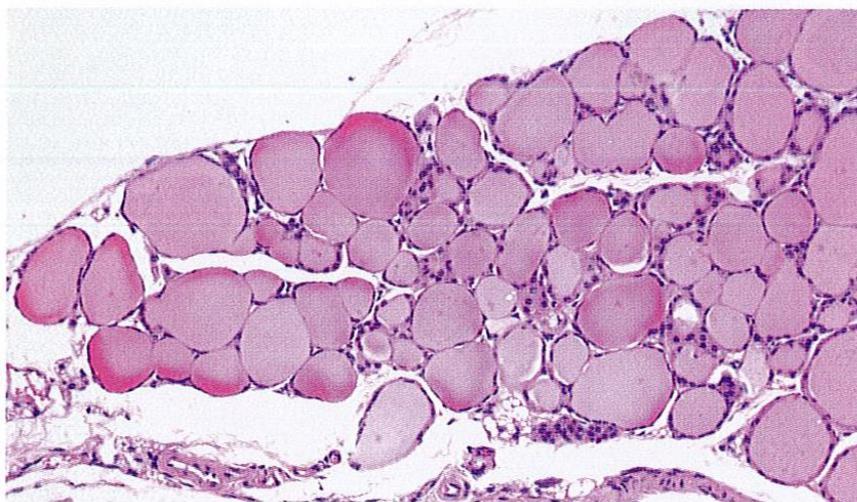


Figure 7 - Thyroïde de souris âgée, présence de nombreux grands follicules au repos (hémalum-éosine) (Scudamore, 2014)

Outre les effets de l'âge, la structure histologique de la glande thyroïde de la souris peut varier selon le régime alimentaire, l'environnement, le sexe ou le statut endocrinien (Hardisty & Boorman, 1999).

Les thyrocytes présentent un noyau rond à ovale avec une chromatine assez granuleuse (La Perle & Jordan, 2012). La microscopie électronique permet de mettre en évidence sur le thyrocyte des microvillosités apicales qui se projettent dans la colloïde ainsi que des organites (appareil de Golgi, réticulum endoplasmique granuleux) qui soulignent son rôle dans la synthèse de protéines (Figure 8).

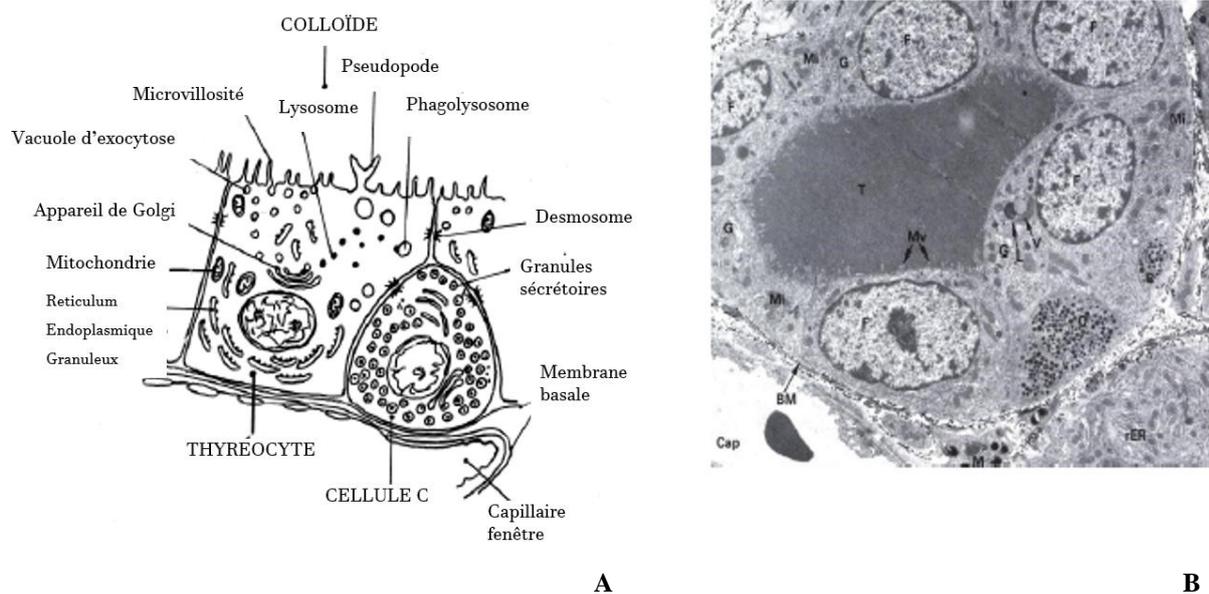


Figure 8 - Ultrastructure des cellules thyroïdiennes

A : Illustration N.Bourgès-Abella, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse ; **B** : Cellules thyroïdiennes de rat en microscopie électronique (Young, 2000)

La colloïde est composée d'une glycoprotéine, la thyroglobuline ainsi que d'autres substances comme des enzymes protéolytiques (La Perle & Jordan, 2012). Macroscopiquement, elle a la consistance d'un gel jaunâtre et visqueux qui coagule sous l'effet des fixateurs histologiques et qui est majoritairement basophile après coloration à l'hémalun-éosine lorsque la glande est active, et éosinophile lorsqu'elle est inactive. La colloïde est aussi à l'origine de divers artéfacts lors de la réalisation de la technique histologique. Le plus fréquemment, elle peut se rétracter et donner l'impression de ne pas être au contact de l'épithélium folliculaire, ou avoir un aspect strié, ou encore, apparaître de différentes teintes de couleur dans un même lobe (Hardisty & Boorman, 1999).

2. Cellules C ou cellules parafolliculaires

Les cellules C, ou cellules claires, ou cellules parafolliculaires, sont présentes dans le tissu interstitiel interfolliculaire ou en localisation intraépithéliale folliculaire. Chez la souris, elles sont présentes en très faible proportion (0.1% des cellules épithéliales de la thyroïde) et particulièrement difficiles à observer en histologie conventionnelle à l'hémalun-éosine (La Perle & Jordan, 2012). Elles contiennent des granules bordés d'une membrane et contenant la calcitonine (Hardisty & Boorman, 1999). La méthode de Grimelius modifiée est reconnue pour mettre en évidence les granules des cellules C. Cependant, elle s'avère un peu moins efficace chez les rongeurs pour lesquels les meilleurs résultats ont été obtenus en utilisant les méthodes de coloration HCl-bleu de toluidine et HCl-Giemsa (Sawicki & Kuczyński, 1977). L'immunohistochimie ciblée sur la calcitonine peut aussi être utilisée pour les marquer spécifiquement (Scudamore, 2014).

Dans les travaux de Sawicki (1977) réalisés sur des souris, les cellules C sont regroupées près du centre de la thyroïde si bien qu'une zone périphérique apparaît complètement dépourvue de cellules C. Cette observation a été rapportée plus récemment (Scudamore, 2014) (Figure 9).

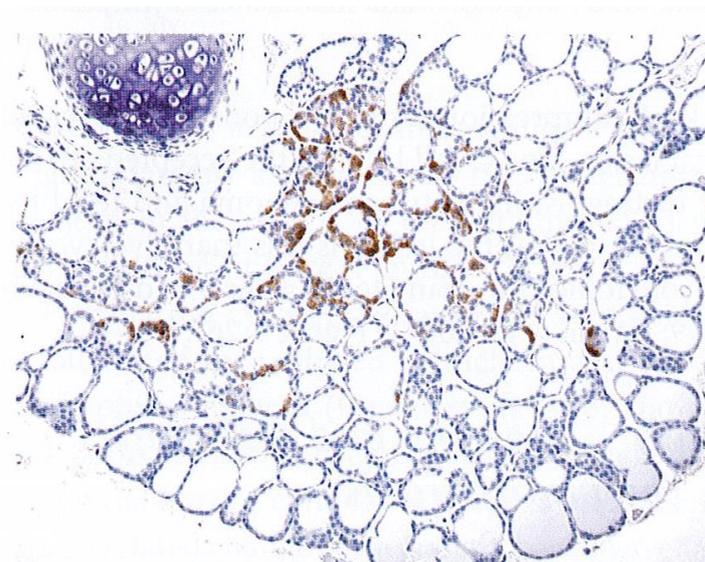


Figure 9 - Révélation de la calcitonine présente dans les cellules C par Immunohistochimie
(Scudamore, 2014)

Comparativement au rat, les cellules C murines ont généralement une taille plus petite et une forme plus allongée. On les retrouve moins souvent sous forme d'amas et elles occupent préférentiellement une position intrafolliculaire plutôt qu'interfolliculaire (Sawicki & Kuczyński, 1977).

Enfin, une structure folliculaire supplémentaire, issue des corps ultimobranchiaux, tapissée de cellules ciliées et non ciliées et formant souvent des kystes, est rencontrée chez la souris (La Perle & Jordan, 2012).

D. Physiologie de la fonction thyroïdienne

1. Synthèse des hormones thyroïdiennes iodées

Le follicule thyroïdien, unité fonctionnelle de la glande thyroïde a le rôle d'assurer la synthèse des hormones thyroïdiennes iodées, la tétra-iodothyronine (ou T4, ou thyroxine) et la tri-iodothyronine (ou T3), essentielles à de nombreuses fonctions de l'organisme comme le développement du système nerveux central, la thermorégulation, le maintien d'un métabolisme cellulaire basal, et bien d'autres. Le mécanisme de biosynthèse des hormones thyroïdiennes est par ailleurs unique pour une glande endocrine. En effet, les principales étapes de la synthèse des hormones sont extra-cellulaires et se déroule dans la lumière du follicule, différant ainsi des autres glandes endocrines pour lesquelles ce mécanisme est intra-cellulaire.

Les hormones thyroïdiennes sont des protéines iodées lipophiles, leur synthèse nécessite une fixation d'iode sur des résidus tyrosines. Or, l'iode est un oligo-élément rare dans les sols. Les aliments riches en iode sont principalement les denrées issues des milieux marins, comme le sel de mer, les poissons et fruits de mer. Une carence en iode affecte directement la thyroïde, qui augmente en volume, jusqu'à former un goitre. Elle entraîne aussi des troubles du développement aussi bien physique que du système nerveux. Ainsi, les habitants éloignés de la mer, autrefois soumis à des carences en iode sévères, étaient souvent atteints de nanisme et de retards mentaux, plus communément désigné sous le nom de « crétinisme ». L'iode est donc un élément précieux pour l'organisme et son recyclage est donc nécessaire (Larsen et al., 2002).

a. Absorption de l'iode dans le thyrocyte

L'iode d'origine alimentaire est transformé en ion iodure I^- par l'estomac, permettant son absorption par les entérocytes de l'intestin grêle. Les ions iodures gagnent ensuite la circulation sanguine, jusqu'à la glande thyroïde, richement vascularisée par l'artère thyroïde. L'iode

pénètre alors dans les thyrocytes grâce à un transporteur actif, le symport sodium/iode (NIS), (Brent & Koenig, 2006). Il peut être inhibé par différents composés dont les ions thiocyanate. Un gradient de concentration transmembranaire en sodium maintenu par une pompe Na/K ATPase dépendante, fournit l'énergie nécessaire à ce transport actif. Ce transporteur est aussi présent sur d'autres organes, en particulier dans le rein où il serait l'élément majeur responsable du maintien de l'homéostasie de l'iode, en modulant l'élimination rénale de cet oligo-élément (Plantin-Carrenard et al., 2005).

La fixation de l'iode sur les tyrosines s'effectue à l'extérieur du thyrocyte, dans la colloïde. L'iode est transporté du thyrocyte jusqu'à la lumière folliculaire par transport passif grâce à un transporteur membranaire apical d'iode, la pendrine (Brent & Ronald, 2002) (Figure 10)

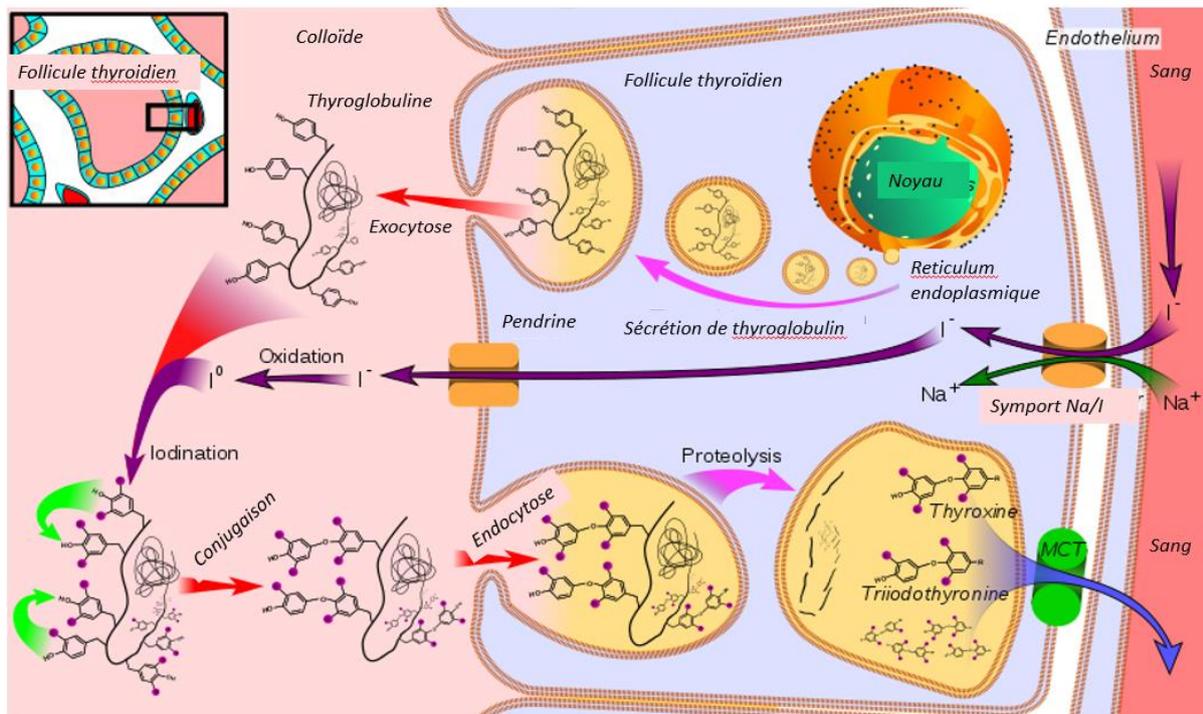


Figure 10 - Synthèse des hormones thyroïdiennes à l'échelle du thyrocyte.

D'après Walter F., Medical physiology : a cellular and molecular approach (Boron & Boulpaep, 2003)

b. Oxydation de l'iode et formation des précurseurs d'hormones thyroïdiennes

Avant sa fixation sur les résidus tyrosine, l'ion iodure I^- subit une oxydation grâce à l'enzyme thyroperoxydase (TPO), une hémoprotéine glycosylée présente seulement dans le thyrocyte. Son activité est inhibée par les composés thionamides tels que PropylThioUracile (PTU), le

thio-urée et le thio-uracile (Corban et al., 2011). Sous l'action de la TPO, les ions iodures sont oxydés en diiode I_2 en présence d' H_2O_2 .

La thyroglobuline, une glycoprotéine de 660 kDa qui compose la colloïde à 90%, est la matrice indispensable à la formation des hormones thyroïdiennes iodées, qui permet également leur stockage. Elle est synthétisée par le réticulum endoplasmique, puis transférée dans l'appareil de Golgi. Elle est ensuite libérée dans la lumière du follicule par les vésicules de sécrétion (Brent & Ronald, 2002). Cette protéine présente des sites sur lesquels l'iode peut se fixer sous l'action de la TPO, formant ainsi les iodotyrosines. Cette étape est nommée organification. Selon la position de l'iode sur le noyau aromatique, deux types de molécules sont formées : la 3-monoiodotyrosine (MIT) lorsque l'iode se fixe en position 3, et la diiodotyrosine (DIT) lorsque l'iode se fixe en position en positions 3 et 5 (Figure 11).

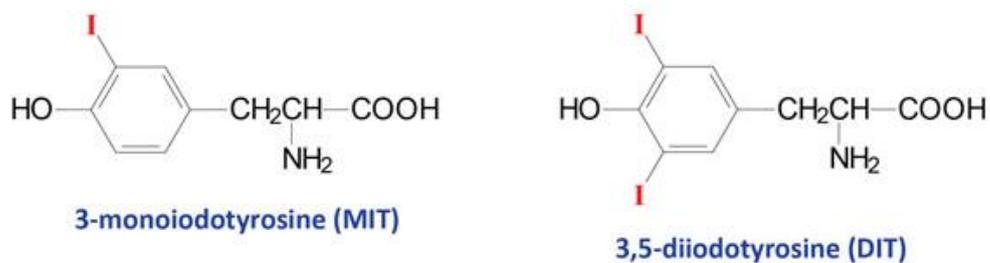


Figure 11 - Structure chimique des précurseurs d'hormones thyroïdiennes

Le couplage de ces iodotyrosines, catalysé par l'enzyme TPO, conduit à la formation de T4 par association de deux composés DIT, ou de T3 par association d'un composé DIT à un composé MIT (Figure 12). En conditions physiologiques, la TPO a tendance à favoriser la formation de T4 plutôt que de T3.

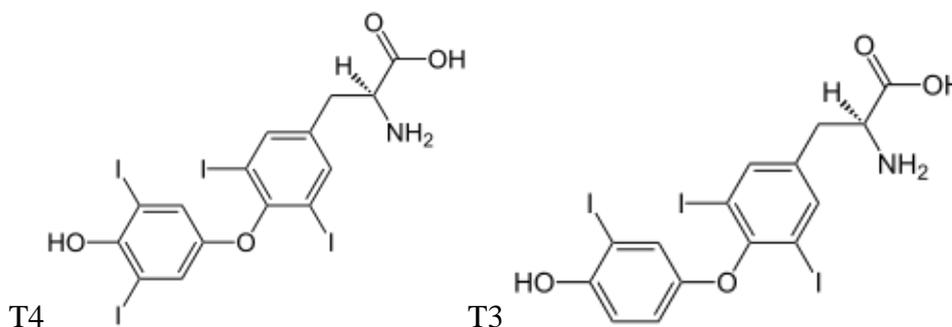


Figure 12 - Structure chimique des hormones thyroïdiennes T4 (thyroxine) et T3 (triiodothyronine)

Les hormones thyroïdiennes néoformées sont internalisées dans les cellules épithéliales du thyrocyte par endocytose de la colloïde. Des protéines lysosomales telles que la cathepsin, formée par l'appareil de Golgi, vont intégrer les vésicules d'endocytose, formant des lysosomes. A l'intérieur de ces derniers, s'effectue la protéolyse de la thyroglobuline, les hormones thyroïdiennes sont alors libérées de leur matrice et vont intégrer la circulation sanguine par exocytose (Figure 13).

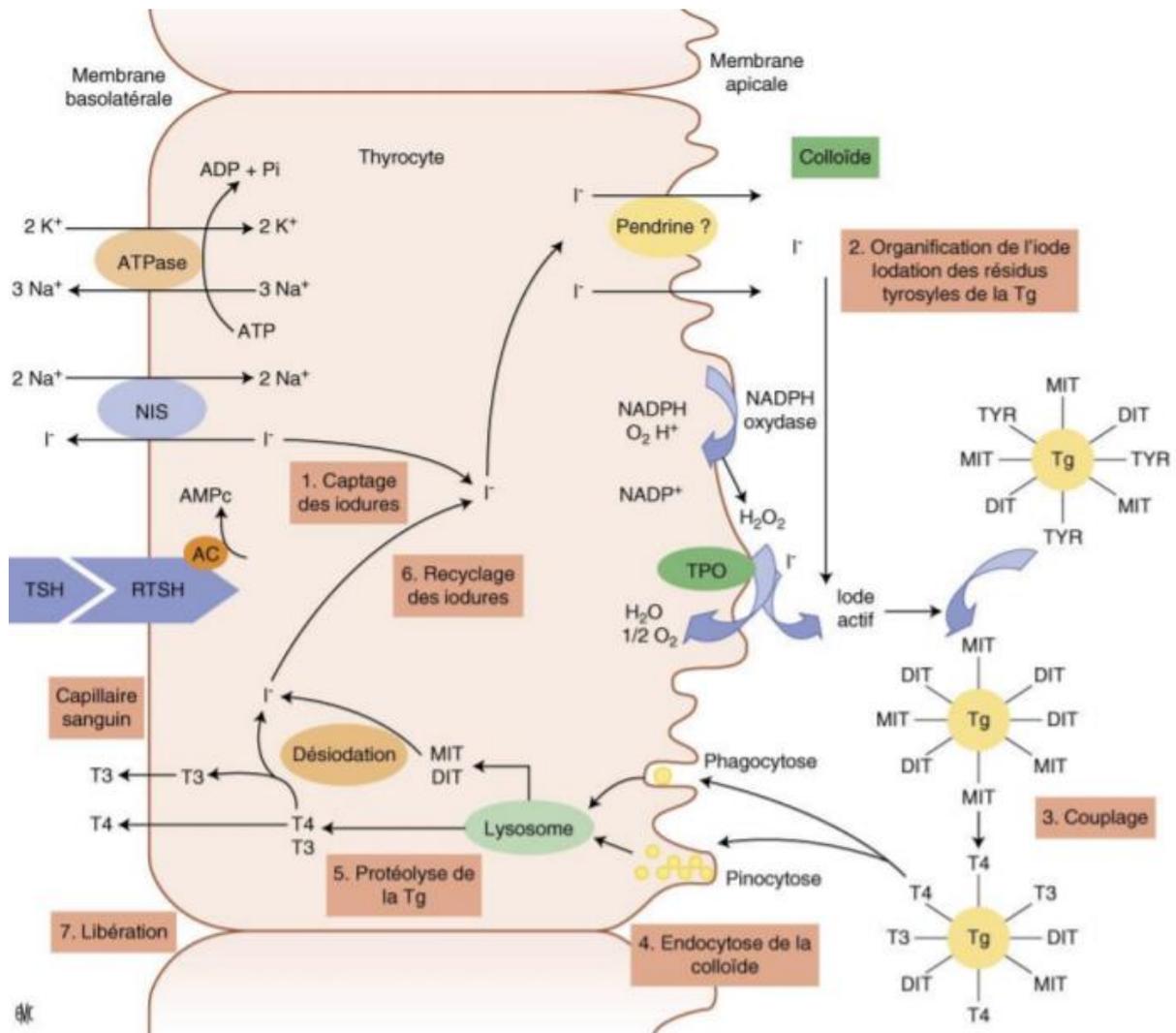


Figure 13 - Biosynthèse des hormones thyroïdiennes iodées à l'échelle du follicule thyroïdien.
(Illustration d'après C. Massart et al., 2013)

Cette synthèse et cette sécrétion sont soumises au contrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire thyroïdienne que nous allons évoquer dans le paragraphe suivant.

2. Régulation de la synthèse des hormones thyroïdiennes iodées

- a. TRH acteur central de la régulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire thyroïdien

L'hormone thyrotrope ou Thyrotropine Releasing Hormone (TRH) ou Thyrotropine Releasing Factor (TRF) appelée également thyrolibérine est un tripeptide sécrété par les corps cellulaires des neurones des noyaux paraventriculaires de l'hypothalamus, localisés à la limite dorsale du troisième ventricule cérébral. Cette neuro-hormone est libérée dans le système porte hypothalamo-hypophysaire, puis vient se fixer sur des récepteurs présents sur les cellules thyrotropes de l'adénohypophyse. La TRH contrôle ainsi la sécrétion d'une seconde hormone, la Thyroid Stimulating Hormone (TSH) dénommée également thyrotropine ou thyrostimuline. En effet, la fixation de la TRH sur ses récepteurs -couplés à la protéine G- induit un signal cellulaire provoquant une augmentation du calcium intracellulaire (Figure 14).

La TSH est sécrétée par l'antéhypophyse, cette hormone, est composée de 2 sous-unités, une alpha (commune aux hormones hypophysaires FSH et LH) et une bêta spécifique de la TSH. La synthèse de cette dernière sous-unité est soumise à régulation stricte par la TRH, et constitue le principal mode d'action dans le contrôle de la sécrétion de TSH.

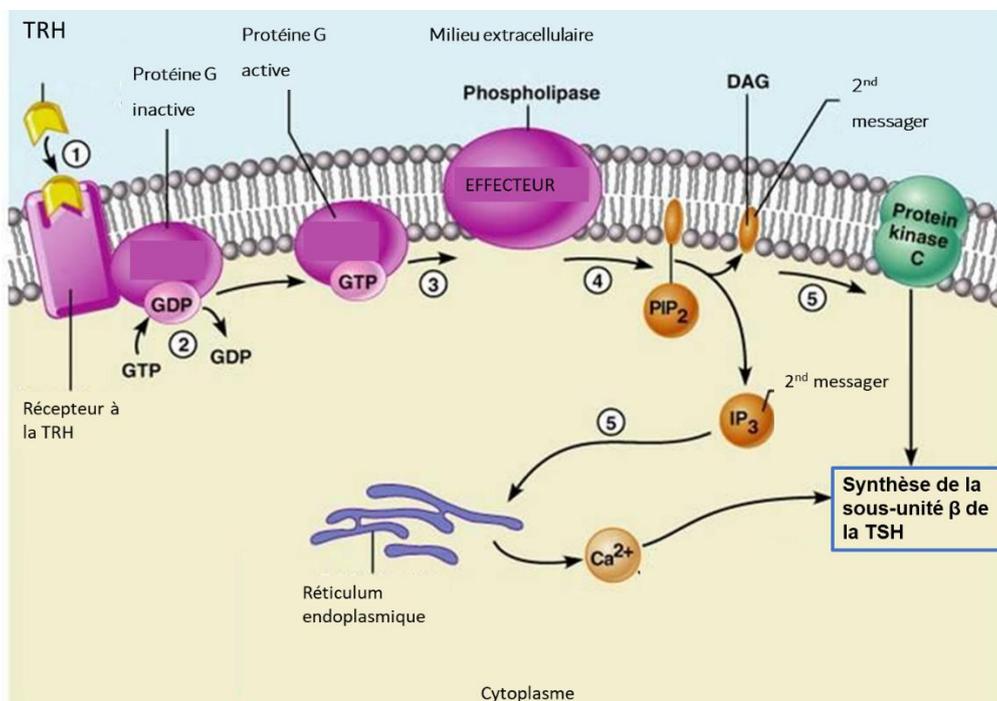


Figure 14 - Mécanisme de régulation de la synthèse de thyrotropine (ou TSH) par la TRH.

(Inspiré de 2006, Pearson education, Inc., d'après Benjamin Cummings)

TRH : Thyrosin Releasing Hormone, GTP : Guanosine TriPhosphate ; GDP : Guanosine DiPhosphate ; DAG : DiAcylGlycerol ; PIP₂ : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate ; IP₃ : inositol trisphosphate

La TRH est soumise au rétrocontrôle négatif des hormones thyroïdiennes, mais aussi à des facteurs extra-thyroïdiens. Les catécholamines, libérées lors d'exposition au froid par exemple, sont reconnues pour augmenter la sécrétion de TRH. Il en est de même au cours du jeûne, via la sécrétion de leptine, hormone de satiété. Les glucocorticoïdes sont eux aussi susceptibles d'inhiber la synthèse de TRH (Mullur et al., 2014).

b. La TSH, hormone activatrice de la synthèse des hormones thyroïdiennes iodées

La TSH est sécrétée, par pulse via un processus d'exocytose, directement dans la circulation sanguine sous forme libre en raison de son hydrosolubilité. Elle se fixe sur des récepteurs spécifiques présents principalement sur la membrane basale des thyrocytes, mais aussi, dans une moindre mesure, sur la membrane de différents types cellulaires (adipocytes, lymphocytes). Ces récepteurs sont eux aussi couplés aux protéines G dont l'activation permet la transduction du signal. C'est principalement l'Adénosine MonoPhosphate cyclique (AMPc) le messager responsable de la transduction du signal au sein des cellules cibles, permettant *in fine* l'activation de la synthèse des hormones thyroïdiennes T3 et T4 ainsi que leur sécrétion et libération dans la circulation sanguine. Ce mécanisme cellulaire fait intervenir l'enzyme adénylate cyclase qui est activée par la protéine G activée (cf paragraphe précédent) capable de former un AMPc à partir d'ATP, libérant au passage un phosphate inorganique. Cette réaction s'effectue massivement, si bien que la concentration intra-cellulaire en AMPc augmente rapidement. Ce transducteur active en cascade une chaîne enzymatique, qui à terme active la différenciation cellulaire ainsi que la prolifération cellulaire. Les gènes de la machinerie de synthèse hormonale sont stimulés, notamment les gènes de la thyroglobuline, de la TPO et des transporteurs NIS. Ainsi la synthèse des hormones thyroïdiennes est stimulée sous l'action relayée de la TSH (Figure 15).

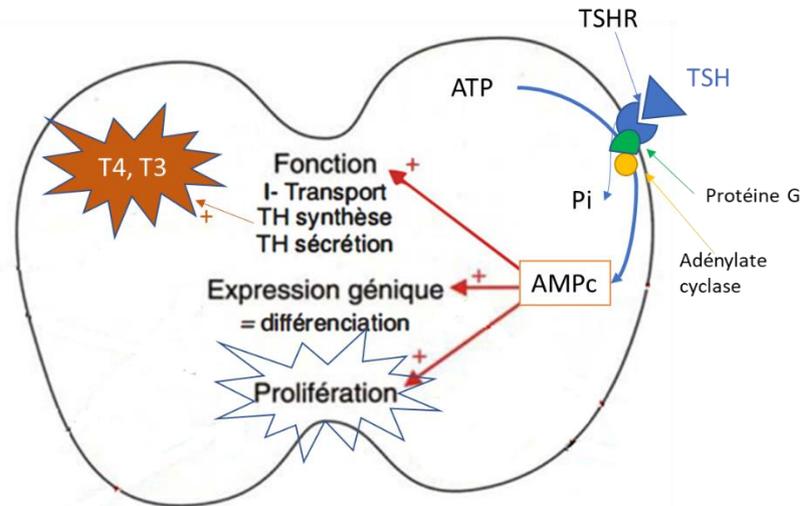


Figure 15 - Mécanisme cellulaire résultant de l'activation par la TSH sur les follicules thyroïdiens
 TSHR : récepteur TSH, Pi : Phosphate inorganique D'après (Maenhaut et al., 1995)

Tout comme la TRH, la TSH est soumise à une régulation « extra-thyroïdienne » : il est aujourd'hui reconnu que le système nerveux adrénergique a une importance dans la régulation de TSH, au même titre que le cortisol et la leptine (Fekete & Lechan, 2014; Mullur et al., 2014).

3. Métabolisme des hormones thyroïdiennes

a. Déiodination des hormones thyroïdiennes

La forme métaboliquement active des hormones thyroïdiennes est T3 or c'est aussi la forme circulante minoritaire L'organisme va donc convertir T4 en T3 par le retrait d'un atome d'iode sur le noyau aromatique, c'est la déiodination.

Le retrait de l'iode du noyau aromatique nécessite l'action de déiodinases, des enzymes membranaires sélénium dépendantes, qui permettent la régulation de la biodisponibilité des hormones thyroïdiennes intracellulaires. Il en existe trois types, qui diffèrent par leur substrat (iodothyronines), leur produit (forme active ou inactive) et leur site (Figure 16) (van der Spek, et al., 2017; Wu et al., 2005).

- Déiodinase de type 1 ou DIO1 : cette enzyme est responsable de la déiodation des deux cycles aromatiques (position 5 ou 5'). Elle permet aussi la dégradation des hormones thyroïdiennes inactives comme les formes sulfatées T3S, T4S et reverse T3 (rT3). Elle est présente chez la souris dans les hépatocytes, néphrocytes,

thyrocytes, et dans une moindre mesure les cellules thyroïdiques adénohypophysaires.

- Déiodinase de type 2 ou DIO2 : tout comme DIO1, elle transforme T4 en sa forme bioactive T3 et T2 à partir de rT3, par déiodation du cycle externe, soit en position 5'. Elle se trouve dans le réticulum endoplasmique des cellules hypophysaires, dans le tissu adipeux brun, et le placenta.
- Déiodinase de type 3 ou DIO3 : cette enzyme convertit T4 en forme inactive (rT3), et T3 en T2 en supprimant l'iode du cycle interne (soit en position 5). Elle se retrouve surtout durant la phase embryonnaire, dans le placenta.

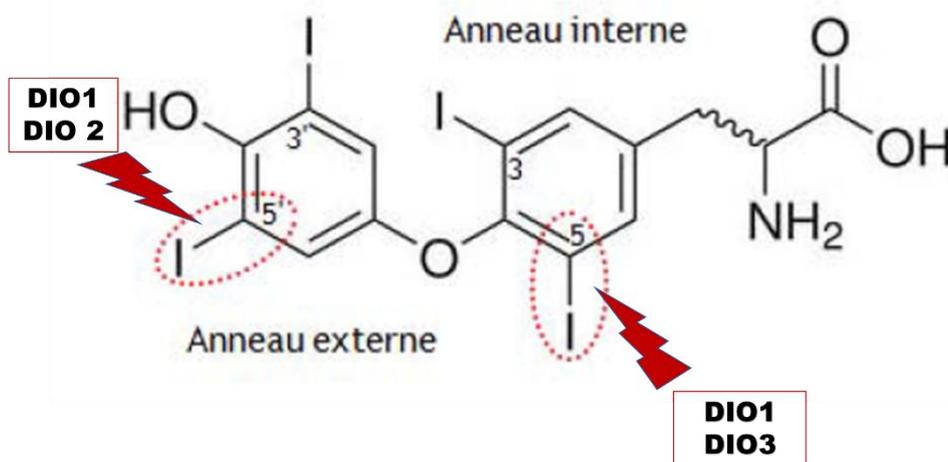


Figure 16 - Structure chimique de la thyroxine et localisation du site d'action des déiodinases

b. Glucuroconjugaison des hormones thyroïdiennes

Les hormones thyroïdiennes glucuronées sont plus solubles, ce qui augmente leur excrétion par les voies biliaires ou urinaires.

La glucuroconjugaison permet la fixation d'un hydroxyphénol conjugué à un acide glucuronique sur les hormones thyroïdiennes via l'action de la glucuronyltransferase. Il semblerait que cette voie métabolique soit plus importante chez la souris que chez l'homme. Cette réaction s'effectue majoritairement au sein du foie, mais aussi du rein. Elle privilégie comme substrat la pro-hormone T4, formant ainsi des T4G, bien qu'elle soit aussi capable de convertir T3 en T3G (van der Spek et al., 2017; Wu et al., 2005).

La forme glucuronée de T4 peut constituer un réservoir de T4 pour l'intestin, et plus précisément son microbiote. En effet, sous l'action d'une glucuronidase, sécrétée par les bactéries intestinales, la T4G est déconjugée, libérant la forme active dont une partie sera absorbée par l'organisme. Cela constitue alors un cycle entérohépatique.

c. Sulfonation des hormones thyroïdiennes

La phénol-sulfotransférase est une enzyme importante dans le métabolisme des hormones thyroïdiennes, puisqu'elle permet la sulfonation des hormones T4 et T3, c'est-à-dire la conjugaison d'un groupement sulfate sur la fonction phénol du cycle. Les formes T3S et T4S ne pouvant se fixer sur les récepteurs thyroïdiens, elles sont donc inactives. Comme évoqué précédemment, la T4S et la T3S sont des substrats privilégiés de la DIO1. Cependant, la déiodination du cycle externe (=5') est empêchée par la conjugaison avec un sulfate, la DIO1 n'a alors pas d'autre choix que de former la rT3S, forme également inactive.

Cette voie métabolique permet la régulation des hormones thyroïdiennes par l'excrétion biliaire et urinaire car elle augmente leur solubilité, mais aussi par simple inactivation de celles-ci (Visser, 1994).

La forme active T3 peut être formée à nouveau par les enzymes sulfatases tissulaires et bactériennes (microbiote intestinal).

Il apparaît que cette voie métabolique intervient principalement durant la gestation, et joue un rôle important dans le développement fœtal (Wu et al., 2005).

d. Désamination et décarboxylation des hormones thyroïdiennes

Les hormones thyroïdiennes peuvent subir, dans une moindre mesure, une désamination ou décarboxylation des composés alanine dans le foie ou le rein ce qui conduit à la formation de l'acide tétraiodothyroacétique (Tetrac) et de l'acide triiodothyroacétique (Triac) par désamination. La décarboxylation permet la formation de tétraiodothyronamine (Tetram) et de triiodothyronamine (Triam) (van der Spek et al., 2017) Ces composés dérivés peuvent ensuite subir une déiodation ou encore une conjugaison.

Le rôle de ces dérivés est encore mal connu, mais il semble qu'ils aient une action thyromimétique et sont capables de moduler la sécrétion de TSH.

e. Oxydation des hormones thyroïdiennes

L'oxydation du groupement phénol sous l'action de peroxydases, induit la formation de DIT. Elle revient à un clivage de la fonction éther du noyau thyronine de la T3 et de la T4. Cette voie métabolique, tout comme la précédente, est mineure (van der Spek et al., 2017). L'ensemble de ces réactions est représenté dans la Figure 17.

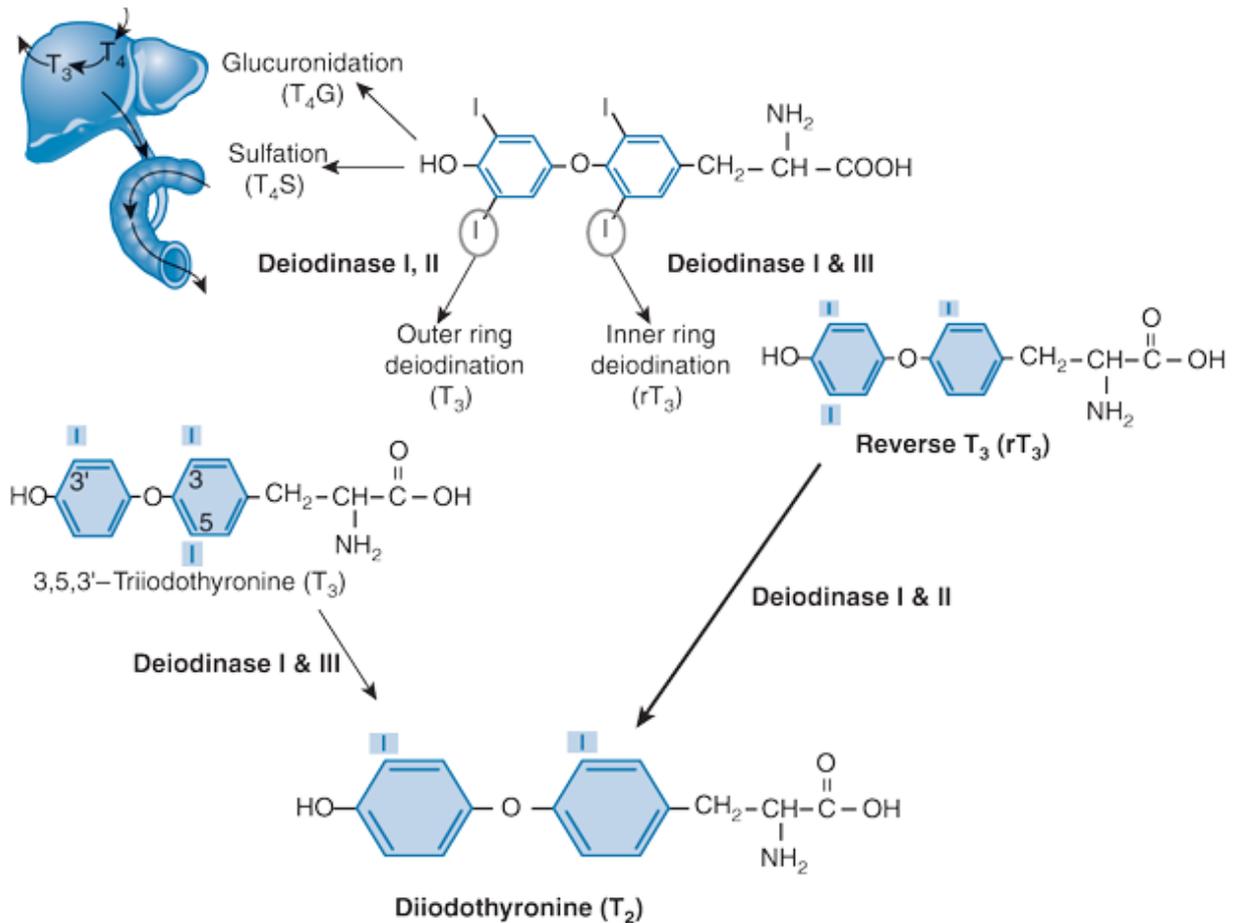


Figure 17 - Métabolisme des hormones thyroïdiennes
D'après Patricia E. Molina (2018)

CHAPITRE 2 – Le 6-n-Propylthiouracile, un antithyroïdien

A. Propriétés physiques et chimiques du PTU

Le 6-n-PropylThiouracil (PTU) appartenant à la famille des thionamides (Figure 18), se présente sous la forme d'un cristal blanc au goût amer, stable à température ambiante. C'est une molécule hydrosoluble, employée dès les années 1940 pour traiter l'hyperthyroïdie liée à la maladie de Graves (Nambiar et al., 2014). Cependant ce composé est classé en 1985 par le Centre International de Recherche sur le Cancer (IARC) comme une substance possiblement carcinogène (classe 2B), et d'autres substances antithyroïdiennes (méthamizole et carbimazole) présentant moins d'effets secondaires sont aujourd'hui employées à la place du PTU.

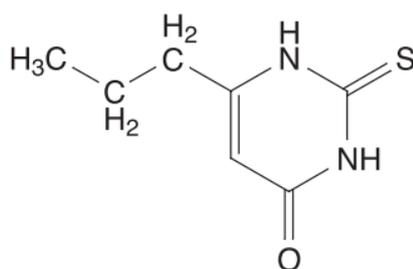


Figure 18 - Structure chimique du 6-n-PropylThiouracil (PTU)

1. Propriétés pharmacocinétiques

Le PTU est administré par voie orale classiquement, son absorption par le tractus digestif est effective en 4h post-ingestion. Il intègre la circulation sanguine avec un temps de demi-vie d'environ 5h, suite à son absorption il atteint la circulation entérique et est acheminé directement au foie où une partie est directement métabolisée et subit une glucuroconjugaison (effet de premier passage hépatique). La part non métabolisée dans la circulation sanguine diffuse dans l'organisme et atteint ainsi la glande thyroïde, dans laquelle il s'accumule. Toutefois, des doses élevées de PTU inhibent l'entrée de ce dernier dans la thyroïde (Halpern et al., 1983; International Agency for Research on Cancer, 2002). L'excrétion des composés métabolisés (glucurono ou sulfo-conjugués) est majoritairement urinaire. Le PTU est capable de traverser la barrière placentaire et d'agir sur la glande thyroïde du fœtus, tout comme il est

excrété dans le lait pouvant ainsi agir sur la thyroïde du nourrisson (International Agency for Research on Cancer, 2002).

2. Propriétés pharmacodynamiques

a. Action intra-thyroïdienne du PTU

L'effet antithyroïdien du PTU est majoritairement intra-thyroïdien. Il repose principalement sur l'inhibition de l'iodination des résidus thyrosines, ainsi que le couplage du DIT et du MIT, contrôlés par l'enzyme TPO au sein des follicules thyroïdiens. L'inhibition de cette étape clé, de façon dose-dépendante chez l'Homme ainsi que chez le rongeur, induit une diminution de la synthèse de T4 et de T3. Le PTU est donc un excellent modèle dose-dépendant dans l'établissement d'une hypothyroïdie (Chen, et al., 2018; Rahaman et al., 2015).

b. Action extra-thyroïdienne du PTU

Outre l'inhibition de la TPO, le PTU a un effet dépresseur sur la DIO1 intrahépatique et intrathyroïdienne (responsable de la conversion de T4 en T3), ce qui renforce l'effet hypothyroïdien de ce composé (Chen et al., 2018). Secondairement à l'hypothyroïdie iatrogène, l'inhibition de l'axe hypothalamo-hypophysaire est levée, stimulant la synthèse de TRH pour compenser ce phénomène. En conséquence, la concentration en TSH sérique est augmentée significativement (Figure 19).

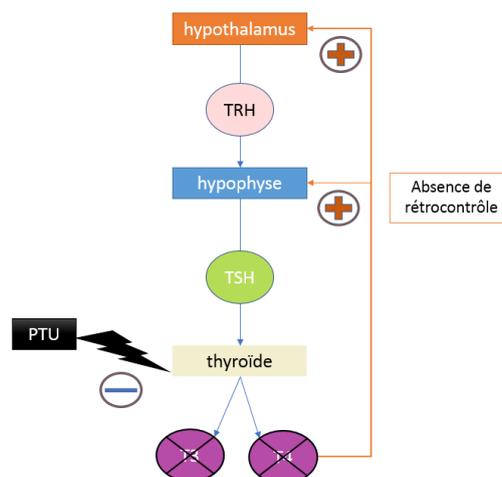


Figure 19 - Mécanisme de régulation de la fonction thyroïdienne lors d'un traitement au PTU.

Il apparait également que le PTU est capable de bloquer l'effet transcriptionnel des hormones thyroïdiennes, et notamment de la T3, par inhibition de sa fixation sur ces récepteurs cibles intranucléaires (Moriyama et al., 2007).

L'ensemble des effets de ce traitement anti-thyroïdien est regroupé dans la Figure 20.

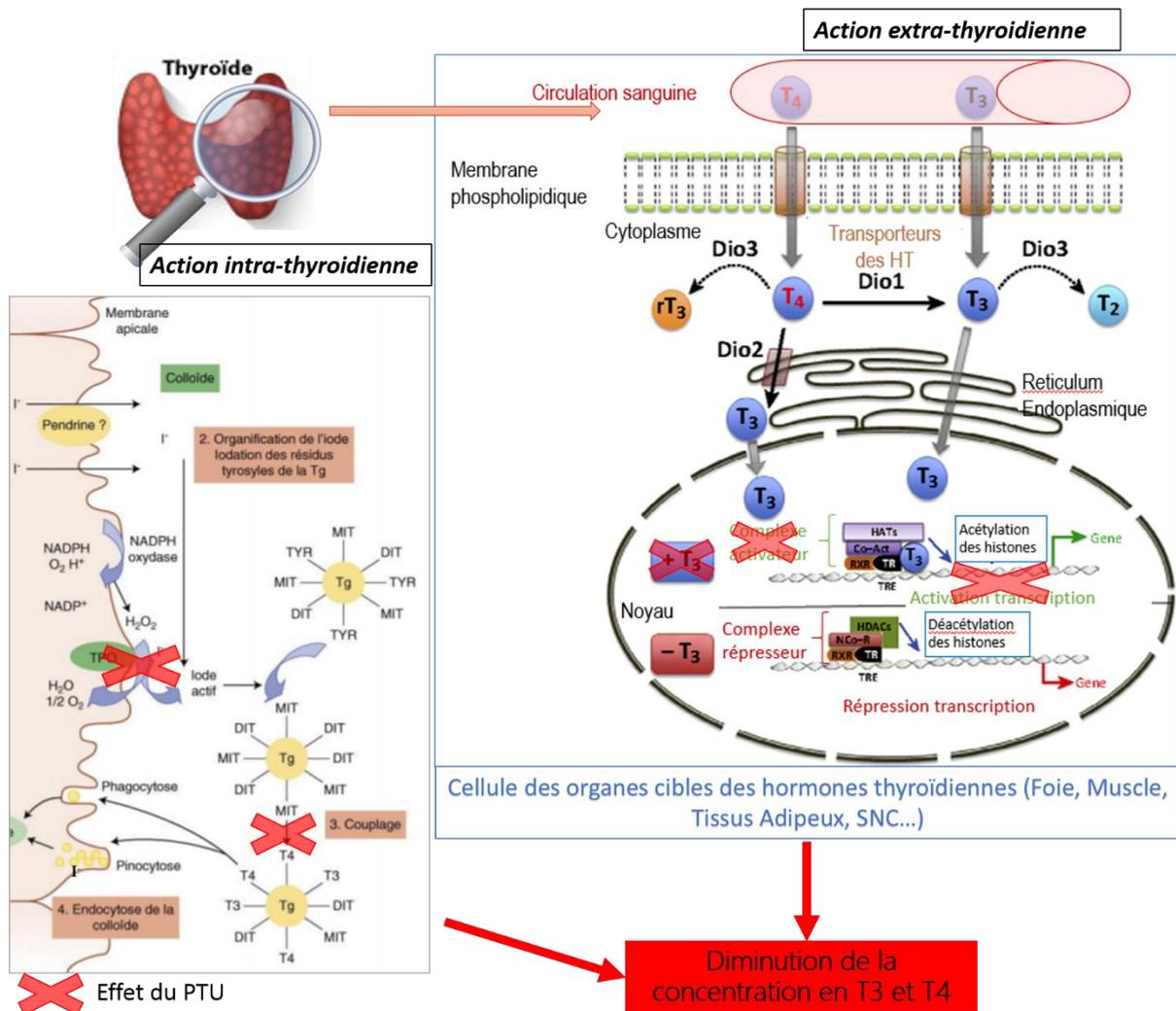


Figure 20 - Synthèse des effets du 6-n-PropylThiouracil (PTU) sur le métabolisme thyroïdien.
(D'après Massart & d'Herbomez, 2013; Rohit et al., 2014)

B. Effets sur la fonction thyroïdienne chez le rat et la souris

1. Effets sur la fonction thyroïdienne chez le rat

a. Effets sur les concentrations des hormones thyroïdiennes du rat

La bibliographie montre que le modèle animal rongeur majeur dans les études utilisant le PTU est le rat. Des études de pharmacocinétique et de pharmacodynamie chez le rat ont ainsi permis d'établir, pour une dose de PTU administrée quotidiennement les concentrations en PTU sérique, en PTU intra-thyroïdienne et en hormones thyroïdiennes circulantes obtenues après traitement (Cooper et al., 2015; Halpern et al., 1983; Mayberry & Astwood, 1960)

Dans l'expérience de Gordon (1997), 6 rats sont soumis pendant 14 jours à 50 ppm de PTU distribué dans l'eau de boisson, soit une dose ingérée estimée à 4 mg/kg/j. L'inconvénient de ce mode d'administration réside dans la difficulté à estimer la consommation en eau journalière (et donc de PTU) des individus. A l'issue de ce traitement, les valeurs de T3 et T4, mesurées dans le sérum par méthode RIA, sont diminuées respectivement de 82% et 99%.

Dans les expériences de Hood et al., (1999 a et b) sur des rats mâles Sprague-Dawley de 5 semaines, l'administration d'un aliment contenant 30 ppm de PTU dans l'alimentation pendant 90 jours (soit une dose ingérée de 2,4 mg/kg/j) induit une réduction de la concentration en T3 de 60% et en T4 de 90%. La concentration en TSH lors de ce traitement était multipliée par 8.

Dans l'expérience de Nambiar (2014), des rats sont gavés une fois par jour durant 29 jours avec des doses de PTU de 1, 20 et 200 ppm (soit de 0.08 mg/kg/j à 16 mg/kg/j). Ce mode d'administration permet de s'assurer de la bonne prise du traitement, tout en maîtrisant la dose ingérée par individu. Les hormones T4 et TSH sont mesurées par méthode RIA, et la T3 est mesurée par test ELISA. Ils observent à l'issue du traitement, une diminution significative de la T3 et de la T4 (les résultats sont équivalents à 0,1 à 0,45 fois les niveaux hormonaux du groupe contrôle) associée à une augmentation de la TSH (de 2,57 à 117,8 fois la concentration contrôle). La thyroxine est plus fortement impactée que la T3, en effet les groupes traités ont un niveau de T4 proche de la limite de détection dès 1 ppm, tandis que la diminution de T3 est plus graduelle entre les doses de 1 ppm et 200 ppm.

Pour résumer, le PTU inhibe la synthèse des hormones thyroïdiennes bien que la triiodothyronine semble impactée moins sévèrement que la thyroxine. La boucle de

rétrocontrôle de l'axe hypothalamique hypophysaire est ensuite stimulée, conduisant à l'augmentation de la TSH qui stimule la glande thyroïde. Chez les rongeurs, la thyroïde est très sensible aux variations de cette hormone.

b. Effets sur la structure histologique de la thyroïde du rat

Les effets histologiques du PTU sur la glande thyroïdienne ont été décrits pour différentes doses et durée d'exposition (Delverdier et al., 1991; Hood et al., 1999 a et b; Nambiar et al., 2014; Suzuki, et al., 1967; Yi et al, 1998). Les deux travaux (Delverdier et al., 1991; Yi et al., 1998) rapportant des mesures histomorphométriques seront détaillés.

Dans l'ensemble des études citées, l'exposition au PTU est associée à une hyperplasie diffuse de la thyroïde et une hypertrophie des thyrocytes : l'épithélium folliculaire est cubique à cylindrique et la colloïde réduite. Ces modifications sont décrites dès une exposition à 1 ppm de PTU dans l'alimentation de rats mâle Sprague-Dawley et Wistar (soit 0,08 mg/kg/j) pendant 21 et 31 jours respectivement (Hood et al., 1999b; Nambiar et al., 2014). Une deuxième étude de Hood (1999a) montre que l'hyperplasie folliculaire est observée après seulement 7 jours d'exposition pour une dose de 30 ppm (2,4 mg/kg/j). Dans un article relativement ancien (Suzuki et al., 1967), une congestion modérée du parenchyme thyroïdien est observée sur des rats Wistar exposés pendant 6 semaines à une dose de 100 ppm (soit une dose ingérée d'environ 8 mg/kg/j).

Dans l'étude de Delverdier en 1991, 3 rats mâles Sprague-Dawley de 10 semaines sont exposés à des concentrations de PTU de 200 ppm dans l'eau de boisson pendant 15 jours (soit 16 mg/kg/j). L'étude histomorphométrique s'est focalisée sur l'étude de 3 paramètres : la surface des follicules thyroïdiens (1889.87 μm^2 vs 1159.73 μm^2), la hauteur de l'épithélium folliculaire (12.88 μm vs 6.92 μm) et le pourcentage occupé par le tissu épithélial (77.27% vs 58.73%) dans la thyroïde. L'ensemble des paramètres présente des valeurs plus élevées chez le groupe traité mais les macro-follicules périphériques inactifs présents à moins de 300 μm du bord de la glande n'ont pas été mesurés. Concernant la méthode, la réaction d'imprégnation argentique histochimique utilisée dans ce travail a permis de discerner clairement la membrane basale des follicules thyroïdiens, ce qui a permis de faciliter les mesures morphométriques (Delverdier et al., 1991).

Dans l'étude de Yi en 1998, 18 rats mâles Wistar de 7 semaines ont été gavés à hauteur de 5 mg de PTU par jour (soit une consommation estimée à 14mg/kg/j) via une sonde gastrique pendant 1 à 2 semaines. La mesure des aires folliculaires et colloïdales a permis de quantifier l'hyperplasie induite par le PTU. Ainsi, après 2 semaines d'exposition, la surface de l'épithélium folliculaire avait augmenté alors que la surface colloïdale avait diminué. Une semaine après le retrait de l'antithyroïdien, les follicules ont retrouvé des proportions comparables à ceux du groupe contrôle.

Une étude (Kmiec et al., 1998) propose une approche méthodologique morphométrique manuelle de la thyroïde. Les contours des follicules et de la lumière folliculaire ont été soigneusement dessinés afin de déterminer les surfaces et « volumes » de l'épithélium et de la colloïde. Un « indice d'activation thyroïdienne » basé sur le rapport volume épithélial / volume colloïdal a ainsi été calculé afin d'évaluer la fonction thyroïdienne. L'ensemble des mesures de cette étude ont été effectuées sur une coupe médiane de la thyroïde car celle-ci est jugée représentative de l'ensemble du lobe selon une étude relativement ancienne (Denef et al., 1979) qui sert cependant de référence dans un article récent de l'association américaine de la thyroïde (Bianco et al., 2014).

2. Effets sur la fonction thyroïdienne chez la souris

Les effets du PTU sur la fonction thyroïdienne chez la souris sont beaucoup moins documentés, notamment en ce qui concerne les modifications histologiques et leur analyse histomorphométrique, décrites dans un unique article (Ferreira et al., 2007).

a. Effets sur les concentrations des hormones thyroïdiennes de la souris

La diminution des hormones thyroïdiennes est retrouvée comme l'illustrent les deux uniques études référencées (Silva & Giusti-Paiva, 2015; Moon et al., 2013). Dans l'étude de Silva & Giusti-Paiva (2015), des souris mâles Swiss sont soumises à des doses de PTU de 500 ppm pendant 30 jours administré dans l'eau de boisson, soit 75 mg/kg/j environ. Les hormones T3 et T4 sont mesurées par méthode RIA (dosage radio-immunologique) et comparées au groupe

contrôle. Les hormones T3 et la T4 sont significativement diminuées par le traitement au PTU respectivement de 18% et de 64%. Des résultats similaires sont observés dans l'expérimentation de Moon (2013) réalisée sur 28 jours avec 6 souris C57BL mâles nourries avec un aliment contenant 1500 ppm de PTU et carencé en iode, soit environ une dose de PTU quotidienne de 225mg/kg. Les mesures de thyroxine libre montrent une diminution de 50% par rapport au groupe contrôle, la thyroxine totale est quant à elle diminuée de 36%.

b. Effets sur la structure histologique de la thyroïde de la souris

Dans l'étude de Ferreira en 2007, 10 souris femelles Swiss de 33 mois sont exposées à des concentrations de PTU de 1000 ppm dans l'eau de boisson pendant 30 jours soit 150 mg/kg/j. Toutes les glandes thyroïdes des animaux traités présentaient des lésions compatibles avec une hyperplasie folliculaire diffuse modérée à sévère. Les follicules présentaient des contours irréguliers et étaient limités par un épithélium cubique à cylindrique parfois stratifié avec des projections papillaires dans la lumière des follicules. Certains follicules n'avaient plus de lumière ou bien la colloïde était vacuolisée. Les thyrocytes hypertrophiés présentaient un noyau large et hypochromatique et un cytoplasme parfois vacuolisé.

Concernant les mesures histomorphométriques, la hauteur de l'épithélium a été obtenue en mesurant l'épithélium de 30 follicules en quatre points différents au grossissement x1000. L'augmentation de la hauteur de l'épithélium entre groupe traité ($12.10 \pm 2.14 \mu\text{m}$) et groupe contrôle ($3.7 \pm 0.28 \mu\text{m}$) a ainsi pu être démontrée.

CHAPITRE 3 – Etude expérimentale

Cette thèse expérimentale s'inscrit dans un projet scientifique plus vaste nommé « Gestation, Pesticides, Thyroïde » (GePeTho) inscrit dans le plan Ecophyto II (Programme National de Recherche sur les Perturbateurs Endocriniens) et faisant intervenir trois partenaires scientifiques, l'Institut National de la Recherche Agronomique (Unité Mixte de Recherche 1331 Toxalim), le Centre National de la Recherche Scientifique (Unité Mixte de Recherche 7221) et l'ENVT (Equipe Centre Régionale d'Exploration Fonctionnelle et de Ressources Expérimentales). Le plan Ecophyto a pour objectif de réduire de 50% les produits phytosanitaires en 10 ans à l'horizon 2030. L'axe de recherche de ce programme a pour objectif de répondre aux besoins de connaissances et d'innovation dans l'idée de mettre au point des solutions alternatives pérennes d'un point de vue technique, économique, environnemental et sanitaire. A terme, une feuille de route pourra être établie dans l'objectif d'une substitution progressive des produits phytosanitaires les plus à risque pour l'environnement et la santé. Le projet GePeTho a pour objectif spécifique d'établir une base scientifique pour une approche intégrative des mécanismes d'action et effet de pesticides perturbateurs thyroïdiens durant la période particulière de la gestation. En termes d'outils, cela implique la détermination de paramètres permettant une évaluation quantitative de la fonction thyroïdienne, afin d'établir une approche normative de cette fonction. Le travail de cette thèse expérimentale consiste en l'évaluation de paramètres histomorphométriques comme marqueur sensible et précoce d'une perturbation thyroïdienne, même subtile, sur modèle murin.

A. Matériels & méthodes

1. Animaux

Ce projet a été évalué par le comité d'éthique en expérimentation animale n°086 et a reçu un avis favorable. Il a également reçu une autorisation de projet scientifique par le Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (APAFIS#14878-2018042715337462 v3).

L'étude est réalisée avec 40 souris Swiss mâles (JANVIER LABS, Saint Bertin, France) reçues à l'âge de 5 semaines et allotées selon leur poids afin de limiter la lutte pour la dominance. Après une période d'acclimatation de 2 semaines, les animaux sont âgés de 7 semaines et répartis en 5 groupes de 8 individus, un code couleur étant affecté à chaque groupe. Le groupe « contrôle » (vert) est soumis à un régime normo-iodé, sans supplémentation en PTU. Les groupes traités jaune, bleu, rouge et noir sont eux soumis à un régime déficient en iode avec une supplémentation en PTU de respectivement 1, 5, 10 et 100 ppm dans le but d'obtenir des doses moyennes ingérées de l'ordre de 0.15, 0.75, 1.5 et 15 mg/kg de souris/jour.

Chaque groupe est divisé en deux lots (1 lot de 4 souris/cage) dont le début de l'administration est décalé de 3 jours afin de répartir les prélèvements (terminaux) sur deux journées.

Les souris sont logées dans les conditions d'hébergement respectant leur bien-être avec un enrichissement du milieu. L'eau et l'aliment sont mis à disposition *ad libitum* (100 g/jour est mis à disposition dans chaque cage).

2. Aliment

La base de l'aliment commune à l'ensemble des groupes est dépourvue d'iode. De l'iodate de potassium a ensuite été ajouté afin d'obtenir une concentration en iode finale de 0,6 ppm pour le groupe contrôle et de 0,06 ppm pour les groupes traités (carence dite modérée : 0,03-0,05 ppm en iode) (Bianco et al., 2014). Du saccharose, indispensable pour compenser l'amertume du PTU et ne pas diminuer l'appétence, a été ajouté à hauteur de 3 % dans l'aliment de l'ensemble des animaux.

Tous les aliments ont été préparés par SAFE diets (Augy, France). Le PTU (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, Etats-Unis) a été incorporé dans l'aliment. Quatre lots de granulés supplémentés à différentes doses de PTU (1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 100 ppm) ont été préparés.

3. Méthodologie expérimentale

a. Plan expérimental

Les souris sont identifiées par un marquage coloré dès leur arrivée et réparties en fonction de leur poids au sein de chaque groupe. Le plan expérimental et la chronologie de l'expérimentation sont décrits dans la figure 21. La durée d'exposition au PTU est de 28 jours, en référence à la ligne directrice de l'OCDE, TG 407.

Les consommations alimentaires, les poids et le comportement des souris sont relevés de façon bi-hebdomadaire. Quatre prélèvements sanguins permettant le suivi des paramètres hormonaux sont réalisés sur chaque individu : à J0 (veine faciale), puis à J14 (veine faciale) et deux à J28 (veine faciale et ponction cardiaque). Les hormones thyroïdiennes T3, T4 et rT3 sont dosées sur ces quatre prélèvements ; la TSH est dosée sur le dernier prélèvement uniquement (ponction cardiaque).

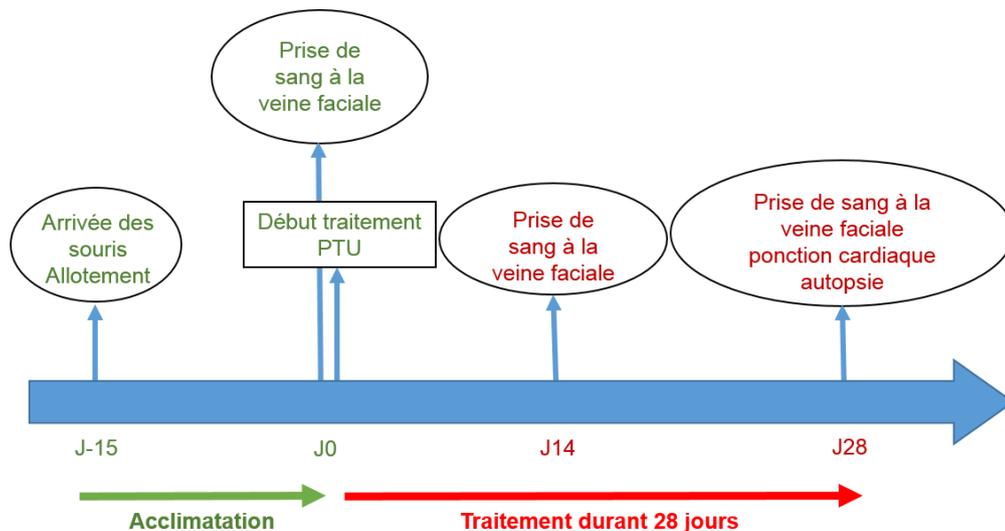


Figure 21 - Frise chronologique situant les différentes phases de l'expérimentation.

b. Procédures expérimentales

i. Modalités de collecte des spécimens sanguins et tissulaires

Des prélèvements sanguins à la veine faciale sont réalisés sous anesthésie gazeuse (flash

anesthésie, moins de 30s isoflurane O2) : 200 µL de sang sont collectés sur microtube hépariné (Microvette CB300LGH SARSTEDT) à J0, J14 et J28. A J28, les animaux sont sacrifiés sous anesthésie gazeuse et un prélèvement sanguin terminal est réalisé par ponction cardiaque. Une dislocation cervicale assure la mort de l'animal.

Les deux lobes thyroïdiens sont prélevés avec trachée, œsophage (Figure 22) selon les recommandations RITA (Morawietz et al., 2003).

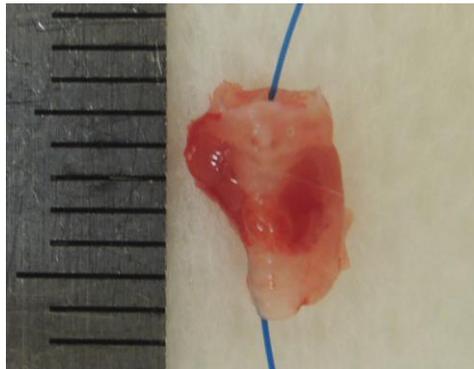


Figure 22 - Ensemble thyroïde-trachée-œsophage avant recoupe.

ii. Modalités de traitement des échantillons

Les échantillons sanguins sont centrifugés puis congelés à -20°C. La stabilité des hormones thyroïdiennes à -20°C durant plusieurs mois a été validée (Gauchez, 2014).

Les prélèvements tissulaires de thyroïde sont conservés dans du formaldéhyde à 4% tamponné à pH neutre, pendant 24-48 heures.

Une mesure de taille de la thyroïde est effectuée sous loupe binoculaire sur le bloc « œsophage-trachée-thyroïde » avec une règle (précision au dixième de millimètre) afin de calculer la distance qui sépareront 5 niveaux de coupes équidistants (N1, N2, N3, N4, N5) (Figure 23) mais également faciliter l'étape de microtomie. Le bloc fixé « œsophage-trachée-thyroïde » est ensuite traité par imprégnation en paraffine et deux sections de 3 à 4 µm d'épaisseur sont confectionnées lors de la microtomie pour chaque niveau N1, N2, N3, N4 et N5.

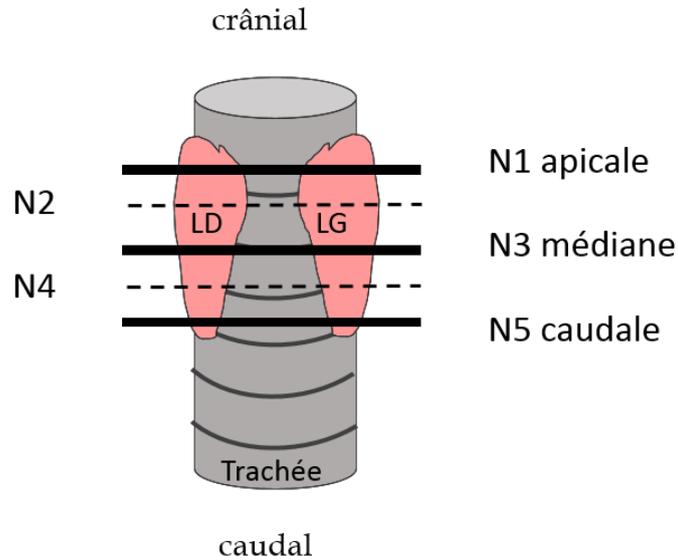


Figure 23 - Représentation des niveaux de coupes histologiques (N1 à N5) sur le bloc « trachée - lobes thyroïdiens » observé en vue ventrale. L'œsophage, dorsal, n'est pas représenté.
LD : Lobe droit, LG : lobe gauche

Pour chaque niveau, deux lames blanches sont confectionnées. Une lame est colorée à l'hématoxyline-éosine (HE) et la seconde est traitée par réaction à l'acide périodique-Schiff (APS).

4. Modalités d'analyse des échantillons

a. Analyse des dosages hormonaux

i. Dosages HPLC des hormones thyroïdiennes T3, T4 (et rT3)

Les hormones thyroïdiennes T3, T4 et rT3 sont dosées selon un protocole HPLC (High Performance Liquid Chromatography) couplé à de la spectrophotométrie de masse. Cette technique d'analyse se base sur la séparation des différents composés de petite taille (< 2 μ m) d'un mélange, ici les hormones thyroïdiennes T4, T3 et rT3 du plasma.

La phase mobile employée dans ce dosage est composée d'acétonitrile et d'eau acidifiée selon un rapport de 40/60. La phase stationnaire est quant à elle constituée de la colonne Cortecs « Waters Acquity UPLC BEH Shield RP18 1,7 μ m ».

La gamme aqueuse nécessaire à la calibration du dosage a été obtenue par solubilisation des hormones thyroïdiennes solides (T3, T4 et rT3) dans une solution d'EtOH à 60. Une courbe étalon est réalisée en phase aqueuse avec des gammes de concentrations de respectivement 0 ; 3.125 ; 6.25 ; 12.5 ; 25 ; 50 ; 100 ; 200 ng/mL et : 0 ; 0.3125 ; 0.625 ; 1.25 ; 2.5 ; 5 ; 10 ; 20 ng/mL pour T4 et T3/rT3.

Cette technique nécessite de précipiter les échantillons de sérum à l'aide de la solution Standard Interne (SI), qui servira aussi de phase mobile. Le SI est constitué d'acétonitrile acidifié à 0,1% auxquels s'ajoutent les hormones thyroïdiennes marquées au ¹²⁵I afin d'obtenir les concentrations suivantes : 25 ng/mL en T4 et 2.5 ng/mL en T3 et rT3.

Les performances du dosage sont évaluées par 3 paramètres : la limite de détection (LOD), la limite de quantification (LOQ) et la justesse évaluée avec des points de contrôle qualité (QC) à au moins 3 concentrations différentes comprise dans la gamme étalon. La LOD représente la limite de détection soit la plus petite concentration en analyte pouvant être détectée mais non quantifiable dans les conditions expérimentales. Cette valeur seuil équivaut à un pic qui aurait une aire équivalente à 3 fois le bruit de fond du chromatogramme. La LOQ représente la limite de quantification soit la plus petite concentration en analyte pouvant être quantifiée avec une incertitude acceptable (Coefficient de Variation < 20% et exactitude de 80%), La LOQ a été validée à 3 ng/mL. La justesse correspond à l'écart entre la concentration des QC obtenue expérimentalement et la valeur nominale des QC qui doit être compris en 85% et 115%.

ii. Dosage ELISA de TSH

La concentration en TSH est mesurée à l'aide d'un kit destiné à la mesure de TSH de sérum de souris par technique immuno-enzymatique d'inhibition compétitive couplée à de la spectrophotométrie (Cloud-Clone Corp. CEA463Mu 96). Le protocole détaillé est disponible en Annexe 2.

b. Analyses histologique et histomorphométrique

L'analyse histologique conventionnelle des thyroïdes en microscopie photonique (Eclipse 50i, Nikon, Kobé, Japon) est effectuée par l'histologiste (N. Bourgès-Abella). L'observation porte sur la structure des follicules (épithélium, colloïde), du tissu interstitiel et la cytologie des thyrocytes. L'évaluation de l'hyperplasie folliculaire diffuse est réalisée de manière semi-quantitative selon une grille de notation à 4 scores : 1 (légère), 2 (modérée), 3 (marquée) et 4 (sévère) par rapport aux observations du groupe contrôle.

Une première lecture permet de sélectionner les niveaux de coupe de telle sorte que C1 est la coupe la plus crâniale, C3 est en position médiane et C5 est la coupe la plus caudale dans le lobe thyroïdien. Cette étape est facilitée par l'estimation des différents niveaux (N1 à N5) sur tissu fixé mais nécessite cependant un contrôle microscopique. Il a fallu recouper des sections au microtome car la coupe de niveau N5 n'était pas suffisamment caudale ou que l'asymétrie des lobes thyroïdiens droit et gauche conduise à recouper spécifiquement C1, C3 et C5 pour chacun d'eux.

L'analyse histomorphométrique est réalisée sur C1, C3 et C5 (Figure 24) pour chaque lobe thyroïdien. Les lames sélectionnées (HE et APS) sont numérisées (Hamamatsu, NanoZoomer 2.0-HT Whole Slide Imager) puis traitées à l'aide du logiciel d'images FIJI-ImageJ.

Sur chaque image numérisée d'une coupe traitée à l'APS, les lobes thyroïdiens sont détournés manuellement (à l'exclusion des parathyroïdes quand elles étaient visibles et de la surface du hile) ce qui permet au logiciel d'image d'en calculer la surface (L. Mialon). Cette opération est réalisée sur les lobes droit et gauche, ainsi que sur l'isthme le cas échéant. Les follicules thyroïdiens sont ensuite comptés manuellement. La densité folliculaire moyenne est calculée selon la formule ci-dessous :

Densité folliculaire = nombre de follicules des 2 lobes/somme des 2 surfaces lobaires

Pour les coupes C3, la surface totale de chaque follicule ainsi que la surface occupée par la colloïde est mesurée au grossissement $\times 20$ (T.Banquet) (Figure 24). L'indice d'activité (IA) est alors calculé selon la formule ci-dessous :

IA = (surface de l'épithélium folliculaire/surface de la colloïde) \times 100

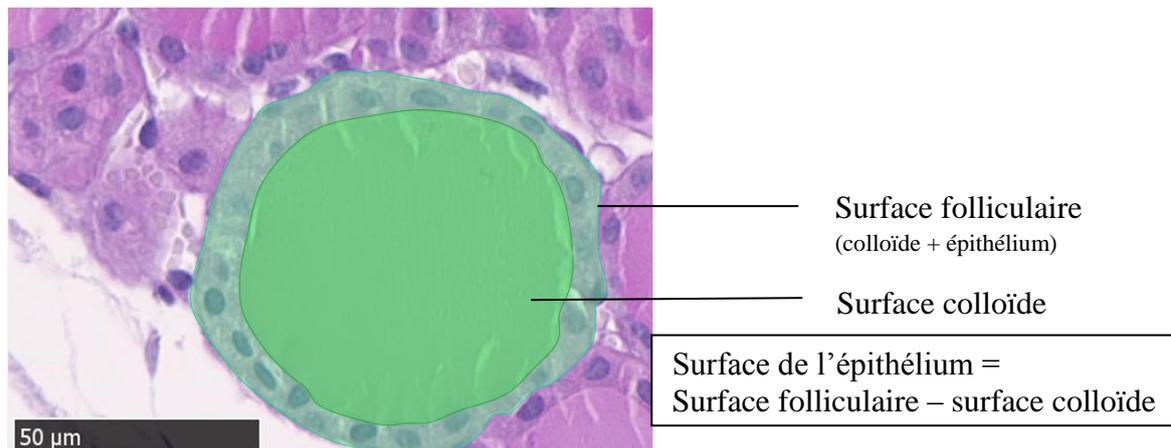


Figure 24 - Illustration de la méthode de mesure manuelle de l'indice d'activité.

La mesure des surfaces (follicules et colloïde) concerne l'ensemble des follicules thyroïdiens des groupes contrôles et traités 1 et 5 ppm. Pour les groupes traités 10 et 100 ppm, les lésions d'hyperplasie marquée à sévère empêchaient le détournement des follicules et/ou de la colloïde. Il a donc été décidé de mesurer seulement 20 IA (10 par lobe) pour ces groupes. Les 20 follicules pour lesquels l'indice d'activité est mesuré sont sélectionnés selon trois critères :

- leur position centrale au sein du lobe
- la présence d'un épithélium simple
- la présence d'une membrane basale bien définie.

Pour ce faire, une image au grossissement x20 en position la plus centrale du lobe est réalisée et 10 follicules présentant un épithélium simple et une lame basale bien définie sont mesurés. Une représentation schématique des différentes mesures réalisées est présentée sur la Figure 25. Les annexes 3 et 4 sont des exemples de mesures de densité folliculaire et d'indice d'activité sur des coupes histologiques de cette étude.

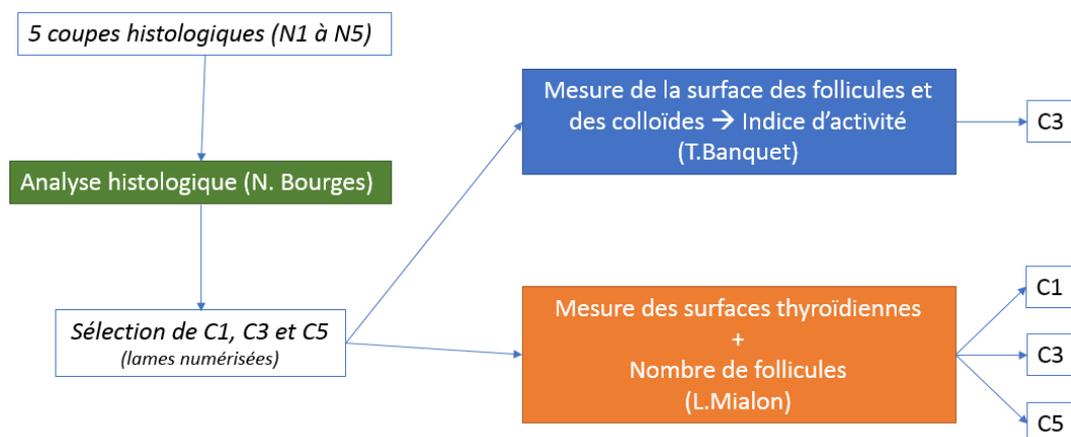


Figure 25 - Représentation schématique des mesures réalisées sur la thyroïde.

5. Analyse des résultats

Les résultats obtenus sont analysés à l'aide du logiciel de biostatistiques R. Des analyses de variance (ANOVA) et des comparaisons post-hoc (tests de Tukey) sont appliquées aux concentrations des hormones thyroïdiennes ainsi qu'aux mesures histomorphométriques.

L'ajustement des courbes de corrélation entre concentrations hormonales et mesures histomorphométriques sont effectuées à partir des logiciels R et Excel selon des modèles linéaires et non linéaires. Les paramètres des équations ont été déterminés selon la méthode des moindres carrés. L'IC 50, ou concentration inhibitrice médiane, correspond à la concentration en T4 pour laquelle la valeur de l'indice d'activité ou de la surface de la colloïde est diminuée de 50%.

B. Résultats

La structure histologique des thyroïdes d'un même groupe traité était homogène à l'exception celle de deux animaux, appartenant aux groupes 5 et 10 ppm respectivement. L'animal du groupe 5 ppm présentait une lésion dégénérative congénitale et a été retiré de l'étude. Une souris du groupe 10 ppm présentait des valeurs totalement aberrantes de concentrations sériques en T3 (outlier vérifié statistiquement) et ont été retirées de l'ensemble des analyses.

1. Animaux

Aucune anomalie clinique n'a été détectée chez les animaux, ni lors du suivi quotidien des animaux, ni lors des observations détaillées bi-hebdomadaires (résultats non présentés). Une souris du groupe 1 ppm est morte au cours de la ponction sanguine à J14. Toutes les données de cet animal ont été exclues.

2. Poids et consommation alimentaire

Les pesées régulières effectuées bi-hebdomadairement montrent une augmentation du poids des souris au cours de l'expérimentation. Les poids entre les groupes ne sont cependant pas statistiquement différents les uns des autres (résultats non présentés).

La consommation alimentaire moyenne des souris n'est pas modifiée par la complémentation en PTU dans l'aliment mis à part pour la plus haute dose (100 ppm) pour laquelle la consommation tend à diminuer (environ 20%)

La consommation moyenne journalière de PTU a été quantifiée (Tableau 1) et est très bien corrélée (test de Pearson $r = 0.9989$, $p < 0.001$) à la quantité de PTU présente dans l'aliment.

Tableau 1 : Consommation moyenne de PTU (en mg par kg de poids corporel par jour)

Groupe	Contrôle	1 ppm	5 ppm	10 ppm	100 ppm
Consommation en PTU (en mg/kg de souris/j)	0	0,12	0,57	1,2	9,3

3. Concentrations hormonales

a. Concentration hormonale en T4

La cinétique de la concentration hormonale de T4 en fonction du temps (J0, J14 et J28) est présentée Figure 26.

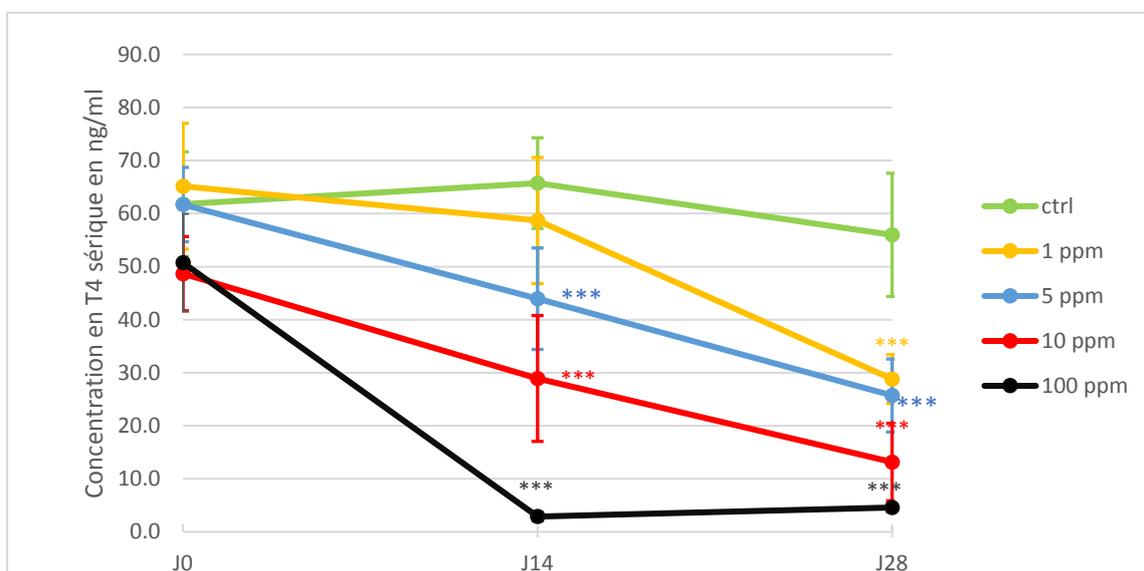


Figure 26 - Evolution de la concentration moyenne et écart type ($\pm 2SE$) en hormone thyroïdienne T4 circulante des groupes contrôle et traités au PTU en début d'étude (J0) puis après 14 (J14) et 28 (J28) jours d'exposition.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ par rapport au groupe contrôle (ctrl)

Initialement, la concentration en T4 est homogène entre les différents groupes ($p>0,05$) puis diminue au cours du temps pour l'ensemble des groupes traités ($p<0,01$). A J28, tous les groupes traités ont une concentration en T4 inférieure à celle du groupe contrôle ($p<0,05$). A J14, dès la dose de 5 ppm en PTU, on observe une différence significative de concentration en T4 par rapport au contrôle ($p<0,05$). Bien que ce ne soit pas toujours significatif (1 ppm, J14), on observe une diminution de T4 dose-dépendante à J14 ou J28.

Les groupes 1 et 5 ppm ont une concentration en T4 identique à J28. Le groupe 5 ppm n'est pas significativement différent du groupe 10 ppm à J14, ni à J28 comme le montre la comparaison des groupes 2 à 2 (Tableau 2). Le groupe 100 ppm présente la décroissance la plus marquée (proche des valeurs non détectables) et la plus précoce. En effet à J14, la concentration de T4 est déjà très faible et n'est pas différente de sa valeur à J28.

Tableau 2 : Comparaison des concentrations plasmatiques en T4 deux à deux avec la valeur de p établie par un test de Tukey.

	Concentration en T4 (ng/ml)	Concentration en T4 (ng/ml)	Valeur de p		Concentration en T4 (ng/ml)	Concentration en T4 (ng/ml)	Valeur de p
J14	contrôle	1 ppm		J28	contrôle	1 ppm	
	65,7 ± 8,5	58,7 ± 6,6	$p>0,05$		56,0 ± 11,6	28,8 ± 4,6	***
	1 ppm	5 ppm			1 ppm	5 ppm	
	58,7 ± 6,6	44,0 ± 9,6	**		28,8 ± 4,6	25,7 ± 6,9	$p>0,05$
	1 ppm	10 ppm			1 ppm	10 ppm	
	58,7 ± 6,6	28,9 ± 11,9	***		28,8 ± 4,6	13,2 ± 7,3	**
	1 ppm	100 ppm			1 ppm	100 ppm	
	58,7 ± 6,6	2,9 ± 1,0	***		28,8 ± 4,6	4,6 ± 0,9	*
	5 ppm	10 ppm			5 ppm	10 ppm	
	44,0 ± 9,6	28,9 ± 11,9	$p>0,05$		25,7 ± 6,9	13,2 ± 7,3	$p>0,05$
	5 ppm	100 ppm			5 ppm	100 ppm	
	44,0 ± 9,6	2,9 ± 1,0	***		25,7 ± 6,9	4,6 ± 0,9	$p>0,05$
10 ppm	100 ppm		10 ppm	100 ppm			
28,9 ± 11,9	2,9 ± 1,0	$p>0,05$	13,2 ± 7,3	4,6 ± 0,9	$p>0,05$		

* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$

b. Concentration hormonale en T3

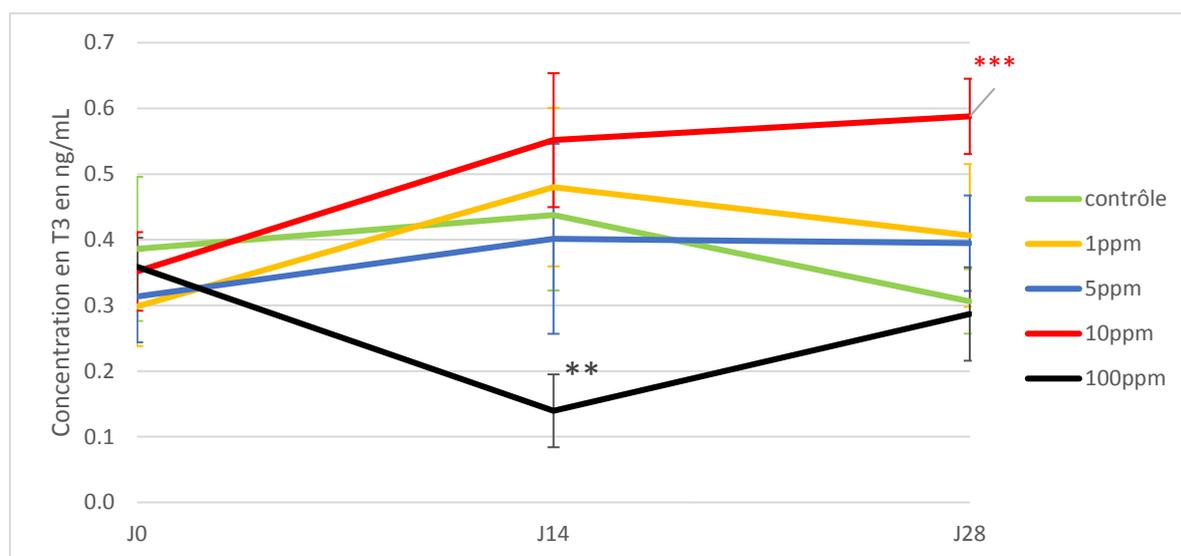


Figure 27 - Evolution de la concentration moyenne et écart type ($\pm 2SE$) en hormone thyroïdienne T3 circulante des groupes contrôle et traités au PTU en début d'étude (J0) puis après 14 (J14) et 28 (J28) jours d'exposition.

** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ résultats significativement différents du groupe contrôle (ctrl).
La souris B4 est exclue de ce dosage, considérée outlier

A J0, les différents groupes ont une concentration de $0,35 \pm 0,1$ ng/mL de T3 en moyenne. A J14, seul le groupe 100 ppm a une concentration en T3 significativement diminuée ($p < 0,01$), mais retrouve des valeurs proches du groupe contrôle à J28 ($p > 0,05$).

Malgré des profils d'évolution différents à l'issue du traitement, les différents groupes ont une concentration en T3 statistiquement non différente du groupe contrôle à l'exception du groupe 10 ppm pour lequel la concentration en T3 est augmentée ($p < 0,001$) à J28 (Figure 27).

c. Concentration hormonale en TSH

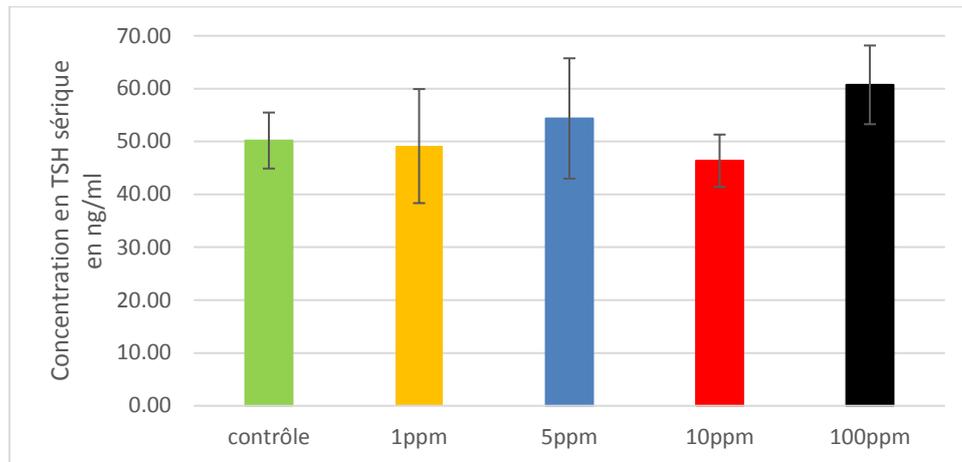


Figure 28 - Concentration moyenne et écart type ($\pm 2SE$) en TSH plasmatique mesurée par dosage ELISA à J28 en fonction de la dose de PTU.

A J28, la concentration en TSH est comparable entre groupe contrôle et groupes traités et est comprise entre 40 et 60 ng/mL ($p > 0,05$). Seul le groupe 100 ppm semble présenter une légère augmentation de la TSH par rapport au groupe contrôle, mais de façon non significative (Figure 28).

4. Analyse histologique

L'ensemble des thyroïdes d'un même groupe présente des structures histologiques similaires à l'exception d'une souris du groupe 5 ppm et d'une autre du groupe 10 ppm.

L'anomalie de la thyroïde du groupe 5 ppm est une lésion de dysplasie folliculaire diffuse. L'épithélium folliculaire est simple cylindrique à bi-stratifié ; les lumières folliculaires étant souvent difficiles à visualiser. Les thyrocytes sont hypertrophiés à rapport nucléo-plasmique très faible, leur noyau est déplacé en position apicale, avec présence d'une vacuole cytoplasmique éosinophile homogène et de grande taille (Figure 29). La dysplasie folliculaire diffuse est une lésion dégénérative, congénitale, décrite dans la littérature (Brändli-baiocco et al., 2018). C'est une lésion spontanée non associée à des modifications prolifératives de la thyroïde et donc à ne pas relier au traitement. Pour ces raisons, l'animal a été retiré de l'étude.

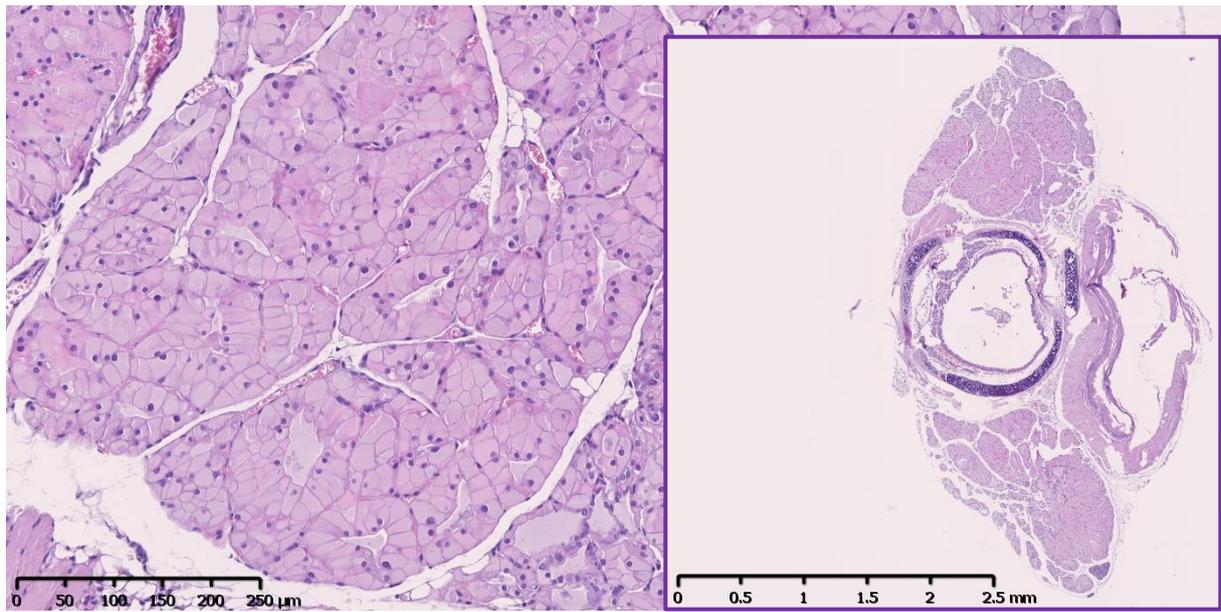


Figure 29 - Photographies à des faibles grossissements ($\times 1.32$ et $\times 10$) de la coupe histologique de la lésion de dysplasie folliculaire de l'animal du groupe 5 ppm (Hémalun-éosine)

Nous allons maintenant présenter les caractéristiques histologiques de chaque groupe tout en incluant un tableau détaillant l'analyse histologique (Annexe 5).

a. Groupe contrôle

Les thyroïdes du groupe contrôle présentent une structure histologique normale avec des follicules bordés en grande majorité par un épithélium simple cubique apalti, des lumières folliculaires ovoïdes et relativement régulières et une coloration intense de la colloïde après réaction à l'APS (Figure 30).

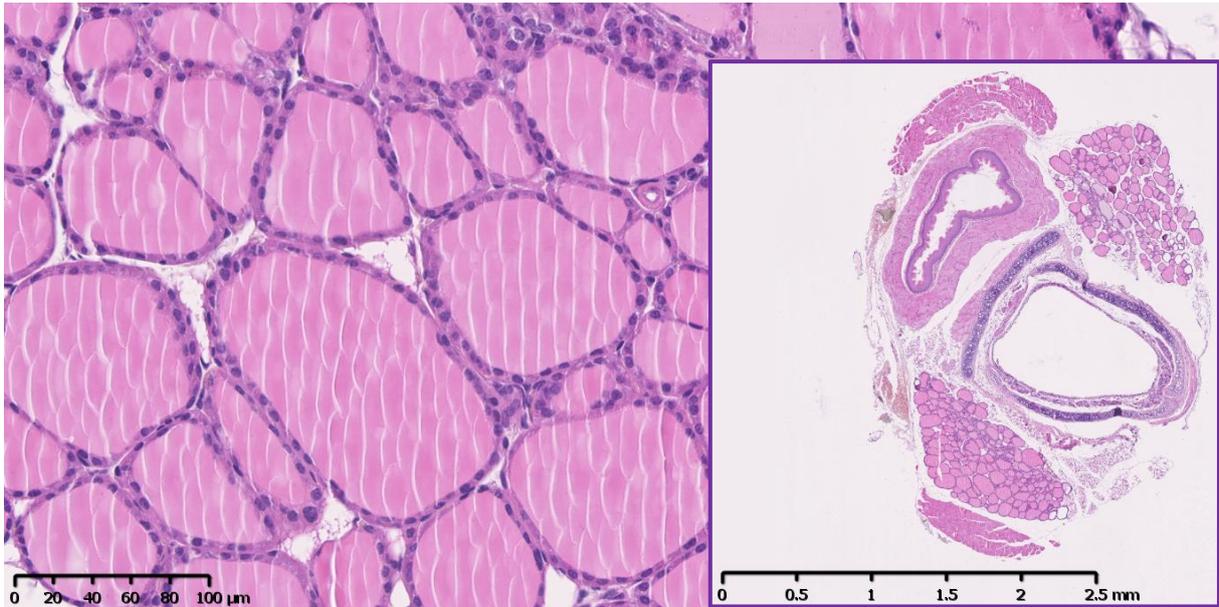


Figure 30 - Photographie d'une coupe histologique de glande thyroïde colorée à l'hémalun-éosine d'une souris du groupe contrôle aux faible ($\times 1.54$) et moyen ($\times 20$) grossissements.

b. Groupe traité 1 ppm

Les thyroïdes du groupe traité 1 ppm présentent une structure histologique légèrement modifiée avec une hyperplasie folliculaire diffuse légère et une congestion légère à absente. Les lumières folliculaires sont ovoïdes et relativement régulières, l'épithélium folliculaire est simple cubique avec des thyrocytes légèrement hypertrophiés ; la colloïde est bien mise en évidence par l'APS. L'analyse a porté sur 7 thyroïdes suite à l'absence de la souris 6, morte à J14 comme déjà mentionné (Figure 31).

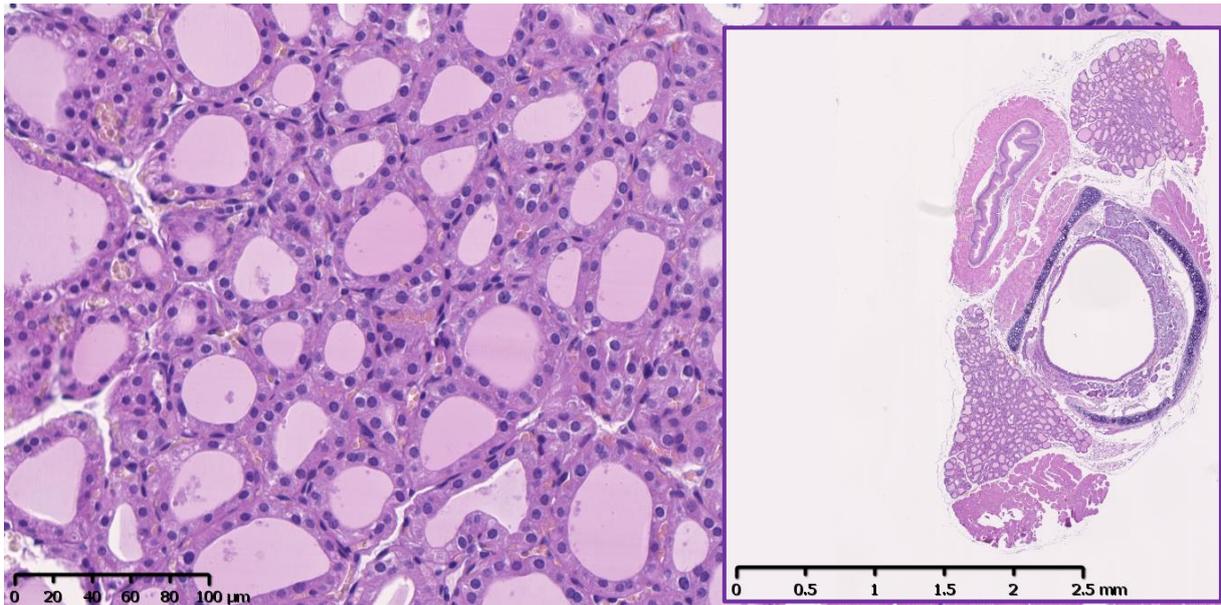


Figure 31 - Photographie d'une coupe histologique de glande thyroïde colorée à l'hémalun-éosine d'une souris du groupe 1 ppm observée aux faible ($\times 1.41$) et moyen ($\times 20$) grossissements.

c. Groupe traité 5 ppm

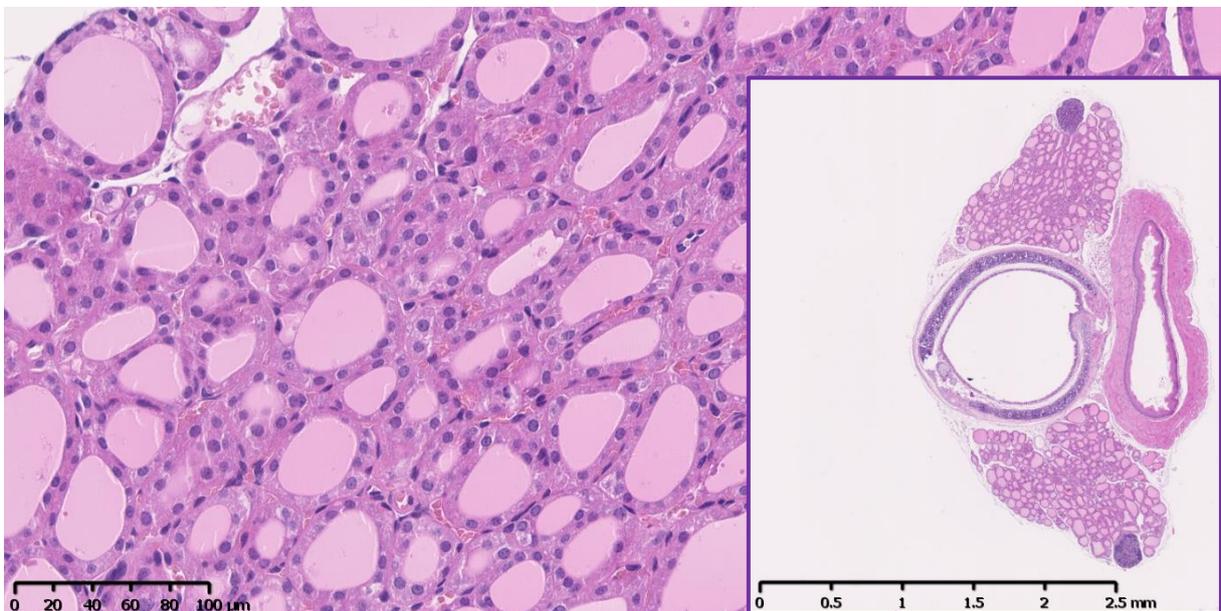


Figure 32 - Photographie d'une coupe histologique de glande thyroïde colorée à l'hémalun-éosine d'une souris du groupe 5 ppm observée aux faible ($\times 1.58$) et moyen ($\times 20$) grossissements.

Une hyperplasie folliculaire légère à modérée diffuse est observée sur l'ensemble des thyroïdes du groupe. L'épithélium folliculaire est simple cubique avec des thyrocytes hypertrophiés (hauteur doublée) ; présence de rares noyaux géants et bi-nucléation. La mise en évidence de la colloïde par l'APS n'est pas homogène pour l'ensemble des follicules mais les lumières folliculaires restent présentes (Figure 32).

d. Groupe traité 10 ppm

Une hyperplasie folliculaire diffuse marquée est observée sur l'ensemble des thyroïdes du groupe avec congestion légère à modérée dans le tissu interstitiel. Les follicules présentent un épithélium simple cubique haut à cylindrique avec stratification épithéliale focale et présence de rares projections papillaires. Les remaniements histologiques sont plus importants et se caractérisent par des thyrocytes hypertrophiés présentant une anisocytose, une anisocaryose modérée et une vacuolisation cytoplasmique légère et la présence de quelques plurinucléations. Les lumières folliculaires sont irrégulières, réduites. La colloïde n'est pas révélée par l'APS et apparaît fortement résorbée voire absente (Figure 33).

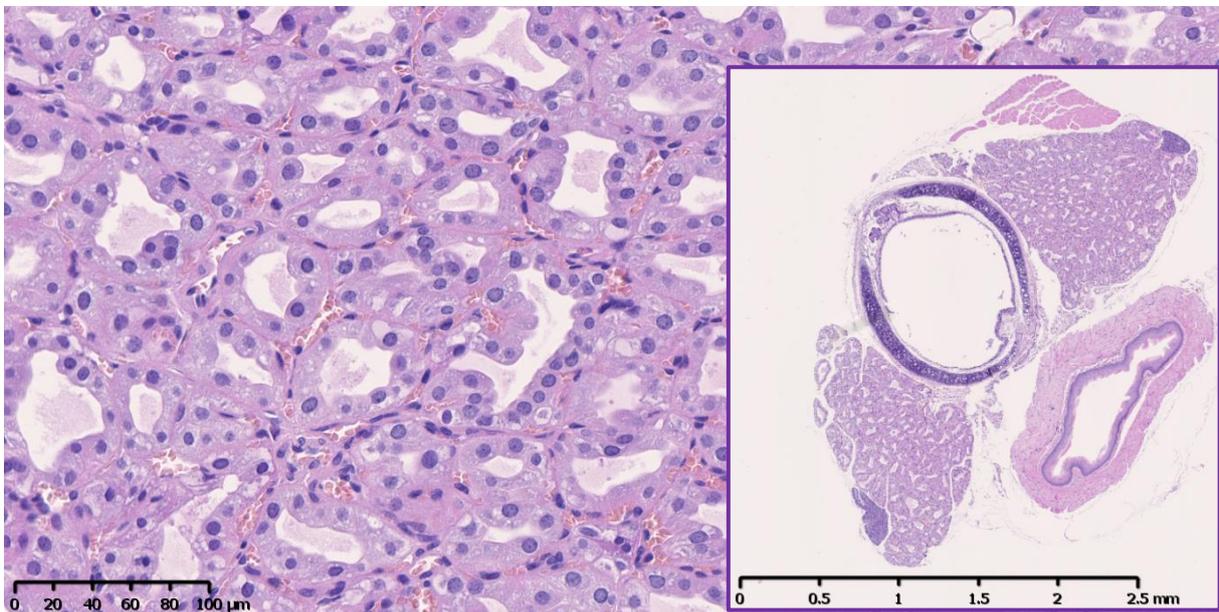


Figure 33 - Photographie d'une coupe histologique de glande thyroïde colorée à l'hémalun-éosine d'une souris du groupe 10 ppm observée aux faible ($\times 1.71$) et moyen ($\times 20$) grossissements.

e. Groupe traité 100 ppm

Une hyperplasie diffuse marquée à sévère ainsi qu'une congestion modérée du parenchyme thyroïdien est observée. Les follicules présentent un épithélium simple cylindrique haut avec stratification épithéliale focale et quelques projections papillaires. Les remaniements cytologiques des thyrocytes hypertrophiés sont importants avec anisocytose et anisocaryose marquées, nombreuses cellules plurinucléées et vacuolisation cytoplasmique marquée. La colloïde est fortement résorbée voire absente ; la réaction à l'APS est négative (Figure 34).

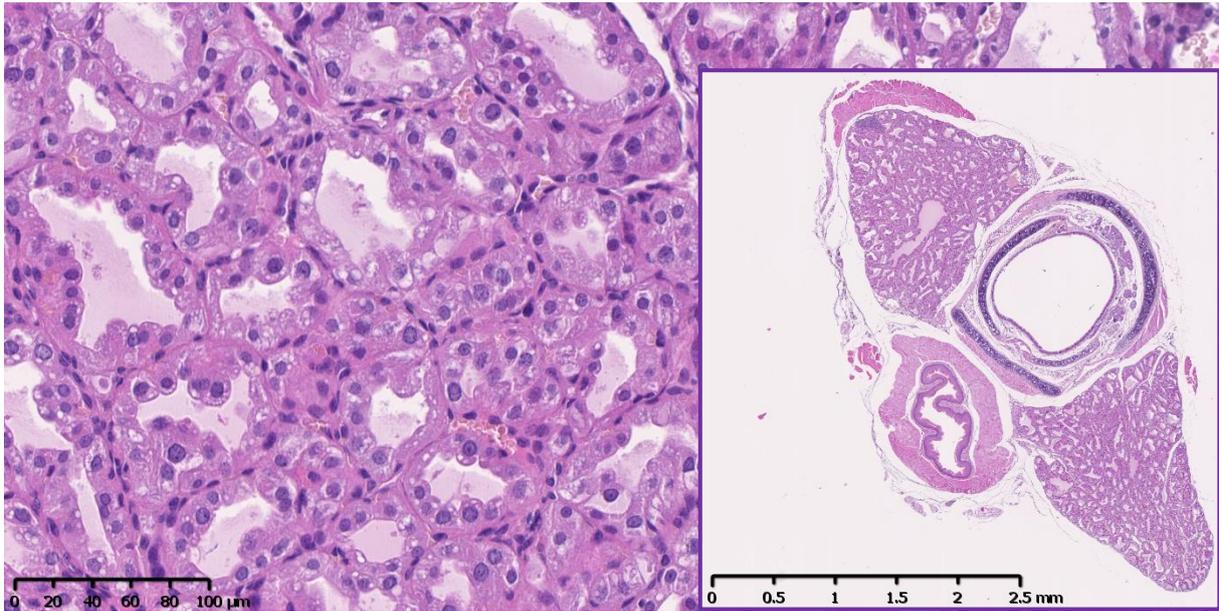


Figure 34 - Photographie d'une coupe histologique de glande thyroïde colorée à l'hémalun-éosine d'une souris du groupe 100 ppm observée aux faible ($\times 1.29$) et moyen ($\times 20$) grossissements.

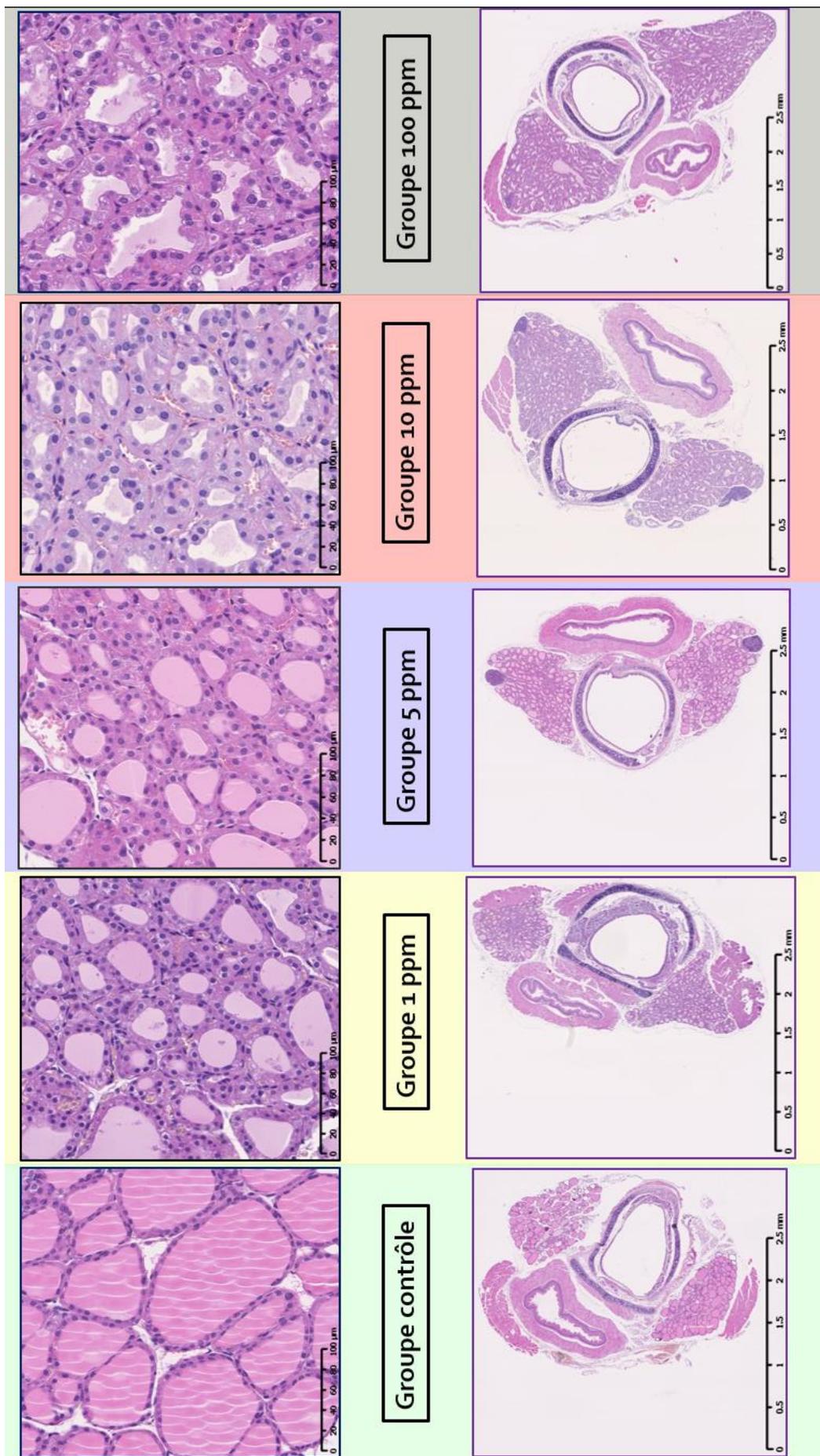


Figure 35 - Représentation de l'évolution graduelle des modifications histologiques de la thyroïde observées aux différentes doses de PTU

5. Analyse morphométrique

a. Mesure macroscopique des lobes thyroïdiens

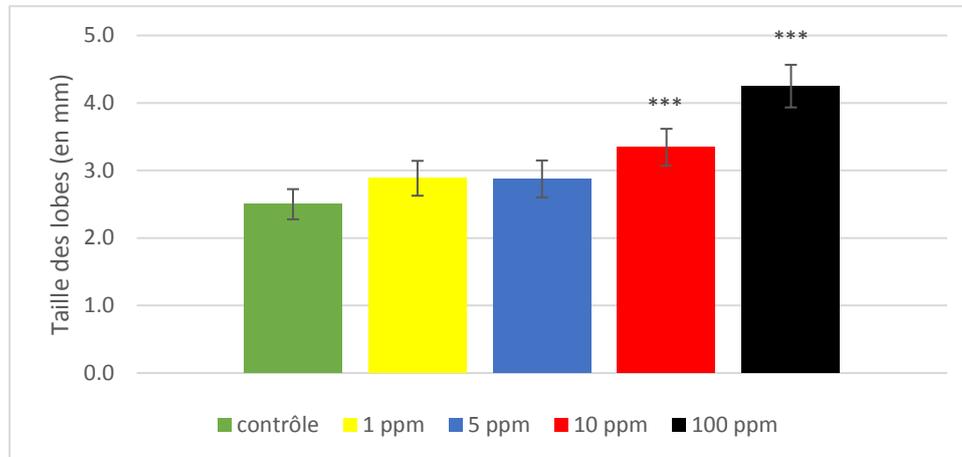


Figure 36 - Mesure moyenne des lobes thyroïdiens et écart type ($\pm 2SE$) à la loupe binoculaire en fonction de la dose de PTU.

*** $p < 0,001$ avec le groupe contrôle

La taille des lobes thyroïdiens augmente progressivement lorsque la dose en PTU augmente bien que cela ne soit significatif qu'à partir de 10 ppm ($p < 0,001$). Le groupe contrôle et les groupes traités 1 et 5 ppm ont des longueurs de lobes sensiblement équivalentes de $2.7 \pm 0,3$ mm². La longueur des lobes est significativement augmentée pour le groupe 100 ppm ($4.2 \pm 0,3$ mm²) (Figure 36).

b. Surface de coupe, nombre total de follicules et densité folliculaire

Les résultats de l'analyse histologique conventionnelle ayant montré que les observations étaient identiques pour un groupe donné quel que soit le niveau de coupe, les analyses histomorphométriques n'ont été réalisées que sur C1, C3 et C5 qui correspondent respectivement à l'apex proximal ou crânial, à la partie médiane et à l'apex distal ou caudal de la glande thyroïde.

Une première analyse statistique des résultats histomorphométriques n'a pas montré de différence entre niveaux de coupe C1, C3 et C5. La coupe C3 a été sélectionnée car elle présentait une densité folliculaire moyenne représentative de la valeur moyenne des trois coupes histologiques (données non fournies).

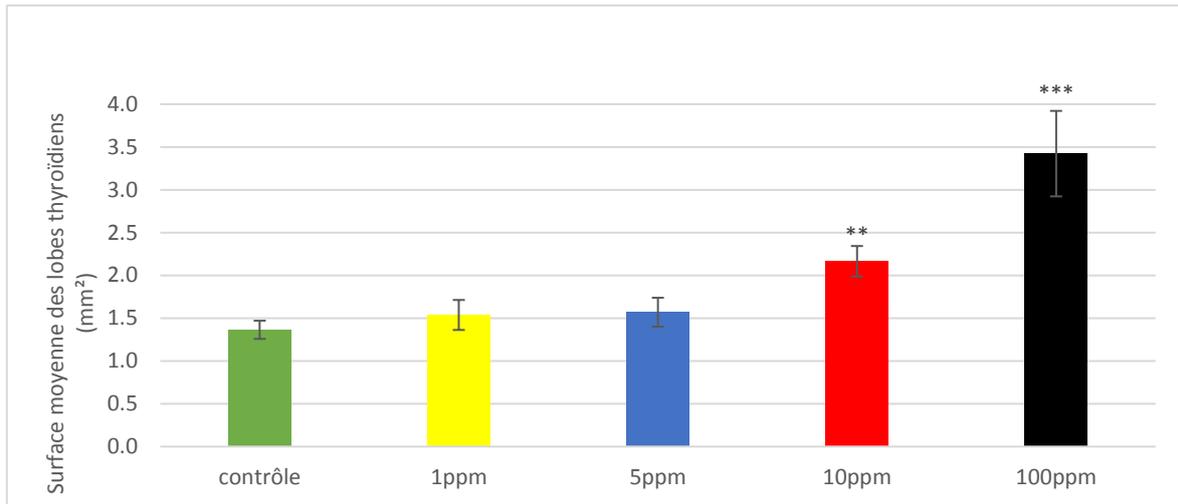


Figure 37 - Surface moyenne ($\pm 2SE$) des lobes thyroïdiens des coupes médianes en fonction de la dose de PTU.

** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ en comparaison avec le groupe contrôle, test de Tukey

La surface moyenne des lobes thyroïdiens augmente progressivement lorsque la dose en PTU augmente, mais cela est significatif à partir de la dose de 10 ppm ($p < 0,01$). Les groupes contrôle et traités (1 et 5 ppm) ont des surfaces lobaires moyennes sensiblement équivalentes de 1.5 mm² ($p > 0,05$). Les thyroïdes du groupe traité 10 ppm ont une surface d'environ 2,2 (± 0.2) mm². Cette surface est doublée pour le groupe 100 ppm (3.4 \pm 0.5 mm²) (Figure 37).

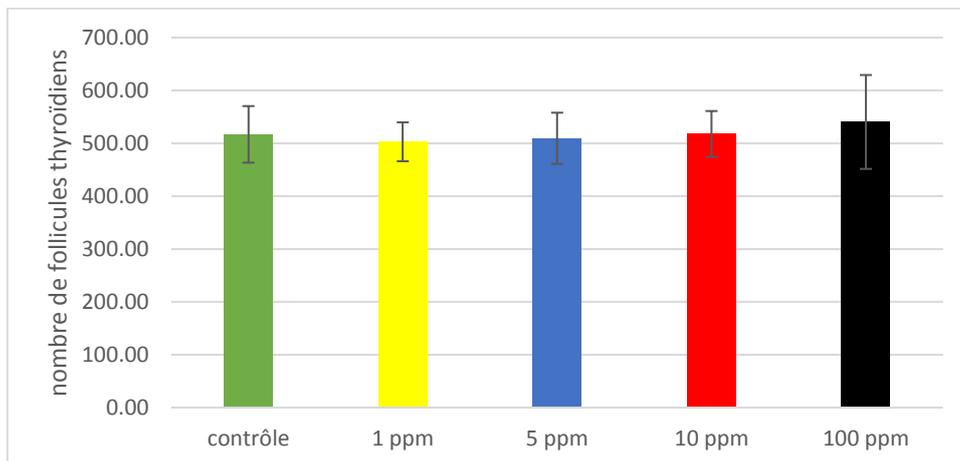


Figure 38 - Nombre moyen de follicules et écart type ($\pm 2SE$) des coupes médianes en fonction de la dose de PTU.

Le traitement au PTU n'a pas d'influence ($p > 0,05$) sur le nombre de follicules thyroïdiens (valeur moyenne de 517 \pm 13 follicules comptés par coupe histologique médiane) (Figure 38).

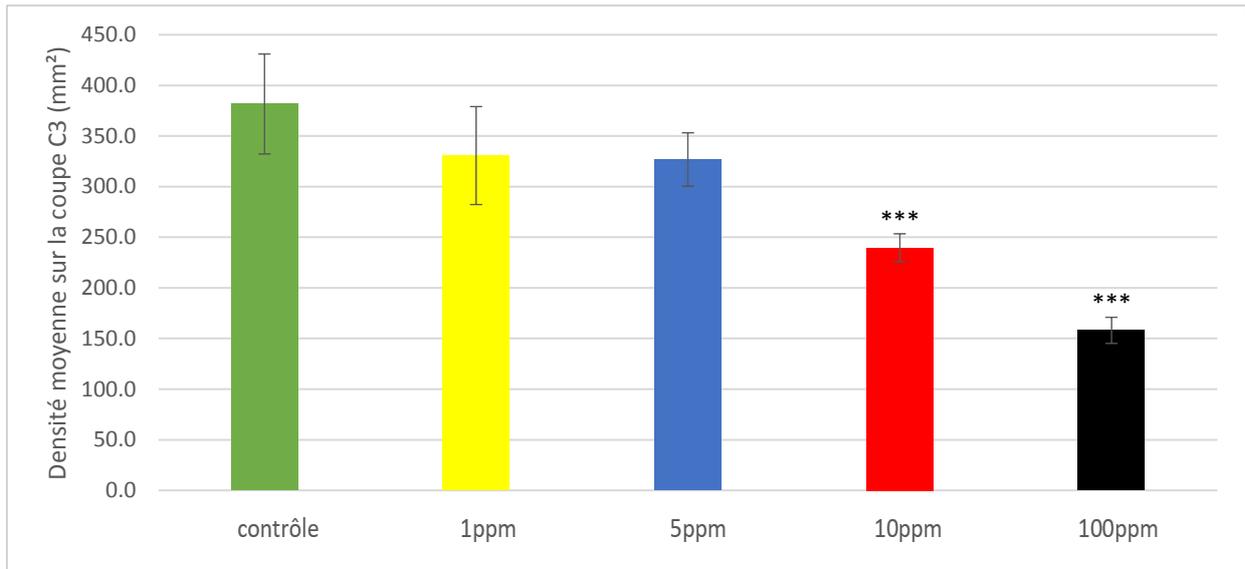


Figure 39 - Densité folliculaire moyenne ($\pm 2SE$) de la coupe histologique médiane en fonction de la dose de PTU administrée.

(*** $p < 0.001$ avec le groupe contrôle)

La décroissance progressive de la densité folliculaire pour la coupe C3 semble dose PTU dépendante (Figure 39). Cette diminution devient significative pour les groupes 10 ppm (240 ± 14 follicules/mm²) et 100 ppm (158 ± 13 follicules/mm²). Les groupes contrôle, traités 1 et 5 ppm ont une densité folliculaire moyenne comprise entre 327 et 381 follicules/mm². Le groupe 100 ppm présente la plus faible densité folliculaire soit près de la moitié de la densité moyenne des groupes contrôle ou faibles doses (1 et 5 ppm).

c. Surface folliculaire totale, surface colloïde, surface épithéliale et indice d'activité

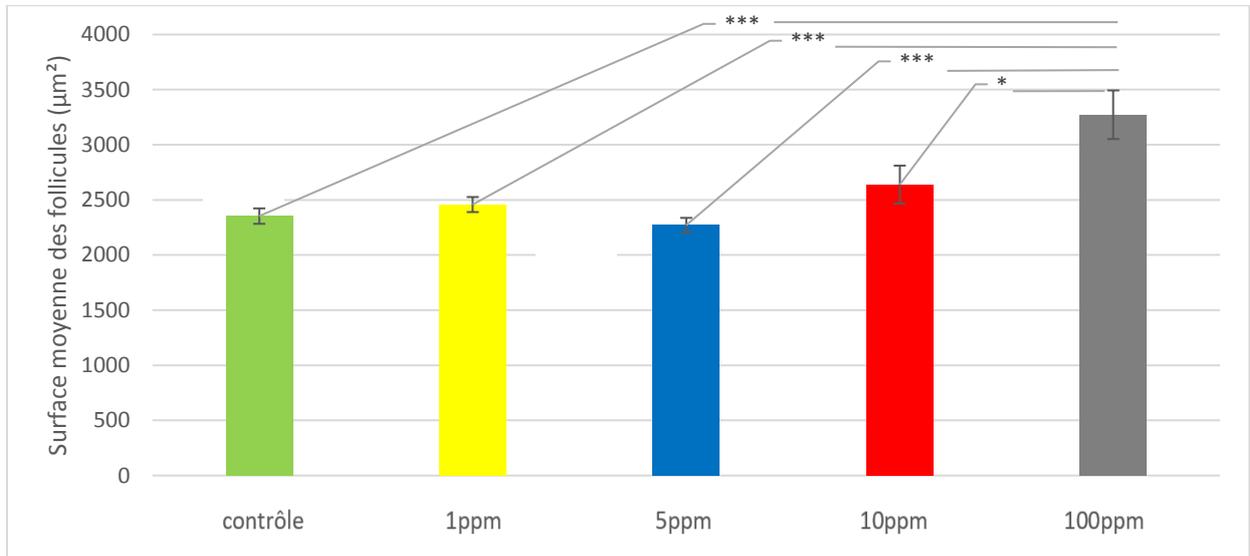


Figure 40 - Surface moyenne des follicules thyroïdiens ($\pm 2SE$) en fonction de la dose de PTU.

*** $p < 0.001$; * $p < 0.05$

La surface moyenne des follicules thyroïdiens n'est pas différente entre le groupe contrôle ($2353 \pm 70 \mu\text{m}^2$) et les groupes traités 1, 5 et 10 ppm. En revanche, le groupe 100 ppm présente une surface folliculaire moyenne significativement plus élevée ($3273 \pm 221 \mu\text{m}^2$) que tous les autres groupes (Figure 40).

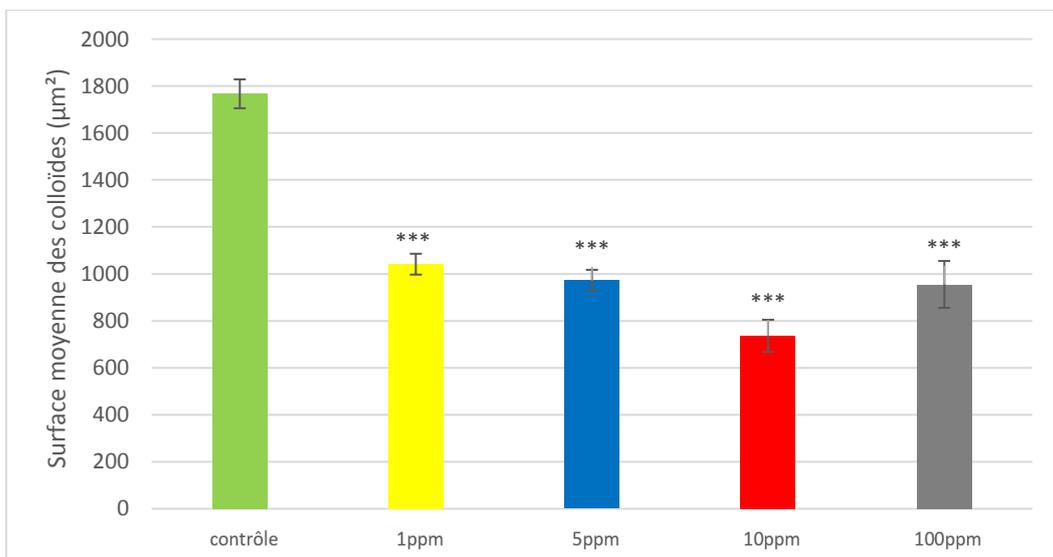


Figure 41 - Surface moyenne de la colloïde ($\pm 2SE$) des follicules thyroïdiens en fonction de la dose de PTU.

*** $p < 0.001$ avec le groupe contrôle

La surface moyenne de colloïde des follicules thyroïdiens des groupes traités est significativement plus faible ($p < 0.001$) que celle du groupe contrôle ($1767 \pm 62 \mu\text{m}^2$). La diminution de la surface de colloïde est significative pour l'ensemble des groupes traités. La comparaison entre groupes traités ne montre pas de différence à l'exception de la comparaison groupe 1 ppm vs groupe 10 ppm (Figure 41).

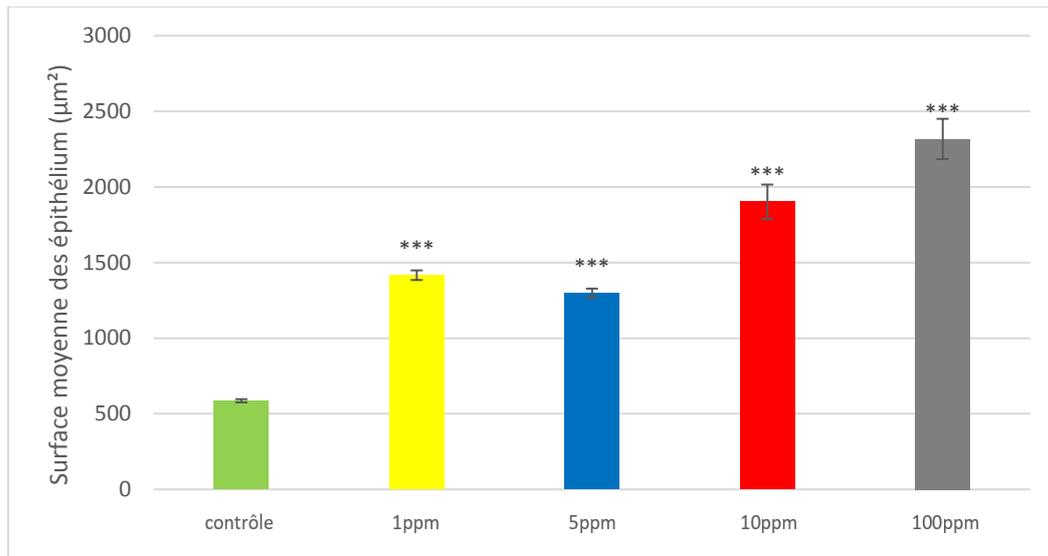


Figure 42 - Surface moyenne épithéliale et écart-type ($\pm 2\text{SE}$) des follicules thyroïdiens en fonction de la dose de PTU.

*** $p < 0.001$ avec le groupe contrôle

La surface moyenne épithéliale folliculaire de l'ensemble des groupes traités (dès 1 ppm : $1416 \pm 32 \mu\text{m}^2$), est significativement plus élevée ($p < 0.001$) que celle du groupe contrôle ($586 \pm 11 \mu\text{m}^2$) (Figure 42). L'étude statistique nous a aussi permis de constater que la surface épithéliale était significativement différente entre chaque groupe traité deux à deux.

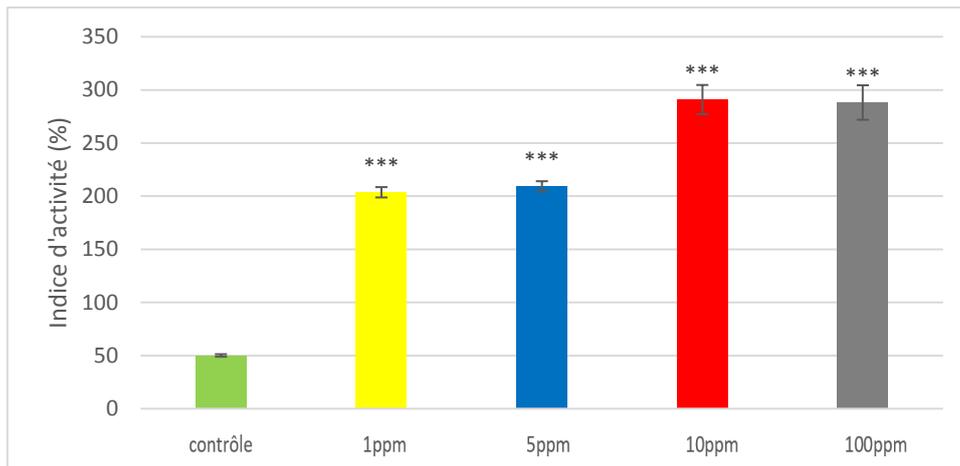


Figure 43 - Indice d'activité moyen et écart-type ($\pm 2SE$) des follicules thyroïdiens en fonction de la dose de PTU administrée.

*** $p < 0.001$ avec le groupe contrôle

L'indice d'activité moyen des follicules des groupes traités est significativement plus élevé ($p < 0.001$) que celui du groupe contrôle ($50,1 \pm 1,2\%$) (Figure 43). L'augmentation de l'indice d'activité est significative dès 1 ppm de PTU ($204 \pm 5\%$). Les groupes traités peuvent se regrouper en deux sous-groupes, les groupes 1 et 5 ppm, avec un indice d'activité intermédiaire inférieur et significativement différent de celui des groupes 10 et 100 ppm présentant l'indice d'activité le plus élevé. Il semble néanmoins important de rappeler que, pour les groupes 10 et 100 ppm, la colloïde n'était pas révélée par l'APS et que seule la lumière folliculaire pouvait être mesurée.

6. Corrélation entre données hormonales et histologiques

Les études de corrélation présentées ci-dessous ont été réalisées en regroupant les résultats de l'ensemble des groupes (contrôle et traités) en fin d'étude à J28, seule date où les prélèvements histologiques et les échantillons sanguins sont prélevés concomitamment. Les données morphométriques portent sur la coupe histologique médiane C3. Les courbes de corrélations ne sont pas pondérées par le nombre de follicules mesurées par individu. Aucune corrélation significative n'a pu être mise en évidence entre T3 ou TSH et les paramètres morphométriques (données non fournies).

- a. Corrélation entre concentration hormonale en T4 et surface moyenne de la colloïde des follicules thyroïdiens à J28

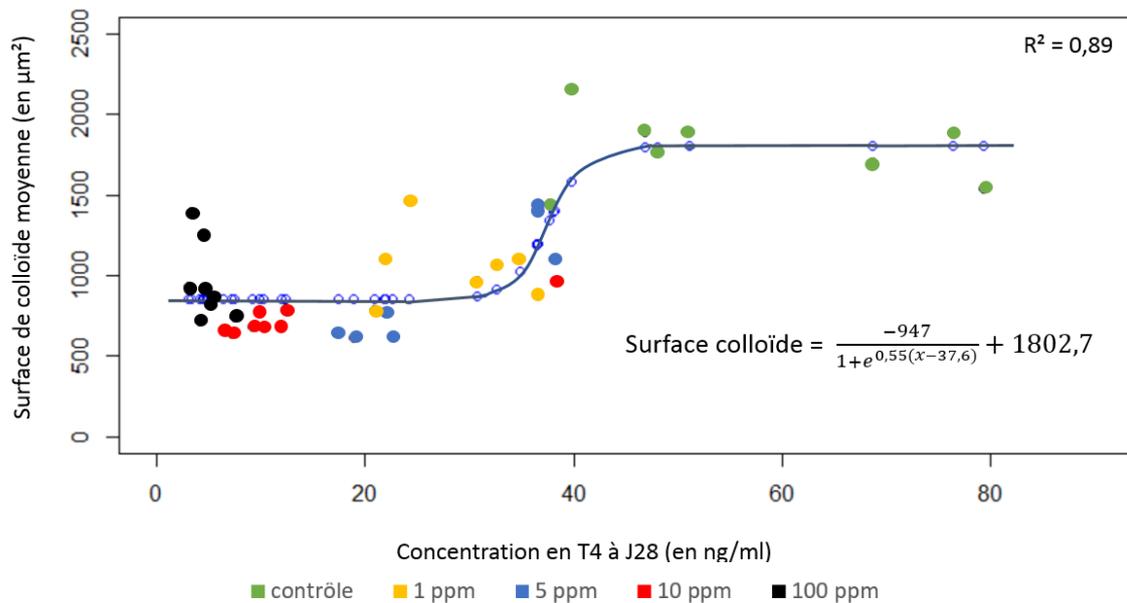


Figure 44 - Evolution de la surface moyenne de colloïde en fonction de la concentration en T4 à J28

L'étude de corrélation (Figure 44) montre que la surface de la colloïde des follicules thyroïdiens est corrélée à la concentration en T4 à J28 ($r = 0.94$). L'IC50 de la courbe sigmoïde se situe à 37,6 ng/mL, ce qui correspond à des valeurs caractéristiques des groupes 1 et 5 ppm.

b. Corrélation entre concentration hormonale en T4 et surface moyenne épithéliale des follicules thyroïdiens à J28

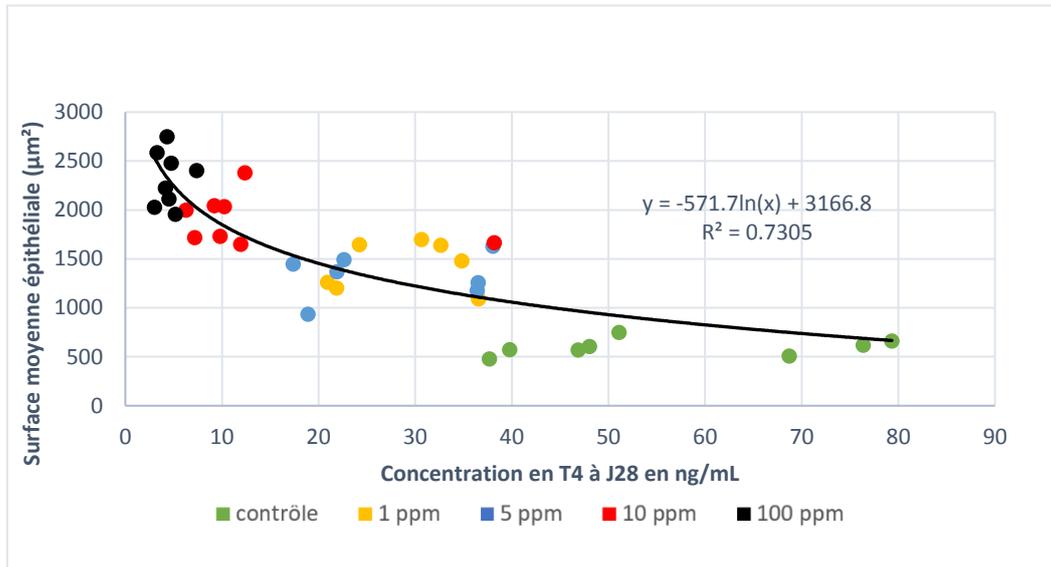


Figure 45 - Evolution de la surface moyenne épithéliale en fonction de la concentration en T4 à J28

L'étude de corrélation (Figure 45) montre que la surface de l'épithélium des follicules thyroïdiens est inversement corrélée à la concentration en T4 à J28 selon une courbe logarithmique ($r = 0.85$).

c. Corrélation entre concentration hormonale en T4 et indice d'activité des follicules thyroïdiens à J28

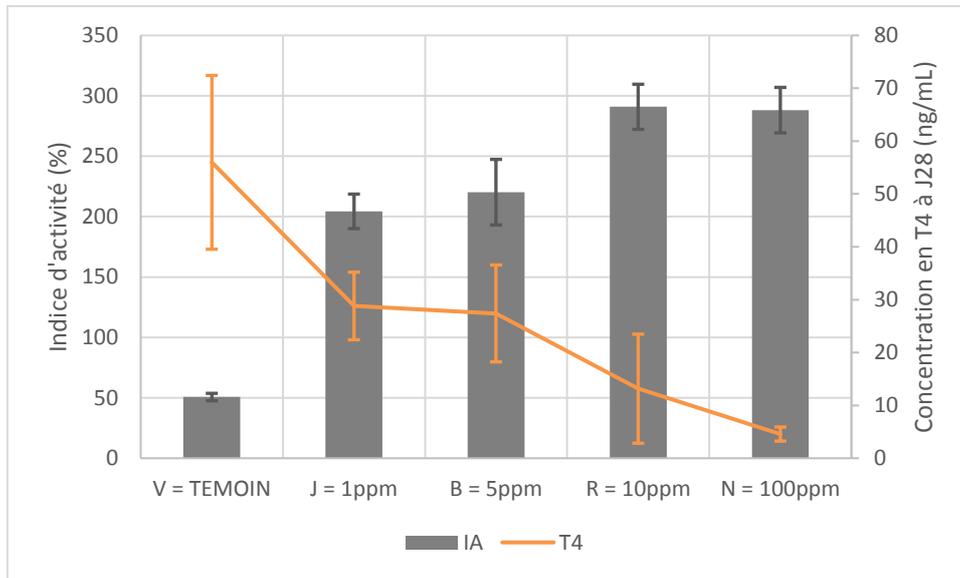


Figure 46 - Evolution de la moyenne de l'indice d'activité (IA) des follicules thyroïdiens et de la concentration hormonale moyenne en T4 en fonction de la dose de PTU à J28

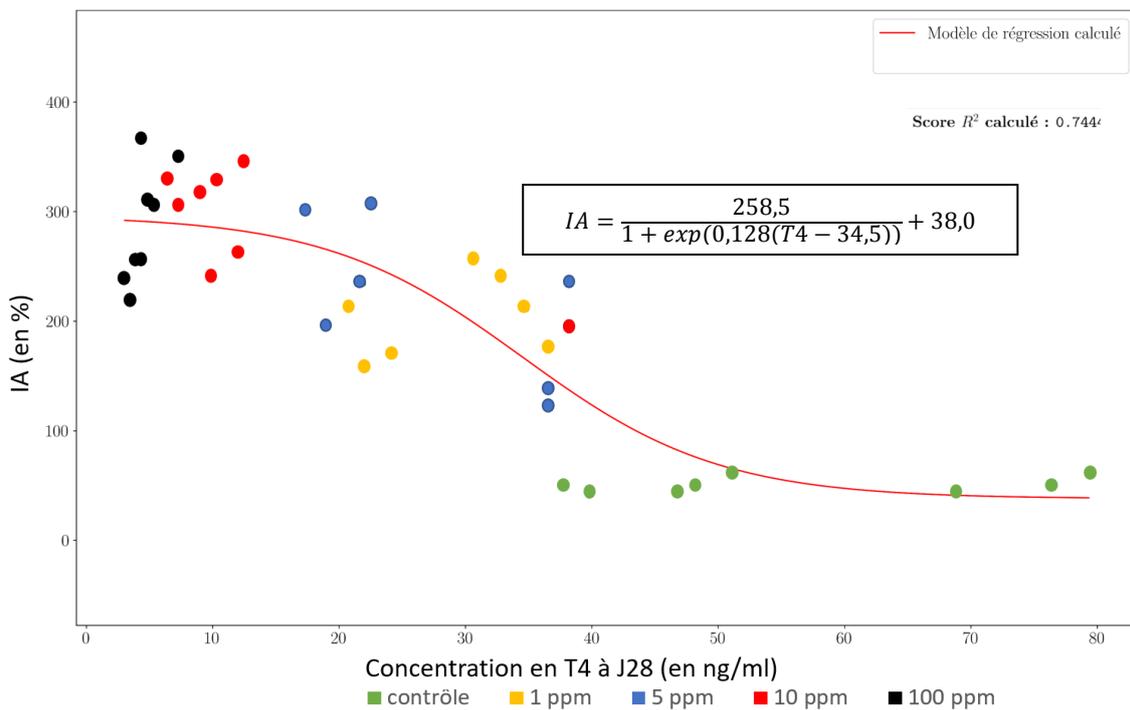


Figure 47 - Evolution de l'indice d'activité (IA) des follicules thyroïdiens en fonction de la concentration en T4 à J28

L'étude de corrélation (Figures 46 et 47) montre que l'indice d'activité des follicules thyroïdiens est inversement corrélé à la concentration en T4 à J28 ($r = 0.86$). L'IC50 de la

courbe sigmoïde se situe à 35 ng/mL pour 180% d'IA, ce qui correspond à des valeurs caractéristiques des groupes 1 et 5 ppm.

d. Corrélation entre concentration hormonale en T4 à J28 et densité folliculaire

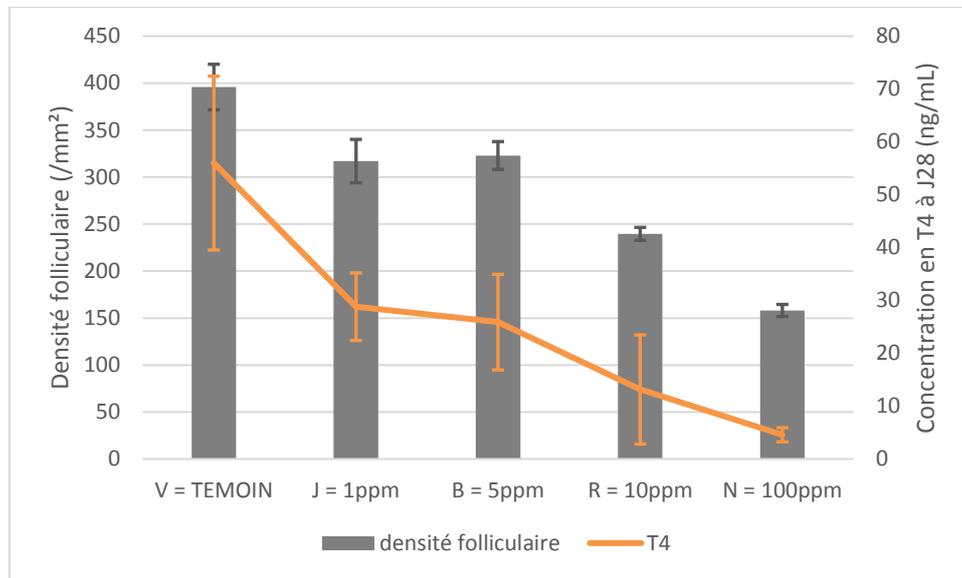


Figure 48 - Evolution de la moyenne de la densité folliculaire de la coupe histologique C3 et de la concentration hormonale moyenne en T4 en fonction de la dose de PTU à J28

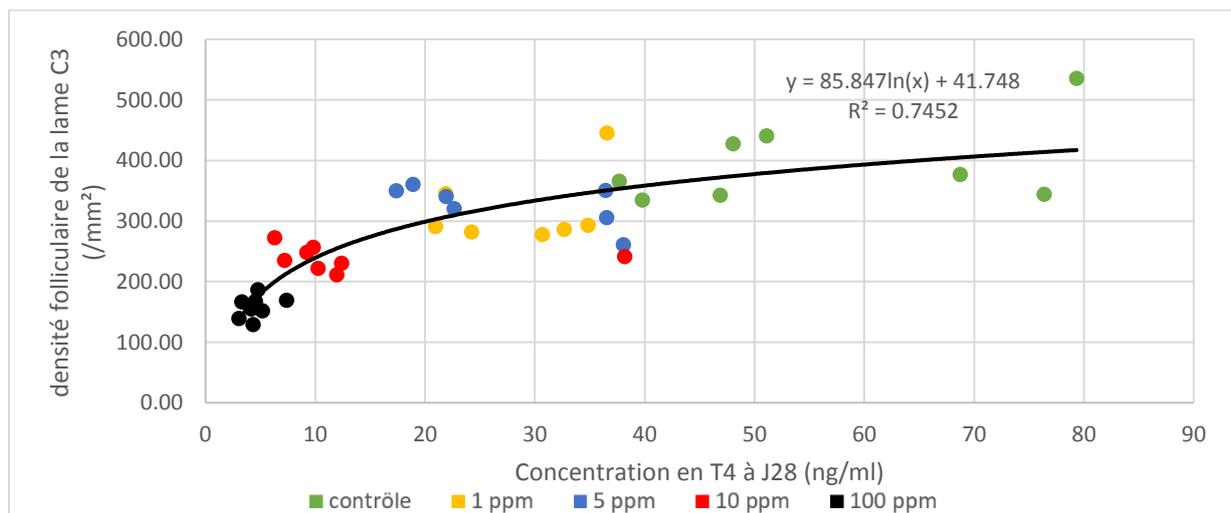


Figure 49 - Evolution de la densité folliculaire moyenne en C3 en fonction de la concentration en T4 à J28

L'étude de corrélation (Figures 48 et 49) montre que la densité folliculaire est corrélée à la concentration en T4 à J28 selon une courbe logarithmique ($r = 0.86$).

C. Discussion

Notre étude met en évidence pour la première fois les effets du PTU à des doses croissantes sur les hormones thyroïdiennes de façon corrélée avec les indicateurs histomorphométriques dans une étude de toxicité par administration répétée pendant 28 jours chez la souris. A notre connaissance, il s'agit d'un apport original et novateur. L'indice d'activité des follicules thyroïdiens est, chez la souris, un bon marqueur d'une hypothyroïdisme et ce, dès la plus faible dose en PTU de 1 ppm. Cette étude n'a cependant pas pu déterminer si l'indice d'activité était un paramètre plus sensible et plus précoce que les paramètres hormonaux. La densité folliculaire est un marqueur moins sensible – car modifié uniquement aux doses fortes de PTU (10 et 100 ppm) – que la concentration en T4 ou l'indice d'activité des follicules thyroïdiens. Il s'agit néanmoins d'un paramètre plus simple à mesurer dans une étude toxicologique.

1. Le modèle souris traité au PTU par voie alimentaire

Dans cette étude chez la souris, les mesures de raffinement et de réduction ont été suivies conformément aux recommandations européennes sur la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (Directive n° 2010/63/UE). La souris est une espèce pouvant être utilisée dans les études réglementaires de toxicité sur 28 jours, dans le cadre de l'évaluation du risque sanitaire des produits chimiques ; notre étude est calquée sur la ligne directrice OCDE 407. Le suivi de la consommation alimentaire et du poids individuel des souris a permis de s'assurer de la prise alimentaire, un des paramètres permettant d'évaluer un état de bonne santé, ainsi que de l'ingestion correcte du traitement anti-thyroïdien. L'hypothyroïdie est induite par l'action combinée du PTU, inhibant la TPO, et d'une déficience modérée en iode. Les doses de PTU menant à des effets dits minimum, moyen et fort ont été définies sur la base de la littérature

(Cooke et al., 1993 ; Gordon et al.,1997) et de deux études pilotes qui ont permis d'affiner la gamme de concentrations. La mesure de l'indice d'activité s'est concentrée sur la coupe médiane qui apparaît représentative de l'ensemble du lobe (Bianco et al., 2014) thyroïdien. A la différence du rat, rongeur de laboratoire pour lequel la pharmacodynamie du PTU a été décrite (Cooper et al., 2015; Halpern et al., 1983), la mesure des concentrations hormonales thyroïdiennes au cours d'un traitement au PTU est peu évaluée chez la souris. Dans la plupart des études conduites dans cette espèce, l'hypothyroïdie est souvent induite avec une dose unique de PTU (par exemple, 500 ppm via l'alimentation, associé à un régime normo-iodé (Silva & Giusti-Paiva, 2015)).

2. Diminution de T4 dose-dépendante

En accord avec la littérature et les descriptions chez le rat (Cooper et al., 2015), nous avons observé chez la souris une diminution de T4 dose dépendante dès 1 ppm de PTU dans l'aliment. La diminution des concentrations en T4 au cours de l'expérimentation s'explique par le mode d'action du PTU : son action inhibitrice sur la TPO entraîne une chute de la production de T4 de façon dose dépendante (Akmal & Kung, 2014; Cooke, et al., 1993; Gordon et al., 1997; Halpern et al., 1983; Mellert, et al., 2003; Nambiar et al., 2014). Ainsi, une diminution de la thyroxinémie a été observée : légère pour le groupe 1 ppm de PTU (de l'ordre de 18%), et sévère pour le groupe 100 ppm avec, pour certains échantillons, des concentrations de T4 proches des seuils de détection. Dans notre étude, la diminution graduelle de la concentration en T4 dès J14 pour les groupes traités traduit l'installation d'une hypothyroïdie progressive au cours du temps. Pour le groupe forte dose (100 ppm), la synthèse des hormones thyroïdiennes semble bloquée très précocement conduisant à un épuisement des réserves en T4 dès J14, expliquant des valeurs de thyroxine très faibles.

Dans notre étude, T4 est plus sensible que T3 puisque l'évolution des concentrations en T3 ne montre pas une diminution dose PTU-dépendante. Ces résultats sont en désaccord avec des travaux réalisés chez le rat où T3 diminue bien que cette baisse demeure moins marquée que celle de la concentration en T4 (Cooper et al., 2015; Gordon et al., 1997; Hood, et al , 1999 a; Silva & Giusti-Paiva, 2015). L'expérience de Hood (1999) montre d'ailleurs une diminution de T3 dès 14 jours de traitement avec des doses de PTU de 30 ppm. Comme évoqué précédemment, T3 constitue la forme active des hormones thyroïdiennes iodées. Hormis sa

production par la glande thyroïde (qui constitue environ 30% de T3 plasmatique), les enzymes DIO 1 et 2 assurent la conversion de T4 en T3 dans les tissus. Les activités déiodinases sont étroitement liées aux niveaux d'hormones thyroïdiennes circulantes : DIO1 est stimulée par des concentrations élevées en T3 alors que ce sont des niveaux faibles en hormones thyroïdiennes qui augmentent la conversion de T4 en T3 par DIO2. L'influence du PTU et des concentrations en hormones thyroïdiennes sur les désiodases est un mécanisme étudié principalement chez le rat. Chez ce dernier, il apparaît qu'une exposition au PTU conduit à une inhibition de 50% de la conversion de T4 en T3 (Larsen et al., 2002). DIO1 est donc fortement inhibée par le PTU alors que DIO2 y serait insensible (Nguyen, et al, 1998; Oppenheimer, et al., 1972). Il est alors raisonnable de supposer que DIO2 est activée par l'hypothyroïdie induite par le PTU (diminution de la T4 drastique), assurant un maintien de la concentration de T3 intracellulaire et sérique. Des différences interspécifiques sur le fonctionnement de ces enzymes sont aussi à envisager.

Le profil particulier du groupe 100 ppm avec des valeurs de T3 inférieures au groupe contrôle à J14, suggèrerait que les mécanismes à la base de la diminution des concentrations en hormones thyroïdiennes sont mis en place dès 14 jours de traitement à cette dose, puis ensuite compensée à J28 avec une concentration en T3 voisine de sa valeur à J0. Cette modification pourrait s'expliquer par un phénomène de compensation du métabolisme thyroïdien qui privilégie le déstockage des hormones thyroïdiennes contenues dans la colloïde et aussi par l'augmentation de l'activité des enzymes désiodinases afin de convertir T4 en sa forme active. Cependant, en complément des dosages réalisés dans cette étude, un dosage direct (par RIA ou HPLC) ou indirect (par mesure de la rT3, et du rapport rT3/T3 au cours du temps (Visser, 1994) des enzymes DIO1 et DIO2 aurait permis de connaître l'effet du PTU sur ces enzymes clé du métabolisme thyroïdien.

Malgré les doses croissantes de PTU, et la diminution des concentrations en thyroxine, les concentrations en TSH demeurent constantes dans cette étude alors que chez le rat, le traitement au PTU est associé à une augmentation de la TSH (Chen et al., 2018; Mellert et al., 2003; Nambiar et al., 2014). Dans une précédente étude chez le rat (Cooper et al., 2015) travaillant avec des doses de PTU identiques aux nôtres et administrés aux animaux dans l'eau de boisson, une augmentation de la TSH, mesurée par technique ELISA, est mise en évidence dès 1 ppm. Une baisse de la concentration plasmatique en hormones thyroïdiennes n'est pas assez spécifique d'un état hypothyroïdien car elle peut être le résultat d'une pseudo-

hypothyroïdie en réponse à une maladie intercurrente. Elle doit obligatoirement être associée à une augmentation de la TSH afin de marquer la chronicité du déficit en hormones thyroïdiennes. L'association « baisse de T4 , augmentation de TSH » est donc un marqueur très spécifique d'hypothyroïdie (Gurnell, 2013). L'hypothyroïdie induite par le PTU est ici primaire et supposée subclinique car la T3 reste dans des valeurs physiologiques normales, sans modification de la TSH. Or, l'hypertrophie des thyrocytes de l'ensemble des groupes traités est le témoin d'une activation de la glande thyroïdienne par la TSH. Les résultats obtenus ici sont donc vraisemblablement imputables à une technique de dosage de la TSH inappropriée. En effet, la gamme étalon établie par le kit de dosage de TSH était inadaptée pour des études in-vivo ; le pool d'échantillons de l'expérience présentait des concentrations en TSH inférieures à la valeur basse du dosage alors que les études in-vitro mesurent des concentrations en TSH supérieures. Bien que la linéarité du dosage ait été vérifiée, par dilution de la gamme étalon, et la concentration de TSH mesurée une seconde fois avec la gamme étalon diluée, montrant des résultats similaires, ce dosage apparaît difficilement interprétable.

A la lumière des résultats observés, il apparaît que le dosage de la thyroxine par méthode HPLC est un bon marqueur pour détecter des variations de concentration de T4 même faibles. En effet, après 28 jours de traitement, le groupe traité pour une dose en PTU faible (1 ppm), est statistiquement différent du groupe contrôle. Il apparaît également que ce dosage peut être réalisé dès 14 jours de traitement et permet d'identifier des modifications de T4 chez des groupes traités PTU de 5 ppm. Néanmoins, le dosage de la TSH, bien qu'il ne montre pas de variations significatives dans notre étude, demeure indispensable pour définir une hypothyroïdie subclinique, et permettre de grader la sévérité de l'hypothyroïdie.

3. Lésion d'hyperplasie folliculaire diffuse de la thyroïde

Au niveau histologique, une lésion d'hyperplasie folliculaire diffuse est observée chez les animaux traités, d'intensité variable selon les groupes. L'hyperplasie diffuse est généralement une réponse à une stimulation chronique. Pour des faibles doses de PTU (1 ppm et 5 ppm), l'hyperplasie est légère mais le tissu glandulaire est plus activé que chez le groupe contrôle comme le montre l'hypertrophie des thyrocytes. Ces résultats sont en accord avec les résultats d'études précédentes réalisées chez le Rat (Hood et al., 1999a, Nambiar et al., 2014) pour lesquelles l'hyperplasie folliculaire est observée chez l'ensemble des animaux traités dès

0.08 mg/kg/j. Pour les plus fortes doses (10 ppm et 100 ppm), les lésions d'hyperplasie folliculaire diffuse sont marquées à sévères. L'hyperplasie diffuse est intimement liée à un état hypothyroïdien car elle est le résultat d'un déficit chronique en hormones thyroïdiennes T4 et T3 (Chen et al., 2018). Elle peut cependant être rencontrée chez des souris contrôles à une fréquence d'environ 1% (Ward et al., 1979). Dans notre étude, une hyperplasie marquée est observée à la dose de 10 ppm, alors que dans l'étude de Ferreira (2007) réalisée également sur modèle murin, une hyperplasie modérée à sévère est observée à la dose de 1000 ppm. La vacuolisation cytoplasmique a aussi été décrite à de plus hautes doses (Ferreira et al., 2007) et la congestion du tissu interstitiel inter-folliculaire s'expliquerait par une exposition longue et continue à de fortes concentrations de PTU (Hardisty & Boorman, 1999). L'hypertrophie et l'hyperplasie se produisent souvent ensemble et sont généralement dues à une augmentation de la concentration de la TSH circulante (Brändli-baiocco et al., 2018).

4. Indice d'activité, densité folliculaire et corrélations avec la baisse de T4

Notre étude a permis, de façon novatrice, de corréler les modifications hormonales aux paramètres histomorphométriques, avec des mesures originales qui n'avaient jamais été publiées chez la souris antérieurement. Les études histomorphométriques de la glande thyroïde des rongeurs, comme évoqué en introduction, sont rares dans la littérature et se résument à deux études réalisées chez le rat (Delverdier et al., 1991, Yi et al, 1998) et une chez la souris Swiss (Ferreira et al., 2007). Les paramètres mesurés, à savoir la densité folliculaire et les surfaces folliculaires n'ont jamais fait l'objet de publication antérieure chez le modèle murin. Dans notre étude, les mesures ont été intégralement manuelles en raison de la difficulté de différencier l'épithélium folliculaire et de limiter précisément la colloïde par analyse d'image. En se référant au groupe de travail de l'association américaine de la thyroïde (Bianco et al., 2014), il est cependant conseillé d'utiliser une technique semi-automatique à l'aide d'un analyseur d'image. Cette recommandation s'appuie sur une ancienne étude (Kmiec et al., 1998) décrivant une méthode relativement lourde à mettre en place. Dans notre étude, les mesures des surfaces folliculaires ont été réalisées sur la totalité des follicules thyroïdiens d'un lobe à l'exception des thyroïdes des groupes traités fortes doses 10 ppm et 100 ppm pour lesquelles les lésions hyperplasiques étaient déjà marquées et empêchaient le détournement des follicules et/ou de la colloïde. Le choix des follicules thyroïdiens mesurés pour ces groupes traités représente

cependant un biais dépendant de l'opérateur. De la même façon, le choix d'éliminer les macro-follicules (Delverdier et al., 1991) en raison d'un état fonctionnel inactif peut constituer un biais de sélection.

L'indice d'activité des follicules thyroïdiens est un bon marqueur de l'état hypothyroïdien et ce, même pour les faibles doses de PTU, à savoir 1 ppm. Les résultats des calculs de surface de l'épithélium folliculaire et de colloïde suggèrent que l'augmentation de l'IA est due à la fois à l'augmentation significative de la hauteur du thyrocyte ($p < 0.001$) et de la diminution de la surface de colloïde ($p < 0.001$) entre groupes traités et groupe témoin. En effet, soumis à une stimulation prolongée à de fortes concentrations de TSH, le rythme d'endocytose de la colloïde peut être supérieur à sa synthèse, entraînant une déplétion progressive de la colloïde (Hardisty & Boorman, 1999). L'augmentation de la hauteur des thyrocytes (hypertrophie) traduit une hyperactivité de la glande (Delverdier et al., 1991). Les résultats observés dans notre étude pour le groupe traité forte dose (100 ppm) concernant la hauteur de l'épithélium folliculaire et le pourcentage de tissu épithélial sont comparables à ceux de Delverdier et al. (1991) (200 ppm de PTU) chez le rat. Ils sont aussi comparables à ceux de Ferreira (2007) concernant la hauteur de l'épithélium folliculaire chez la souris.

Dans notre étude, la densité folliculaire apparaît être un bon marqueur d'hypothyroïdie pour les fortes doses de PTU (10 et 100 ppm). La diminution observée à ces deux doses est identique quel que soit le niveau de coupe transversale (apicales ou médiane), démontrant une homogénéité de ce paramètre dans l'ensemble de l'organe. Ces résultats suggèrent que la mesure de la densité folliculaire sur une coupe médiane de thyroïde est suffisante pour renseigner sur la densité folliculaire du lobe thyroïdien dans son ensemble. Les résultats concernant la différence de taille et de nombre des follicules thyroïdiens entre les groupes ont montré que la diminution de la densité folliculaire observée à fortes doses de PTU (10 et 100 ppm) est due à l'augmentation de la taille des follicules et non de leur nombre. Cette observation est en accord avec l'hyperplasie diffuse épithéliale marquée à sévère constatée à l'évaluation microscopique pour les groupes traités 10 et 100 ppm. L'augmentation de la surface des lobes thyroïdiens pour les fortes doses de PTU est la conséquence de l'hyperplasie et de la congestion modérée à marquée de l'organe. La mesure de la densité folliculaire présente l'avantage d'être un paramètre simple et rapide à évaluer dans une étude toxicologique en plus d'être bien corrélé à la mesure de T4. L'indice d'activité semble néanmoins un marqueur histologique plus sensible

que la densité folliculaire car celui-ci est augmenté dès la faible dose (1ppm). Il est aussi plus sensible que la simple mesure macroscopique de l'organe.

La concentration sérique en T4 à J28 et l'indice d'activité histomorphométrique des follicules thyroïdiens sont deux marqueurs d'état d'hypothyroïdie, et ce, dès la plus faible dose de PTU de 1 ppm. Une analyse statistique montre que ces deux paramètres sont inversement corrélés, une baisse de la concentration en T4 étant corrélée à une augmentation de l'indice d'activité c'est-à-dire à une hyperplasie folliculaire et une dilution/absence de colloïde. Le schéma physiopathologique reconnu est que, le déficit en hormones thyroïdiennes induit par le PTU est responsable d'une hypersécrétion de TSH par diminution du rétrocontrôle négatif de T4 sur la TSH. En retour, l'hyperstimulation par la TSH entraîne une accélération de la dynamique cellulaire de la thyroïde qui se traduit par une apparence histologique caractéristique d'une hyperactivité (Delverdier et al., 1991). Comme déjà évoqué, dans notre étude, la non-augmentation de la TSH est peut-être due à un dosage inadapté. Il est donc difficile de se prononcer sur ce paramètre biologique. Ceci est regrettable car les concentrations de TSH sont très utilisées en toxicologie réglementaire et investigations cliniques pour détecter une perturbation thyroïdienne.

5. Bilan et Perspectives

La mesure de concentration en T4 sérique associée à un calcul d'IA semble être pertinent pour distinguer des perturbations de la fonction thyroïdienne à faible dose, ce qui constitue un outil précieux dans l'évaluation des perturbateurs endocriniens. Dans la théorie où la corrélation entre T4 et IA permet l'obtention d'une courbe sigmoïde, il est envisageable que l'histomorphométrie soit plus adaptée pour détecter de faibles effets sur les concentrations hormonales (dont les perturbateurs endocriniens sont responsables). Afin d'apporter des précisions sur de faibles modifications de T4, une expérimentation avec des doses de PTU inférieure à 1 ppm devrait être réalisée. Cependant, dans le cadre d'une exposition au PTU par voie alimentaire, la dose la plus faible réalisable techniquement est de 1 ppm. A des doses inférieures, la composition en PTU de l'aliment n'est plus homogène, ce qui complique la maîtrise de la dose ingérée. Afin de confirmer la plus grande sensibilité de T4 et d'IA, le même type d'étude peut être réalisée, mais en faisant intervenir cette fois une autre molécule de référence dont le mode d'action diffère du PTU, dans le but de mimer des modes d'actions

différents pouvant s'apparenter à ceux des perturbateurs endocriniens. Le perchlorate, un inhibiteur compétitif du NIS n'agissant pas sur la TPO, peut être considéré comme un bon candidat, bien que d'autres molécules ayant une action sur les enzymes hépatiques de déiodation soient aussi envisageables. Enfin, seule la réalisation de ces travaux avec un perturbateur de la fonction thyroïdienne permettra de valider cette hypothèse. Toutefois cela n'est envisageable que si la détermination de l'indice d'activité est automatisable. Le marquage spécifique de l'épithélium peut permettre au logiciel de traitement d'image de différencier plus facilement ce composant et ainsi de mesurer sa surface, permettant un gain de temps considérable. Par ailleurs, il aurait été intéressant d'observer la structure histologique des thyroïdes dès 14 jours d'exposition au PTU afin de comparer aux profils hormonaux à cette date. En effet, à J14, la concentration en T4 ne permettait pas encore de discriminer le groupe contrôle et le groupe traité à 1 ppm. Cependant, cela aurait nécessité le double d'animaux ce qui est éthiquement discutable et en contradiction avec la règle des 3Rs (Directive n° 2010/63/UE, 2010).

CONCLUSION

Face aux enjeux que représentent les perturbateurs endocriniens aujourd'hui, les études toxicologiques se doivent d'être de plus en plus rigoureuses. En effet, des pesticides jugés dangereux ont été mis sur le marché et sont actuellement au cœur de débats quant à leur réglementation. La mise au point de nouvelles méthodes visant à obtenir une meilleure évaluation de leurs effets sur la fonction thyroïdienne est nécessaire.

Dans cette étude, la mesure de l'indice d'activité se trouve être un bon marqueur de l'hyperplasie folliculaire diffuse induite par le PTU. En effet, l'augmentation de la hauteur des thyrocytes et la déplétion de colloïde sont caractéristiques d'une hyperplasie folliculaire diffuse. L'histomorphométrie semble ainsi constituer un outil utile pour l'évaluation des altérations morphologiques de la glande thyroïde dans une étude toxicologique. Il s'agit d'une méthode simple et objective permettant de quantifier des modifications histologiques susceptibles d'être provoquées par les perturbateurs endocriniens.

L'histomorphométrie reste néanmoins chronophage si elle est réalisée manuellement sur l'ensemble des follicules d'un lobe thyroïdien et nécessite le sacrifice des animaux. Il s'agit des principaux inconvénients de cette technique en comparaison avec la mesure des concentrations hormonales. Les profils hormonaux présentent toutefois une variation individuelle qui peut être marquée, et dans le cas des perturbateurs endocriniens ce sont des variations même minimes des concentrations de ces hormones qui sont recherchées. Il serait donc d'intérêt de standardiser l'analyse morphométrique en mettant en évidence l'épithélium folliculaire de façon spécifique.

BIBLIOGRAPHIE

- Akmal, A., & Kung, J. (2014). Propylthiouracil, and methimazole, and carbimazole-related hepatotoxicity. *Expert Opinion on Drug Safety*, 13(10), 1397- 1406.
- Bianco, A. C., Anderson, G., Forrest, D., Galton, V. A., Gereben, B., Kim, B. W., ... Williams, G. R. (2014). American thyroid association guide to investigating thyroid hormone economy and action in rodent and cell models. *Thyroid*, 24(1), 88- 168.
- Boron, W., & Boulpaep, E. (2003). *Medical Physiology: A Cellular And Molecular Approach*.
- Brändli-baiocco, A., Balme, E., Bruder, M., Chandra, S., Hellmann, J., Hoenerhoff, M. J., ... Rosol, T. J. (2018). Nonproliferative and Proliferative Lesions of the Rat and Mouse Endocrine System. *Journal of Toxicologic Pathology*, 31(3), 1S--95S.
- Brent, G. A., & Ronald, J. K. (2002). Thyroid and antithyroid drugs. In Goodman & Gilman's, *Manual of Pharmacology and THERAPEUTICS* (2nd éd., p. 787- 820).
- Chen, H., Zhang, X., Jia, X., & Liu, Z. (2018). Benchmark dose analysis of multiple thyroid toxicity endpoints in ovariectomized rats exposed to propylthiouracil. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 97(June), 120- 126.
- Cooke, P. S., Kirby, J. D., & Porcelli, J. (1993). Increased testis growth and sperm production in adult rats following transient neonatal goitrogen treatment: Optimization of the propylthiouracil dose and effects of methimazole. *Journal of Reproduction and Fertility*, 97(2), 493- 499.
- Cooper, D. S., Kieffer, J. D., Halpern, R., Saxe, V., Mover, H., Maloof, F., ... Al, C. E. T. (2015). *Propylthiouracil (PTU) Pharmacology in the Rat, II. Effects of PTU on Thyroid Function*. 113(3).
- Corban, G. J., Hadjikakou, S. K., Tsipis, A. C., Kubicki, M., Bakas, T., & Hadjiliadis, N. (2011). Inhibition of peroxidase-catalyzed iodination by thioamides: Experimental and theoretical study of the antithyroid activity of thioamides. *New Journal of Chemistry*, 35(1), 213- 224.
- Delverdier, M., Cabanie, P., Roome, N., Enjalbert, F., & Van Haverbeke, G. (1991). Critical analysis of the histomorphometry of rat thyroid after treatment with thyroxin and propylthiouracil. *Annales de Recherches Veterinaires*, 22(4), 373- 378.
- Denef, J. F., Cordier, A. C., Mesquita, M., & Haumont, S. (1979). The influence of fixation procedure, embedding medium and section thickness on morphometric data in thyroid gland. *Histochemistry*, 63(2), 163- 171.
- DIRECTIVE 2010/63/UE DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (N° L. 276/33;

2010).

- Eldar, S., Sabo, E., Cohen, A., Misselevich, I., Abrahamson, J., Cohen, O., Boss, J. H. (1999). The value of histomorphometric nuclear parameters in the diagnosis of well differentiated follicular carcinomas and follicular adenomas of the thyroid gland. *Histopathology*, 34(5), 453- 461.
- Fekete, C., & Lechan, R. M. (2014). Central regulation of hypothalamic-pituitary-thyroid axis under physiological and pathophysiological conditions. *Endocrine Reviews*, 35(2),
- Ferreira, E., Silva, A. E., Serakides, R., Gomes, A. E. S., & Cassali, G. D. (2007). Model of induction of thyroid dysfunctions in adult female mice. In *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 59(5), 1245- 1249.
- Gauchez, A.-S. (2014). Thyroxine (totale et libre) et tri-iodothyronine (totale et libre). *EMC - Biologie médicale*, 0(0), 1- 6. [https://doi.org/10.1016/S2211-9698\(14\)67244-7](https://doi.org/10.1016/S2211-9698(14)67244-7)
- Gordon, C. J. (1997). Behavioral and autonomic thermoregulation in the rat following propylthiouracil-induced hypothyroidism. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 58(1), 231- 236. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(97\)00014-2](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(97)00014-2)
- Halpern, R., Cooper, D. S., Kieffer, J. D., Saxe, V., Mover, H., Maloof, F., & Ridgway, E. C. (1983). Propylthiouracil (ptu) pharmacology in the rat, I. serum and thyroid ptu measurements by radioimmunoassay. *Endocrinology*, 113(3), 915- 920. <https://doi.org/10.1210/endo-113-3-915>
- Hardisty, J. F., & Boorman, G. A. (1999). Thyroid and Parathyroid Glands. In C. R. Press (Éd.), *Pathology of the mouse* (1st edition, p. 537- 554). Vienne.
- Hood, A., Liu, J., & Klaassen, C. D. (1999a). Effects of phenobarbital, pregnenolone-16 α -carbonitrile, and propylthiouracil on thyroid follicular cell proliferation. *Toxicological Sciences*, 50(1), 45- 53.
- Hood, A., Liu, Y. P., Gattone II, V. H., & Klaassen, C. D. (1999b). Sensitivity of Thyroid Gland Growth to Thyroid Stimulating Hormone (TSH) in Rats Treated with Antithyroid Drugs. *Toxicological sciences*, 49, 263- 271.
- Hummel, K., Richardson, F., & Fekete, E. (1975). *Anatomy. In : Biology of the Laboratory Mouse*.
- INSERM Collective d'expertise. (2007, avril 1). Pesticides - Effets sur la santé. *Revue d'Épidémiologie et de Santé Publique*, 62(2), 173.
- International Agency for Research on Cancer. (2002). *Iarc Monographs On The Evaluation Of Carcinogenic Risks To Humansarc Monographs On The Evaluation Of Carcinogenic Risks To Humans*, 96.
- Kirby, J. D. (2001). *Increased testis growth and sperm production in adult rats following transient neonatal goitrogen treatment : optimization of the propylthiouracil dose and*

effects of methimazole. (May 1992).

- Kmiec, Z., Kotlarz, G., Smiechowska, B., & Mysliwski, A. (1998). The effect of fasting and refeeding on thyroid follicle structure and thyroid hormone levels in young and old rats. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 26, 161–175.
- La Perle, K. M. D., & Jordan, C. D. (2012). Endocrine System. In *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse and Human Atlas* (p. 211- 220).
- Larsen, W. J., Schoenwolf, G. C., Bleyl, S. B., Brauer, P. R., Francis-West, P. H., Alexandre, H., & Milaire, J. (2003). *Embryologie humaine*.
- Larsen, P. R., Bianco, A. C., Salvatore, D., Gereben, B., & Berry, M. J. (2002). Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocrine Reviews*, 23(1), 38- 89.
- Leemans, M., Couderq, S., Demeneix, B., & Fini, J. B. (2019). Pesticides With Potential Thyroid Hormone-Disrupting Effects: A Review of Recent Data. *Frontiers in Endocrinology*, 10.
- Maenhaut, C., Pirson, I., Baptist, M., Lamy, F., Miot, F., Roger, P., & Dumont Remerciements, J. E. (1995). La cascade mitogène de l'AMPC dans la thyroïde et dans d'autres tissus. *médecine/sciences*, 11, 204- 217.
- Mark, G., & Koulouri, O. (2013). CME endocrinology - How to interpret thyroid function tests. *Clinical Medicine, Journal of the Royal College of Physicians of London*, 13(3), 282- 286.
- Massart, C., & D'Herbomez, M. (2013). Autoanticorps des maladies auto-immunes de la thyroïde. Indications des dosages. *EMC - Biologie Médicale*, 8(1), 1- 10.
- Mayberry, W. E., & Astwood, E. B. (1960). The effect of propylthiouracil on the intrathyroid metabolism of iodine in rats. *The Journal of biological chemistry*, 235(10), 2977- 2980.
- Mellert, W., Deckardt, K., Walter, J., Gfatter, S., & Ravenzwaay, B. Van. (2003). *Detection of endocrine-modulating effects of the antithyroid acting drug 6-propyl-2-thiouracil in rats , based on the ‘ ‘ Enhanced OECD Test Guideline 407 ’ ’*. 38, 368- 377.
- Moon, J. H., Kim, H. J., Kim, H. M., Choi, S. H., Lim, S., Park, Y. J., ... Cha, B. S. (2013). Decreased Expression of Hepatic Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 in Hypothyroidism: A Novel Mechanism of Atherogenic Dyslipidemia in Hypothyroidism. *Thyroid*, 23(9), 1057- 1065.
- Morawietz, G., Ruehl-Fehlert, C., Kittel, B., Bube, A., Keane, K., Halm, S., ... Hellmann, J. (2003). Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice – Part 1. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 55(6), 433- 449.
- Moriyama, K., Tagami, T., Usui, T., Naruse, M., Nambu, T., Hataya, Y., ... Nakao, K. (2007). Antithyroid drugs inhibit thyroid hormone receptor-mediated transcription. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 92(3), 1066- 1072.

- Mullur, R., Liu, Y.-Y., & Brent, G. A. (2014). Thyroid Hormone Regulation of Metabolism. *Physiological Reviews*, 94(2), 355- 382.
- Nambiar, P. R., Palanisamy, G. S., Okerberg, C., Wolford, A., Walters, K., Buckbinder, L., & Reagan, W. J. (2014). Toxicities Associated with 1-month Treatment with Propylthiouracil (PTU) and Methimazole (MMI) in Male Rats. *Toxicologic Pathology*, 42(6), 970- 983.
- Nève, P., & Rondeaux, P. (1991). Age-related accumulation of lysosomes and other cytological features in active thyroid follicles of the CBA mouse. *Cell Tissue Res*, 265, 275- 285.
- Nguyen, T. T., Chapa, F., & Iii, J. J. D. I. S. (1998). Triiodothyronine Production from Thyroxine in the Rat. *Society*, 139(11), 4626- 4633.
- OCDE (2008), *Test No. 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Éditions OCDE, Paris
- Oppenheimer, J. H., Schwartz, H. L., & Surks, M. I. (1972). Propylthiouracil inhibits the conversion of L-thyroxine to L-triiodothyronine. An explanation of the antithyroxine effect of propylthiouracil and evidence supporting the concept that triiodothyronine is the active thyroid hormone. *The Journal of clinical investigation*, 51(9), 2493- 2497.
- Patricia E. Molina. (2018). Thyroid gland. In The McGraw-Hill Companies (Éd.), *Endocrine Physiology* (5th éd.). New-York.
- Plantin-Carrenard, E., Foglietti, M. J., & Beaudeau, J. L. (2005). Sodium/iodide symporter: Physiopathological aspects and therapeutic perspectives. *Pathologie Biologie*, 53(3), 174- 182.
- Rahaman, M. M., Reinders, F. G., Koes, D., Nguyen, A. T., Mutchler, S. M., Sparacino-Watkins, C., ... Straub, A. C. (2015). Structure guided chemical modifications of propylthiouracil reveal novel small molecule inhibitors of cytochrome b5 reductase 3 that increase nitric oxide bioavailability. *Journal of Biological Chemistry*, 290(27), 16861- 16872.
- Ruberte, J., Carretero, A., & Navarro, M. (2017). *Morphological Mouse Phenotyping: Anatomy, Histology and Imaging*.
- Salvatore, D., Davies, T. F., Schlumberger, M.-J., Hay, I. D., & Larsen, P. R. (2011). Thyroid Physiology and Diagnostic Evaluation of Patients with Thyroid Disorders. In *Williams Textbook of Endocrinology* (p. 327- 361). <https://doi.org/10.1016/b978-1-4377-0324-5.00011-0>
- Sawicki, B., & Kuczyński, M. (1977). Morphological Studies on the C Cells of the Thyroid of Certain Rodents. *Acta Theriologica*, 22, 251- 260.
- Scudamore, C. L. (2014). A Practical Guide to the Histology of the Mouse. In Wiley Backwell (Éd.), *A Practical Guide to the Histology of the Mouse*.

- Silva V.C., Giusti-Paiva A. (2015). Sickness behavior is delayed in hypothyroid mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 45, 109- 117.
- Sinha, R. A., Singh, B. K., & Yen, P. M. (2014, octobre 1). Thyroid hormone regulation of hepatic lipid and carbohydrate metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, Vol. 25, p. 538- 545.
- Studer, H., Conti, A., Kohler, H., & Haerberli, A. (1978). Transformation of Normal Follicles into Thyrotropin- Refractory « Cold » Follicles in the Aging Mouse Thyroid Gland. *Endocrinology*, 102(5), 1576- 1586.
- Suzuki, Minoru; O'Neal, R. (1967). Effects of therapeutic and toxic doses of PTU in rats. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 155.
- van der Spek, A. H., Fliers, E., & Boelen, A. (2017). The classic pathways of thyroid hormone metabolism. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 458, 29- 38.
- Visser, T. J. (1994). Role of sulfation in thyroid hormone metabolism. *Chemico-Biological Interactions*, 92(1- 3), 293- 303.
- Ward, J. M., Goodman, D. G., Squire, R. A., Chu, K. C., & Linhart, M. S. (1979). Neoplastic and Nonneoplastic Lesions in Aging (C57BL / 6N X C3H / HeN) F1 (B6C3F1) Mice. *Journal of the National Cancer Institute*, 63(3), 849- 854.
- Woodruff, T. J., Zota, A. R., & Schwartz, J. M. (2011). Environmental chemicals in pregnant women in the united states: NHANES 2003- 2004. *Environmental Health Perspectives*, 119(6), 878- 885.
- Wu, S. Y., Green, W. L., Huang, W. S., Hays, M. T., & Chopra, I. J. (2005). Alternate pathways of thyroid hormone metabolism. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*, 15(8), 943- 958.
- Yi, X., Yamamoto, K., Shu, L., Katoh, R., & Kawaoi, A. (1998). Effects of Propylthiouracil (PTU) Administration on the Synthesis and Secretion of Thyroglobulin in the Rat Thyroid Gland: A Quantitative Immuno- electron Microscopic Study Using Immunogold Technique. *Endocrine Pathology*, 8(4), 315- 325.
- Young, B. (2000). *Wheater's functional histology : a text and colour atlas* (4th edition).

ANNEXES

Annexe 1 - Recommandation de l'OECD (TG 407) pour l'évaluation réglementaire in vivo des perturbateurs endocriniens

Endpoints recommended for the detection of endocrine disruptors (EDs) in TG 407

Mandatory endpoints	Optional endpoints
Weight	
<ul style="list-style-type: none"> - Testes - Epididymides - Adrenals - Prostate + seminal vesicles with coagulating glands 	<ul style="list-style-type: none"> - Ovaries - Uterus, including cervix - Thyroid
Histopathology	
<ul style="list-style-type: none"> - Gonads: <ul style="list-style-type: none"> - Testes and - Ovaries - Accessory sex organs : <ul style="list-style-type: none"> - Epididymides, - Prostate + seminal vesicle with coagulating glands - Uterus, including cervix - Adrenal - Thyroid - Vagina 	<ul style="list-style-type: none"> - Vaginal smears - Male mammary glands - Pituitary
Hormones measurement	
	<ul style="list-style-type: none"> - Circulating levels of T3, T4 - Circulating levels of TSH

Annexe 2 - Protocole dosage TSH Kit ELISA Cloud-Clone Corp.

Réf KIT : Cloud-Clone Corp. CEA463Mu 96 tests ELISA for TSH

- 1- Ramener les réactifs et échantillons à T°C ambiante (18-25°C) avant usage. Sortir le nombre de «strips » et la quantité de réactif suffisants et replacer les autres à T°C de stockage
- 2- Reconstituer le **STANDARD** avec **1mL de diluant à Standard** ; laisser 10 minutes à T°C ambiante, agiter avec précaution. [solution stock] = **12000 pg/mL**

Point de gamme (pg/ml)	600	300	150	100	80	40	20
Volume de « Standard Diluent » (µL)	950	500	500	250	100	300	300
Volume solution (µL)	50 de solution à 12000 pg/mL	500 de solution à 600 pg/mL	500 de sol à 300 pg/mL	500 de sol à 150 pg/mL	400 de sol à 100 pg/mL	300 de sol à 80 pg/mL	300 de sol à 40 pg/mL
Dilution	1 :20	1 :2	1 :2	1 :1.5	1 :1.25	1 :2	1 :2

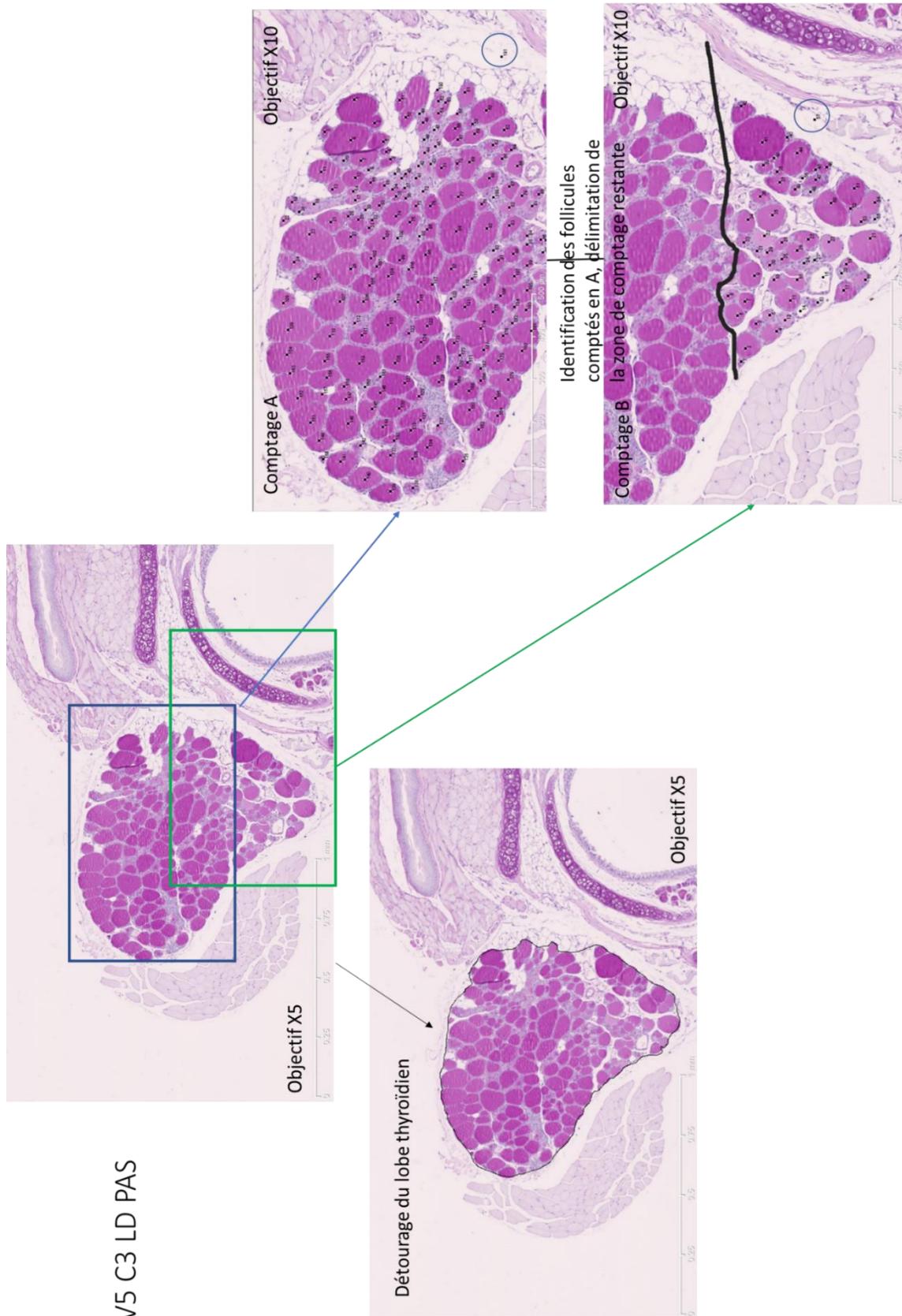
Le point O sera composé de « Standard Diluent » à 100%

- 3- **Detection Reagent A et B** : homogénéiser au vortex puis **diluer 100 fois** avec, respectivement, **Assay Diluent A et B** afin d'obtenir les solutions de travail.
- 4- Diluer **20mL de Wash solution (30X)** avec **580mL** d'eau déionisée ou eau bi-distillée pour préparer 600mL de **Wash Solution à 1X**
- 5- Echantillons : estimer en amont la concentration des échantillons à doser ; si besoin diluer dans du PBS
- 6- Préparer les puits ; faire un plan de plaques :

Par ex : Puit 1A : **blanc** ; puits 1B à 2A: **gamme (50µL)** ; autres puits : **échantillons (50µL)** ; dernier puit : **blanc**
- 7- Ensuite, ajouter immédiatement **50µL** de solution de travail de **Detection Reagent A** dans chaque puit. Agiter, avec un agitateur de plaque de préférence, recouvrir la plaque avec le sealer puis **incuber 1H à 37°C**
- 8- **Aspirer la solution et laver** avec **350 µL** de **Wash Solution 1X** (avec une multi-pipettes ou autre). Laisser 1-2 minutes. Ensuite **enlever le liquide de rinçage** complètement en « Tapant » la plaque contre un **papier absorbant** ; **répéter 3 fois toute l'opération**
- 9- Ajouter **100µL** de solution de travail de **Detection Reagent B** dans chaque puit. **Sceller** la plaque puis **incuber 30 minutes à 37°C**
- 10- Procéder à l'étape de **lavage** comme indiqué en 9- ; **5 fois**
- 11- Ajouter **90µL** de **Substrate Solution (= TMB)** dans chaque puit, avec cône stérile. **Sceller** la plaque ; **incuber 10-20 minutes à 37°C** (NE PAS DEPASSER 30 min) en **protégeant de la lumière** ; le liquide va virer au bleu

- 12- Ajouter **50 μ L** de **Stop Solution** dans chaque puit ; le liquide va alors **virer au jaune**. Agiter en tapotant avec les doigts sur les bords de la boîte
- 13- Enlever toute trace de liquide, d'empreinte, etc... puis placer la plaque dans le spectrophotomètre pour une **lecture à 450 nm**

Annexe 3 – Mesure de la densité folliculaire de la coupe médiane du lobe droit d’une souris du groupe contrôle (coloration PAS).



Annexe 4 – Mesure de l'indice d'activité de quelques follicules thyroïdiens.

La colloïde et le follicule sont détournés manuellement au grossissement $\times 20$ (coloration PAS)



Annexe 5 – Analyse histologique conventionnelle des coupes de thyroïdes en microscopie phototonique (microscope Eclipse 50i, Nikon, Kobé, Japon).

souris 19/0 R	grading Hyperplasie DIFFUSE	Epithélium follicule	thyrocytes	colloïde	congestion	Analyse morphométrie IA (%) et d = densité folliculaire moyenne (mm ⁻²)
375 V1	-	simple cubique aplati	thyrocyte hypertrophié	PAS+	ras	IA = 63, d = 368
376 J1	±	simple cubique		PAS+	ras	IA = 173, d = 320
377 B1	±	simple cubique	hypertrophiés -anisocaryose légère -quelques binucléés		ras	IA = 126, d = 320
378 R1	+	simple cubique à cylindrique,	thyrocyte hypertrophié anisocaryose: modérée	lumières non ovoïdes; irrégulières et réduites PAS± à - résorption visible en PAS	légère	IA = 331, d = 222
379 N1	++	simple cubique à cylindrique empilement des thyrocytes léger	thyrocyte hypertrophié anisocaryose>>anisocytose vacuolisation cytoplasmique marquée (75%T)	lumières non ovoïdes; irrégulières et réduites PAS- résorption visible en PAS	modérée	IA = 221, d = 152
380 V2	-	simple cubique aplati	vacuolisation cytoplasmique: légère	PAS+	ras	IA = 50, d = 377
381 J2	± à +	simple cubique	hypertrophiés	PAS+ sur les F à ep. Bas; PAS± sur les F à ep. haut	minime	IA = 158, d = 427
382 B2	+	simple cubique	hypertrophiés	PAS±	ras	IA = 199, d = 420
383 R2	++	simple cubique haut à cylindrique -rars stratification focale avec rares projections papillaires	thyrocyte hypertrophié - anisocytose et anisocaryose: modérée -des cellules plurinucléées -vacuolisation cytoplasmique: minime	lumières non ovoïdes; irrégulières et réduites PAS± à - résorption visible en PAS	légère à modérée	IA = 329, d = 226
384 N2	++ à +++	simple cubique haut à cylindrique -empilement des thyrocytes modéré (stratification focale) -ques projections papillaires: léger	thyrocyte hypertrophié -anisocytose et anisocaryose: marquée -des cellules plurinucléées -vacuolisation cytoplasmique: modérée	lumières non ovoïdes; irrégulières et réduites PAS- résorption visible en PAS	modérée	IA = 256, d = 126
385 V3	-	simple cubique		PAS+	ras	IA = 50, d = 438
386 J3	±	simple cubique	thyrocyte hypertrophié vacuolisation cytoplasmique: légère	PAS±	minime	IA = 213, d = 317

387	B3	+	simple cubique en majorité	hypertrophiés anisocaryose minime vacuolisation cytoplasmique: légère	PAS± à + (qqes F périphériques)	minime	IA = 136, d = 330
388	R3	++	simple cubique haut à cylindrique -rares stratification focale avec rares projections papillaires légère	thyrocytes hypertrophiés - anisocaryose: modérée (25% Thyrocytes) - quelques plurinucléation -vacuolisation cytoplasmique: minime	lumières non ovoïdes; irrégulières et réduites PAS± à _ résorption visible en PAS	légère à modérée	IA = 265, d = 201
389	N3	++ à +++	simple cubique haut à cylindrique -empilement des thyrocytes modéré (stratification focale) -qqes projections papillaires: léger	thyrocyte hypertrophié -anisocaryose et anisocaryose: marquée -des cellules plurinucléées -vacuolisation cytoplasmique: modérée	lumières non ovoïdes; irrégulières et réduites PAS_ résorption visible en PAS	modérée	IA = 310, d = 193
390	V4	-	simple cubique aplati		PAS+	ras	IA = 44, d = 330
391	J4	±	simple cubique	hypertrophiés	PAS±	minime	IA = 175, d = 430
392	B4	+	simple cubique	hypertrophiés	PAS± à + (pour qqes F périphériques)	légère à modérée	IA = 234, d = 420
393	R4	++	simple cubique haut à cylindrique - stratification focale minime	thyrocytes hypertrophiés - anisocaryose: modérée (25% Thyrocytes) - rares plurinucléation -vacuolisation cytoplasmique: minime	lumières non ovoïdes; irrégulières et réduites PAS± à _ résorption visible en PAS	légère à modérée (N6)	IA = 243, d = 257
394	N4	+++	simple cubique haut à cylindrique -empilement des thyrocytes modéré (stratification focale) -qqes projections papillaires: modéré	thyrocyte hypertrophié -anisocaryose et anisocaryose: marquée -des cellules plurinucléées -vacuolisation cytoplasmique: marquée	lumières non ovoïdes; irrégulières et réduites PAS_ résorption visible en PAS	modérée	IA = 257, d = 154
395	V5	-	simple cubique aplati		PAS+	ras	IA = 64, d = 443
396	J5	± à +	simple cubique en majorité; des cubiques bas plus en périphérie	hypertrophiés	PAS+ sur les F à ep. Bas; PAS± sur les F à ep. haut	légère	IA = 244, d = 305
397	B5	± à +	simple cubique en majorité; hypertrophiés	rare cellules binucléées	PAS±	légère	IA = 302, d = 339

398	R5	++	simple cubique haut à cylindrique stratification focale légère	thyrocytes hypertrophiés - anisocytose et anisocaryose: modérée -vacuolisation cytoplasmique: modérée	lumière non ovoïdes; irrégulières et réduites PAS± à _ résorption visible en PAS	modérée	IA = 344, d = 203
399	N5	++ à +++	simple cubique haut à cylindrique -empilement des thyrocytes modéré (stratification focale) -ques projections papillaires: modéré	thyrocyte hypertrophié -anisocytose et anisocaryose: marquée -vacuolisation cytoplasmique: marquée rares cellules plurinucléées	lumière non ovoïdes; irrégulières et réduites PAS- résorption visible en PAS	modérée	IA = 350, d = 134
400	V6	-	simple cubique aplati		PAS+	ras	IA = 48, d = 342
374	J6	± à + Pas de # majeure /aux autres	simple cubique		PAS+ sur les F à ep. Bas; PAS± sur les follicules à ep. Haut	ras	IA = 120, d = 439
401	B6	± à +	simple cubique	hypertrophiés	PAS±	légère	IA = 306, d = 347
402	R6	++	simple cubique haut à cylindrique stratification focale	thyrocytes hypertrophiés - anisocytose et anisocaryose: modérée -vacuolisation cytoplasmique: légère	lumière non ovoïdes; irrégulières et réduites PAS± à - résorption visible en PAS	légère	IA = 305, d = 230
403	N6	++ à +++	simple cubique haut à cylindrique -empilement des thyrocytes modéré (stratification focale) -ques projections papillaires: modéré	thyrocyte hypertrophié -anisocytose et anisocaryose: marquée -vacuolisation cytoplasmique: marquée rares cellules plurinucléées	lumière non ovoïdes; irrégulières et réduites PAS- résorption visible en PAS	modérée	IA = 307, d = 126
404	V7	-	simple cubique aplati		PAS+	ras	IA = 41, d = 328
405	J7	± à +	simple cubique	hypertrophiés	PAS+ sur les F à ep. Bas; PAS± sur les follicules à ep. haut	ras	IA = 211, d = 300
406	B7	++	-simple cylindrique HAUT à bistratifié - lumières parfois difficile à voir	-thyrocytes de grande taille à RNP très faible (comme gonflés) -noyau de petite taille, à la chromatine dense, de localisation souvent apicale	PAS±	légère	Impossible
	DYSPLASIE						

407 R7	± à +	simple cubique en majorité; des cubiques bas plus en périphérie			PAS+ sur les F à ep. Bas; PAS± sur les follicules à ep. haut	légère	IA = 192, d = 283
408 N7	++ à +++	simple cubique haut à cylindrique -empilement des thyrocytes modéré (stratification focale) -qqes projections papillaires: modéré	thyrocyte hypertrophié -anisocytose et anisocaryose: marquée -vacuolisation cytoplasmique: léger rares cellules plurinucléées		lumières non ovoïdes; irrégulières et réduites PAS- résorption visible en PAS	modérée	IA = 367, d = 149
409 V8	-	simple cubique aplati			PAS+	ras	IA = 45, d = 438
410 J8	± à +	simple cubique	hypertrophiés		PAS+ sur les F à ep. Bas; PAS± sur les F à ep. haut	légère	IA = 258, d = 258
411 B8	± à +	simple cubique	hypertrophiés rares noyaux géants		PAS±	minime	IA = 238, d = 245
412 R8	++	simple cubique haut à cylindrique stratification focale	thyrocytes hypertrophiés - anisocaryose et anisocytose: modérée -vacuolisation cytoplasmique: légère		lumières non ovoïdes; irrégulières et réduites PAS± à - résorption visible en PAS	légère	IA = 318, d = 264
413 N8	++ à +++	simple cubique haut à cylindrique -empilement des thyrocytes modéré (stratification focale) -qqes projections papillaires: modéré	thyrocyte hypertrophié -anisocytose et anisocaryose: marquée -vacuolisation cytoplasmique: marquée rares cellules plurinucléées		lumières non ovoïdes; irrégulières et réduites PAS- résorption visible en PAS	modérée à marquée	IA = 238, d = 135

AGREMENT SCIENTIFIQUE

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

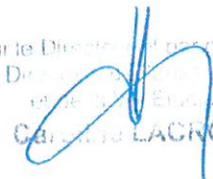
Je soussignée, Nathalie BOURGES-ABELLA, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directrice de thèse, certifie avoir examiné la thèse commune de **Lise MIALON** et **Thibaut BANQUET** intitulée « **Comparaison des marqueurs hormonaux et histomorphométriques chez la souris dans un modèle d'hypothyroïdie après 28 jours de traitement au PTU par voie alimentaire** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 23 Juillet 2020
Enseignant-chercheur de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Professeure Nathalie BOURGES-ABELLA



Vu :
Le Directeur de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
M. Pierre SANS

Pour le Directeur, par délégation,
la Directrice de l'École Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Caroline LACROIX




Vu :
La Présidente du jury
Professeure Frédérique SAVAGNER



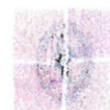
Vu et autorisation de l'impression :
Le Président de l'Université Paul Sabatier
M. Jean-Marc BRUTO



Le Président de l'Université Paul Sabatier,
par délégation,
La Vice-Présidente de la CFVU

Fabienne ALARY

Mme Lisa MIALON et M. Thibaud BANQUET
ont respectivement été admis sur concours en 2015
ont obtenu leur diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 09/07/2019
ont validé leur année d'approfondissement le : 16/07/2020
n'ont plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.



Auteurs : BANQUET Thibaud et MIALON Lise

Titre : Comparaison des marqueurs hormonaux et histomorphométriques chez la souris dans un modèle d'hypothyroïdie après 28 jours de traitement au Propyl-n-6-ThioUracile (PTU) par voie alimentaire

Résumé :

Face aux enjeux que représentent les perturbateurs endocriniens aujourd'hui, de nouvelles méthodes sont à l'étude afin de réaliser une meilleure évaluation de la fonction thyroïdienne. Le but de cette étude *in vivo* est de comparer les paramètres hormonaux (T4, T3, TSH) aux paramètres histomorphométriques de la thyroïde (indice d'activité et densité folliculaire) pour différents niveaux d'hypothyroïdie induite par le propylthiouracile (PTU). Pendant 28 jours, des souris ont été exposées au PTU par voie alimentaire à des concentrations de 1, 5, 10 et 100 ppm (soit des doses de 0,12 ; 0,57 ; 1,2 ; 9,3 mg/kg/j). Les résultats suggèrent que le traitement au PTU induit une diminution de T4 dose-dépendante, corrélée à une augmentation de l'indice d'activité. La mesure de l'indice d'activité se révèle être plus sensible que la mesure de la densité folliculaire. Cependant, aucune différence de sensibilité n'a pu être mise en évidence entre la mesure de T4 et l'évaluation de l'indice d'activité.

Mots-clés : PTU, hypothyroïdie, indice d'activité, souris, histologie, perturbateurs endocriniens, histomorphométrie, T4, T3, TSH

Authors : BANQUET Thibaud, MIALON Lise

Title : Hypothyroidism model comparing hormone levels and histomorphometry measurements in mice for 28 days treatment by Propyl-n-6-ThioUracil (PTU) in diet.

Abstract :

Endocrine disruptors are of high concern regarding human health, requiring accurate investigation for thyroid function. The aim of this *in vivo* study was to compare hormonal levels (T4, T3 and TSH) to thyroid histomorphometry measurements (activity index and follicular density) regarding their sensibility for a gradual hypothyroidism induced by propylthiouracil (PTU). During 28 days, 8 weeks-old mice were exposed to PTU (1, 5, 10 et 100 ppm) in the diet (equivalent to 0,12 ; 0,57 ; 1,2 ; 9,3 mg/kg bw/day). T4 showed significant dose-response with treatment, in relation with an increased activity index. Regarding histomorphometry analyses, activity index measurement was the most sensitive method. However, no difference in sensitivity could be found between T4 and activity index measurements.

Key Words: PTU, hypothyroidism, activity index, mouse, histology, endocrine disruptors, histomorphometry, T4, T3, TSH