

17

Pathologies thyroïdiennes

L'expertise collective de l'Inserm sur les pesticides, publiée en 2013, n'avait pas analysé de manière approfondie les pathologies de la thyroïde en raison du faible nombre d'études sur ce sujet. Ces dernières avaient été abordées sous la forme d'une communication sur les pathologies métaboliques qui comprenaient l'obésité, le diabète et les dysfonctions thyroïdiennes (Inserm, 2013). Malgré des données toxicologiques positives pour certains pesticides sur des modèles *in vivo* (rongeurs) ou *in vitro*, aucune étude de cohorte prospective en population générale n'existait à l'époque, et il était difficile de conclure quant aux effets des pesticides sur la fonction thyroïdienne à partir de quelques études transversales. Ces études montraient de faibles associations entre certains composés, appartenant aux familles des organophosphorés ou des organochlorés, et une modification du taux d'hormones thyroïdiennes (HT) ou une hypothyroïdie. Depuis, la littérature s'est étoffée tant en épidémiologie qu'en toxicologie moléculaire avec pour conséquence cette synthèse des connaissances sur le rôle des pesticides dans la survenue de pathologies thyroïdiennes.

Physiologie de la thyroïde

La thyroïde est une glande constituée de deux lobes reliés par un isthme, située à la base du cou, en avant de la trachée. Elle est organisée en follicules formés par une monocouche de cellules épithéliales, les thyrocytes, délimitant une cavité (l'espace folliculaire) contenant la substance colloïde. Les thyrocytes, responsables de la synthèse des HT, représentent plus de 99 % des cellules de la glande. Ces cellules bipolaires ont une fonction exocrine vers la cavité folliculaire, et endocrine vers la circulation sanguine. La thyroïde comporte par ailleurs des cellules dites parafoolliculaires (cellules claires ou C) responsables de la synthèse de la calcitonine, une hormone qui régule l'homéostasie calcique. Les HT régulent divers processus physiologiques : le métabolisme cellulaire, l'énergie musculaire et la température du corps, l'humeur, le rythme cardiaque, la motricité du tube digestif, l'utilisation et

la transformation des glucides, des lipides et des protéines issues de l'alimentation, et la croissance et le développement de l'enfant.

Hormones thyroïdiennes

La thyroïdostimuline ou thyrotropine (*Thyroid-Stimulating Hormone* ; TSH), hormone d'origine hypophysaire, stimule la biosynthèse des HT dans la thyroïde. Cela permet la synthèse de la thyroglobuline (TG), une glycoprotéine de 660 kDa, et précurseur de la tri-iodothyronine (T3) et de la tétra-iodothyronine ou thyroxine (T4). Le colloïde joue un rôle important dans l'hormonogénèse en stockant la TG iodée à haute concentration (Brent, 2012). L'iode est un oligo-élément qui est indispensable à la fabrication des HT. Une dose minimale d'iode est nécessaire pour un bon fonctionnement de la thyroïde. Présent en très faible quantité dans le corps, il doit être fourni par l'alimentation quotidienne (notamment sel iodé de cuisine, poissons, fruits de mer). La TSH participe à la captation de l'iode de la circulation sanguine et sa fixation sur la TG, puis à terme à la libération de T3, T4 et de TG dans la circulation sanguine.

La première étape du processus d'iodation concerne la capture d'ions iodures circulants via un symport Na^+/I^- membranaire, le *Sodium Iodide Symporter* (NIS) (Darrouzet et coll., 2014) (figure 17.1). L'activité et l'expression de ce transporteur sont stimulées par la TSH. L'iode est oxydé en présence d' H_2O_2 par la thyroperoxydase (TPO) localisée sur la membrane en contact avec le colloïde et peut ainsi se lier aux résidus tyrosine de la TG. Cette réaction aboutit à la formation du mono-iodotyrosine (MIT) puis avec la fixation d'un second atome d'iode, au di-iodotyrosine (DIT). Les molécules de TG iodées sont substrats d'une réaction de couplage des résidus iodo-tyrosine catalysée par la TPO produisant la T3 (MIT + DIT) et la T4 (DIT + DIT). Cette dernière est une hormone de réserve, produite en plus grande quantité que la T3 et qui peut à tout moment être modifiée en T3 par la déiodation qui est la forme active. La MIT et la DIT sont métabolisées, dans la thyroïde, en iodeure et en tyrosine par une iodo-tyrosine déhalogénase (Dehal1). L'iodure ainsi libéré peut alors être réintroduit dans le processus d'organification. L'activité Dehal1 est critique pour la synthèse de quantités adéquates d'HT car elle assure ce recyclage de l'iodure intra-thyroïdien à partir des formes intermédiaires des HT. La quantité d'iodure recyclé est 3 à 5 fois plus importante que celle provenant de l'alimentation au niveau de l'iode utilisé dans la synthèse des HT (Hichri, 2018).

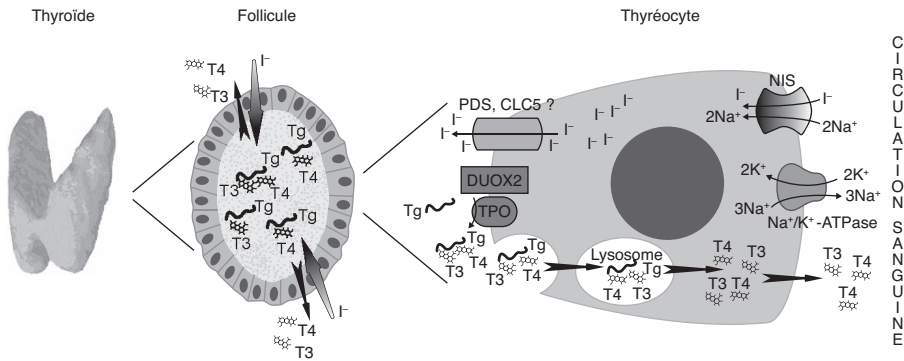


Figure 17.1 : Biosynthèse des hormones thyroïdiennes (d'après Darrouzet et coll., 2014)

(Figure traduite de l'anglais)

Régulation de la production et de la biodisponibilité des hormones thyroïdiennes

La régulation en amont de la synthèse hormonale repose sur la sécrétion et action de l'hormone thyroïdienne (Thyrotropin-Releasing Hormone ; TRH) produite par les neurones du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus et dont la sécrétion est contrôlée par les récepteurs aux hormones thyroïdiennes (Thyroid Hormone Receptors ; TR, rétrocontrôle négatif en cas d'excès) et une voie nerveuse (conditionnée par la disponibilité en nourriture, la température corporelle, le fonctionnement cardiovasculaire...) (Chiamolera et Wondisford, 2009). La TRH stimule la synthèse de la TSH par l'antéhypophyse dont la sécrétion est aussi contrôlée par les TR (Szkudlinski et coll., 2002). La TSH se lie au récepteur de l'hormone stimulant la thyroïde (TSHR) exprimé au niveau de la membrane basolatérale des cellules folliculaires de la thyroïde. Ce récepteur couplé à la protéine G provoque par l'intermédiaire de l'adénylate cyclase, une augmentation de l'adénosine 3',5'-monophosphate cyclique (AMPc) intracellulaire entraînant une production accrue d'HT dans les cellules folliculaires. Seules les concentrations circulantes libres (T4L et T3L ; L pour « libre ») participent au rétrocontrôle négatif sur la TSH hypophysaire et la TRH hypothalamique.

Les hormones T3 et T4 sont liées à plus de 99 % aux protéines plasmatiques de transport : Thyroxine-Binding Globulin (TBG), transthyrétine (TTR) ou albumine (Janssen et Janssen, 2017). Chez l'être humain, la T4 circulante est à 75 % liée à la TBG, à 15 % à la TTR et à 10 % à l'albumine. La fraction libre des HT représente en effet moins de 0,5 % de la concentration sérique totale.

Seule la fraction libre (T3L, T4L) traverse la membrane des capillaires sanguins et les HT sont transportées activement à travers la membrane cellulaire des cellules cibles via des transporteurs appartenant à différentes familles telles que les *Organic Anion Transporting Polypeptide* (OATP), *Multidrug Resistance-Associated Protein*, *Na⁺-Taurocholate Cotransporting Polypeptide* et *Monocarboxylate Transporter* (MCT). Ces transporteurs tissus-spécifiques participent à la régulation et effets des HT en fonction du tissu cible (Visser et coll., 2011). La concentration de T3 est indépendante des variations physiologiques ou pathologiques des protéines porteuses à l'inverse de la T4. En effet, une augmentation de T4 peut résulter d'une élévation de la TBG ou inversement pour une diminution de T4, variations induites en particulier par des xénobiotiques dont certains médicaments.

La majorité de T3 (80 %) est produite par déiodination de T4 *via* un processus enzymatique catalysé par les désiodases intracellulaires, D2 et D1 (figures 17.2 et 17.3). Par ailleurs, T4, une pré-hormone (qui n'a pas d'action sur les TR), peut aussi avec T3 être déiodinée en métabolites inactifs ou quasi-inactifs T3 *reverse* (rT3), T2 et T1 suite à l'action de D3 (Dentice et coll., 2013 ; Gereben et coll., 2015). L'expression des 5'-désiodases D1, D2 et D3 est variable dans le temps et selon les organes, ce qui constitue un mécanisme important de modulation de la signalisation des HT (Bianco et Kim, 2006 ; Bianco, 2011 ; Gereben et coll., 2015).

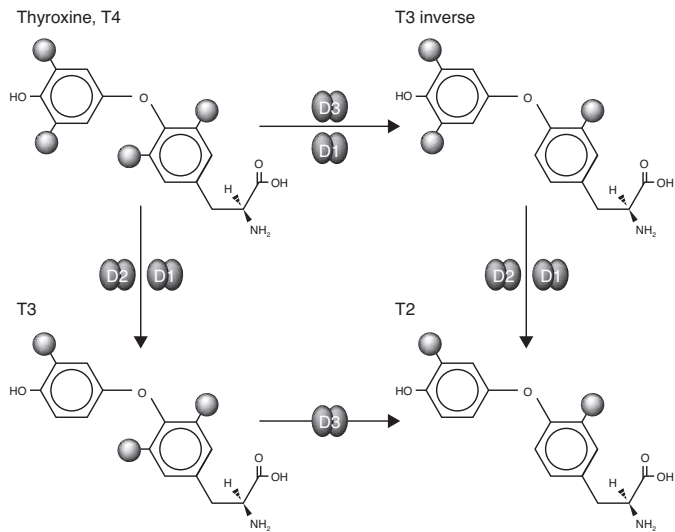


Figure 17.2 : Régulation de l'activité des hormones thyroïdiennes par la déiodation (d'après Bianco et Kim, 2006)

Récepteurs des hormones thyroïdiennes

Les mammifères expriment deux isoformes de TR qui sont codées par les gènes *THRA* et *THRB*, chacune donnant lieu à quatre variantes : TR α 1, TR α 2, TR $\Delta\alpha$ 1, TR $\Delta\alpha$ 2 et TR β 1, TR β 2, TR β 3, TR $\Delta\beta$ 3 (Sirakov et Plateroti, 2011). Chez les vertébrés, T3 est le ligand majoritaire d'une isoforme (TR α 1) d'un des récepteurs (Tata, 2013 ; Taylor et Heyland, 2017 ; Vella et Hollenberg, 2017). Outre les récepteurs nucléaires, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, un récepteur et molécule d'adhésion transmembranaire liant la vitronectine (une glycoprotéine sérique), a été identifiée comme récepteur de nombreux ligands incluant les HT (Bergh et coll., 2005).

Les TR sont constitutivement liés à l'ADN au niveau d'éléments de réponse (*Thyroid-Response Elements* ; TRE) caractérisés par des variations de répétitions du motif PuGGTCA (Pu pour purine) séparées de 4 pb présents dans des promoteurs de gènes cibles (figure 17.3) ; ils forment des hétérodimères avec le récepteur X de rétinoïdes, inactifs en l'absence de ligands (et recrutant à cet effet, des corépresseurs transcriptionnels). La liaison des HT aux TR nucléaires induit l'activation de l'hétérodimère qui échange ces corépresseurs avec des coactivateurs, permettant l'activation transcriptionnelle

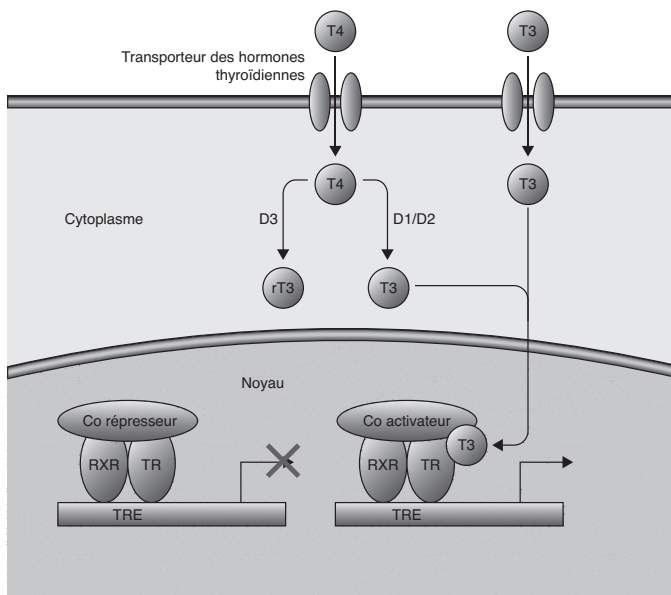


Figure 17.3 : Signalisation nucléaire par les hormones thyroïdiennes (d'après Brent, 2012)

(Figure traduite de l'anglais)

des gènes cibles. Le récepteur TR β semble principalement impliqué dans le rétrocontrôle de la sécrétion hypophysaire de TSH et dans le développement de l'audition. En revanche, l'invalidation de TR α conduit à une atrophie thyroïdienne avec diminution des taux de TSH et des HT. Certains organes constituent des tissus cibles spécifiques d'un type de récepteur comme l'oreille interne, l'hypophyse, le cœur, le foie, l'os ou l'intestin grêle. Cependant, les TR α et TR β peuvent coopérer dans certains cas (Flamant et coll., 2007).

Les HT peuvent aussi agir selon une régulation non génomique par liaison à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, T4 étant le ligand principal, alors que T3 a une action limitée (Davis et coll., 2016 ; Taylor et Heyland, 2017). Les données cristallographiques du récepteur $\alpha_v\beta_3$ révèlent deux domaines de liaison S1 et S2 (Lin et coll., 2011). T3 se lie au domaine S1 et active la PI3K via la kinase Src alors que T3 et T4 se lient au domaine S2 et activent MAPK1 et 2. Les gènes régulés par la liaison des HT à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ incluent ceux codant pour les récepteurs d'hormones non peptidiques TR et ER α et d'autres codant pour des protéines qui contrôlent l'angiogenèse et qui sont associés au développement tumoral (*FGF2*, *MMP2*, *HIF1A*, *COX2*) (Davis et coll., 2016). Parmi d'autres activités non génomiques des HT, il est rapporté que i) T4 module la localisation et l'activité de la désiodase D2, et ainsi la production de T3, en régulant la dynamique du cytosquelette d'actine des astrocytes (Farwell et coll., 1990) ; ii) T3 participe à la respiration cellulaire via l'interaction avec le récepteur p43 de la matrice mitochondriale (43-kDa c-ErbA α 1) (Casas et coll., 1999) avec pour conséquence une contribution à l'intolérance au glucose et à l'insulino-résistance (Davis et coll., 2016) ; iii) T2 participe aux régulations métaboliques via des interactions complexes avec la chaîne respiratoire mitochondriale (Lanni et coll., 2005 ; Davis et coll., 2016).

Métabolisme et excrétion

Les HT sont conjuguées au niveau hépatique et éliminées de la circulation sanguine par voie biliaire. Les voies majeures de métabolisation de phase II sont la sulfonylation par les sulfotransférases (SULT) ou glucuronylation par les uridine diphosphate glucuronyltransférases (UGT). Des transporteurs spécifiques peuvent également prendre en charge les HT conjuguées, par exemple le OATP1B1 pour les sulfoconjugués. L'expression des gènes codant les enzymes du métabolisme hépatique (phases I, II et III) et leur activité sont régulées par de nombreux xénobiotiques. Cette régulation est décrite pour l'activité sulfotransférase (Wang et James, 2006) et glucuronyltransférase (Barter et Klaassen, 1992). Comme des inducteurs d'UGT peuvent

augmenter l'élimination de T4 et non de T3, cette régulation du taux d'hormones libres repose sur l'activité d'isoenzymes différentes pour UGT ou SULT (Visser, 1996).

Pathologies de la thyroïde

Les pathologies qui affectent la glande thyroïde sont multiples, qu'elles soient non tumorales ou tumorales. La thyroïde ayant comme principale fonction celle de produire les hormones thyroïdiennes T4 et T3, les pathologies qui affectent la glande se traduisent fréquemment par des dysfonctionnements hormonaux. Ces dysfonctionnements peuvent conduire à une insuffisance ou absence de synthèse ou de libération des HT se traduisant par un tableau clinique dénommé hypothyroïdie. Dans certains cas l'origine est un déficit de stimulation hypophysaire, c'est-à-dire de TSH (hypothyroïdie centrale). Inversement, ils peuvent conduire à un excès de production ou sécrétion des HT se traduisant par un tableau clinique dénommé hyperthyroïdie.

On distingue l'hypothyroïdie clinique (lorsque des signes cliniques accompagnent une TSH augmentée au-delà de la valeur normale supérieure et une T4 (libre ou totale) abaissée au-delà de la valeur normale inférieure) de l'hypothyroïdie sous- ou infra-clinique (lorsque les signes cliniques sont minimes ou absents, avec une TSH augmentée au-delà de la valeur normale supérieure, et une T4 libre normale). Il en est de même pour l'hyperthyroïdie clinique (qui associe des signes cliniques francs à une TSH effondrée et à une T4 libre et/ou T3 libre augmentées au-delà de la valeur normale inférieure) et l'hyperthyroïdie sous- ou infra-clinique (lorsque les signes cliniques sont minimes ou absents avec une TSH inférieure à la valeur normale et les T4 et T3 libres normales).

L'étiologie des dysthyroïdies est multiple. Des maladies ou affections auto-immunes (dont la thyroïdite de Hashimoto ou la thyroïdite atrophique post-ménopausique), des traitements (iode radioactif pour traiter une hyperthyroïdie, radiothérapie de la tête ou cou, médicaments à base de lithium ou d'antithyroïdiens de synthèse, chirurgie thyroïdienne,...), une dysgénésie thyroïdienne au cours du développement (dont l'hypothyroïdie congénitale), des pathologies hypophysaires ou hypothalamiques ainsi que des carences en iode alimentaire peuvent entraîner une hypothyroïdie. D'autres affections d'origine auto-immune (maladie de Graves-Basedow, thyroïdite du post-partum), des traitements médicamenteux (certains anti-arythmiques comme l'amiodarone), la présence de nodules thyroïdiens hypersécrétants (goitre multinodulaire, adénome) ou des inflammations virales peuvent entraîner

une hyperthyroïdie. Il faut noter que certaines affections peuvent débiter par une hypothyroïdie et évoluer vers une hyperthyroïdie et inversement.

La prévalence et l'incidence des dysthyroïdies varient entre pays en raison des différences des seuils de diagnostic, de la sensibilité des essais, de la consommation d'iode et de la dynamique démographique. Dans les pays avec un apport suffisant en iode, la prévalence de l'hyperthyroïdie clinique est estimée entre 0,2 % et 1,3 %, alors que celle de l'hyperthyroïdie sous-clinique est entre 1 % et 5 % (certaines études incluaient des patients sous lévothyroxine). Concernant les hypothyroïdies franches, la prévalence dans la population générale est estimée à entre 0,2 % et 5,3 % en Europe et entre 0,3 % et 3,7 % aux États-Unis (Taylor et coll., 2018). Plus généralement, une méta-analyse de 17 études européennes a rapporté une prévalence des dysthyroïdies (formes cliniques et sous-cliniques) de 11 %, avec seulement la moitié des patients qui seraient diagnostiqués (Garmendia Madariaga et coll., 2014). En ce qui concerne les données françaises, dans le cadre de l'étude SU.VI.MAX sur la consommation alimentaire et la santé, menée chez des hommes de 45-60 ans et des femmes de 35-60 ans, l'incidence annuelle moyenne des dysthyroïdies était de 267 cas pour 100 000 personnes pour l'ensemble de la population, correspondant à une incidence globale de 2,0 % sur la période de l'étude de 7,5 ans (Estaquio et coll., 2009). Plus récemment, Barry et coll. ont constaté une augmentation de l'incidence des hypothyroïdies congénitales avec glande en place (par opposition aux dysgénésies) en France durant la période 2002-2012, avec des disparités régionales (Barry et coll., 2015).

Plusieurs facteurs de risque des pathologies thyroïdiennes sont reconnus. S'agissant de celles entraînant une hypothyroïdie, on peut citer le sexe féminin, un âge avancé, des antécédents familiaux d'hypothyroïdie, des atteintes auto-immunes (diabète de type 1, maladie coéliquae), des traitements médicamenteux, et la radiothérapie (Vanderpump, 2011 ; Burch, 2019 ; Lin et coll., 2019). La carence en iode reste la principale cause d'hypothyroïdie, mais elle est devenue rare dans les pays développés (Taylor et coll., 2018). S'agissant de celles entraînant une hyperthyroïdie, on peut citer le sexe féminin, des antécédents familiaux d'hyperthyroïdie, notamment la maladie de Graves-Basedow, ou des affections auto-immunes (diabète de type 1, anémie pernicieuse). Le rôle de multiples substances chimiques pouvant perturber l'homéostasie thyroïdienne est de plus en plus suggéré, comme par exemple les ions perchlorates (Leux et Guenel, 2010).

Concernant les pathologies tumorales, chez l'être humain, il existe deux principaux types de cancers thyroïdiens : le cancer papillaire, le plus couramment rencontré, et le cancer folliculaire.

Données des études épidémiologiques

En 2016, Campos et Freire ont réalisé une revue systématique des études épidémiologiques explorant le lien entre les pesticides et la fonction thyroïdienne, et plus spécifiquement sur les pesticides non persistants, qui sont les plus utilisés actuellement depuis que les organochlorés ont été interdits dans la plupart des pays (Campos et Freire, 2016). Malgré une hétérogénéité méthodologique entre les 19 études incluses dans la revue, la plupart montrent des effets sur les niveaux de T3 et T4, et/ou de TSH, et plusieurs révèlent une association entre l'exposition aux pesticides et l'hypothyroïdie. Néanmoins, en raison d'un manque d'ajustement pour les variables confondantes et des méthodes d'échantillonnage peu rigoureuses identifiés dans la majorité des études, les auteurs ont conclu que, dans l'ensemble, la connaissance actuelle restait limitée pour un effet des pesticides sur la thyroïde.

Les résultats de notre analyse de la littérature scientifique sont présentés ci-dessous selon la population concernée : études en milieu professionnel, études en population générale ou riverains.

Exposition aux pesticides en milieu professionnel

De nombreuses études (cohortes ou études transversales essentiellement) ont été réalisées en milieu professionnel. Certaines se sont adressées à des pathologies thyroïdiennes soutenues par un diagnostic médical ou par un profil biologique (notamment les hypothyroïdies et hyperthyroïdies sous-cliniques). D'autres ont étudié les relations entre l'exposition à des pesticides et des variations des concentrations circulantes en HT. Ces dernières ne permettent pas de conclure à une hypothyroïdie ou hyperthyroïdie tant qu'il n'est pas précisé la distribution des HT dans la population d'étude et le pourcentage de sujets qui présentent des concentrations anormales. Quelques études concernent le cancer de la thyroïde. L'ensemble de ces études ont été conduites chez des populations d'applicateurs, d'agriculteurs, d'ouvriers d'usine de pesticides mais aussi chez les conjointes d'agriculteurs, et dans d'autres populations particulières. À notre connaissance, il n'y a pas de méta-analyse sur l'impact de l'exposition professionnelle à des pesticides et la survenue de pathologies de la thyroïde. Les études de cohorte sont présentées dans le tableau 17.I (voir en fin de ce chapitre).

Pathologies de la thyroïde non cancéreuses

- **Études chez les applicateurs de pesticides – cohorte Agricultural Health Study**

Le lien entre l'utilisation de pesticides et des troubles de la thyroïde a été étudié chez des applicateurs privés dans la cohorte prospective américaine *Agricultural Health Study* (AHS). Les sujets, majoritairement de sexe masculin, ont été interrogés sur la présence d'atteintes compatibles avec une hypothyroïdie clinique (Shrestha et coll., 2018b) ou sous-clinique (Lerro et coll., 2018b), ou une hyperthyroïdie (Shrestha et coll., 2019).

Dans la première étude de Shrestha et coll., l'apparition d'hypothyroïdies rapportées ($n = 829$) a été évaluée en relation avec l'utilisation de cinquante pesticides différents, à un moment donné du passé, ainsi qu'avec un indicateur d'exposition cumulée (nombre de jours d'utilisation au cours de la vie, pondéré par l'intensité ; variable qui était codée en trois ou quatre catégories selon les effectifs) (Shrestha et coll., 2018b). Cette mesure d'exposition par questionnaire était réalisée au moment de l'inclusion chez 35 150 hommes et femmes avec un suivi de 20 ans. Des analyses de sensibilité ont été réalisées pour évaluer l'impact de l'attrition (nombre de sujets perdus de vue au cours du suivi), qui se sont révélées sans impact sur la mesure de l'association. Dans cette étude, après ajustement sur sexe, âge, région et tabagisme, le risque d'hypothyroïdie était augmenté chez les participants qui avaient déjà utilisé quatre insecticides organochlorés parmi les sept étudiés (aldrine, heptachlore et lindane parmi les participants de plus de 62 ans [âge médian de la population à l'inclusion] ; chlordane chez l'ensemble des participants), quatre insecticides organophosphorés parmi les 9 étudiés (coumaphos chez les plus de 62 ans ; diazinon, dichlorvos, et malathion chez l'ensemble des participants) et trois herbicides parmi les 18 étudiés (dicamba, glyphosate et 2,4-D⁶⁵ chez l'ensemble des participants). Les HR allaient de 1,21 ; IC 95 % [1,04-1,41] pour le chlordane à 1,54 ; IC 95 % [1,23-19,4] pour le lindane chez les plus de 62 ans. Les insecticides carbamates ($n = 3$) et pyréthrinoides ($n = 2$), ainsi que les fongicides ($n = 5$) et les fumigants ($n = 4$) étudiés n'étaient pas associés au risque d'hypothyroïdie. En ajustant sur les pesticides corrélés, les associations sont restées significatives pour le chlordane, l'heptachlore, le diazinon et le dicamba. Le risque était le plus important parmi ceux avec la plus forte intensité d'exposition cumulée avec des tendances linéaires pour le chlordane, le lindane, le diazinon, et le coumaphos (chez les plus de 62 ans). Il y avait des tendances ($p \leq 0,2$) pour l'aldrine, le dichlorvos, le fonofos, et la perméthrine, même si les HR n'augmentaient

pas toujours de façon monotone en fonction de la catégorie d'exposition aux pesticides. Pour les herbicides, l'augmentation du risque d'hypothyroïdie était observée pour le 2,4-D (p de tendance = 0,01). Il y avait aussi une tendance pour le 2,4,5-T (acide 2,4,5-trichlorophénoxyacétique) parmi les applicateurs les plus âgés (p de tendance = 0,05), même si les HR augmentaient faiblement entre les catégories d'exposition 2 et 3. Même s'il n'y avait pas d'augmentation dose-réponse pour le glyphosate, les HR étaient augmentés dans la 2^e (1,27 ; IC 95 % [1,03-1,69]) et 3^e catégorie (1,38 ; IC 95 % [1,12-1,69]) d'exposition cumulée, et un peu moins dans la dernière catégorie (1,17 ; IC 95 % [0,94-1,45]). Les résultats de cette étude étaient généralement cohérents avec les précédentes analyses sur le risque d'hypothyroïdie en étudiant les cas prévalents de l'étude AHS ou avec un moindre suivi (Goldner et coll., 2013 ; Lerro et coll., 2018b).

Lerro et coll. ont également publié en 2018 les résultats d'une étude sur 679 hommes applicateurs de pesticides dans l'AHS avec des données biologiques permettant de caractériser plus finement la fonction thyroïdienne (Lerro et coll., 2018b). Cette étude a été réalisée chez des sujets ne déclarant pas de trouble de la thyroïde et ne prenant aucune médication thyroïdienne. Les auteurs ont montré parmi cinquante pesticides différents des associations entre le risque d'une hypothyroïdie sous-clinique (TSH supérieure à 4,5 mIU/l) et l'exposition cumulée au cours de la vie à l'aldrine avec une relation exposition-effet (OR = 4,76 ; IC 95 % [1,53-14,82] pour la catégorie d'exposition la plus élevée) et à l'herbicide pendiméthaline (OR = 2,78 ; IC 95 % [1,30-5,95] pour la catégorie d'exposition la plus élevée). Le captane et l'éthyl-dipropylthiocarbamate étaient eux associés, à la limite de la signification statistique, à une hypothyroïdie sous-clinique (p de tendance respectivement 0,09 et 0,05) et à une augmentation de TSH (p de tendance respectivement 0,05 et 0,04). Le fumigant bromure de méthyle était associé à une diminution de la TSH et augmentation de T4. Une association positive et modeste, mais à la limite de la signification statistique, était observée entre le glyphosate et la TSH (OR = 1,14 ; IC 95 % [0,99-1,33]), ainsi que la trifluraline et la TSH (OR = 1,14 ; IC 95 % [0,97-1,34]) chez les applicateurs dans la catégorie d'exposition la plus élevée alors que ces substances n'étaient pas associées à un risque accru d'hypothyroïdie sous-clinique. Toutes les associations étaient ajustées sur l'âge, la région, l'IMC, le tabagisme et sur les autres pesticides associés au pesticide étudié.

Les deux études ci-dessus sont généralement cohérentes et dans l'ensemble elles confirment les résultats d'une précédente étude menée sur la cohorte AHS, basée sur l'auto-déclaration et avec un moindre suivi (Goldner et coll., 2013), qui a montré que l'exposition des applicateurs à certains pesticides

organochlorés (heptachlore, lindane, et chlordane), organophosphorés (diazinon et malathion) ou herbicides (2,4-D et dicamba) était associée à une augmentation de risque d'hypothyroïdie. Les études récentes n'ont pas confirmé les associations mises en évidence précédemment impliquant le DDT, le toxaphène et le carbofuran, et elles ont fait ressortir des associations modestes entre l'exposition au glyphosate ou à la trifluraline et un risque accru de l'hypothyroïdie.

Une publication par Shrestha et coll. fait état de la relation entre l'utilisation des pesticides par les agriculteurs de l'AHS et la survenue d'hyperthyroïdie rapportée (Shrestha et coll., 2019). Parmi les mêmes 35 150 applicateurs de l'étude présentée ci-dessus (Shrestha et coll., 2018b), 271 ont développé une hyperthyroïdie au cours du suivi. L'analyse par modèle de Cox ajusté sur sexe, éducation, région et tabagisme a mis en évidence que plusieurs pesticides (malathion, manèbe/mancozèbe, dicamba, métolachlore, et atrazine dans l'échantillon complet et le chlorimuron-éthyle chez les moins de 62 ans) étaient associés à une diminution de risque d'hyperthyroïdie. L'association négative la plus forte était observée avec le manèbe/mancozèbe (HR = 0,50 ; IC 95 % [0,30-0,83]). Le risque d'hyperthyroïdie était également plus faible parmi les agriculteurs qui avaient une exposition au cours de la vie pondérée par l'intensité plus importante au carbofuran et chlorpyrifos.

- **Études chez les femmes d'agriculteurs - cohorte Agricultural Health Study**

Une étude transversale sur les épouses (n = 16 529) des applicateurs de pesticides dans la cohorte AHS a analysé cinquante pesticides différents appartenant à plusieurs familles chimiques (herbicides, insecticides organochlorés, organophosphorés, carbamates et pyrèthrinoides, fongicides et fumigants) en lien avec les pathologies de la thyroïde (Goldner et coll., 2010). Les participantes étaient classées comme cas lorsqu'elles rapportaient un diagnostic médical. L'exposition était évaluée par questionnaire, avec des questions sur le fait que les épouses elles-mêmes avaient déjà mélangé ou appliqué les pesticides étudiés. Les OR étaient calculés par régression logistique polytomique (absence de pathologie de la thyroïde, hypothyroïdie, hyperthyroïdie ou autres), ajustés sur le niveau d'éducation (études supérieures oui/non), l'âge à l'inclusion (< 45, 46-55, 56-65, > 66 ans), le statut tabagique (jamais, passé, actuel), l'indice de masse corporelle (IMC : < 25 ; 25-29,9 ; > 30 kg/m²), et la prise de traitement hormonal substitutif (jamais, déjà). Une augmentation du risque d'hypothyroïdie a été mise en évidence en lien avec l'utilisation de pesticides organochlorés sans distinction (OR = 1,2 ; IC 95 % [1,0-1,6]), ainsi que des fongicides sans distinction (OR = 1,4 ; IC 95 % [1,1-1,8]). Les associations étaient plus particulièrement observées

avec le chlordane, les fongicides bénomyl, manèbe et mancozèbe et l'herbicide paraquat. Concernant les hyperthyroïdies, le manèbe et mancozèbe, membres de la famille des dithiocarbamates, étaient les seuls également associés avec un risque augmenté d'hyperthyroïdie (OR = 2,3 ; IC 95 % [1,2-4,4]). Il n'y avait pas d'association avec l'utilisation par le passé d'herbicides, de fumigants, ou d'insecticides de la famille des organochlorés, organophosphorés, carbamates ou pyréthrinoides.

Cette même population a par la suite été étudiée de manière longitudinale sur une période de 20 ans, au cours de laquelle ont été recensés 1 627 cas incidents d'hypothyroïdie et 531 d'hyperthyroïdie (Shrestha et coll., 2018a). Une validation interne montrait que la qualité des informations recueillies par auto-déclaration était meilleure pour l'hypothyroïdie que pour l'hyperthyroïdie (confirmées par les dossiers médicaux respectivement pour 91 % et 32 % des cas). Pour les fongicides sans distinction, les auteurs mettaient en évidence une augmentation du risque d'hypothyroïdie, avec un HR (ajusté sur l'éducation, lieu de résidence et le tabagisme) de 1,26 ; IC 95 % [1,02-1,54]. Des associations statistiquement significatives ont été retrouvées en particulier pour le bénomyl, le manèbe/mancozèbe, et le métalaxyl. Un risque élevé d'hypothyroïdie était également observé en lien avec la pendiméthaline après ajustement sur d'autres pesticides corrélés (HR = 1,77 ; IC 95 % [1,19-2,62]), et parmi les plus de 60 ans, pour le parathion (HR = 2,44 ; IC 95 % [1,43-4,16], 14 cas exposés) et la perméthrine (HR = 1,68 ; IC 95 % [1,01-2,82]). Par ailleurs, l'insecticide phorate, et les herbicides imazéthapyr et métolachlore étaient associés à une diminution de risque d'hypothyroïdie, tandis qu'aucun lien n'a été retrouvé pour le glyphosate (HR = 1,07 ; IC 95 % [0,95-1,20]). L'insecticide diazinon (HR = 1,35 ; IC 95 % [1,05-1,73]), les fongicides manèbe et mancozèbe (HR = 1,74 ; IC 95 % [1,05-2,88]), et l'herbicide métolachlore (HR = 2,01 ; IC 95 % [1,17-3,44]) étaient associés à un risque augmenté d'hyperthyroïdie, tandis qu'une diminution du risque a été observée pour l'herbicide trifluraline.

- **Études transversales chez les agriculteurs ou travailleurs agricoles**

De nombreuses études, pour la plupart de nature transversale, se sont intéressées à des associations avec les concentrations sériques d'hormones thyroïdiennes et de TSH en absence de diagnostic clinique de pathologie thyroïdienne.

Une étude en Thaïlande a comparé les niveaux d'hormones thyroïdiennes chez des agriculteurs travaillant en agriculture biologique (n = 222) ou traditionnelle (n = 195) (Kongtip et coll., 2019). Le type et la quantité de pesticides utilisés étaient demandés à ceux travaillant dans l'agriculture

traditionnelle. Les niveaux de TSH, T3 libre, T3 et T4 des agriculteurs traditionnels étaient environ 1,6, 1,2, 1,3 et 1,1 fois plus élevés que ceux de l'agriculture biologique. Ces résultats peuvent s'expliquer par les taux d'hormones thyroïdiennes au-dessous des valeurs de référence chez les agriculteurs biologiques mais les auteurs ont noté que ces différences pourraient également s'expliquer par des effets d'âge ou de genre. En regardant les associations avec des pesticides spécifiques, les auteurs ont mis en évidence des associations, uniquement positives, entre la quantité appliquée de plusieurs herbicides dans le passé et le niveau d'hormones thyroïdiennes, après ajustement sur les variables associées aux hormones thyroïdiennes : sexe, tabagisme actuel, consommation d'alcool actuelle, utilisation de pesticides au domicile durant l'année précédente, niveaux de triglycérides et stress dans les 2 à 4 dernières semaines. Les substances actives analysées étaient le paraquat (associé à une augmentation de TSH, T3 libre et T3), l'acétochlore (T4 libre), l'atrazine (TSH, T3 libre et T3), le glyphosate (T4) ; le diuron (TSH) et une catégorie « autres herbicides » qui incluait l'alachlore, le propanil, et le butachlor (FT4 et T3). Les produits les plus utilisés dans cette étude étaient le glyphosate, le paraquat et le 2,4-D.

Une étude transversale récente chez 275 résidents d'une ferme au Brésil suggérait qu'à la fois une exposition professionnelle aiguë et chronique était associée à une augmentation des niveaux de TSH chez les ouvriers agricoles masculins (Piccoli et coll., 2016). Dans cette population, le mancozèbe et le sulfate de cuivre étaient les fongicides les plus fréquemment utilisés, et le glyphosate et le paraquat étaient les deux herbicides rapportés comme les plus fréquemment utilisés. L'exposition au cours de la vie aux fongicides, herbicides et dithiocarbamates était associée à l'augmentation de la TSH et la diminution de la T4 libre, plus particulièrement chez les hommes, avec une relation exposition-effet monotone. En revanche, le travail à la ferme et l'exposition globale à tous pesticides au cours de la vie étaient associés à une baisse de TSH et respectivement à une augmentation des T3 totale et T4 libre. Les auteurs retrouvaient peu d'associations chez les femmes. Les associations avec les biomarqueurs de pesticides étaient faibles et peu consistantes. Après ajustement sur le sexe, l'âge, l'IMC, le tabagisme et la consommation d'alcool, parmi les nombreux métabolites de pesticides testés, la détection de γ -chlordane était associée positivement à la concentration de TSH en log ($\beta = 1,25$ [1,01-1,54]) et au log de la concentration en T3 ($\beta = 1,06$ [1,01-1,11]), la dieldrine négativement au log de la concentration en T4 libre ($\beta = 0,92$ [0,86-0,99]). Des pesticides en nombre plus important étaient associés au niveau de T3 soit positivement (γ -chlordane, β -HCH, époxyde d'heptachlore [un métabolite d'heptachlore], *trans*-nonachlore, p,p'-DDE, endosulfan II) soit négativement (endrine, heptachlore).

D'autres études transversales, reposant sur un plus faible nombre d'effectifs, ont également trouvé des associations entre l'exposition professionnelle aux pesticides et des signes cliniques et biologiques d'hypothyroïdie. C'est le cas des applicateurs ($n = 63$) de fongicides de la famille des éthylène bis-dithiocarbamates (EBDC) au Mexique (Steenland et coll., 1997), des travailleurs de la banane aux Philippines ($n = 88$) exposés aux EBDC et autres fongicides (chlorothalonil, propanil, et bitertanol) utilisés en même temps ou en alternance avec ce dernier (Panganiban et coll., 2004), et travailleurs dans des serres ($n = 108$) en Roumanie (Simescu et coll., 2014).

Une étude au Mexique a rapporté une association positive entre les taux urinaires de dialkylphosphates (DAP ; métabolites des pesticides organophosphorés et marqueurs indirects d'exposition à ces composés) et des perturbations des taux sériques d'hormones thyroïdiennes (augmentation de TSH et T4, baisse de T3) chez des hommes ($n = 136$) travaillant en floriculture (Lacasaña et coll., 2010a). Les auteurs ont montré par la suite que ces effets sont déterminés par l'activité de la paraoxonase, une enzyme intervenant dans l'hydrolyse des organophosphorés (Lacasaña et coll., 2010b). Blanco-Munoz et coll. ont exploré le lien entre les taux sériques de p,p'-DDE et les hormones thyroïdiennes dans cette même population (Blanco-Munoz et coll., 2016). Une association positive a été retrouvée entre le p,p'-DDE et les concentrations de T3 et de T4 totales avec une relation exposition-effet, mais sans effet sur la TSH.

Une étude portant sur 96 agriculteurs de la bande de Gaza a mis en évidence une élévation des niveaux de TSH et une diminution des T3 et T4 par comparaison à un groupe de témoins de même effectif non exposés aux pesticides et appariés sur l'âge (Al-Shanti et Yassin, 2017). Aux États-Unis, 144 applicateurs de pesticides avaient également des niveaux de TSH plus élevés que 49 témoins urbains, ainsi que des variations saisonnières non observées chez ces derniers (Garry et coll., 2003).

Une étude chez 122 agriculteurs danois a examiné les variations saisonnières des taux sériques des hormones thyroïdiennes chez des sujets travaillant dans des serres. Une analyse transversale des données a montré que la pulvérisation plus importante de pesticides pendant l'été, pour une période de trois mois, était associée à une diminution mineure de T4 libre en automne. Cette association était également constatée au printemps, ce qui pourrait s'expliquer par le fait que les travailleurs des serres sont exposés aux différents pesticides tout au long de l'année. Une analyse longitudinale a montré une diminution de TSH et une augmentation de T3 (totale et libre) et de T4 libre en automne. Les auteurs notent que cet effet saisonnier, qui est à l'inverse de celui attendu étant donné que l'été et l'automne sont des périodes

de forte utilisation de pesticides, ne montre pas une relation exposition-effet et pourrait s'expliquer par des raisons autres que l'exposition aux pesticides (Toft et coll., 2006).

Dans une étude au Pakistan sur 88 exposés à la culture du coton et 88 témoins appariés sur l'âge et le sexe, des différences hormonales étaient retrouvées et en particulier une baisse des niveaux de T4 libres sériques chez les cueilleurs de coton, mais pas chez les applicateurs de pesticides (Khan et coll., 2013).

Bien que les troubles de la thyroïde chez les agriculteurs aient été constatés dans de nombreuses études, d'autres en revanche n'ont pas montré de tels effets. Une étude au Cameroun n'a pas retrouvé de différence dans les taux des hormones thyroïdiennes entre 47 hommes exposés aux pesticides et 37 témoins (Manfo et coll., 2012). Dans une étude analysant la fonction de reproduction chez des agriculteurs vénézuéliens, aucune différence dans les taux sériques de T4 libres et de TSH n'a été retrouvée entre les hommes ($n = 64$) exposés aux organophosphorés et aux carbamates par rapport à 35 témoins non exposés (Miranda-Contreras et coll., 2013).

- ***Études dans des populations sensibles – exposition in utero***

Des femmes travaillant dans des serres et exposées pendant leur grossesse à des pesticides non persistants ou en combinaison (potentiellement plus de 100 substances actives différentes) ont été incluses dans une cohorte danoise entre 1996 et 2000. Sur les 247 enfants nés de ces mères, des dosages sanguins ont été réalisés sur 90 et 55 enfants respectivement classés comme exposés ou non exposés. L'exposition prénatale était associée à une baisse des concentrations de TSH chez les enfants entre 6 et 11 ans, après ajustement sur l'IMC en plus du changement dans la composition corporelle. La différence de z-scores de TSH était $-0,66$ [$-1,29$; $-0,02$] chez les enfants de 6-11 ans nés de mères exposées par rapport au groupe d'enfants nés de mères non exposées (Wohlfahrt-Veje et coll., 2011).

- ***Études chez d'autres professionnels***

Les associations entre p,p'-DDE (un métabolite du DDT) et concentrations circulantes d'hormones thyroïdiennes ont également été étudiées dans des populations de pêcheurs ou capitaines de bateaux. L'hypothèse était que leurs activités et habitudes de consommation amenaient ces professionnels à être plus fortement exposés aux polluants organiques persistants (y compris les pesticides) que la population générale. En 2000, dans une population de près de 200 pêcheurs suédois de la mer baltique, Rylander et coll. ont rapporté une association positive entre le p,p'-DDE et la concentration de TSH (Rylander et coll., 2006). Une augmentation de 100 ng/g lipides de p,p'-DDE

correspondait à une augmentation de 0,03 mU/l (IC 95 % [0,01-0,05]) de TSH, après ajustement sur l'âge. Lorsque l'exposition était catégorisée, l'association semblait être liée au dernier quartile ($\beta = 0,33$; IC 95 % [- 0,08 ; 0,73]), alors qu'elle était plutôt négative pour les quartiles 2 et 3. Chez 56 capitaines de bateaux consommateurs ou non de poissons des Grands Lacs d'Amérique du Nord, Turyk et coll. observaient une corrélation négative, mais non statistiquement significative, entre les taux sériques de DDE et de T4 ($r = - 0,26$; $p = 0,09$) ou de TSH ($r = - 0,25$; $p = 0,09$) après ajustement sur l'âge, l'IMC, et la prise de médicaments antilipémiants, antihypertenseurs, et anti-inflammatoires non stéroïdiens (Turyk et coll., 2006). Herin et coll., dans une étude portant sur 159 travailleurs d'une usine française de médicaments vétérinaires contenant du fipronil, ont constaté une corrélation négative entre la concentration plasmatique en fipronil sulfone et le taux de TSH dans des analyses non ajustées, mais sans effet sur le taux de T4 totale ou libre (la T3 n'a pas été analysée) (Herin et coll., 2011).

Trois études ont porté sur des ouvriers d'usines de pesticides. Une étude au Royaume-Uni a examiné les taux sériques des HT chez des travailleurs dans deux usines de production ou de formulation d'éthylène thiourée (ETU), un métabolite de l'EBDC. Les travailleurs qui formulaient l'ETU ($n = 5$), qui étaient plus exposés à la substance par leur poste, avaient une diminution de T4 totale (et chez 1 sujet seulement, une augmentation de TSH) par rapport à des témoins travaillant dans ces mêmes usines qui ne manipulaient pas la substance. Aucune différence n'était observée chez les producteurs ($n = 8$) par comparaison à leurs témoins appariés (Smith, 1984). Une étude portant sur des travailleurs ($n = 30$) d'une usine de fabrication de pesticides en Inde a comparé les taux sériques des HT dans cette population à ceux de 20 sujets en population générale. Les travailleurs exposés à plusieurs pesticides (endosulfan, quinalphos, chlorpyrifos, monocrotophos, lindane, parathion, phorate, fenvalérate) avaient une baisse de T3 totale et une augmentation non statistiquement significative de TSH (Zaidi et coll., 2000). Une étude menée en Nouvelle-Zélande a montré que des producteurs de pesticides les plus exposés à la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD) par leur poste, avait une baisse de la T4 libre ('t Mannetje et coll., 2018). Enfin, cette même équipe a précédemment montré, dans un cadre professionnel différent, une augmentation de risque non significative des troubles thyroïdiens (sans précision) en lien avec l'exposition au pentachlorophénol chez les employés ($n = 293$) d'une scierie (McLean et coll., 2009).

Cancer de la thyroïde

Dans une étude réalisée sur les épouses des applicateurs de pesticides de l'AHS, Lerro et coll. ont rapporté que, parmi les pesticides organophosphorés étudiés, l'exposition au malathion était associée au risque de cancer de la thyroïde (RR = 2,04 ; IC 95 % [1,14-3,63]) (Lerro et coll., 2015). En Norvège, à partir de registres recensant 236 646 personnes faisant partie de familles d'agriculteurs, les auteurs n'ont pas mis en évidence de lien entre un indicateur d'exposition au mancozèbe et le risque de cancer de la thyroïde (Nordby et coll., 2005). Dans une étude cas-témoins (près de 500 cas et 500 témoins) sur le cancer de la thyroïde aux États-Unis, utilisant une matrice emploi-exposition, aucune association n'était observée en lien avec l'exposition professionnelle aux pesticides (Zeng et coll., 2017). Enfin, aucun lien robuste n'était retrouvé entre cancer (tout site, dont thyroïde) et l'atrazine dans la cohorte AHS qui incluait 57 310 applicateurs de pesticides dont 68 % avaient rapporté une application de l'atrazine (Freeman et coll., 2011), excepté pour le cancer de la thyroïde, pour les sujets dans les 2^e (RR ajusté = 4,55 [1,27-16,24]) et 4^e (RR ajusté = 4,84 [1,31-17,93]) quartiles d'exposition définie comme le nombre de jours pondéré par l'intensité d'exposition, mais le nombre de cas total exposés était faible (n = 29). En Allemagne, dans une usine d'herbicides, Nasterlack et coll. n'ont pas trouvé d'association avec le risque de cancer de la thyroïde parmi 185 sujets d'une étude de cohorte rétrospective, en comparant selon le poste de production de benzothiadiazine et en couplant à un suivi médical additionnel (Nasterlack et coll., 2007).

Exposition aux pesticides en population générale

Les études en population générale s'intéressent essentiellement aux variations des niveaux d'hormones thyroïdiennes (TSH, T4, T3...) et certaines utilisent des biomarqueurs comme indicateur de l'exposition, principalement des organochlorés.

Études en population : effectifs les plus importants

L'association entre le DDE, métabolite du DDT (pesticides organochlorés), et les hormones thyroïdiennes a été étudiée par Turyk et coll. dans deux cycles des enquêtes transversales américaines NHANES (*National Health and Nutrition Examination Survey*), chez des sujets indemnes de pathologie thyroïdienne (Turyk et coll., 2007). Après prise en compte du schéma d'échantillonnage et ajustement sur la concentration sérique en lipides, l'IMC, l'ethnie, l'âge, le logarithme de la concentration sérique de cotinine (un

métabolite de la nicotine utilisé comme mesure d'exposition au tabagisme), le statut ménopausique chez les femmes, et la prise de médicament (furosémide, VIH, bêtabloquants, normo-glycémifiants et autres médicaments), les auteurs ont rapporté une association entre le logarithme népérien de p,p'-DDE sérique, et l'augmentation de T4 chez les femmes de moins de 60 ans ($\beta = 0,33$; IC 95 % [0,04-0,62], $n = 219$), et une diminution de T4 et augmentation de TSH chez les femmes de plus de 60 ans (respectivement, $\beta = -0,47$ (IC 95 % [-0,74 ; -0,20], $n = 131$ et $0,23$; IC 95 % [0,04-0,42], $n = 126$). Les résultats n'étaient cependant pas retrouvés dans les deux cycles d'échantillonnage (1999-2000 ou 2001-2002). Chez les hommes, les auteurs ne montraient pas d'association statistiquement significative. Il est à noter que dans une population de plus de 1 000 adultes thaïlandais, aucune association n'était retrouvée entre les taux sériques de p,p'-DDT ou de p,p'-DDE et les niveaux de TSH ou de T4 (Teeyapant et coll., 2014).

Dans l'étude transversale NHANES également, l'association entre le 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCPy ; métabolite urinaire du chlorpyrifos et du chlorpyrifos-méthyl) ainsi que des pesticides organophosphorés non persistants, et hormones thyroïdiennes a également été étudiée (Fortenberry et coll., 2012). Dans cette étude sur plus de 3 000 sujets de plus de 12 ans, les auteurs ont mis en évidence chez les hommes de moins de 40 ans une relation entre un interquartile de la mesure du biomarqueur et une augmentation des T4 en $\mu\text{g/dl}$ ($\beta = 3,00$; IC 95 % [-0,81 ; 6,82] chez les 18-40 ans, $n = 506$) et une diminution de TSH ($\beta = -10,7$; IC 95 % [-18,7 ; -2,05] aux mêmes âges), après ajustement sur la créatinine urinaire, la cotinine sérique, l'IMC, l'âge, l'ethnie et le revenu. Chez les femmes, on observait une augmentation de TSH avec l'exposition à tous les âges, mais plus fortement chez les plus âgées ($\beta = 21,5$; IC 95 % [3,37 ; 42,8], $n = 218$). Les résultats suggéraient donc des modifications hormonales en fonction de l'exposition, mais ne semblaient pas homogènes selon l'âge et le sexe.

Les concentrations urinaires d'acide 3-phénoxybenzoïque (3-PBA), métabolite commun à plusieurs pyréthrinoides (cyperméthrine, deltaméthrine... mais pas à la cyfluthrine), chez 6 500 adultes coréens étaient 3 fois plus élevées qu'au Canada ou aux États-Unis et étaient associées négativement aux T4 et T3 totales (Hwang et coll., 2019). Cette association était surtout constatée chez les hommes.

En résumé, les études en population générale avec des effectifs importants ne permettaient pas de conclure de manière certaine à une association entre l'exposition à des pesticides et des variations cohérentes des concentrations circulantes en hormones thyroïdiennes.

Autres études chez des populations d'effectifs plus réduits

Dans une population de 123 femmes indiennes, Rathore montrait une diminution de T4 et une augmentation de TSH, en fonction de la concentration de dieldrine (Rathore et coll., 2002). Dans une petite population de sportifs ($n = 66$), le hexachlorobenzène (HCB) était également associé négativement (mais non significativement) avec la concentration en T4 (Bloom et coll., 2003). Chez 16 obèses ayant perdu du poids, les augmentations de concentration en DDT et HCB observées étaient associées négativement au niveau de T3 (Pelletier et coll., 2002), cela était également observé pour plusieurs PCB. Dans une étude transversale slovaque chez 454 adultes, la somme d'organochlorés (PCB, DDE et HCB) était associée sans ajustement à une diminution de TSH (Langer et coll., 2006).

Meeker et coll., chez 341 hommes recrutés dans un centre d'infertilité, retrouvaient une association positive entre p,p'-DDE et hormones thyroïdiennes (T3 totale, T4 libre) et négative avec la TSH (Meeker et coll., 2007), ainsi qu'une association négative entre HCB et T3 totale plus forte après prise en compte du niveau de p,p'-DDE. Dans leur population de plus de 300 hommes recrutés dans un centre d'infertilité ($n = 322$ ici), Meeker et coll. ont également exploré le lien entre les concentrations circulantes en hormones thyroïdiennes et l'exposition à des insecticides non persistants : le TCPy (pour rappel, un métabolite du chlorpyrifos et du chlorpyrifos-méthyl), et le 1-naphthol (un métabolite du carbaryl et du naphthalène). Après ajustement sur l'âge, l'IMC, le tabagisme et la saison, ils ont retrouvé une association positive entre le TCPy et la TSH et une relation négative avec la T4 libre (Meeker et coll., 2006). Dans un sous-groupe de cette même population ($n = 161$), les auteurs ont également montré une diminution de la T3 avec une augmentation des concentrations urinaires de *cis*-DCCA⁶⁶, métabolite de pyréthrinoides (Meeker et coll., 2009).

Dans un article utilisant les données de l'étude NHANES et qui étudie globalement le métabolisme glucidique et lipidique, chez 727 sujets sains, une association positive était retrouvée entre le 2,4-D et les niveaux de TSH, plus particulièrement chez les sujets avec des niveaux de T4 « bas » (en dessous de la médiane de 8,5 µg/dl), considérés comme population sensible (Schreinemachers, 2010).

Enfin, concernant l'exposition aux pesticides et le risque de cancer de la thyroïde en population générale, une étude cas-témoins nichée dans une cohorte norvégienne (Lerro et coll., 2018a) a rapporté une association négative en lien avec le DDT et une association positive pour le chlordane chez

les sujets les plus jeunes (métabolites du chlordane, OR pour 10 ng/g de lipides = 1,78 ; IC 95 % [1,09-2,93]).

Études chez les femmes enceintes et les nouveau-nés

L'étude la plus récente portant sur une population de femmes enceintes n'a trouvé aucune relation entre l'exposition aux pesticides organophosphorés et les concentrations en hormones thyroïdiennes chez la mère (n = 715) et dans le sang de cordon (n = 482) dans la cohorte prospective GENERATION R (Mulder et coll., 2019). Les concentrations de six métabolites urinaires de DAP ont été mesurées à 3 reprises pendant la grossesse (< 18, 18-25, et > 25 semaines de gestation) et étaient 2 à 3 fois plus importantes que dans la plupart des autres cohortes de naissance au Canada, aux États-Unis, et en Europe. La TSH et la T4 libre ont été mesurées dans le sang maternel et de cordon. La T4 totale et les anticorps TPO ont également été mesurés chez la mère. Aucune information n'était disponible sur le moment du recueil urinaire (premières urines ou échantillons aléatoires recueillis entre 8 h et 20 h), alors que les concentrations de substances chimiques, le volume d'urine, et le taux d'excrétion varient en fonction notamment de la prise de boissons, du moment de la journée (Boeniger et coll., 1993 ; Cornelis et coll., 1996 ; Barr et coll., 2005). Si, comme le disent les auteurs, cela n'est pas susceptible d'entraîner un biais de confusion, puisque les T4 libres n'ont pas de rythme circadien et la TSH varie surtout entre le jour et la nuit (Ehrenkranz et coll., 2015), cela peut en revanche entraîner un biais de classement non différentiel susceptible de réduire les associations vers une absence d'association, et cela n'est pas commenté. À cela s'ajoute que les mesures urinaires de polluants peu persistants ne reflètent pas forcément de manière optimale l'exposition, les coefficients de corrélation intra-classe étant modestes. L'utilisation d'un nombre plus important d'échantillons par femme pourrait permettre de pallier cette limite. Enfin, les mêmes auteurs ont montré précédemment que l'exposition à des pesticides organophosphorés pendant la grossesse survient probablement par voie alimentaire, avec l'ingestion de fruits essentiellement (van den Dries et coll., 2018). Un repas incluant beaucoup de fruits et légumes, les noix et poisson n'est donc pas seulement une source d'éléments sains comme le sélénium, l'iode et le fer, mais peut aussi être une source de pesticides organophosphorés. Ces micronutriments sont importants pour la fonction thyroïdienne et pourraient contrecarrer les effets de l'exposition aux pesticides organophosphorés et atténuer des associations avec ces substances dans des études épidémiologiques. Cependant, dans l'étude ci-dessus (Mulder et coll., 2019), les résultats n'étaient pas modifiés après ajustement sur la consommation de fruits comme proxy d'un repas sain.

Chez 157 femmes enceintes espagnoles (Lopez-Espinosa et coll., 2009), celles qui avaient des concentrations sériques de p,p'-DDE plus élevées étaient plus souvent celles qui avaient des niveaux élevés de TSH au-dessus de 2,5 mIU/l ($OR = 2,53$; IC 95 % [1,36-4,73] $p = 0,004$), et des niveaux plus faibles de T4 libre ($\beta = -0,03$; IC 95 % [-0,05-0,00] $p = 0,05$) après ajustement sur l'âge maternel et les semaines de gestation au moment du prélèvement, les lipides totaux et d'autres variables si elles modifiaient la relation de plus de 10 % (tabagisme et consommation de caféine pour la TSH et pays de naissance, statut professionnel, cohabitation, consommation de caféine pour la T4 libre). Chez 334 femmes enceintes dans la cohorte prospective CHAMACOS (*Center for the Health Assessment of Mothers and Children of Salinas*) les concentrations de HCB (mais pas de DDT ou de DDE) étaient associées négativement avec les mesures de T4 totale ($\beta = -0,51$; IC 95 % [-0,97 ; -0,04]) et de T4 libre ($\beta = -0,08$; IC 95 % [-0,15 ; -0,01]) après prise en compte de l'âge et de l'IMC maternel préconceptionnel (Chevrier et coll., 2008). Une relation négative entre trois pesticides organochlorés (p,p'-DDE, *cis*-nonachlore, et HCB) et T3 dans le sang maternel a également été retrouvée chez 150 femmes enceintes en bonne santé au Québec (Takser et coll., 2005). Aucune association n'a été retrouvée avec les hormones mesurées dans le sang de cordon. En revanche, deux autres études retrouvaient des associations entre l'exposition *in utero* et les paramètres thyroïdiens mesurés. Chez 115 nouveau-nés chinois (Luo et coll., 2017), certains pesticides organochlorés tendaient à être associés négativement avec les T4 (HCH, DDE, méthoxychlore) et à une augmentation des niveaux de TSH (aldrine, dieldrine, DDT) après ajustement sur âge maternel, niveau d'éducation, revenu du foyer, parité, et sexe du nouveau-né. L'association la plus nette étant la relation entre TSH et aldrine. Dans une population d'un peu moins de 100 nouveau-nés coréens (effectifs variables selon les associations), les auteurs rapportaient une association négative entre la T4 totale et l'HCB, une tendance négative entre T3 et p,p'-DDE et une relation positive entre TSH et p,p'-DDE (dans le sang 2 jours après la naissance) et la somme des chlordanes, dans le sang de cordon (Kim et coll., 2015).

Dans une étude transversale plus récente où les niveaux d'expositions étaient élevés, la somme de biomarqueurs urinaires de pesticides organophosphorés était associée chez 325 femmes enceintes à une augmentation des T4 libres et à une diminution de la TSH après ajustement sur le revenu du foyer et le tabagisme pendant la grossesse et prise en compte de la créatinine urinaire (Wang et coll., 2017b). L'exposition aux pyréthrinoides (par le métabolite 3-PBA) a été mesurée au 1^{er} trimestre de grossesse dans les urines d'un échantillon de femmes enceintes japonaises ($n = 231$) ; aucune association n'était retrouvée avec les concentrations de TSH et T4 chez les mères (Zhang et coll., 2013a) comme chez les nouveau-nés (Zhang et coll., 2014a).

Dans une étude en Chine sur 247 couples mères-enfants, sur 11 pesticides organochlorés, 3 étaient détectés dans plus de 50 % des cas à la fois chez la mère et l'enfant, et une association était rapportée entre la concentration en HCB dans le sang de cordon et une diminution de la TSH (Li et coll., 2014). Dans une autre étude chinoise, portant sur 374 femmes enceintes habitant au Shandong, le 3-PBA (un métabolite des pyréthrinoides) a été détecté dans la majorité des échantillons d'urines testés (90,4 %) à une concentration médiane de 1,14 mg/g de créatinine (Hu et coll., 2019). Une association négative entre ce biomarqueur et les niveaux sériques de T3 libres a été mise en évidence, avec une relation effet-dose, alors qu'aucune association n'a été constatée avec les autres hormones thyroïdiennes. Dans une étude coréenne portant sur 59 paires mères-nouveau-nés, les niveaux de fipronil sulfone dans le sang de cordon à la naissance (qui représentent l'exposition intra-utérine) étaient inversement associés aux niveaux de T3 totale et libre, y compris après ajustement sur un grand nombre de facteurs de confusion potentiels (Kim et coll., 2019). Les niveaux de T4 totale et libre et de TSH dans le sang de cordon des nouveau-nés n'étaient pas corrélés avec le fipronil sulfone. Chez 220 nouveau-nés garçons espagnols (Freire et coll., 2011), sur 17 pesticides organochlorés mesurés dans le placenta, il y avait également une tendance à une association négative entre HCB et TSH dans le sang de cordon, et une association négative également avec l'endosulfan, tandis que l'endrine et dans une moindre mesure le p,p'-DDE étaient associés plutôt positivement à la TSH. Dans le sang de cordon de 198 nouveau-nés belges, on retrouvait des concentrations réduites de T3 et T4 libres en fonction du niveau de substances organochlorés (dont HCB, p,p'-DDE) chez la mère (Maervoet et coll., 2007). Plusieurs pesticides organochlorés (p,p'-DDT, p,p'-DDE, β -HCH et HCB) étaient associés à une diminution des concentrations d'hormones thyroïdiennes (T3) également chez des enfants de 4 ans (n = 259) en Espagne (Alvarez-Pedrerol et coll., 2008). En revanche, l'association était retrouvée positive avec de nombreux organochlorés (y compris β -HCH, HCB, p,p'-DDE, chlordane, dieldrine) chez des enfants de 0-15 ans (n = 193) au Brésil (Freire et coll., 2012), selon les auteurs les expositions élevées pourraient expliquer ces résultats en contradiction avec la littérature. Les niveaux de T4 libres étaient associés positivement également avec p,p'-DDD, endosulfan I, et dieldrine. Dans une petite étude en Thaïlande de 39 couples mères-enfants, le niveau de T4 dans le sang de cordon était associé négativement au DDT et à ses métabolites p,p'-DDE, p,p'-DDT et o,p'-DDE (Asawasinsopon et coll., 2006). Et toujours chez des couples mères-enfants, à nouveau dans une petite population de 34 cas d'hypothyroïdie congénitale et 102 témoins, au Japon, les pesticides organochlorés contenus dans le lait (DDT, HCH, chlordane, HCB et leurs

métabolites) ont été mesurés comme marqueurs d'exposition prénatale (Nagayama et coll., 2007). Des associations positives en lien avec le risque de crétinisme étaient montrées avec le DDT et l'HCB, après ajustement sur la parité et l'âge. Chez 111 jeunes enfants en Guadeloupe, le chlordécone, mesuré dans le sang de cordon, était associé à une augmentation de TSH à 3 mois uniquement chez les garçons et sans modification de la T3 libre ou de la T4 libre. Lorsque le chlordécone était mesuré dans le lait maternel, une association positive avec la TSH à 3 mois a été observée uniquement chez les filles et accompagnée d'une diminution de T4 libre. Dans tous les cas, les concentrations circulantes en hormones thyroïdiennes se trouvaient dans le rang des valeurs attendues à l'âge de 3 mois. De plus, ces variations hormonales n'expliquaient pas les moins bons scores estimant la motricité fine à 18 mois d'âge en lien avec l'exposition prénatale au chlordécone (Cordier et coll., 2015).

Chez des nouveau-nés participant à une étude en Afrique du Sud, prendre en compte le sexe et la pauvreté modifiaient les associations entre les concentrations maternelles en DDT/DDE ou métabolites de pyréthrinoides et les niveaux d'hormones thyroïdiennes (Chevrier et coll., 2019). Tous les métabolites de pyréthrinoides étaient positivement associés à la TSH ; le *trans*-DCCA et le 3-PBA étaient les plus fortement associés avec un changement de 12,3 % (IC 95 % [3,0-22,3]) et 14,0 % (IC 95 % [0,50-30,2]) pour chaque augmentation par 10 des concentrations en biomarqueur. Ces associations étaient plus élevées chez les enfants de foyers en dessous du seuil de pauvreté. Les DDT et DDE étaient associés à des niveaux plus faibles de T4 totale seulement chez les garçons ($\beta = -0,27 \mu\text{g/dl}$ pour une augmentation par 10 de l'exposition ; IC 95 % [-0,47 ; -0,04]).

Exposition aux pesticides des populations riveraines des zones agricoles ou industrielles

Pathologies de la thyroïde non cancéreuses

Requena et coll. ont examiné si l'exposition environnementale continue aux pesticides chez des personnes habitant à proximité de zones d'agriculture intensive en Andalousie (Espagne) était associée à une plus grande prévalence et un risque plus important de pathologies thyroïdiennes sur 18 ans de suivi (Requena et coll., 2019). Au total, 80 132 individus ont été diagnostiqués avec des désordres thyroïdiens divers (goitre, hypothyroïdie, thyrotoxicose et thyroïdite). Les auteurs ont trouvé une augmentation de 49 % du risque d'hypothyroïdie dans les zones où les pesticides étaient davantage utilisés après ajustement sur l'âge et le sexe. Cette étude a mis en évidence

une augmentation modeste du risque de goitre (11 %) chez les sujets vivant dans les régions avec une utilisation importante de pesticides. Une augmentation de 20 % du risque de thyroïdite et de 41 % du risque de thyrotoxicose a également été trouvée. La quantité totale de pesticides utilisés et la surface totale des serres étaient supérieures dans la région avec les utilisations plus importantes de pesticides. Donc, en dehors des applicateurs et des agriculteurs, la population vivant proche des régions d'agriculture intensive est considérée comme ayant des expositions plus élevées de pesticides que d'autres populations. Cependant, cette étude pratiquement écologique dans son approche ne permet pas de tirer de conclusion forte.

Freire et coll. ont mené une étude portant sur les habitants d'un village au Brésil, à proximité d'un ancien site d'une usine de production de pesticides, où les sols, les eaux et les produits alimentaires locaux sont fortement contaminés par des pesticides organochlorés. Les auteurs ont montré par une approche transversale chez environ 600 hommes et femmes, que les concentrations de T3 totale étaient associées positivement avec la concentration sérique d'endosulfan II chez les hommes, alors que chez les femmes des associations négatives ont été retrouvées pour l'endosulfan II, ainsi que pour l' α -chlordan, le DDT, et le méthoxychlore (Freire et coll., 2013). Une diminution des T4 libres était observée avec le β -HCH et le DDT chez les hommes et une augmentation des T4 libres avec le HCB, l'heptachlore et le DDT chez les femmes. Les niveaux de TSH étaient associés positivement à ceux de β -HCH chez les hommes.

Dans une étude portant sur une population rurale habitant à proximité d'une usine de production de composés organochlorés et fortement exposée au HCB, Sala et coll. ont montré une association négative entre les concentrations sériques de HCB et T4 totale après ajustement sur les facteurs de confusion (diminution de 0,32 μ g/dl pour chaque unité, ln ng/ml, d'augmentation de HCB, n = 192). Les associations n'étaient pas modifiées après ajustement sur les lipides (Sala et coll., 2001).

Dans une population de 232 jeunes Américains habitant à proximité de plusieurs fonderies, après ajustement sur les variables sociodémographiques et autres polluants, la concentration sérique de HCB était associée à une diminution de T4 (Schell et coll., 2008). La même équipe a montré ensuite une augmentation des anticorps anti-TPO, uniquement chez les jeunes qui avaient été allaités (n = 47) en relation avec une exposition avec DDT (évalués par la mesure du DDE), HCB et mirex (Schell et coll., 2009).

Une petite étude menée en Inde a mesuré les hormones thyroïdiennes et les biomarqueurs d'exposition aux pesticides chez une centaine de sujets habitant

dans une zone rurale avec une forte utilisation de pesticides (Srivastava et coll., 1995). Au total, 24 % des sujets avaient des niveaux bas de thyroxine, et ces niveaux étaient associés à des faibles niveaux de résidus de pesticides organochlorés.

- ***Études chez les femmes enceintes ou enfants***

Chez 430 femmes enceintes habitant dans une région de floriculture au Mexique, la mesure de l'exposition au p,p'-DDE lors de la première moitié de la grossesse était associée positivement au niveau de T3 totale (Hernandez-Mariano et coll., 2017). Finalement, dans une étude transversale portant sur 66 enfants indonésiens habitant en zone agricole (Suhartono et coll., 2018), la TSH était plus élevée et on constatait davantage d'hypothyroïdie (définie par les auteurs comme un taux de TSH > 4,5 µIU/l) chez les plus exposés (par exemple, ratio de la prévalence = 2,4 ; IC 95 % [1,4-4,3] avec la détection de pesticides organophosphorés).

Pathologies cancéreuses

Dans une population importante de 6 310 femmes résidentes de ferme, un excès de cancer de la thyroïde était retrouvé par rapport à des femmes qui habitaient en milieu rural, mais cet excès n'était pas statistiquement significatif malgré la taille de l'échantillon, en raison du faible nombre de cas (n = 9) (Wang et coll., 2002).

Conclusion – données épidémiologiques

Sur plus de 70 études épidémiologiques, une dizaine portaient sur des riverains de zones agricoles ou industrielles et l'autre partie des études portaient sur des populations en milieu professionnel, et en population générale en proportion équivalente. La majorité des études étaient transversales, avec uniquement 15 études de cohorte (tableau 17.I, voir en fin de ce chapitre) et 3 études cas-témoins dont une nichée dans une cohorte.

La plupart des études retrouvaient une association entre les mesures d'exposition et des variations de marqueurs biologiques de la thyroïde, mais avec des directions qui n'étaient pas toujours concordantes. De nombreuses études ont montré une association entre l'exposition aux pesticides organochlorés et une diminution de la concentration sérique des hormones thyroïdiennes (T4 et T3) et/ou une augmentation des niveaux de TSH, notamment chez les travailleurs exposés professionnellement. Selon Piccoli et coll., les données actuelles suggéreraient que les modifications des hormones thyroïdiennes

induites par les pesticides pourraient être permanentes ou réversibles en fonction de l'intensité et la durée de l'exposition, tout en précisant que c'est une hypothèse qui demande à être confirmée (Piccoli et coll., 2016).

À noter qu'il est souvent difficile pour les pesticides organochlorés de faire la part des expositions car les concentrations sériques (principale mesure d'exposition) sont associées notamment aux PCB et aux dioxines dont ils partagent la propriété de lipophilie et s'accumulent donc dans les graisses au cours du temps de la même manière. Également, comme les DAP sont aussi présents dans les aliments et l'environnement, leur présence peut être attribuée à tort à une exposition aux pesticides organophosphorés (parent actif) alors que cela reflète plutôt une exposition aux composés DAP (Krieger et coll., 2012).

Il y a une augmentation récente du nombre d'études montrant qu'un nombre croissant de substances chimiques, à des concentrations environnementales, pourraient perturber les fonctions thyroïdiennes. L'association entre l'exposition aux pesticides organochlorés et le risque d'hypothyroïdie semble être retrouvée dans beaucoup d'études, en particulier en milieu professionnel, mais la plupart reposent sur les données de l'AHS. Pour les autres pesticides, l'association a été moins étudiée et les résultats sont moins concordants. Comme ont souligné les auteurs d'une revue récente (Campos et Freire, 2016), étant donné l'utilisation généralisée des pesticides, les recherches à venir doivent se focaliser sur les effets des substances actives actuellement utilisées, et reposer sur des études de cohorte qui évaluent l'exposition en combinant questionnaire et mesure de biomarqueurs.

Finalement, les données sont plus rares pour les autres pathologies de la thyroïde, notamment pour les cancers. On ne retrouvait pas d'association claire avec le risque de cancer de la thyroïde, avec des études montrant soit une augmentation de risque, une diminution de risque ou une absence d'association.

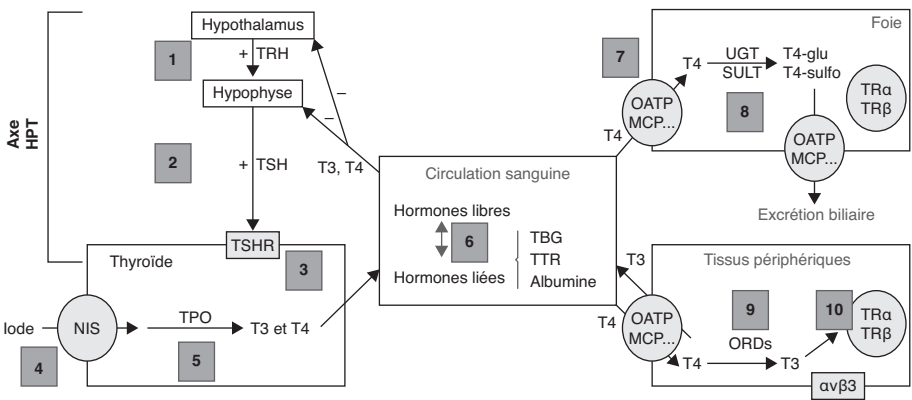
Thyroïde et pesticides : aspects mécanistiques

La glande thyroïde a longtemps été ignorée en tant que cible potentielle des perturbateurs endocriniens au profit d'études orientées très majoritairement vers la fonction de reproduction. Cela peut s'expliquer par plusieurs raisons, notamment par le fait que les HT ont des effets biologiques multiples, tant au niveau des organes qu'au niveau moléculaire (Brouwer et coll., 1998 ; Miller et coll., 2009 ; Tata, 2013). Ces processus sont pour la plupart aussi soumis à d'autres contrôles, et les régulations croisées par exemple entre les

axes hypothalamo-hypophyso-gonadique (*Hypothalamic-Pituitary-Gonad* ; HPG) et hypothalamo-hypophyso-thyroïdien (*Hypothalamic-Pituitary-Thyroid* ; HPT) compliquent encore davantage ces questions (figure 17.4). Les perturbateurs des hormones thyroïdiennes (*Thyroid Hormone Disrupting Compounds* ; THDC) sont susceptibles d'interagir avec un ou plusieurs acteurs impliqués dans la fonction thyroïdienne mais aussi avec d'autres systèmes de régulation, par exemple via la modulation d'expression des UGT par les ligands du récepteur aryl-hydrocarbone (AhR).

En rapport avec les outils et modèles disponibles pour tester une dérégulation de la fonction thyroïdienne, les cibles le plus souvent testées sont les suivantes :

- inhibition du transport de l'iode > diminution taux sérique T3 et T4 (niveau 4) ;
- inhibition de la TPO > diminution taux sérique T3 et T4 (niveau 5) ;
- altération de la fixation aux protéines de transport > relargage de T4 et T3 (niveau 6) ;
- augmentation du transport cellulaire > élimination accrue de T3 et T4 (niveau 7) ;
- augmentation du métabolisme de phase 2 hépatique > élimination accrue de T3 et T4 (niveau 8) ;
- inhibition des sulfotransférases > diminution de sulfonylation des HT (niveau 8) ;
- inhibition des désiodases > diminution taux sérique T3 (niveau 9) ;
- perturbation de l'interaction de T3 avec ses récepteurs (niveau 10).



704 **Figure 17.4 : Régulation thyroïdienne et sites de perturbation**

Quels essais et modèles pour tester les effets perturbateurs de la fonction thyroïdienne ?

Un récent rapport de l'OCDE recense les essais *in vitro* ou *ex vivo* pour le criblage des composés pouvant avoir des effets perturbateurs thyroïdiens (OECD, 2017). Des tests ont été développés pour évaluer l'action des THDC soit *in vivo*, majoritairement chez le rat, soit *in vitro*. Parmi les nombreux essais réglementaires, commercialisés ou développés dans les laboratoires de recherche, le ciblage est majoritairement orienté vers la synthèse hormonale via une interaction avec la TPO ou le NIS, et leurs interactions avec les différents récepteurs, transporteurs ou enzymes périphériques de conversion de l'axe HPT. Néanmoins, cette revue souligne l'impossibilité de réaliser une batterie de tests qui permettent de cribler tous les mécanismes de perturbation de l'axe HPT. Il ressort également, de ce travail d'inventaire, qu'il n'existe pas à l'heure actuelle de test réalisable en routine intégrant le criblage de l'ensemble de ces mécanismes de toxicité.

La majeure partie du criblage de la perturbation de la fonction thyroïdienne est réalisée grâce à l'analyse de paramètres qui sont venus se greffer aux tests de criblage de la perturbation des hormones sexuelles.

Si l'analyse détaillée de la batterie de tests existants (voir addenda en fin de chapitre) illustre l'absence d'un test unique qui intégrerait les différents mécanismes de toxicité directe vis-à-vis de la glande thyroïde, un criblage à moyen/haut débit est proposé par différentes agences. Ce criblage pourrait reposer sur la mesure de l'activité transcriptionnelle de gènes régulés par la fonction thyroïdienne, par exemple sur la lignée cellulaire PCCl3, dans le but de détecter des événements initiateurs de toxicité. Pour les essais *in vivo*, il est urgent et essentiel de poursuivre et développer des tests tirant profit des étapes de métamorphose et organogenèse chez les batraciens ou les poissons, et pour des essais à court terme, de construire des modèles de génotype sauvage ou muté avec des gènes rapporteurs (Morvan-Dubois et coll., 2008 ; Morvan-Dubois et coll., 2013 ; Spirhanzlova et coll., 2019).

Données des études toxicologiques

Des études épidémiologiques suggèrent un lien entre l'exposition professionnelle et environnementale à certaines substances actives ou familles de pesticides et une augmentation du risque de pathologies thyroïdiennes. Les résultats d'études expérimentales peuvent renforcer la plausibilité d'une

association, contribuer à identifier les substances actives impliquées et éclairer les mécanismes potentiellement à l'origine de l'effet.

En raison d'un mode d'action en amont de la fonction de la thyroïde et de la production des HT, d'interconnexion de régulations endocriniennes, de l'importance de la dose, de la fenêtre et du temps d'exposition sur les modèles aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*, la littérature scientifique est contradictoire sur un effet pathologique avéré et spécifique d'une dérégulation de la fonction thyroïdienne suite à l'exposition de pesticides. Plusieurs rapports ont été publiés ces dernières années par l'Efsa analysant les données issues des essais toxicologiques sur différentes substances actives de pesticides en vue de caractériser leurs effets sur la thyroïde. En 2013, l'agence rapportait que parmi 287 pesticides autorisés jusqu'au 1^{er} janvier 2012, 101 d'entre eux montraient une activité potentielle ou avérée de perturbation de la fonction thyroïdienne, bien que la très grande majorité de ces pesticides aient été interdits à la vente (Efsa PPR, 2013). Un rapport subséquent a identifié 57 substances actives ayant au moins un effet sur le système thyroïdien, dont 53 composés affectant les cellules folliculaires ou les niveaux sériques d'hormones (RIVM, ICPS, ANSES, 2016). Enfin, dans un rapport récent, 128 pesticides étaient identifiés comme pouvant être responsables d'hypothyroïdie (insuffisance de production d'HT), la pathologie thyroïdienne la plus fréquemment associée à l'exposition aux pesticides (Efsa, 2019).

Une analyse des études mécanistiques sur quatre familles de pesticides (organophosphorés, organochlorés, carbamates, pyréthrinoïdes) ou substances actives (glyphosate, fipronil) sélectionnées sur la base d'évidences épidémiologiques même faibles est présentée. D'autres familles chimiques (néonicotinoïdes, inhibiteurs de la succinate déshydrogénase) ont été également analysées en se fondant sur leur effet de perturbation thyroïdienne. Un classement par cible n'a pas été retenu car de nombreux THDC interagissent sur plusieurs cibles. Notons que des formulations peuvent être utilisées avec des résultats différents de ceux des substances actives, et que la question des mélanges sera simplement abordée et non traitée, car les cas concrets sont encore en nombre limité.

Organochlorés

In vivo

Bien qu'interdits au niveau européen, les pesticides organochlorés sont très persistants dans l'environnement et ils ont la capacité de s'accumuler dans les tissus adipeux des organismes vivants. Les études épidémiologiques ont montré des associations entre plusieurs substances actives organochlorées et

une diminution du taux des HT ou d'augmentation de TSH (les signes d'une hypothyroïdie).

Sur les modèles animaux, les organochlorés induisent une altération du niveau des hormones thyroïdiennes via différents mécanismes. Ainsi, une exposition de rats au DDT dans l'eau de boisson en chronique et à faible dose produit une augmentation de T4, T3 ainsi qu'une baisse du taux de TSH à 6 semaines de traitement, puis il est observé à 10 semaines une baisse des taux de T4 et T3 (Yaglova et Yaglov, 2014). Des rats exposés pendant 1, 6 ou 10 semaines à une faible dose de DDT (20 µg/l dans l'eau de boisson) présentent des modifications cytologiques de l'épithélium folliculaire de la thyroïde et un transport vésiculaire altéré au niveau apical (Yaglova et Yaglov, 2017). De plus, le fonctionnement de l'appareil de Golgi et la sécrétion de HT est perturbé. Son métabolite, le DDE, provoque des résultats en partie similaires : il induit chez les rats mâles exposés pendant 5 ou 10 jours par voie intra-péritonéale une diminution de T4L, T3L, TSH et de TTR ainsi qu'une augmentation des ARNm des enzymes hépatiques UGT impliqués dans l'élimination des HT et de ceux des TR au niveau hypothalamique (potentiellement responsables de rétrocontrôles) (Liu et coll., 2011 ; Liu et coll., 2014). Une diminution de l'expression de l'ARNm codant la désiodase D2 est constatée alors que l'expression de D1 et D3 n'est pas altérée (Liu et coll., 2014).

Des jeunes poissons (*S. salar*) exposés pendant 5 jours au DDE à la dose de 10 µg/l montrent une diminution d'expression au niveau du SNC, des gènes codant à la fois la TSHβ et le TRα, une induction hépatique et rénale de TSHβ et D2 et une induction de TRβ dans le foie (Mortensen et Arukwe, 2006). De plus, le DDE induit l'expression de CYP3A et PXR dans le foie. Enfin, le DDE est positif dès 10⁻¹² M et présente une relation dose-réponse non monotone dans le test *Xenopus Embryonic Thyroid Assay* (XETA ; voir addenda en fin de chapitre) après 3 jours d'exposition, une concentration retrouvée dans le liquide amniotique (Fini et coll., 2017).

D'autres organochlorés ont fait l'objet d'études approfondies : chez le rat, une exposition au HCB induit une diminution de T4 mais un maintien du taux de T3L en rapport avec une augmentation de 5'-désiodase de type I dans la thyroïde et le foie. Il est observé une augmentation de UGT-T4 sans changement de l'UGT-T3 expliquant le maintien du taux de T3L (Alvarez et coll., 2005). Le HCB peut aussi se lier aux transporteurs sériques et entrer en compétition avec T4 (van Raaij et coll., 1993). Enfin, le HCB est positif dès 10⁻⁹ M dans l'essai XETA après 3 jours d'exposition (Fini et coll., 2017).

Chez le poisson zèbre (*D. rerio*), l'exposition des larves au pentachlorophénol (PCP) induit une augmentation d'expression (dès 3 µg/l) de *Tshβ*, *Nis*, *Tg* et *Dio1*, *Dio2*, *Trα*, *Trβ* (dès 1 µg/l). Le taux de T4 est diminué alors que celui de T3 est augmenté (à 10 µg/l) d'où une augmentation du rapport T3L/T4L (Guo et Zhou, 2013). L'induction de *Nis* et *Tg* peut être un mécanisme de compensation de la diminution de T4. La diminution de T4 suite à une augmentation de T3 est fréquemment observée chez les poissons exposés aux THDC avec pour conséquence une augmentation d'expression de gènes pour contrer la diminution de T4 (Wang et coll., 2013). Ainsi, le niveau de T4 joue un rôle critique majeur suite à une augmentation de T3. L'exposition au PCP pendant 4 jours à 0,1, 1, 10, 100, 500, 1 000 µg/l régule positivement l'expression des gènes de l'axe de régulation HPT, tels que les *TRα* et *β*, *Nis*, *Dio1* et *Dio2* illustrant la perturbation de la régulation thyroïdienne (Guo et Zhou, 2013 ; Cheng et coll., 2015). L'exposition pendant 70 jours de *D. rerio* au PCP induit une diminution d'expression de *tshβ* et *trβ* dans le cerveau ainsi qu'une augmentation d'expression hépatique de *ugt1a* et une diminution de *dio1*. Un dimorphisme sexuel est observé pour les niveaux de *dio2*, *sult1* et *ttr* (Yu et coll., 2014). Enfin, cette exposition à doses environnementales est associée à des perturbations d'expression de gènes impliqués dans la régulation thyroïdienne, une altération du taux des HT et des malformations dans la descendance des mères exposées correspondant à une perturbation du développement (Yu et coll., 2014).

Chez le poisson zèbre, le chlorothalonil (apparenté aux organochlorés) ainsi que son métabolite, le 4-hydroxychlorothalonil, exercent une activité agoniste du récepteur *ERα* à des doses d'exposition environnementales. En revanche, seul le 4-hydroxychlorothalonil présente à la fois une activité agoniste à faible concentration (10^{-9} M) et faiblement antagoniste à forte concentration (10^{-5} M) en présence de 10^{-8} M de T3 vis-à-vis du récepteur *TRβ* (Zhang et coll., 2016). Ce résultat illustre encore une fois le fait que les métabolites ne doivent pas être oubliés dans une recherche de toxicité.

Des poissons (*O. niloticus*) ont été exposés via l'alimentation à l'endosulfan à faible dose (0,1 µg/g) ou forte dose (0,5 µg/g) pendant 21 ou 35 jours (Coimbra et coll., 2005). Alors que le taux de T3 est stable, à faible dose d'exposition (21 et 35 jours), l'endosulfan induit une baisse du taux de T4 et rT3. Pour étudier le mécanisme permettant le maintien du taux de T3, l'activité des désiodases est déterminée dans différents organes. L'activité hépatique de D1 est diminuée alors que celle de D3 est augmentée. L'activité hépatique de D2 est stable ainsi que celle de D1 augmentée au niveau rénal. La stabilité du taux de T3 est probablement en rapport avec le rôle majeur joué par la désiodase hépatique D2 et la compensation par l'activité de D1 rénale. Ce résultat

illustre le fait que le simple dosage des HT pourrait ne pas être suffisant pour évaluer une perturbation de l'axe HPT (Coimbra et coll., 2005).

Des poissons médaka (*O. latipes*) sont exposés au métolachlore à 1, 10, 100 et 1 000 µg/l pendant 14 jours avec la conduite d'une analyse en transcriptomique (Jin et coll., 2011). Le métolachlore dès 10 µg/l chez les juvéniles induit l'expression de *Trh*, *Dio2*, *Thrα*, et *Thrβ* chez les jeunes poissons et chez les femelles adultes (100 µg/l) illustrant l'impact sur la régulation de l'axe HPT et aussi un effet dimorphique sexuel.

Des carpes (*G. rarus*) à l'état larvaire et adulte sont exposées à l'acétochlore à 20, 200 et 2 000 ng/l pendant 21 jours dans le cadre d'une analyse transcriptomique (Li et coll., 2009). L'expression de *trα* est induite chez les larves à faible dose (20 µg/l) alors que celle de *d1* est stable et celles de *d2*, *nis*, et *me* (enzyme malique ; impliquée dans le métabolisme des lipides et régulée par les HT) sont diminuées. À plus forte dose, tous les gènes sont réprimés indiquant que le développement peut être affecté en condition environnementale. Chez les adultes, l'expression des gènes étudiés est diminuée dans le cerveau des poissons exposés et plus particulièrement chez les femelles. Ces résultats suggèrent que l'acétochlore perturbe le développement de SNC de façon plus marquée chez les femelles.

In vitro

Peu d'études ont été menées *in vitro* en comparaison des expérimentations animales ; elles illustrent toutefois des mécanismes susceptibles d'impacter l'axe HPT en amont de la sécrétion des HT. Ainsi, le DDT testé sur des cellules CHO exprimant le récepteur humain de la TSH provoque une inhibition dose dépendante de l'activité adénylate cyclase stimulée par la TSH (Santini et coll., 2003). Le DDT exerce en outre dans ces cellules CHO, une inhibition de la mobilisation du TSHR (De Gregorio et coll., 2011). Le DDT peut aussi intervenir dans la formation de vésicules extracellulaires en excluant le récepteur de la TSH des radeaux lipidiques empêchant son activation et son internalisation. Ainsi la formation de vésicules extracellulaires contenant le récepteur de la TSH induite par le DDT pourrait être impliquée dans le développement d'une hyperthyroïdie auto-immune dans la maladie de Basedow (Rossi et coll., 2018).

Le PCP testé sur des cellules CHO transgéniques présente une activité antagoniste sur le TRβ à la concentration très élevée de 10^{-5} M (Yu et coll., 2019). Ce résultat est en accord avec la diminution d'activité transcriptionnelle de *Dio1*, un gène dépendant de la régulation de T3 dans la lignée GH3 (cellules hypothalamiques de rat) (Guo et Zhou, 2013).

Un mécanisme indirect inhibiteur de la croissance des thyrocytes est illustré par une augmentation de la production de TGF- β 1 suite à l'exposition des cellules FRTL-5 à HCB (Chiappini et coll., 2014). TGF- β 1 est un régulateur négatif de la croissance des cellules épithéliales thyroïdiennes. Les niveaux de p27 cytosolique et nucléaire (un inhibiteur de CDK bloquant le cycle cellulaire) étaient augmentés dès 5 μ M de HCB. Le HCB (5 μ M) induit une diminution concomitante du taux de la protéine cycline D1 dans le noyau. De plus la signalisation du TGF- β 1-Smad est impliquée dans les altérations des taux de protéines p27 et cycline D1 induites par HCB.

En résumé, les organochlorés dans leur ensemble semblent avoir un impact *in vivo* sur la diminution des HT avec constamment une diminution de la T4 (les résultats obtenus sur la T3 libre sont contradictoires) ; une augmentation des UGT hépatiques pourrait être responsable de cet effet (observé avec le DDT et le HCB). Toutefois, les études *in vitro* montrent que des mécanismes impliquant d'autres acteurs de l'axe HPT, comme le fonctionnement du récepteur à la TSH sont possibles. Pour lever les contradictions (par exemple sur la T3), des études mesurant les niveaux d'organochlorés chez des personnes souffrant d'hypothyroïdie ou hyperthyroïdie sont nécessaires.

Organophosphorés

In vivo

Plusieurs organophosphorés parmi les plus utilisés ont été testés sur différents modèles animaux. Ainsi, le malathion semble négativement impacter les niveaux de HT sur différents systèmes d'exposition et de modèles : une exposition de rats pendant 21 jours à une dose non toxique de malathion (0,06 mg/j) induit une diminution des niveaux sériques de T3 et T4, ainsi qu'une augmentation de TSH (Akhtar et coll., 1996). Des larves de soles (*S. senegalensis*) sont exposées du 4^e jour post-éclosion jusqu'à un mois au malathion à concentrations retrouvées dans l'environnement (1,56, 3,12, et 6,25 μ g/l) (Ortiz-Delgado et coll., 2019). Il est observé des phénotypes anormaux principalement en rapport avec une perturbation de la métamorphose (migration des yeux, squelette, augmentation taille des thyrocytes). La diminution de T3 et T4 sérique est aussi observée liée dans ce cas à une hypo-activité de la thyroïde due à une diminution de sécrétion de T4 mais aussi une inhibition des désiodases. De plus une régulation négative de l'expression de TR β est constatée parallèlement au déclin des HT sériques.

Des souris sont exposées au chlorpyrifos (CPF) à des doses n'induisant pas d'inhibition de l'acétylcholinestérase au niveau du SNC, pendant la gestation et/ou en post-natal (De Angelis et coll., 2009). Comme dans le cas du malathion, il est observé une diminution de T4 chez les souris gestantes mais aussi chez la descendance 150 jours après la naissance, avec un dimorphisme sexuel, marqué par une apparente vulnérabilité des mâles ; au niveau histomorphologique, il est observé des modifications chez les mères avec une augmentation de la hauteur des cellules folliculaires et, chez la progénie, une augmentation du nombre de cellules folliculaires nécrotiques en relation avec la dose d'exposition. Chez des rates exposées au CPF entre les jours 17 et 20 de gestation, dans une fenêtre de temps cruciale pour le processus de neurogenèse à faible dose (1 ou 5 mg/kg/j), les femelles de la descendance (jeunes adultes et adultes) montrent une hyperactivité locomotrice, une baisse de mémorisation et des fonctions cognitives, plus marquées à faible dose (1 mg/kg/j) (Levin et coll., 2002). Sur un troisième modèle (*A. triostegus*, le chirurgien-bagnard), une exposition des larves au CPF à dose correspondant à une pollution environnementale, conduit là aussi, à une diminution du taux de T3 et des perturbations de la métamorphose du poisson vivant dans les récifs coralliens (Holzer et coll., 2017).

D'autres organophosphorés ont été testés avec des résultats concordants avec du CPF et du malathion : ainsi, l'exposition de gardons (*R. rutilus*) au diazinon à concentration environnementale induit une diminution des taux de T3, T4 et TSH ainsi que de cortisol qui pourrait être relié à un dysfonctionnement thyroïdien, soit de la production, soit de la sécrétion des HT (Katuli et coll., 2014).

Par ailleurs, l'exposition de poissons rouges (*C. auratus*) au monocrotophos (MCP) conduit à une hyperplasie et hypertrophie de l'épithélium folliculaire thyroïdien entraînant une diminution du taux plasmatique de T3L en relation avec une augmentation d'expression des gènes de désiodase D1 (formation de T3) et D3 (formation de T2, hormone inactive) hépatiques corrélées à la modulation de l'expression de l'ARNm de la transthyréine hépatique (Zhang et coll., 2013b ; Zhang et coll., 2014b ; Zhang et coll., 2018). Une réponse compensatoire à la baisse des taux de T3 est illustrée par une augmentation de la transcription du gène de la sous-unité β de la TSH. De plus, le MCP induit une augmentation du taux plasmatique de 17β -œstradiol qui pourrait renforcer l'impact du pesticide sur l'axe HPT en modulant l'expression des désiodases hépatiques (Zhang et coll., 2018).

In vitro

Malathion et CPF ont été principalement étudiés sur des modèles cellulaires : l'exposition de cellules FRTL-5 au malathion conduit à une inhibition de la transcription de la TG, une baisse d'expression du récepteur de la TSH et une réduction du niveau d'AMPc intracellulaire (Xiong et coll., 2018). Le malathion diminue la synthèse des HT et diminue l'expression des TR, ce qui pourrait expliquer les résultats quantitatifs obtenus *in vivo* (baisse des niveaux sériques de HT).

Des cellules PCCl3 (thyrocytes immortalisés de rat) ont été exposées à trois concentrations de CPF avec la conduite d'une analyse du transcriptome (Porreca et coll., 2016). Parmi les gènes dérégulés, il a été identifié trois gènes, dont l'expression était diminuée, participant à différents complexes et réseaux de régulation intervenant dans la prolifération et la survie des thyrocytes : *Egr1* (*Early growth response protein 1*), *Hmgal* (*High-mobility group AT hook 1*) et *Zfp36l2* (*Zinc Finger Protein 36, CH3 Type-Like 2*).

Ces derniers résultats sont confirmés par une analyse du transcriptome d'organes (thyroïde, rate) de souris exposées au CPF par voie orale. De plus une réduction de T4L est constatée ainsi que le développement d'une pancytopenie lors d'une exposition prolongée, signe d'une hématotoxicité déjà décrite chez les agriculteurs exposés (Fareed et coll., 2013) et des souris (Chatterjee et coll., 2014). Plus généralement, la totalité des études *in vitro* et *in vivo* vont dans le sens d'une diminution des HT liée à une exposition aux organophosphorés (à des doses environnementales dans certains cas). Sur le plan mécanistique, cette diminution est liée dans certaines études, à une diminution de la production de celles-ci.

Carbamates

Ces fongicides sont majoritairement utilisés pour la culture des fruits et légumes ainsi que des plantes ornementales. Le mancozèbe et le thirame sont particulièrement étudiés sur le plan toxicologique.

In vivo

L'exposition du bengali rouge (un passereau, *A. amandava*) au mancozèbe (0,5 % de la DL₅₀) par alimentation pendant 30 jours provoque une hypertrophie des thyrocytes, une altération du colloïde et une perturbation de l'axe HPT avec une diminution de T4, T3 et TSH (Pandey et Mohanty, 2015). Des effets ont aussi été constatés chez des rates Wistar exposées par gavage à 50, 100 ou 150 mg/kg/j de mancozèbe (NOAEL = 5 à 10 mg/kg/j)

du 7^e jour de gestation (*Gestational Day 7* ; GD7) au 16^e jour post-naissance (*Post-Natal Day 16* ; PND16). Une neurotoxicité est observée chez les femelles gestantes exposées à 150 mg/kg/j. Aux doses inférieures, le taux de T4 est diminué dès GD15 alors qu'il n'est pas modifié chez les nouveau-nés à PND16 (Axelstad et coll., 2011).

L'ETU, un métabolite du mancozèbe et d'autres pesticides de la famille EBDC, est utilisé comme un biomarqueur d'exposition à ces composés, et montre lui aussi des effets toxiques sur la thyroïde. L'exposition des rates à 0, 0,1, 0,3, et 1,0 mg/kg/j d'ETU par gavage entre GD8 et PND16 est associée à une reprotoxicité et une hypothyroïdie chez les rates gestantes et chez la génération F1 à une dose d'exposition équivalente à la LOAEL⁶⁷ (0,25 mg/kg/j pour un effet thyroïdien à long terme) (Maranghi et coll., 2013). La perturbation de la synthèse des HT par l'ETU, le mancozèbe, et d'autres composés apparentés peut s'expliquer par une inhibition de l'activité de la TPO (Doerge et Takazawa, 1990 ; Freyberger et Ahr, 2006), ce qui pourrait conduire à la baisse de concentration de T4 observée à la fois chez les rates et le bengali.

Un effet inhibiteur sur l'activité de la TPO se retrouve aussi avec le thirame. En effet, des embryons de poisson zèbre exposés à divers stades de développement (2 à 120 heures après la fertilisation ; hpf) pendant 1 h à des concentrations entre 0,001 et 10 µM sont caractérisés par une diminution de l'expression de *Dio3* à 12 et 24 hpf de façon dose-dépendante ainsi que de celle de *TPO* à 48 et 96 hpf (Chen et coll., 2019). La courbure anormale de la notocorde⁶⁸ apparaît comme un marqueur de toxicité du thirame suite à une exposition à des temps précoces de développement potentiellement en relation avec la dérégulation de *Dio3* et *TPO*.

In vitro

Peu d'études ont été conduites *in vitro* pour tester la fonction thyroïdienne. Une étude toxicogénomique sur la lignée PCC13 exposée à l'ETU avait pour objectif de comparer la signature des transcrits *in vitro* en rapport avec les effets adverses observés *in vivo* chez la souris (Porreca et coll., 2016). Il est observé l'inhibition d'expression des transcrits *Egr1*, *Hmga1* et *Zfp3612* mais non spécifiques d'une atteinte de la thyroïde car ils correspondent à des gènes impliqués dans des réseaux cycle cellulaire/apoptose de la thyroïde mais aussi du système hématopoïétique.

67. Dose minimale ayant un effet nocif observé (*Lowest-Observed Adverse Effect Level* ; LOAEL).

68. Axe dorsal primitif des embryons vertébrés constitué d'un cordon cellulaire d'origine méso-dermique qui joue un rôle dans la différenciation et l'organisation de la colonne vertébrale.

Ces résultats sur les modèles *in vivo* suggèrent que certains carbamates (mancozèbe et thirame) pourraient, comme pour les organophosphorés, affecter les niveaux des HT par une dérégulation de certaines activités comme celle de la TPO (Marinovich et coll., 1997).

Pyréthrinoïdes

Ces molécules ont remplacé les organochlorés et exercent leur action par le biais entre autres, d'une liaison à des canaux sodiques voltage-dépendants bloquant la respiration chez les insectes. Il existe de nombreux pyréthrinoïdes différents, dont certains qui sont suspectés d'exercer un effet sur le système thyroïdien.

In vivo

Un effet du fenvalérate sur la signalisation thyroïdienne dans le placenta est corroboré par plusieurs études expérimentales sur des rongeurs. Ainsi, l'exposition des souris gravides au fenvalérate (0,2, 2 ou 20 mg/kg/j) par voie orale pendant la gestation entraîne, à la plus forte dose, une diminution du poids foetal de la progénie (mâle et femelle) (Wang et coll., 2017a). Il n'est pas trouvé de différence du taux de T4 et T3 sérique mais une diminution d'expression de TR α 1 et TR β 1 placentaires dès 0,2 mg/kg. Une des voies de régulation dépendant des TR pourrait concerner l'expression du *vascular endothelial growth factor* (VEGF), un régulateur clé de l'angiogenèse du placenta. L'expression du VEGF est stimulée par T3 dans les trophoblastes de souris (Silva et coll., 2015a) et par T4 dans le placenta de rat (Silva et coll., 2015b). En accord avec cette hypothèse, il est retrouvé une diminution d'expression de *Igf2* et *Vegf α* dans le placenta de souris exposées. De plus, le fenvalérate réduit l'expression des transporteurs de nutriments *CD36*, *Snat1*, et *Snat2*. Ainsi, l'exposition de souris gestantes au fenvalérate perturbe la signalisation dépendante des TR et impacte le développement foetal (Wang et coll., 2017a).

Des rats mâles Wistar exposés à la dose de 100 et 200 mg/kg/j de fenvalérate par voie intrapéritonéale pendant 45 jours montrent une augmentation du taux sérique de T3 et T4. Cependant il est rapporté des paralysies en fin d'expérience en rapport avec les doses élevées d'exposition (Kaul et coll., 1996). D'autres expériences, sur une période plus courte, démontrent un effet du fenvalérate sur les niveaux sériques des HT. Ainsi, des rats mâles Wistar exposés pendant une semaine à la dose de 100 mg/kg/j (un tiers de la DL₅₀) de fenvalérate par voie intrapéritonéale montrent une augmentation du taux de T3 sans diminution significative de TSH (Giray et coll., 2010).

En revanche, des souris femelles exposées par voie orale à des doses de 40, 80 et 120 mg/kg/j de fenvalérate (utilisé à 20 % d'activité) pendant une semaine montrent une diminution dose-dépendante du taux de T3 et T4 et de l'activité de la 5' désiodase hépatique (Maiti et coll., 1995). Comme dans de nombreuses expérimentations chez les rongeurs, les causes conduisant à ces résultats contradictoires peuvent concerner le plan expérimental, le sexe en raison d'un dimorphisme, l'agent utilisé et sa pureté, l'espèce ou la souche, la voie et la durée d'exposition, et surtout la dose utilisée. Des doses toxiques peuvent induire des modifications des constantes sériques non spécifiques et signent simplement un dysfonctionnement global. Cependant, d'après les expérimentations recherchant les causes de retard de croissance intra-utérine, le fenvalérate est un candidat potentiel d'une perturbation de l'axe HPT.

D'autres pyréthrinoides ont été étudiés en rapport avec l'axe HPT ; des embryons de poisson zèbre ont été exposés à trois substances actives (λ -cyhalothrine, le fenvalérate et la perméthrine) à 2,5, 10, 25, 125 et 500 nM pendant 96 h (Zhang et coll., 2017). Les doses de 2,5 et 10 nM correspondent aux concentrations retrouvées dans l'environnement mais la diminution d'expression de *TR α* et *TR β* pour les trois composés correspond à des concentrations supérieures soit au-delà de 25 nM. Dans une autre étude, des embryons (2 hpf) de poisson zèbre sont exposés à 1, 3 et 10 μ g/l de perméthrine (concentrations retrouvées dans l'environnement) jusqu'à 72 hpf (Tu et coll., 2016b). En rapport avec l'absorption du composé sur les parois de l'aquarium, les concentrations réelles d'exposition étaient 0,47, 1,38 et 4,30 μ g/l. La perméthrine à la dose de 4,3 μ g/l inhibe le développement embryonnaire et induit une augmentation des taux de T4 et T3 sans baisse compensatrice de TSH (Tu et coll., 2016b). La perméthrine à la plus forte dose augmente l'expression des ARNm codant TRF, *TSH β* , *Pax8*, *Dio1*, *Dio2* et *TPO* ainsi que *TTR*, *TR α* et *TR β* . La perturbation induite par la perméthrine est probablement la conséquence de sa liaison à la TTR qui déplace T3 et T4 de son transporteur.

Une exposition de rats pendant 21 jours à une dose non toxique de bifenthrine (0,5 mg/j) ou λ -cyhalothrine (0,2 mg/j) induit une diminution de T3, T4 et une augmentation de TSH (Akhtar et coll., 1996). Des embryons (2 hpf) de poisson zèbre sont exposés à 1, 3, et 10 μ g/l de bifenthrine ou λ -cyhalothrine jusqu'à 72 hpf (Tu et coll., 2016a). La majorité des gènes étudiés reliés à l'axe HPT incluent TRF, *TSH β* , *TTR*, *UGT1ab*, *Pax8*, *Dio2* et *TR α* sont surexprimés suite à l'exposition à la bifenthrine. La λ -cyhalothrine induit un réseau de gènes un peu différent incluant *TTR*, *Pax8*, *Dio2* et *TR α* avec une diminution concomitante de *Dio1*. De plus la bifenthrine

se lie au TR α avec une affinité plus forte que la λ -cyhalothrine (Tu et coll., 2016a).

In vitro

Peu d'études ont été réalisées *in vitro*. Toutefois, une étude vient appuyer un effet potentiel de certains pyréthriinoïdes sur les TR. Ainsi, des cellules rénales de singe (lignée CV-1) exprimant une construction pGal4-L-TR β plus pUAS-tk-Luc ont été exposées à neuf dérivés pyréthriinoïdes (cycloprothrine, cyfluthrine, cyhalothrine, cyperméthrine, deltaméthrine, étofenprox, fenvalérate, perméthrine et tétraméthrine) de 10^{-5} à 10^{-9} M et montrent un effet antagoniste sur le récepteur (Du et coll., 2010). Les profils sont néanmoins différents : l'effet est observé à 10^{-8} M pour la perméthrine, tétraméthrine et deltaméthrine et à 10^{-7} M pour la cyhalothrine et étofenprox.

En résumé, les résultats expérimentaux sur les pyréthriinoïdes suggèrent fortement un effet de plusieurs de ces molécules sur l'axe HPT. L'étude *in vitro* suggère des modes d'action à des doses faibles (10^{-8} M pour la perméthrine, tétraméthrine et deltaméthrine par exemple) pour certaines molécules toutefois insuffisamment étudiées *in vivo* (à l'exception de la perméthrine, résultats concordants *in vitro* et *in vivo*).

Glyphosate et formulations à base de glyphosate

Une étude très complète a été menée sur des rates gestantes avec du Roundup. Celles-ci sont exposées de GD18 à PND5 au Roundup Transorb à la concentration de 5 mg/kg/j ou 50 mg/kg/j (dose correspondant à la NOAEL). Dans la progénie, le profil hormonal des rats mâles âgés de 3 mois montre une diminution du taux de TSH sans variation de T3 et T4 (de Souza et coll., 2017). L'analyse de l'expression génique a été conduite avec comme résultats pour les groupes exposés : une diminution d'expression de *Dio2*, *Dio3* et des transporteurs membranaires *Slc1c1* (anciennement *Oatp1c1*) et *Slc16a2* (anciennement *Mct8*) au niveau de l'hypothalamus (dès 5 mg/kg/j), une augmentation d'expression de *Dio2*, *Thr α 1*, *Thr β 1* et *Slc16a2* et une absence de variation du taux de *Tsh β* au niveau de l'hypophyse (5 mg/kg/j), une augmentation d'expression de *Thr α 1*, *Thr β 1* au niveau du foie (50 mg/kg/j) et au niveau du myocarde une augmentation de *Myh6* et diminution de *Dio2*, *Mb*, *Slc2a4*. De plus, le profil d'expression des gènes et les données de métabolomique sont similaires aux données trouvées pour des rats hypothyroïdiens. En résumé, l'exposition au Roundup à faible dose induit une perturbation de l'axe HPT qui mériterait d'être précisée en testant le glyphosate seul sachant que des données épidémiologiques sur le Roundup indiquent

potentiellement une association avec une hypothyroïdie. D'autres modèles et protocoles d'études expérimentales devraient être mis en place pour confirmer ces observations.

Fipronil

Le fipronil, un agent peu toxique pour les mammifères (LD50 = 97 mg/kg en exposition aiguë chez le rat), est très couramment utilisé comme insecticide en médecine vétérinaire. Il est métabolisé par les enzymes hépatiques en fipronil sulfone, et en fipronil-désulfinyl par photoréaction dans l'environnement (FAO et OMS, 1998).

In vivo

Les résultats d'une étude de cancérogenèse chez le rat, mais réalisée à doses toxiques inductrices d'une mortalité excessive, ont montré une augmentation de l'incidence des tumeurs de la thyroïde chez le rat mâle et femelle à des doses de 13 mg/kg/j. Chez ces rats, la concentration de T4 était diminuée et celle de TSH augmentée (FAO et OMS, 1998). Le processus de cancérogenèse chez le rat induit par le fipronil ne repose pas sur un effet génotoxique comme pour la plupart des pesticides inducteurs de tumeurs thyroïdiennes folliculaires mais semble lié à une perturbation de l'homéostasie de l'axe HPT (Hurley, 1998).

Une exposition au fipronil (3 mg/kg/j) *per os* pendant 14 jours de rats femelles induit une diminution concomitante des concentrations plasmatiques d'HT totale et libre, ainsi qu'une augmentation des concentrations plasmatiques de TSH (Leghait et coll., 2009). Sur la base d'un modèle de rat thyroïdec-tomisé et compensé par injection de T3 afin d'évaluer les clairances de T4T et T4L, le fipronil augmente de deux fois les clairances ainsi que celle de l'antipyrine chez les rats thyroïdiens intacts. Ces résultats suggèrent une augmentation des activités métaboliques hépatiques facilitant l'élimination des HT. En effet le fipronil induit l'expression de plusieurs ARNm des enzymes de phase I (Cyp2b1, Cyp2b2, Cyp3a1, ces2, ces6), de phase II (Ugt1a1, Sult1b1, Gst2) et de phase III (Abcc2, Abcc3, Abcg5, Abcg8, Slco1a1 et Slco1a4) (Roques et coll., 2013). Ainsi, la perturbation de la fonction thyroïdienne repose sur un métabolisme accru en fipronil sulfone (Cyp2b1, Cyp2b2, Cyp3a1). D'autre part ces perturbations participent à un flux augmenté d'entrée de T4L (Abcc2, Abcc3, Slco1a1 et Slco1a4) et d'efflux des conjugués glucuronés (Ugt1a1). Les concentrations plasmatiques de fipronil sulfone sont retrouvées 20 fois supérieures à celles du fipronil (Leghait et coll., 2009). L'augmentation d'expression de gènes du métabolisme hépatique

suggère une participation des récepteurs CAR et/ou PXR activés par les xénobiotiques (car régulateurs par exemple des CYP des familles 2 et 3). En effet, le fipronil active CAR/PXR (Lemaire et coll., 2006) qui régule majoritairement le profil d'expression des gènes hépatiques (Roques et coll., 2013).

Ces expérimentations de toxicologie, parfois à haute dose, sont cependant peu indicatives d'un effet perturbateur endocrinien chez l'être humain ; en effet, le fipronil a été l'objet d'une discussion sur la pertinence du modèle rongeur en raison de l'absence de régulation du taux d'HT libres par la TBG. En conséquence, le même type d'étude a été réalisé chez les ovins qui expriment la TBG avec une régulation thyroïdienne proche de celle de l'être humain. Le fipronil (5 mg/kg tous les 4 jours *per os*) chez les béliers n'induit pas de modifications des taux de T3 et T4 libre et liée et TSH (Leghait et coll., 2010). Chez des brebis thyroïdectomisées de type euthyroïdienne, l'effet de ce traitement est limité à une augmentation modérée de la clairance de T4L. Contrairement au rat, le traitement au fipronil n'a aucun effet sur la clairance de l'antipyrine, marqueur de l'activité de CYP hépatique, chez les brebis.

La différence de réponse entre rongeurs et ovins quant au potentiel perturbateur thyroïdien du fipronil pourrait être liée à la différence d'exposition au toxique ultime, le fipronil sulfone, dont la concentration plasmatique est plus faible chez le mouton que chez le rat.

L'absence d'effet chez les ovins et probablement chez l'être humain en exposition environnementale repose aussi sur des différences interspécifiques bien connues au niveau du domaine de liaison des récepteurs CAR/PXR entre l'être humain et les rongeurs (Kretschmer et Baldwin, 2005). L'absence d'effet inducteur enzymatique hépatique du fipronil chez les ovins pourrait s'expliquer par l'absence de liaison du fipronil aux récepteurs ovins CAR/PXR.

In vitro

Lu et coll. ont comparé l'effet perturbateur endocrinien du fipronil à celui de son métabolite principal, le fipronil sulfone. Les auteurs ont montré que ce dernier (et non le fipronil) présente une activité dose dépendante antagoniste de TR β analysée à l'aide d'une lignée cellulaire CHO-K1 exprimant le gène rapporteur pGal4-L-hTR β (Lu et coll., 2015). Ce résultat souligne à nouveau la nécessité d'étudier les métabolites des pesticides qui peuvent se révéler plus actifs que la molécule mère.

En résumé, même si des associations ont été mises en évidence dans deux études menées chez l'être humain et des études réalisées expérimentalement sur les animaux et cellules, il est encore trop tôt pour évoquer un lien entre une exposition au fipronil et la baisse des HT car la qualité et le nombre des études épidémiologiques sont insuffisants et les effets qui sont rapportés le sont chez les rongeurs à haute dose. Toutefois, il est démontré que ce pesticide lie les récepteurs CAR et PXR humain, il a donc une toxicité potentielle en lien avec une augmentation du métabolisme. Comme le fipronil est inducteur d'enzymes hépatiques, une étude d'hépatotoxicité a récemment été réalisée chez le rat Wistar exposé pendant 3 mois à des doses de fipronil (par gavage) et a conclu avec certitude à une hépatotoxicité aux plus fortes doses et montré des résultats plus ambigus à la plus faible dose d'exposition (Karthek et David, 2018). Ces résultats mériteraient d'être confirmés.

Néonicotinoïdes

Les résultats les plus intéressants concernent l'imidaclopride, un des néonicotinoïdes les plus utilisés dans le monde.

In vivo

L'exposition du bengali rouge (*A. amandava*) à l'imidaclopride (0,5 % de la DL₅₀) *per os* pendant 30 jours provoque une altération du colloïde et une perturbation de l'axe HPT avec une diminution des niveaux de T4, T3 et TSH (Pandey et Mohanty, 2015). Cependant les auteurs ont utilisé une formulation contenant du 1-méthyl-2-pyrrolidone qui peut induire des malformations comme une ossification incomplète chez le rat (Saillenfait et coll., 2002) et cette formulation est 10 fois plus toxique que le principe actif (imidaclopride) (Mesnage et coll., 2014). Les doses toxiques des formulations et les effets délétères ne correspondent pas à ceux des principes actifs et si les organismes sont exposés aux formulations et produits de dégradation dans l'environnement la réglementation concerne les principes actifs. L'effet de l'imidaclopride pourrait cependant refléter une spécificité particulière au sein de la famille des néonicotinoïdes comme le montrent des résultats *in vitro*.

In vitro

L'effet de sept agents de la famille des néonicotinoïdes a ainsi été testé sur la prolifération de cellules hypophysaires GH3 sensibles à l'action de la T3. Il est observé une absence d'effet des néonicotinoïdes testés : thiaméthoxame, imidaclopride, clothianidine, flupyradifurone, dinotéfurane, nitenpyrame, thiaclopride (Mesnage et coll., 2018). En revanche, l'imidaclopride exerce

un effet agoniste à très faible dose (2×10^{-10} M) d'après un essai luciférase sur cellules GH3-TRE exprimant un gène rapporteur sensible à l'action des TR activés par un ligand (Xiang et coll., 2017). Ce résultat qui semble en opposition du précédent, peut en fait provenir du faible effet agoniste (moins de 2 fois) qui ne se traduirait pas en réponse physiologique observable ; il pourrait également refléter un effet agoniste partiel, c'est-à-dire agoniste en l'absence d'autres ligands mais antagoniste vis-à-vis de l'action de ligands naturels comme la T3. Ainsi, les vitesses d'association et dissociation du ligand de TR β sont semblables à celles obtenues avec T3 d'après une expérimentation en résonance plasmonique de surface (Xiang et coll., 2017). Ce résultat démontrerait qu'un effet de compétition est possible d'autant que la concentration utilisée pour lier le récepteur est infra-nanomolaire. L'effet compétiteur semble confirmé par une analyse *in silico* de « docking » conduite sur TR α et TR β , bien que l'affinité de l'imidaclopride soit plus faible que celle de la T3 (Bhaskar et Mohanty, 2014).

En résumé, si la plupart des néonicotinoïdes testés ne semblent pas influencer l'axe HPT (données à reproduire avec d'autres modèles, d'autres protocoles), l'un des plus utilisés, l'imidaclopride, semble exercer un effet de type agoniste partiel, potentiellement compétiteur avec la T3, vis-à-vis des TR et donc susceptible d'interférer avec les boucles de rétrocontrôle.

Inhibiteurs de la succinate déshydrogénase

Le fluopyram, un fongicide à large spectre, est inducteur d'une hyperplasie folliculaire chez les souris mâles et femelles mais est inducteur d'adénome de la thyroïde seulement chez les mâles (Rouquié et coll., 2014). De plus, des souris mâles exposées à 750 ppm de fluopyram pendant 28 jours montrent une augmentation d'élimination de la T4-glucuronidé, une baisse de T4 sérique et une augmentation de TSH. L'évènement moléculaire initial est une activation de CAR/PXR qui induit les enzymes de phase I et II dont les UGT (Rouquié et coll., 2014) soulignant que la prise en compte des mécanismes cataboliques d'élimination des HT au niveau hépatique est essentielle.

Autres dérivés

L'exposition chronique à la trifluraline (un herbicide de la famille des dinitro-anilines) pendant 2 ans chez les rats induit des tumeurs de la thyroïde (Emmerson et coll., 1996). Des rats mâles exposés à la trifluraline à la même dose (325 mg/kg/j) dans l'aliment pendant deux semaines montrent une induction d'UGT avec une élimination accrue de T4 conjuguée (Saghir et

coll., 2008). Les taux sériques de T3 et T4 sont diminués avec une augmentation de TSH probablement en rapport avec l'induction d'une hyperplasie de la thyroïde conduisant au développement tumoral.

Conclusion – données mécanistiques

Pour un certain nombre de pesticides, les résultats de tests *in vivo* et *in vitro* (tableau 17.II, voir en fin de ce chapitre) confirment la dérégulation thyroïdienne, très souvent associée à des signes histopathologiques. D'après les tests chez les rongeurs, le seul dosage de TSH n'est pas le biomarqueur de choix pour mettre en évidence une pathologie thyroïdienne et presque toutes les cibles avec des spécificités de tissus peuvent être touchées. L'exposition de rats, souvent à forte dose, aboutit généralement à une augmentation de la conjugaison de T4 (voire T3) et son élimination biliaire sous forme T4-UDG avec une augmentation compensatrice de TSH générant une stimulation de la thyroïde qui peut aboutir au développement tumoral.

Le dossier toxicologique des pesticides est basé sur les recommandations réglementaires et les rongeurs ont été le modèle classiquement utilisé malgré ses limites pour évaluer des THDC chez l'être humain. Les modèles reposant sur la métamorphose des poissons ou batraciens devraient désormais remplacer les rongeurs après une étape de criblage *in vitro*. Les modèles *in vivo* (rongeurs, batraciens, poissons) révèlent assez souvent un dimorphisme sexuel quant à l'expression de gènes dans différents tissus, dont certains peuvent être co-régulés par l'axe HPG avec des conséquences phénotypiques ou physiopathologiques.

Par ailleurs, les pesticides perturbant la régulation thyroïdienne peuvent interagir avec le foie avec comme cible initiale l'activation de CAR, d'Ahr... ou à un niveau intégratif de modifier la régulation de l'axe HPT comme par exemple certains pyréthrinoides, dont la perméthrine qui interagit avec le récepteur ER α . D'autre part, parmi les pistes à explorer trois d'entre elles méritent un intérêt particulier : *i*) peu d'expérimentations concernent l'évaluation de pesticides comme potentiels perturbateurs du système immunitaire lequel peut représenter un évènement initial amplifié par les interférences sur les cibles de l'axe HPT ; *ii*) peu d'expérimentations se sont intéressées à la régulation non génomique de l'axe HPT suite à une exposition aux pesticides ; *iii*) peu d'expérimentations sont orientées vers les mélanges qui évaluent les effets spécifiques de différents principes actifs en comparaison de combinaisons classiquement retrouvées en agriculture et élevage.

Enfin des pesticides présentant une activité THDC devraient être suivis par les enquêtes épidémiologiques et réciproquement les associations trouvées sur des populations exposées devraient provoquer des recherches sur les mécanismes d'action. Ce domaine toxicologique manquait jusqu'à très récemment d'une approche AOP⁶⁹ qui lèvera les ambiguïtés et controverses générées par des tests *in vivo* avec leurs limites.

69. « *Adverse Outcome Pathway* » : une construction conceptuelle rassemblant les connaissances sur le lien entre un événement moléculaire et un effet néfaste à un niveau pertinent pour une évaluation de risque.

Tableau 17.1 : Études de cohortes portant sur le lien entre les pathologies thyroïdiennes et l'exposition aux pesticides

Référence Pays	Type d'étude	Population	Nombre de sujets	Exposition Pesticides	Résultats
Exposition professionnelle					
Shrestha et coll., 2018b États-Unis	Cohorte prospective	Applicateurs	35 150	Environ cinquante pesticides des familles de OC, OP, carbamates, Pyr	Augmentation de risque d'hypothyroïdie
Shrestha et coll., 2018a États-Unis	Idem	Épouses des applicateurs	24 092	Idem	Fongicides (bénomyl, manèbe/mancozèbe, métalaxyl), herbicides (pendiméthaline), et parmi les plus de 60 ans : insecticides (parathion, perméthrine) : Hypothyroïdisme : HR [1,56-2,44] Insecticides (diazinon), fongicides (manèbe, mancozèbe), herbicides (métolachlore) : Hyperthyroïdisme : HR [1,35-2,01]
Lerro et coll., 2018b États-Unis	Idem	Applicateurs	679	Idem	Aldrine : Hypothyroïdie sous-clinique, augmentation de TSH et diminution de T4 Pendiméthaline : Hypothyroïdie sous-clinique, augmentation de TSH et augmentation anticorps anti-TPO Bromure de méthyl : Augmentation de T4 et diminution de la TSH Captane, EPTC : Augmentation de la TSH
Lerro et coll., 2015 États-Unis	Idem	Épouses des applicateurs	30 003	Utilisation de pesticides OP	Malathion associé au risque de cancer de la thyroïde : RR = 2,04 ; IC 95 % [1,14-3,63]

Tableau 17.1 : (suite)

Référence Pays	Type d'étude	Population	Nombre de sujets	Exposition Pesticides	Résultats
Freeman et coll., 2011 États-Unis	Cohorte prospective	Applicateurs d'atrazine	36 357	Utilisation d'atrazine	Augmentation de risque de cancer de la thyroïde dans les 2 ^e et 4 ^e quartiles d'exposition cumulée au cours de la vie
McLean et coll., 2009 Nouvelle Zélande	Cohorte rétrospective	Employés d'une scierie	293	Pentachlorophénol	Association entre la durée d'emploi et les désordres thyroïdiens
Nasterlack et coll., 2007 Allemagne	Cohorte rétrospective	Employés d'une usine d'herbicides	185	Poste de production de benzothiadiazine <i>versus</i> registre de cas	Pas d'association (mais puissance trop faible)
Toft et coll., 2006 Danemark	Cohorte	Travailleurs de serres appliquant pesticides	122	Pulvérisation de plus de 60 pesticides	Diminution de T4 libre, diminution de la TSH, augmentation de T3, T3 libre, et T4 libre dans la période la plus exposée <i>versus</i> la moins exposée
Smith, 1984 Angleterre	Cohorte prospective	Mélangeurs de pesticides <i>versus</i> travailleurs de procédés	45	Usine fabriquant de l'ETU	Diminution de T4 chez les mélangeurs, pas chez les travailleurs
Exposition en population générale					
Mulder et coll., 2019 Pays-Bas	Cohorte prospective	Femmes enceintes en population générale	715 sang maternel + 482 sang de cordon	Six métabolites de pesticides OP	Pas d'association
Chevrier et coll., 2019 Afrique du sud	Cohorte prospective	Couples mères-enfants	717	DDT/E sériques et concentrations urinaires de métabolites de pyréthrinoides	Pyréthroïdes associés positivement à la TSH, DDT associé négativement à T4 (garçons)
Cordier et coll., 2015 Guadeloupe	Cohorte prospective	Jeunes enfants (3 mois)	111	Chlordécone mesuré dans le sang de cordon et le lait	Cordon : augmentation de TSH chez les garçons ; lait : diminution de T4 (filles) et T3 libres

Tableau 17.I : (suite)

Référence Pays	Type d'étude	Population	Nombre de sujets	Exposition Pesticides	Résultats
Zhang et coll., 2014a Japon	Cohorte prospective	Couples mères-nouveau-nés	147	3-PBA au 1 ^{er} trimestre	Pas d'association avec la T4 libre et la TSH
Wohlfahrt-Veje et coll., 2011 Danemark	Cohorte rétrospective	Enfants nés de femmes travaillant dans les serres	145 dont 90 exposés	Exposition prénatale	Diminution de la TSH chez les exposés
Exposition résidentielle					
Wang et coll., 2002 États-Unis	Cohorte rétrospective	Femmes résidentes de fermes	6 310	Résidentes sur une ferme <i>versus</i> non-résidentes	Tendance à l'augmentation des cas de cancers de la thyroïde

3-PBA : acide 3-phénoxybenzoïque ; DDE : dichlorodiphényldichloroéthylène ; DDT : dichlorodiphényltrichloroéthane ; EPTC : éthyl-dipropylthiocarbamate ; ETU : éthylène thiourée ; OC : organochlorés ; OP : organophosphorés ; Pyr : pyréthrinoïdes ; TSH : *Thyroid-Stimulating Hormone* (thyroestimuline ou thyrotropine) ; TPO : thyroperoxydase

Tableau 17.II : Récapitulatif des résultats d'études expérimentales sur les effets perturbateurs thyroïdiens des pesticides

Pesticide	Approche	Modèle	Paramètres	Références
Organophosphorés				
Chlorpyrifos	<i>in vitro</i>	PCCI3	Thyréocytes : ↓ ARNm Egr1, Hmga1, Zfp36l2	Porreca et coll., 2016
	<i>in vivo</i>	souris	T4 ↓ Thyréocytes : ↑ taille	De Angelis et coll., 2009
	<i>in vivo</i>	souris	TG ↓ T4 ↓ Thyréocytes : ↓ ARNm Egr1, Hmga1, Zfp36l2	Porreca et coll., 2016
	<i>in vivo</i>	poisson larve	T3 ↓	Holzer et coll., 2017
Diazinon	<i>in vivo</i>	poisson	TSH ↓ T3 ↓ T4 ↓	Katuli et coll., 2014
Malathion	<i>in vitro</i>	FRTL-5	TSHR ↓ TG ↓	Xiong et coll., 2018
	<i>in vivo</i>	rat	TSH↑ T3 ↓ T4 ↓	Akhtar et coll., 1996
	<i>in vivo</i>	poisson larve	T3 ↓ T4 ↓ TR ↓ Thyréocytes : ↑ taille	Ortiz-Delgado et coll., 2019
Monocrotophos	<i>in vivo</i>	poisson	TRH↓ TSH↓ T3↓ TTR↑ D2↓, D1 et D3↑ Thyréocytes : hyperplasie	Zhang et coll., 2013b ; Zhang et coll., 2014b ; Zhang et coll., 2018
Carbamates				
Mancozèbe	<i>in vivo</i>	oiseau	TSH ↓ T3 ↓ T4 ↓ Hypertrophie thyroïdienne et altération du colloïde	Pandey et Mohanty, 2015
	<i>in vivo</i>	rat	T4 ↓	Axelstad et coll., 2011
Thirame	<i>in vivo</i>	poisson	TPO ↓ D3↑	Chen et coll., 2019
Éthylène thiourée	<i>in vitro</i>	PCCI3	Thyréocytes : ↓ ARNm Egr1, Hmga1, Zfp36l2	Porreca et coll., 2016
	<i>in vivo</i>	souris	TG↓ T4↓ Thyréocytes : ↓ ARNm Egr1, Hmga1, Zfp36l2	Porreca et coll., 2016
	<i>in vivo</i>	rat	TSH ↓ T3↓ T4↓ Thyréocytes : vacuolisation, ↓ colloïde	Maranghi et coll., 2013

Tableau 17.II : (suite)

Pesticide	Approche	Modèle	Paramètres	Références
Organochlorés				
DDT/DDE	<i>in vitro</i>	CHO	TSHR↓	Santini et coll., 2003 ; De Gregorio et coll., 2011
	<i>in vivo</i>	rat	TSH↓ T3↓ T4↓ Thyrocytes : ↑ taille et ↑ transport vésiculaire	Yaglova et Yaglov, 2014 ; Yaglova et Yaglov, 2017
	<i>in vivo</i>	rat	TSH↓ T3↓ T4↓ TTR↓ UGT↑ ↓D2 TR↑	Liu et coll., 2011 ; Liu et coll., 2014
	<i>in vivo</i>	poisson (SNC)	TSH↓ TR↑	Mortensen et Arukwe, 2006
	<i>in vivo</i>	batracien XETA	TH/bZIP:GFP↑ (si T3)	Fini et coll., 2007
Hexachlorobenzène	<i>in vitro</i>	FRTL-5	Thyrocytes : inhibition de croissance	Chiappini et coll., 2014
	<i>in vivo</i>	rat	T4↓ UGT↑ D1↑	Alvarez et coll., 2005
	<i>in vivo</i>	rat	TSH↑ T4↓ TTR↑	van Raaij et coll., 1993
	<i>in vivo</i>	batracien XETA	TH/bZIP:GFP↑ (si T3)	Fini et coll., 2007
	<i>in vitro</i>	CHO	TR↓	Yu et coll., 2019
Pentachlorophénol	<i>in vitro</i>	GH3	D1↓	Guo et Zhou, 2013
	<i>in vivo</i>	poisson larve	TSH↑ NIS↑ T3↑ T4↓ D1 et D2↑ TR↑	Guo et Zhou, 2013 ; Cheng et coll., 2015
	<i>in vivo</i>	poisson adulte	TSH↓ T3↓ (M) T4↑ TTR↓ (M) ↑ (F) SULT↓ (F) ↑ (M) UGT↑ D1↓ D2↑ (F) ↓ (M) TR↓ (M)	Yu et coll., 2014
	<i>in vivo</i>	poisson	T4↓ D1↓ D3↑	Coimbra et coll., 2005
	<i>in vivo</i>	poisson juvénile	TRH↑ D2↑ TR↑	Jin et coll., 2011
Acétochlore	<i>in vivo</i>	poisson larve	NIS↓ D2 et D1↓ TR↓	Li et coll., 2009
	<i>in vivo</i>	poisson adulte	NIS↓ (F) T3↓ T4↓ D2↓ TR↑	Li et coll., 2009

Tableau 17.II : (suite)

Pesticide	Approche	Modèle	Paramètres	Références
Pyréthrinoïdes				
l-cyhalothrine	<i>in vitro</i>	CV-1	TR↓	Du et coll., 2010
	<i>in vivo</i>	poisson	TR↓	Zhang et coll., 2017
	<i>in vivo</i>	rat	TSH↑ T3↓ T4↓	Akhtar et coll., 1996
	<i>in vivo</i>	poisson	T3↑ T4↑ TTR↑ UGT↑ D2↑, D1↓ TR↑	Tu et coll., 2016a
Fenvalérate	<i>in vitro</i>	CV-1	TR↓	Du et coll., 2010
	<i>in vivo</i>	souris	TR↓	Wang et coll., 2017a
	<i>in vivo</i>	rat	T3↑	Giray et coll., 2010
	<i>in vivo</i>	souris	T3↓ T4↓ Désiodases↓	Maiti et coll., 1995
Perméthrine	<i>in vivo</i>	poisson	TR↓	Zhang et coll., 2017
	<i>in vitro</i>	CV-1	TR↓	Du et coll., 2010
	<i>in vivo</i>	poisson	TR↓	Zhang et coll., 2017
	<i>in vivo</i>	poisson	TSH↑ TPO↑ T3↑ T4↑ TTR↑ D1 et D2 ↑ TR↑	Tu et coll., 2016b
Autres				
Chlorothalonil	<i>in vitro</i>	CHO	TR↑	Zhang et coll., 2016
Glyphosate	<i>in vivo</i>	rat	TSH↓ OATP ↓ D2 et D3↓	de Souza et coll., 2017
Trifluraline	<i>in vivo</i>	rat	TSH↑ T3↓ T4↓ UGT↑	Saghir et coll., 2008
Fluopyram	<i>in vivo</i>	souris	TSH↑ T4↓ UGT↑ Thyrocytes : hyperplasie	Rouquié et coll., 2014
Imidaclopride	<i>in vitro</i>	GH3	TR↑	Xiang et coll., 2017
	<i>in vivo</i>	oiseau	TSH↓ T3↓ T4↓ Altération du colloïde	Pandey et Mohanty, 2015
Fipronil	<i>in vitro</i>	CHO-K1	TR↓	Lu et coll., 2015
	<i>in vivo</i>	rat	TSH↑ T3↓ T4↓	Leghait et coll., 2009
	<i>in vivo</i>	rat	OATP↑ SUL↑ UGT↑	Roques et coll., 2013
	<i>in vivo</i>	brebis	TSH, T3 et T4 inchangés	Leghait et coll., 2010

D1, D2, D3 : désiodase de type I, II et III ; Egr1 : *Early growth response protein 1* ; F : femelles ; Hmga1 : *High-mobility group AT hook 1* ; M : mâles ; OAPT : *organic anion transporting polypeptide* ; SNC : système nerveux central ; SULT : sulfotransférase ; T3 et T4 : hormones thyroïdiennes ; TRH : *Thyrotropin-Releasing Hormone* (l'hormone thyroïdienne) ; TSH : *thyroxine stimulating hormone* ; TSHR : récepteur de la TSH ; NIS : symport iode-sodium ; TG : thyroglobuline ; TPO : thyroperoxydase ; TTR : transthyrétine ; TR : récepteur des hormones thyroïdiennes ; UGT : uridine diphospho-glucuronosyltransférase ; Zfp36l2 : *Zinc Finger Protein 36, CH3 Type-Like 2*

Addenda : Modèles et tests pour analyser l'effet des perturbateurs de la fonction thyroïdienne

Tests réglementaires des agences européennes pour identifier les agents perturbateurs endocriniens

L'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) a publié en 2014, et a révisé en 2018, un document guide pour identifier les principes actifs phytopharmaceutiques et biocides présentant une activité de perturbateur endocrinien (régulations EU #528/2012 et EC #1107/2009) (OECD, 2014 ; OECD, 2018). Les tests ciblent les régulations des voies EATS (*Estrogenic, Androgenic, Thyroidal, Steroidogenic*) et sont organisés en 5 niveaux décrits ci-dessous (les essais réglementaires européens⁷⁰ correspondants sont rapportés) :

Niveau 1 : recueil de données pour trier et prioriser (inclus également (Q)SAR)

Tri et classement sur les informations existantes telles que les propriétés physico-chimiques, données écotoxicologiques, lecture croisée (prédire les caractéristiques toxicologiques d'une substance à partir des connaissances disponibles sur la base de la littérature pour d'autres molécules similaires), famille chimique, relation entre une activité et les propriétés physico-chimiques et structurales d'une molécule ((Q)SAR ; (*Quantitative*) *Structure-Activity Relationship*), modèles de prédiction des propriétés ADME (absorption, distribution, métabolisme, excrétion).

Niveau 2 : tests in vitro sur cellules, à visée mécanistique (criblage)

Ces tests sont destinés à dépister l'existence d'un danger, et il est recherché un effet délétère, sans évaluer un risque dans le cadre de l'utilisation prévue de la substance. Les essais sont issus de modèles mammifères et non mammifères. Certains de ces tests sont adaptés au criblage haut débit. Les essais réglementaires évaluent la liaison des œstrogènes (OECD TG 493), la trans-activation des récepteurs aux œstrogènes (OECD TG 455, ISO 19040-3) ou androgènes (OECD TG 458), le criblage d'une activité œstrogène chez la levure recombinante (ISO 19040-1&2).

⁷⁰. Organisation for Economic Co-operation and Development Test Guideline (OECD TG) ou Guidance Document (OECD GD).

Niveau 3 : tests sur organismes entiers avec un seul agent, reproduisant les mécanismes spécifiques des critères de perturbation

Ces tests « court terme » ont pour but de confirmer l'existence du danger, de fournir une première indication du niveau de dose auquel le danger peut se réaliser *in vivo*. Les essais réglementaires évaluent :

- chez les mammifères les effets œstrogéniques et anti-œstrogéniques (OECD TG 440, OECD GD 71) ainsi que les effets androgéniques et anti-androgéniques (OECD TG 441, OECD GD 115) avec la possibilité d'un dosage du niveau plasmatique de T3/T4 pour évaluer l'effet sur le système thyroïdien ;
- chez les espèces non mammifères, la reproduction à court terme chez les poissons (OECD TG 229, 230 et OECD GD 148). Un essai de détection de molécules actives sur les récepteurs aux œstrogènes utilise des embryons de *Danio rerio* cyp19a1b :GFP (promoteur de l'aromatase exprimée dans le cerveau couplé au gène rapporteur *Green Fluorescent Protein*, GFP) (EASZY assay, en cours d'évaluation OECD). Chez les batraciens, un essai de métamorphose chez *Xenopus laevis*, test AMA (*amphibian metamorphosis assay*, OECD TG 231), un essai d'identification de perturbateurs de la fonction thyroïdienne, test XETA (*xenopus embryonic thyroid signaling assay*, OECD TG 248).

Niveau 4 : tests sur organismes entiers, reproduisant l'effet néfaste spécifique des critères de perturbation

Ces tests permettent d'approfondir la compréhension des mécanismes d'action toxiques avec une exposition chronique des organismes pour étudier la toxicité à long terme tout en ouvrant l'analyse à des effets sur le développement et la reproduction. Les essais réglementaires évaluent :

- chez les mammifères la toxicité chronique par voie orale chez les rats (OECD TG 407, 408) ou un non-rongeur (en général le chien : OECD TG 409), par inhalation chez les rongeurs (28 jours : OECD TG 412 ou 90 jours OECD TG 413) le développement prénatal chez les rats ou lapins (OECD TG 414) ou la toxicité cutanée chez les rongeurs ou le lapin (21/28 jours : OECD TG 410, 90 jours OECD TG 411) ; la reproduction et le développement (OECD TG 421), la reproduction sur une génération chez les rats ou souris (OECD TG 415, 422) ; le développement et la neurotoxicité chez les rats (OECD TG 426) ; la toxicité chronique et cancérogène chez les rats ou souris (OECD TG 451-3) ;
- chez les espèces non mammifères, un effet inhibiteur œstrogène, androgène ou stéroïdogène testé sur le développement et la différenciation sexuelle

des poissons (OECD TG 234) ; la toxicité sur des poissons exposés au stade d'embryons (OECD TG 210) ; la croissance et le développement de larves d'amphibiens (LAGDA, *Larval Amphibian Growth and Development Assay*, OECD TG 241) ; la reproduction chez les oiseaux (OECD TG 206) ou chez les mollusques (*Potamopyrgus antipodarum* : OECD TG 242, *Lymnaea stagnalis* : OECD TG 243).

Niveau 5 : tests sur organismes entiers renseignant sur les effets perturbateurs endocriniens et autres mécanismes, sur tout le cycle de vie

Les essais réglementaires évaluent :

- chez les mammifères la toxicité de la reproduction sur deux générations chez les rongeurs (OECD TG 416, 443) ;
- chez les espèces non mammifères, la reproduction sur une génération chez le médaka (*Oryzias latipes*, OECD TG 240), une espèce de poissons de la famille des *Adrianichthyidae* ; la toxicité sur le cycle de vie des chironomes (diptères d'eau douce) dans un système eau-sédiment chargé ou eau chargée-sédiment (OECD TG 233).

Méthodes d'identification des agents perturbateurs de la fonction thyroïdienne

Tests in vivo chez les mammifères

Aucun test réglementaire chez les mammifères (principalement le rat) n'est conduit spécifiquement pour dépister la perturbation de la fonction thyroïdienne en première intention. Les effets sur la fonction thyroïdienne sont évalués par des tests de dosage des hormones thyroïdiennes (HT) T3 et T4 et plusieurs essais⁷¹ correspondant à des niveaux 3 ou 4 ci-dessus et qui sont orientés vers la reproduction et les impacts sur la régulation des hormones sexuelles. Ces tests correspondent à une question de toxicologie générale et reposent en général sur trois doses d'exposition qui correspondent à une faible, voire forte, toxicité générant des effets non spécifiques. En outre, les THDC (*thyroid hormone disrupting chemicals*) peuvent être actifs à différentes concentrations internes en rapport avec une courbe effet non monotone, ce qui génère discussions et confusion sur l'interprétation des résultats expérimentaux.

71. Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques : https://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals_72d77764-en [consulté le 27 octobre 2020].

Chez le rat, animal de référence pour la quasi-totalité des tests validés par l'OCDE chez les mammifères, parmi les organes analysés en histopathologie il est classiquement indiqué dans les lignes directrices OCDE en toxicité chronique d'examiner la thyroïde et l'hypophyse (parfois sans la « pars distalis ») (Crissman et coll., 2004) mais non l'hypothalamus très difficilement prélevable à l'autopsie. En biochimie les dosages de la TSH (*thyroid stimulating hormone*) circulante et des hormones T3 et T4 (totale ou libre) sont réalisés. Sur la base de ces analyses la différenciation est cependant difficile entre une action centrale *versus* un effet se produisant spécifiquement sur les événements en aval de l'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien (*Hypothalamic-Pituitary-Thyroid ; HPT*) (Dallot, 2015).

Tests in vivo chez les non-mammifères

Si le modèle rongeur, avec ses limites (Bianco et coll., 2014), participe à l'évaluation des perturbateurs thyroïdiens, d'autres modèles ont été développés principalement chez les poissons et les batraciens. Les essais de niveau 3, OECD TG 229 (test de reproduction court terme chez les poissons) OECD TG 230 (toxicité 21 jours chez les poissons) ne donnent pas d'information spécifique d'une perturbation de la fonction thyroïdienne. En revanche un essai, le test de métamorphose AMA (OECD TG 231) chez les amphibiens intègre potentiellement tous les mécanismes possibles de perturbation de la fonction thyroïdienne puisque le paramètre étudié, la métamorphose, est un effet apical des HT. Cette approche est intéressante du fait de la grande conservation de l'axe HPT entre les espèces (Paris et Laudet, 2008 ; Buchholz, 2017). Le test XETA (Fini et coll., 2007), validé en 2019 (OECD TG 248), utilise une lignée transgénique de *X. laevis* Tg(th1bz :eGFP), qui exprime le gène rapporteur GFP sous le contrôle d'un élément de réponse aux récepteurs thyroïdiens (TRE) du promoteur du gène TH/bZIP, un facteur de transcription hautement régulé par les HT (Furlow et Brown, 1999). Le test est basé sur des critères physiologiques de perturbation thyroïdienne tels qu'ils sont définis par l'essai OECD TG 231. Les têtards ont pour avantage de bénéficier de la grande conservation de la signalisation thyroïdienne chez les vertébrés et d'autre part de donner accès au suivi de l'organogenèse, un stade de développement difficile à suivre pour les modèles mammifères. La quantification des variations du signal GFP est indicatrice de l'altération de la biodisponibilité des HT.

Les essais de niveau 4, OECD TG 206 (test de reproduction chez les oiseaux), OECD TG 210 (toxicité chez les embryons des poissons), OECD TG 234 (développement sexuel chez les poissons), OECD TG 242 (toxicité chez le mollusque *Potamopyrgus antipodarum*), ou OECD TG 243 (toxicité chez le

mollusque *Lymnaea stagnalis*) n'apportent pas de données spécifiques d'une perturbation de la fonction thyroïdienne. Le test LAGDA (OECD TG 241) avec une exposition chronique chez le xénope sur une génération permet d'évaluer des paramètres de la fonction thyroïdienne ; les dosages de T4 et de TSH et l'analyse histopathologique de la thyroïde sont inclus et la connaissance du temps requis pour la métamorphose est un paramètre d'un impact d'une perturbation thyroïdienne.

Les essais de niveau 5, OECD TG 233 (toxicité sur le cycle de vie des chironomes) ou OECD TG 240 (essai sur une génération étendue chez le poisson *Oryzias latipes*) permettent de suivre voire quantifier des paramètres tels que croissance, développement et comportement qui ne sont pas spécifiques d'une perturbation de la fonction thyroïdienne.

En conclusion, il serait utile d'ajouter des paramètres additionnels dans le contexte de la neurotoxicité (OECD TG 421, 422), tels que la migration et prolifération neuronale, la différenciation des oligodendrocytes, l'histogenèse du cervelet, « endpoints » plus pertinents pour évaluer une potentielle perturbation de la fonction thyroïdienne (Dugas et coll., 2012 ; Picou et coll., 2012 ; Dezone et coll., 2015 ; Préau et coll., 2015). Les essais reposant sur des modèles d'embryons de poissons ou d'amphibiens se révèlent d'un grand intérêt en raison de la conservation de la voie de signalisation des HT illustrée par i) le domaine de liaison des TR α et β pour le ligand T3, ii) le domaine de liaison à l'ADN et iii) la séquence de liaison des TRE à l'ADN (Paris et Laudet, 2008). La conservation est également retrouvée au niveau de la glande thyroïde des vertébrés, avec l'iodation et l'organification ainsi que les protéines sériques de liaison et les désiodases.

Tests in vitro

De nombreux tests *in vitro* ciblant la fonction thyroïdienne adaptés au criblage haut débit ont été intégrés aux programmes ToxCast et Tox21 (Thomas et coll., 2018). Dans le cadre du développement des méthodes d'évaluation d'effets perturbateurs endocriniens, l'OCDE a publié en 2017 un guide des essais d'évaluation des THDC (OECD, 2017). Ces tests présentent les limitations suivantes, outre la question du rapport entre les données obtenues *in vivo* et *in vitro* : i) contrairement aux organismes ou aux cellules spécialisées telles que les hépatocytes, tous les modèles *in vitro* ne disposent pas des capacités métaboliques d'oxydation, de dégradation et/ou de conjugaison des THDC ; ii) en physiopathologie, un effet peut être réversible et plusieurs cibles peuvent être touchées ; iii) parfois le toxique ultime n'est pas le principe actif utilisé pour l'exposition qui interagit avec ses cibles, mais un métabolite qui, s'il est connu, doit être testé. En outre, une batterie de tests est

nécessaire pour caractériser une activité perturbatrice de la fonction thyroïdienne.

Les nombreux tests construits tirent bénéfice des connaissances acquises sur les cibles et leur fonctionnement (revue dans Murk et coll., 2013). La perturbation de la fonction thyroïdienne est mise en évidence par des essais ciblant la signalisation HPT, la production des HT (perturbation du symport Na^+/I^- (NIS), thyroperoxydase ou TPO, désiodases), le transport avec la liaison à la transthyrétine (TTR) ou à la *thyroxine-binding globulin* (TBG), la réponse cellulaire (par exemple des essais de transactivation du récepteur des HT). Une liste courte et non exhaustive des tests (niveau 2 dans l'évaluation) illustre la possibilité d'étudier chacune des cibles potentielles :

- **Régulation de l'axe hypothalamo-pituitaire-thyroïdien**

Deux hormones participent à la régulation de l'axe thyroïdien : i) la TRH (*thyrotropin-releasing hormone*) sécrétée par le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus puis libérée dans le système porte hypothalamo-hypophysaire se lie aux récepteurs hypophysaires (récepteur transmembranaire couplé aux protéines G) et régule la formation et sécrétion de TSH ; et ii) la TSH produite par l'antéhypophyse, libérée dans la circulation sanguine se lie à son récepteur au niveau des thyrocytes (récepteur transmembranaire couplé aux protéines G), a pour rôle le contrôle et stimulation de la thyroglobuline, du symport NIS et de la thyroperoxydase. De nombreux tests sont utilisés pour étudier ces processus :

Production et régulation de l'hormone thyroïdienne (TRH)

La régulation négative de la transcription de la TRH par la T3 (Koller et coll., 1987), a pu être reproduite dans les modèles cellulaires suivants : la lignée de cellules rénales de singe CV-1 (Ohba et coll., 2011) ou la lignée de cellules placentaires humaines JEG-3 (Flynn et coll., 1994) transfectées avec le TR β , la lignée humaine de glioblastome-astrocytome (U-373 MG) et les cultures primaires de neurones hypothalamiques de poussin (Lezoualc'h et coll., 1992) et de rat (Carreón-Rodríguez et coll., 2009).

Activation du récepteur hypophysaire de la TRH (TRH-R, couplé à l'influx de Ca^{2+})

La lignée cellulaire hypophysaire de rat GH3 a pour particularité une production de prolactine régulée non seulement par la dopamine mais aussi par la TRH via l'activation de la kinase ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) (Mijiddorj et coll., 2011). Le suivi de production de la prolactine est un

indicateur de la stimulation du récepteur membranaire TRH-R. La lignée Chem-1 est utilisée pour mesurer indirectement la stimulation du récepteur de la TRH humain par les variations de flux de calcium intracellulaire (test commercial ChemiScreen™ TRH *Thyrotropin-Releasing Hormone Receptor Stable Cell Line*).

Fonctionnement du récepteur de la TSH (TSH-R, couplé à la production d'AMPc)

Des lignées transfectées permettent de suivre l'activité ou les modifications du TSH-R suite à une exposition à des produits chimiques. La lignée CHO transfectée avec le récepteur de la TSH (Santini et coll., 2003 ; De Gregorio et coll., 2011) permet d'évaluer l'activité du récepteur par dosage de la production d'AMPc. Les lignées CHO, COS-7 et HeLa ont été transfectées avec le TSH-R pour étudier l'effet de pesticides sur le mécanisme d'internalisation du récepteur et ont mis en évidence un effet inhibiteur de cette réaction par le DDT (De Gregorio et coll., 2011). La lignée HEK293-TSH-R (utilisée dans le cadre du programme ToxCast de l'Agence américaine de protection de l'environnement) est utilisée pour étudier l'activation ou l'inhibition du TSH-R en utilisant l'AMPc comme marqueur (Neumann et coll., 2010).

Entrée d'iode médiée par le symport NIS

L'évaluation de l'activation du symport sodium/iodure est classiquement mesurée par l'augmentation de la radioactivité des cellules FRTL-5 mises en présence d'iode radio- (^{125}I) (Schmutzler et coll., 2007). La mesure de l'incorporation d'iode radiomarqué est également documentée pour la lignée humaine hNIS-HEK293T-EPA exprimant le NIS humain (Hallinger et coll., 2017).

Activité de la TPO

La fonction de la TPO est classiquement évaluée *in vitro* sur extrait cellulaire ou microsomes de thyroïde à l'aide d'un essai d'oxydation du guaiacol (Paul et coll., 2013). Un test plus sensible sur microsomes de thyroïde, le test AUR-TPO (*Amplex UltraRed TPO Inhibition Assay*) utilise un excès de peroxyde d'hydrogène et de substrat (*Amplex UltraRed*), l'activité peroxydase de la TPO étant mesurée par la perte de fluorescence du substrat une fois oxydé (Paul et coll., 2014).

Production des HT

La production des HT est mesurée par *i*) un dosage soit immunologique soit en LC-MS/MS réalisé sur des follicules isolés (*ex vivo*) ; *ii*) des essais permettent de quantifier l'expression de gènes impliqués dans la synthèse des HT ou dans la prolifération des thyrocytes (*Tpo*, *Tg*, *Duox1*, *Notch1*, *Pttg1*, et *Gtse1*).

- ***Liaison et transport sérique des HT***

Puisque les HT se lient aux transporteurs sériques TBG, TTR et albumine, plusieurs essais ont été développés pour quantifier ces interactions. Un essai de déplacement de T4 pour TBG ou TTR est proposé à l'aide par exemple d'une puce Biacore recouverte de T4 ; le suivi de la T4 radiomarquée (^{125}I -T4) mesure spécifiquement et quantitativement le déplacement de la T4 endogène de la TTR avec séparation de la fraction liée à cette dernière (Weiss et coll., 2009) ; la fixation d'un isotope stable de la T4 ($^{13}\text{C}_6$ -L-Thyroxine) est déterminée sur la TBG et/ou la TTR avec un dosage en LC-MS/MS ; le déplacement d'un marqueur fluorescent (sel d'ammonium de l'acide 8-anilino naphthalène sulfonique) des transporteurs est mesuré par spectrofluorométrie (Cao et coll., 2010).

Il est intéressant de noter que la TBG est quasiment absente chez le rongeur adulte, ce qui pourrait expliquer la différence de sensibilité à certains THDC entre le rat et l'être humain. En conséquence, la TTR et l'albumine transportent la quasi-totalité (99,9 %) des HT chez le rongeur. Comme cela a été noté par Leghait, les espèces dépourvues de TBG seraient donc plus sensibles aux perturbateurs thyroïdiens, notamment à ceux augmentant l'élimination des HT (Leghait, 2008). Les perturbations thyroïdiennes par augmentation du catabolisme des HT observées chez le rat sont donc souvent considérées comme une particularité d'espèce.

- ***Métabolisme des HT***

Les HT sont déiodées dans les organes cibles avec production de métabolites actifs ou inactifs (Bianco et Kim, 2006) et métabolisées au niveau hépatique pour être excrétées après conjugaison ou sulfatation (Visser, 1994 ; Visser, 1996 ; Wu et coll., 2005 ; Bianco et Kim, 2006).

Induction d'UGT (UPG-glucuronyltransférases) et de SULT (sulfotransférases)

Ces enzymes interviennent dans la métabolisation et l'excrétion des HT chez le rat. Leur induction dans le foie, ainsi qu'une augmentation du poids du foie peuvent refléter une perturbation de la fonction thyroïdienne. Le suivi

de l'expression des gènes codant les UGT et SULT est réalisé *in vitro* par RT-qPCR sur des cellules de la lignée HepaRG ou sur hépatocytes de rats ou humains cryopréservés (*Liverbeads*).

Déiodation

L'activité de déiodation peut être suivie en incubant la T4 radiomarquée avec des extraits cellulaires (par exemple de la lignée FTRL-5) ou de microsomes suivis par la quantification de l'iode radioactif libéré. L'utilisation du propylthiouracile comme inhibiteur spécifique de la désiodase 1 permet la comparaison avec les activités des désiodases 2 et 3 (Schmutzler et coll., 2007). Une technique colorimétrique est proposée pour tester l'activité des désiodases (Renko et coll., 2012). L'activité des désiodases de type I, II ou III peut être suivie en quantifiant l'expression des gènes *dio1*, 2, 3 ou les protéines. L'expression des désiodases est une source de variabilité des effets physiopathologiques des perturbateurs de la fonction thyroïdienne entre espèces, par exemple entre le rat et l'être humain (Gereben et coll., 2015).

- **Distribution subcellulaire des HT**

Puisque le processus de diffusion passive des HT est limité, le passage intracellulaire est réalisé via différents transporteurs non spécifiques. Les cellules cibles expriment avec quelques exceptions (intégrine $\alpha_v\beta_3$, voir ci-après dans « Réponses cellulaires aux HT ») des transporteurs membranaires incluant MCT8 et 10 (*monocarboxylate transporter*), LAT1 et 2 (*L-type amino acid transporter*), OATP1C1 (*organic anion-transporting polypeptide 1c1*) (Visser et coll., 2011 ; Bernal et coll., 2015). Les transporteurs MCT8 et 10 ont une activité bidirectionnelle et sont fortement exprimés dans le foie, le rein et la glande thyroïde avec pour conséquence un influx et efflux de T3 et T4 assurant le maintien d'un équilibre. Le suivi de ce transport est réalisé sur des cellules transfectées (COS, HEK293, MDCK, JEG, HeLa, GH3...) exprimant spécifiquement MCT8, MCT10, LAT1/2 ou OATP1C1.

- **Réponses cellulaires aux HT**

L'activité des HT est déterminée *via* l'interaction avec les TR nucléaires, des variants des TR, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et des changements de l'architecture chromatinienne qui modifient l'accessibilité des HT aux TRE (Sirakov et Plateroti, 2011 ; Cioffi et coll., 2013). Les essais examinent soit l'interaction ligand-récepteur, soit l'activité des promoteurs ou bien l'interaction récepteurs/corépresseurs ou autres « interactants ». Un essai de prolifération cellulaire peut aussi détecter les agonistes ou antagonistes des TR. Il est important de noter que la liaison de T3 dans la poche de liaison des TR est

hautement spécifique ce qui implique que ce mécanisme de dérégulation induit par des perturbateurs thyroïdiens est peu illustré (Gauger et coll., 2004) en rapport avec la diversité de structures chimiques des THDC (Mughal et coll., 2018).

Liaison aux récepteurs TR α ou TR β

Un essai de liaison compétitive est réalisé avec un radio-ligand sur des cellules, par exemple la lignée MtT/E-2 (cellules hypophysaires de rat) (Kitamura et coll., 2005). Des cellules ont été transfectées transitoirement par des constructions qui permettent le suivi de l'activité des récepteurs par une réaction de luminescence : des cellules HeLa exprimant les constructions entre le domaine de liaison du récepteur (LBD : *Ligand Binding Domain*) pGAL4-TR α -puro et la luciférase sous contrôle de GAL4, pGAL4RE-ERE- β Glob-Luc-SVNeo (Fini et coll., 2012) ; des cellules HepG2 exprimant les constructions Gal4-L-TR β , pUAS-tk-luc et phRL-tk (Sun et coll., 2008). La séquence du LBD peut être exprimée en fusion avec la thymidilate synthétase chez *E. coli* permettant d'associer la croissance bactérienne à la liaison d'un agoniste avec TR α 1 ou TR β 1 (Gierach et coll., 2012). Des essais utilisent la transfection stable de constructions TR α ou TR β en fusion avec le gène codant pour la luciférase dans différentes lignées cellulaires : cellules pituitaires de rat GH3 testant TR α et TR β (Freitas et coll., 2011), lignée de cellules de xénope XL58 testant TR β (Sugiyama et coll., 2005), lignée de phéochromocytome de rat PC12 testant TR α 1 (Jugan et coll., 2007).

Liaison au récepteur de type intégrine $\alpha_v\beta_3$

L'intégrine $\alpha_v\beta_3$, originellement identifiée comme le récepteur de la vitronectine, peut lier un grand nombre de ligands protéiques ou non protéiques (Davis et coll., 2005) incluant les HT (Bergh et coll., 2005). L'activation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ par les HT initie un signal qui induit différentes réponses cellulaires impliquées dans l'angiogenèse, la prolifération cellulaire (Stenzel et coll., 2014) et l'entrée du glucose intracellulaire (Incerpi et coll., 2014). Un essai peut être conduit sur la lignée CV-1 qui exprime l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ mais pas les récepteurs nucléaires aux HT.

Co-activateurs ou corépresseurs

Les co-activateurs SRC2 (*steroid receptor coactivator-2*) sont recrutés par le complexe récepteur-hormone (TR-T3) alors que les corépresseurs NCoR (*Nuclear receptor Co Repressor*) sont recrutés par les récepteurs libres (TR).

Ces corégulateurs interagissent avec le LBD des TR via une séquence peptidique conservée qui peut être utilisée pour tester le changement de conformation du récepteur lors de la liaison. Le LBD recombinant de TR α 1 fusionné avec la glutathion S-transférase est utilisé dans une réaction de polarisation de fluorescence pour quantifier la liaison de peptides fluorescents SRC2 ou NCoR. L'activité du principe actif est testée en plaque 384 puits par dissociation du peptide corégulateur fluorescent du LBD TR α 1 seul ou en présence de T3 (Lévy-Bimbot et coll., 2012).

Prolifération cellulaire induite par les HT

La prolifération des cellules GH3 qui expriment fortement les TR est dépendante de la présence de T3. Un essai, désigné « T-Screen », détecte des agonistes ou antagonistes sur le critère de la prolifération cellulaire (Ghisari et Bonefeld-Jorgensen, 2005). Cependant, de nombreux faux positifs par un mécanisme indépendant de l'effet prolifératif des HT représentent une limite de cet essai.

Conclusion

La complexité de la fonction thyroïdienne est illustrée par son implication dans de nombreuses voies de régulations métaboliques via l'interaction des hormones avec les TR des tissus cibles mais aussi via des réponses non génomiques (Liu et Brent, 2010 ; Hammes et Davis, 2015 ; Little, 2018). Ces actions non génomiques des HT sont initiées au niveau de récepteurs membranaires, du cytoplasme ou d'organelles qui peuvent être les récepteurs classiques TR ou de leurs variants ou bien l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Hammes et Davis, 2015). Au niveau du système nerveux central, celui-ci pourrait moduler le traitement de l'information reçue par les tissus périphériques induisant une régulation des actions locales dépendantes des HT. Enfin, une perturbation d'un niveau de régulation peut être compensée via des actions à un autre niveau (Di Cosmo et coll., 2013).

Bien que l'axe HPT et les processus physiologiques de base régulant la synthèse et la libération des HT soient qualitativement similaires d'une espèce à l'autre, il existe toutefois des différences quantitatives spécifiques pour chaque espèce (Janssen et Janssen, 2017). Ces différences complexifient la relation entre les changements de taux sérique des HT, y compris ceux induits par les différences de métabolisme. En outre, les capacités métaboliques d'une espèce et les différences de sensibilité dues à l'âge, doivent être prises en considération. En conséquence, la différence entre espèces quant à la

sensibilité à certaines maladies du développement induites par des modifications des niveaux d'HT ne peut pas être exclue.

Dans l'objectif de clarifier les critères sur lesquels se fonde une évaluation du risque des effets perturbateurs endocriniens, la Commission européenne a confié aux autorités réglementaires l'élaboration de lignes directrices pour l'interprétation des données provenant des études expérimentales sur les animaux. L'Echa et l'Efsa (2018) ont conclu, premièrement, que les substances induisant des modifications histopathologiques de la thyroïde (hypertrophie des cellules folliculaires, hyperplasie, néoplasie...), avec ou sans modification des niveaux circulants de HT, posent un risque d'insuffisance d'HT chez l'être humain adulte, ainsi que sur le développement neurologique pré- et post-natal de sa progéniture. De plus, les substances qui modifient les niveaux circulants de T3 et/ou T4, sans signes histopathologiques, présentent une préoccupation potentielle pour le neurodéveloppement. Finalement, en absence de données spécifiques sur la substance prouvant le contraire, les êtres humains et les rongeurs sont considérés comme étant également sensibles à la perturbation de la thyroïde (y compris dans les cas où l'induction hépatique est responsable de la clairance accrue de la HT).

L'évaluation du risque par les agences repose sur les résultats d'études épidémiologiques et d'expérimentations réalisées quasi-exclusivement chez les rongeurs avec quelques tests sur des lignées cellulaires. L'expérimentation chez les rongeurs n'a pas été organisée pour identifier un dysfonctionnement thyroïdien car à l'analyse histopathologique de la thyroïde, seuls les dosages de TSH, T4 et T3 ont été ajoutés. En outre, il est peu fréquent de trouver des résultats de tests transgénérationnels alors que le neurodéveloppement fœtal est sous la dépendance de perturbations de la régulation thyroïdienne.

En raison d'une part de différences entre l'être humain et les rongeurs (TBG, métabolisme et clairance hépatique...) et d'autre part de la conservation de la régulation thyroïdienne chez les vertébrés, il apparaît urgent de favoriser le développement d'essais chez les poissons ou batraciens et de bénéficier du processus de métamorphose de ces organismes qui dépend du contrôle thyroïdien (l'utilisation des larves étant rapide est une excellente alternative au modèle rongeur) mais aussi de tests *in vitro* spécifiques sur les cibles potentielles des THDC.

RÉFÉRENCES

- Un ou plusieurs auteurs sont affiliés à une industrie des phytosanitaires.
- Akhtar N, Kayani SA, Ahmad MM, *et al.* Insecticide-induced changes in secretory activity of the thyroid gland in rats. *J Appl Toxicol* 1996 ; 16 : 397-400.
- Al-Shanti TA, Yassin MM. Pesticides impact on testicular and thyroid functions of farm workers in Gaza Strip. *Annals of British Medical Sciences* 2017 ; 3 : 3-9.
- Alvarez L, Hernández S, Martinez-de-Mena R, *et al.* The role of type I and type II 5' deiodinases on hexachlorobenzene-induced alteration of the hormonal thyroid status. *Toxicology* 2005 ; 207 : 349-62.
- Alvarez-Pedrerol M, Ribas-Fitó N, Torrent M, *et al.* Effects of PCBs, p,p'-DDT, p,p'-DDE, HCB and beta-HCH on thyroid function in preschool children. *Occup Environ Med* 2008 ; 65 : 452-7.
- Asawasinsopon R, Prapamontol T, Prakobvitayakit O, *et al.* The association between organochlorine and thyroid hormone levels in cord serum: a study from northern Thailand. *Environ Int* 2006 ; 32 : 554-9.
- Axelstad M, Boberg J, Nellemann C, *et al.* Exposure to the widely used fungicide mancozeb causes thyroid hormone disruption in rat dams but no behavioral effects in the offspring. *Toxicol Sci* 2011 ; 120 : 439-46.
- Barr DB, Allen R, Olsson AO, *et al.* Concentrations of selective metabolites of organophosphorus pesticides in the United States population. *Environ Res* 2005 ; 99 : 314-26.
- Barry KH, Goulet V., Coutant R., *et al.* Hypothyroïdie congénitale en France : analyse des données recueillies lors du dépistage néonatal de 2002 à 2012. *Bull Epidemiol Hebd* 2015 : 239-47.
- Barter RA, Klaassen CD. UDP-glucuronosyltransferase inducers reduce thyroid hormone levels in rats by an extrathyroidal mechanism. *Toxicol Appl Pharmacol* 1992 ; 113 : 36-42.
- Bergh JJ, Lin H-Y, Lansing L, *et al.* Integrin alphaVbeta3 contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. *Endocrinology* 2005 ; 146 : 2864-71.
- Bernal J, Guadaño-Ferraz A, Morte B. Thyroid hormone transporters--functions and clinical implications. *Nat Rev Endocrinol* 2015 ; 11 : 406-17.
- Bhaskar R, Mohanty B. Pesticides in mixture disrupt metabolic regulation: in silico and in vivo analysis of cumulative toxicity of mancozeb and imidacloprid on body weight of mice. *Gen Comp Endocrinol* 2014 ; 205 : 226-34.
- Bianco AC, Anderson G, Forrest D, *et al.* American Thyroid Association Guide to investigating thyroid hormone economy and action in rodent and cell models. *Thyroid* 2014 ; 24 : 88-168.
- Bianco AC. Minireview: cracking the metabolic code for thyroid hormone signaling. *Endocrinology* 2011 ; 152 : 3306-11.

Bianco AC, Kim BW. Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *J Clin Invest* 2006 ; 116 : 2571-9.

Blanco-Munoz J, Lacasana M, Lopez-Flores I, *et al.* Association between organochlorine pesticide exposure and thyroid hormones in floriculture workers. *Environ Res* 2016 ; 150 : 357-63.

Bloom MS, Weiner JM, Vena JE, *et al.* Exploring associations between serum levels of select organochlorines and thyroxine in a sample of New York state sportsmen. *Environ Res* 2003 ; 93 : 52-66.

Boeniger MF, Lowry LK, Rosenberg J. Interpretation of urine results used to assess chemical exposure with emphasis on creatinine adjustments: a review. *Am Ind Hyg Assoc J* 1993 ; 54 : 615-27.

Brent GA. Mechanisms of thyroid hormone action. *J Clin Invest* 2012 ; 122 : 3035-43.

Brouwer A, Morse DC, Lans MC, *et al.* Interactions of persistent environmental organohalogenes with the thyroid hormone system: mechanisms and possible consequences for animal and human health. *Toxicol Ind Health* 1998 ; 14 : 59-84.

Buchholz DR. *Xenopus* metamorphosis as a model to study thyroid hormone receptor function during vertebrate developmental transitions. *Mol Cell Endocrinol* 2017 ; 459 : 64-70.

Burch HB. Drug effects on the thyroid. *N Engl J Med* 2019 ; 381 : 749-61.

Campos E, Freire C. Exposure to non-persistent pesticides and thyroid function: A systematic review of epidemiological evidence. *Int J Hyg Environ Health* 2016 ; 219 : 481-97.

Cao J, Lin Y, Guo L-H, *et al.* Structure-based investigation on the binding interaction of hydroxylated polybrominated diphenyl ethers with thyroxine transport proteins. *Toxicology* 2010 ; 277 : 20-8.

Carreón-Rodríguez A, Charli J-L, Pérez-Martínez L. T3 differentially regulates TRH expression in developing hypothalamic neurons in vitro. *Brain Res* 2009 ; 1305 : 20-30.

Casas F, Rochard P, Rodier A, *et al.* A variant form of the nuclear triiodothyronine receptor c-ErbAalpha1 plays a direct role in regulation of mitochondrial RNA synthesis. *Mol Cell Biol* 1999 ; 19 : 7913-24.

Chatterjee S, Basak P, Chaklader M, *et al.* Pesticide induced alterations in marrow physiology and depletion of stem and stromal progenitor population: an experimental model to study the toxic effects of pesticide. *Environ Toxicol* 2014 ; 29 : 84-97.

Cheng Y, Ekker M, Chan HM. Relative developmental toxicities of pentachloroanisole and pentachlorophenol in a zebrafish model (*Danio rerio*). *Ecotoxicol Environ Saf* 2015 ; 112 : 7-14.

Chen X, Fang M, Chernick M, *et al.* The case for thyroid disruption in early life stage exposures to thiram in zebrafish (*Danio rerio*). *Gen Comp Endocrinol* 2019 ; 271 : 73-81.

Chevrier J, Rauch S, Obida M, *et al.* Sex and poverty modify associations between maternal peripartum concentrations of DDT/E and pyrethroid metabolites and thyroid hormone levels in neonates participating in the VHEMBE study, South Africa. *Environ Int* 2019 ; 131 : 104958.

Chevrier J, Eskenazi B, Holland N, *et al.* Effects of exposure to polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides on thyroid function during pregnancy. *Am J Epidemiol* 2008 ; 168 : 298-310.

Chiamolera MI, Wondisford FE. Minireview: Thyrotropin-releasing hormone and the thyroid hormone feedback mechanism. *Endocrinology* 2009 ; 150 : 1091-6.

Chiappini F, Pontillo C, Randi A, *et al.* Hexachlorobenzene induces TGF- β 1 expression, which is a regulator of p27 and cyclin D1 modifications. *Toxicol Lett* 2014 ; 230 : 1-9.

Cioffi F, Senese R, Lanni A, *et al.* Thyroid hormones and mitochondria: with a brief look at derivatives and analogues. *Mol Cell Endocrinol* 2013 ; 379 : 51-61.

Coimbra AM, Reis-Henriques MA, Darras VM. Circulating thyroid hormone levels and iodothyronine deiodinase activities in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following dietary exposure to Endosulfan and Aroclor 1254. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2005 ; 141 : 8-14.

Cordier S, Bouquet E, Warembourg C, *et al.* Perinatal exposure to chlordecone, thyroid hormone status and neurodevelopment in infants: the Timoun cohort study in Guadeloupe (French West Indies). *Environ Res* 2015 ; 138 : 271-8.

Cornelis R, Heinzow B, Herber RF, *et al.* Sample collection guidelines for trace elements in blood and urine. IUPAC Commission of Toxicology. *J Trace Elem Med Biol* 1996 ; 10 : 103-27.

Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK, *et al.* Best practices guideline: toxicologic histopathology. *Toxicol Pathol* 2004 ; 32 : 126-31. •

Dallot C. *Perturbation de la fonction thyroïdienne : mise en place d'une stratégie de criblage des produits chimiques* : Université Nice Sophia Antipolis. Thèse de Doctorat, 2015.

Darrouzet E, Lindenthal S, Marcellin D, *et al.* The sodium/iodide symporter: state of the art of its molecular characterization. *Biochim Biophys Acta* 2014 ; 1838 : 244-53.

Davis PJ, Goglia F, Leonard JL. Nongenomic actions of thyroid hormone. *Nat Rev Endocrinol* 2016 ; 12 : 111-21.

Davis PJ, Davis FB, Cody V. Membrane receptors mediating thyroid hormone action. *Trends Endocrinol Metab* 2005 ; 16 : 429-35.

De Angelis S, Tassinari R, Maranghi F, *et al.* Developmental exposure to chlorpyrifos induces alterations in thyroid and thyroid hormone levels without other toxicity signs in CD-1 mice. *Toxicol Sci* 2009 ; 108 : 311-9.

De Gregorio F, Pellegrino M, Picchietti S, *et al.* The insecticide 1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl) ethane (DDT) alters the membrane raft location of the TSH receptor stably expressed in Chinese hamster ovary cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011 ; 253 : 121-9.

de Souza JS, Kizys MML, da Conceicao RR, *et al.* Perinatal exposure to glyphosate-based herbicide alters the thyrotrophic axis and causes thyroid hormone homeostasis imbalance in male rats. *Toxicology* 2017 ; 377 : 25-37.

Dentice M, Marsili A, Zavacki A, *et al.* The deiodinases and the control of intracellular thyroid hormone signaling during cellular differentiation. *Biochim Biophys Acta* 2013 ; 1830 : 3937-45.

Dezonne RS, Lima FRS, Trentin AG, *et al.* Thyroid hormone and astroglia: endocrine control of the neural environment. *J Neuroendocrinol* 2015 ; 27 : 435-45.

Di Cosmo C, Liao X-H, Ye H, *et al.* Mct8-deficient mice have increased energy expenditure and reduced fat mass that is abrogated by normalization of serum T3 levels. *Endocrinology* 2013 ; 154 : 4885-95.

Doerge DR, Takazawa RS. Mechanism of thyroid peroxidase inhibition by ethylenethiourea. *Chem Res Toxicol* 1990 ; 3 : 98-101.

Du G, Shen O, Sun H, *et al.* Assessing hormone receptor activities of pyrethroid insecticides and their metabolites in reporter gene assays. *Toxicol Sci* 2010 ; 116 : 58-66.

Dugas JC, Ibrahim A, Barres BA. The T3-induced gene KLF9 regulates oligodendrocyte differentiation and myelin regeneration. *Mol Cell Neurosci* 2012 ; 50 : 45-57.

Echa (European Chemicals Agency) and Efsa (European Food Safety Authority) with the technical support of the Joint Research Centre (JRC). Guidance for the identification of endocrine disruptors in the context of Regulations (EU) No 528/2012 and (EC) No 1107/2009. *EFSA J* 2018 ; 16 : e05311.

Efsa. Establishment of cumulative assessment groups of pesticides for their effects on the thyroid. *EFSA J* 2019 ; 17 : 5801.

Efsa PPR. Scientific Opinion on the identification of pesticides to be included in cumulative assessment groups on the basis of their toxicological profile (2014 update). *EFSA J* 2013 ; 11 : 3293.

Ehrenkranz J, Bach PR, Snow GL, *et al.* Circadian and circannual rhythms in thyroid hormones: determining the TSH and free T4 reference intervals based upon time of day, age, and sex. *Thyroid* 2015 ; 25 : 954-61.

Emmerson JL, Pierce EC, McGrath JP. The chronic toxicity of compound 36352 (trifluralin) given as a compound of the diet to the Fischer 344 rats for two years: Studies R-87 and R-97 (Elanco Products Co., Division of Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN). In : *Reregistration Eligibility Decision (RED) on trifluralin*, 1996.

Estaquio C, Valeix P, Leenhardt L, *et al.* Maladies thyroïdiennes dans la cohorte SU.VI.MAX. Estimation de leur incidence, 1994-2002. *Bull Epidemiol Hebd* 2009 : 445-8.

FAO et OMS. *Pesticide residues in food -1997: Report 1998 - Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticides Residues in Food and the Environment and the WHO Expert Group on Pesticide Residues*. Lyon, France, 1998 : 846 p. : <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42130>

Fareed M, Pathak MK, Bihari V, *et al.* Adverse respiratory health and hematological alterations among agricultural workers occupationally exposed to organophosphate pesticides: a cross-sectional study in North India. *PLoS One* 2013 ; 8 : e69755.

Farwell AP, Lynch RM, Okulicz WC, *et al.* The actin cytoskeleton mediates the hormonally regulated translocation of type II iodothyronine 5'-deiodinase in astrocytes. *J Biol Chem* 1990 ; 265 : 18546-53.

Fini J-B, Mughal BB, Le Mével S, *et al.* Human amniotic fluid contaminants alter thyroid hormone signalling and early brain development in *Xenopus* embryos. *Sci Rep* 2017 ; 7 : 43786.

Fini J-B, Riu A, Debrauwer L, *et al.* Parallel biotransformation of tetrabromobisphenol A in *Xenopus laevis* and mammals: *Xenopus* as a model for endocrine perturbation studies. *Toxicol Sci* 2012 ; 125 : 359-67.

Fini J-B, Le Mevel S, Turque N, *et al.* An in vivo multiwell-based fluorescent screen for monitoring vertebrate thyroid hormone disruption. *Environ Sci Technol* 2007 ; 41 : 5908-14.

Flamant F, Gauthier K, Samarut J. Thyroid hormones signaling is getting more complex: STORMs are coming. *Mol Endocrinol* 2007 ; 21 : 321-33.

Flynn TR, Hollenberg AN, Cohen O, *et al.* A novel C-terminal domain in the thyroid hormone receptor selectively mediates thyroid hormone inhibition. *J Biol Chem* 1994 ; 269 : 32713-6.

Fortenberry GZ, Hu H, Turyk M, *et al.* Association between urinary 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol, a metabolite of chlorpyrifos and chlorpyrifos-methyl, and serum T4 and TSH in NHANES 1999-2002. *Sci Total Environ* 2012 ; 424 : 351-5.

Freeman LEB, Rusiecki JA, Hoppin JA, *et al.* Atrazine and cancer incidence among pesticide applicators in the agricultural health study (1994-2007). *Environ Health Perspect* 2011 ; 119 : 1253-9.

Freire C, Koifman RJ, Sarcinelli PN, *et al.* Long-term exposure to organochlorine pesticides and thyroid status in adults in a heavily contaminated area in Brazil. *Environ Res* 2013 ; 127 : 7-15.

Freire C, Koifman RJ, Sarcinelli P, *et al.* Long term exposure to organochlorine pesticides and thyroid function in children from Cidade dos Meninos, Rio de Janeiro, Brazil. *Environ Res* 2012 ; 117 : 68-74.

Freire C, Lopez-Espinosa M-J, Fernández M, *et al.* Prenatal exposure to organochlorine pesticides and TSH status in newborns from Southern Spain. *Sci Total Environ* 2011 ; 409 : 3281-7.

Freitas J, Cano P, Craig-Veit C, *et al.* Detection of thyroid hormone receptor disruptors by a novel stable in vitro reporter gene assay. *Toxicol In Vitro* 2011 ; 25 : 257-66.

Freyberger A, Ahr H-J. Studies on the goitrogenic mechanism of action of N,N,N',N'-tetramethylthiourea. *Toxicology* 2006 ; 217 : 169-75. •

Furlow JD, Brown DD. In vitro and in vivo analysis of the regulation of a transcription factor gene by thyroid hormone during *Xenopus laevis* metamorphosis. *Mol Endocrinol* 1999 ; 13 : 2076-89.

Garmendia Madariaga A, Santos Palacios S, Guillen-Grima F, *et al.* The incidence and prevalence of thyroid dysfunction in Europe: a meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2014 ; 99 : 923-31.

Garry VF, Holland SE, Erickson LL, *et al.* Male reproductive hormones and thyroid function in pesticide applicators in the Red River Valley of Minnesota. *J Toxicol Environ Health A* 2003 ; 66 : 965-86.

Gauger KJ, Kato Y, Haraguchi K, *et al.* Polychlorinated biphenyls (PCBs) exert thyroid hormone-like effects in the fetal rat brain but do not bind to thyroid hormone receptors. *Environ Health Perspect* 2004 ; 112 : 516-23.

Gereben B, McAninch EA, Ribeiro MO, *et al.* Scope and limitations of iodothyronine deiodinases in hypothyroidism. *Nat Rev Endocrinol* 2015 ; 11 : 642-52.

Ghisari M, Bonefeld-Jorgensen EC. Impact of environmental chemicals on the thyroid hormone function in pituitary rat GH3 cells. *Mol Cell Endocrinol* 2005 ; 244 : 31-41.

Gierach I, Li J, Wu W-Y, *et al.* Bacterial biosensors for screening isoform-selective ligands for human thyroid receptors α -1 and β -1. *FEBS Open Bio* 2012 ; 2 : 247-53.

Giray B, Çağlayan A, Erkekoğlu P, *et al.* Fenvalerate exposure alters thyroid hormone status in selenium- and/or iodine-deficient rats. *Biol Trace Elem Res* 2010 ; 135 : 233-41.

Goldner WS, Sandler DP, Yu F, *et al.* Hypothyroidism and pesticide use among male private pesticide applicators in the agricultural health study. *J Occup Environ Med* 2013 ; 55 : 1171-8.

Goldner WS, Sandler DP, Yu F, *et al.* Pesticide use and thyroid disease among women in the Agricultural Health Study. *Am J Epidemiol* 2010 ; 171 : 455-64.

Guo Y, Zhou B. Thyroid endocrine system disruption by pentachlorophenol: an in vitro and in vivo assay. *Aquat Toxicol* 2013 ; 142-143 : 138-45.

Hallinger DR, Murr AS, Buckalew AR, *et al.* Development of a screening approach to detect thyroid disrupting chemicals that inhibit the human sodium iodide symporter (NIS). *Toxicol In Vitro* 2017 ; 40 : 66-78.

Hammes SR, Davis PJ. Overlapping nongenomic and genomic actions of thyroid hormone and steroids. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2015 ; 29 : 581-93.

Herin F, Boutet-Robinet E, Levant A, *et al.* Thyroid function tests in persons with occupational exposure to fipronil. *Thyroid* 2011 ; 21 : 701-6.

Hernandez-Mariano JA, Torres-Sanchez L, Bassol-Mayagoitia S, *et al.* Effect of exposure to p,p'-DDE during the first half of pregnancy in the maternal thyroid profile of female residents in a Mexican floriculture area. *Environ Res* 2017 ; 156 : 597-604.

Hichri M. *Étude omique de la régulation de la thyroïde par l'iode et du rôle de SLC5A8 dans la thyroïde* : Université Côte d'Azur. Thèse de Doctorat, 2018.

Holzer G, Besson M, Lambert A, *et al.* Fish larval recruitment to reefs is a thyroid hormone-mediated metamorphosis sensitive to the pesticide chlorpyrifos. *Elife* 2017 ; 6 : e27595.

Hurley PM. Mode of carcinogenic action of pesticides inducing thyroid follicular cell tumors in rodents. *Environ Health Perspect* 1998 ; 106 : 437-45.

Hu Y, Zhang Z, Qin K, *et al.* Environmental pyrethroid exposure and thyroid hormones of pregnant women in Shandong, China. *Chemosphere* 2019 ; 234 : 815-21.

Hwang M, Lee Y, Choi K, *et al.* Urinary 3-phenoxybenzoic acid levels and the association with thyroid hormones in adults: Korean National Environmental Health Survey 2012-2014. *Sci Total Environ* 2019 ; 696 : 133920.

Incerpi S, Hsieh M-T, Lin H-Y, *et al.* Thyroid hormone inhibition in L6 myoblasts of IGF-I-mediated glucose uptake and proliferation: new roles for integrin $\alpha\beta 3$. *Am J Physiol Cell Physiol* 2014 ; 307 : C150-61.

Inserm. *Pesticides : Effets sur la santé*. Collection Expertise collective. Paris : Inserm, 2013 : 1001 p.

Janssen ST, Janssen OE. Directional thyroid hormone distribution via the blood stream to target sites. *Mol Cell Endocrinol* 2017 ; 458 : 16-21.

Jin Y, Chen R, Wang L, *et al.* Effects of metolachlor on transcription of thyroid system-related genes in juvenile and adult Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Gen Comp Endocrinol* 2011 ; 170 : 487-93.

Jugan ML, Lévy-Bimbot M, Pomérance M, *et al.* A new bioluminescent cellular assay to measure the transcriptional effects of chemicals that modulate the alpha-1 thyroid hormone receptor. *Toxicology in Vitro* 2007 ; 21 : 1197-205.

Kartheek RM, David M. Assessment of fipronil toxicity on wistar rats: A hepatotoxic perspective. *Toxicol Rep* 2018 ; 5 : 448-56.

Katuli KK, Amiri BM, Massarsky A, *et al.* Impact of a short-term diazinon exposure on the osmoregulation potentiality of Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fingerlings. *Chemosphere* 2014 ; 108 : 396-404.

Kaul PP, Rastogi A, Hans RK, *et al.* Fenvalerate-induced alterations in circulatory thyroid hormones and calcium stores in rat brain. *Toxicol Lett* 1996 ; 89 : 29-33.

Khan DA, Ahad K, Ansari WM, *et al.* Pesticide exposure and endocrine dysfunction in the cotton crop agricultural workers of southern Punjab, Pakistan. *Asia Pac J Public Health* 2013 ; 25 : 181-91.

Kim S, Park J, Kim H-J, *et al.* Association between several persistent organic pollutants and thyroid hormone levels in cord blood serum and bloodspot of the newborn infants of Korea. *PLoS One* 2015 ; 10 : e0125213.

Kim YA, Yoon YS, Kim HS, *et al.* Distribution of fipronil in humans, and adverse health outcomes of in utero fipronil sulfone exposure in newborns. *Int J Hyg Environ Health* 2019 ; 222 : 524-32.

Kitamura S, Kato T, Iida M, *et al.* Anti-thyroid hormonal activity of tetrabromobisphenol A, a flame retardant, and related compounds: Affinity to the mammalian

thyroid hormone receptor, and effect on tadpole metamorphosis. *Life Sci* 2005 ; 76 : 1589-601.

Koller KJ, Wolff RS, Warden MK, *et al.* Thyroid hormones regulate levels of thyrotropin-releasing-hormone mRNA in the paraventricular nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987 ; 84 : 7329-33.

Kongtip P, Nankongnab N, Kallayanatham N, *et al.* Thyroid hormones in conventional and organic farmers in Thailand. *Int J Environ Res Public Health* 2019 ; 16 : 2704.

Kretschmer XC, Baldwin WS. CAR and PXR: xenosensors of endocrine disrupters? *Chem Biol Interact* 2005 ; 155 : 111-28.

Krieger RI, Chen L, Ginevan M, *et al.* Implications of estimates of residential organophosphate exposure from dialkylphosphates (DAPs) and their relevance to risk. *Regul Toxicol Pharmacol* 2012 ; 64 : 263-6.

Lacasaña M, López-Flores I, Rodríguez-Barranco M, *et al.* Association between organophosphate pesticides exposure and thyroid hormones in floriculture workers. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010a ; 243 : 19-26.

Lacasaña M, López-Flores I, Rodríguez-Barranco M, *et al.* Interaction between organophosphate pesticide exposure and PON1 activity on thyroid function. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010b ; 249 : 16-24.

Langer P, Tajtakova M, Kocan A, *et al.* Multiple organochlorine pollution and the thyroid. *Endocr Regul* 2006 ; 40 : 46-52.

Lanni A, Moreno M, Lombardi A, *et al.* 3,5-diiodo-L-thyronine powerfully reduces adiposity in rats by increasing the burning of fats. *FASEB J* 2005 ; 19 : 1552-4.

Leghait J, Gayrard V, Toutain P-L, *et al.* Is the mechanisms of fipronil-induced thyroid disruption specific of the rat: Re-evaluation of fipronil thyroid toxicity in sheep? *Toxicol Lett* 2010 ; 194 : 51-7.

Leghait J, Gayrard V, Picard-Hagen N, *et al.* Fipronil-induced disruption of thyroid function in rats is mediated by increased total and free thyroxine clearances concomitantly to increased activity of hepatic enzymes. *Toxicology* 2009 ; 255 : 38-44.

Leghait J. *Evaluation du potentiel perturbateur thyroïdien du fipronil chez deux espèces : le rat et le mouton.* Université Toulouse III - Paul Sabatier. Doctorat, 2008.

Lemaire G, Mnif W, Pascussi J-M, *et al.* Identification of new human pregnane X receptor ligands among pesticides using a stable reporter cell system. *Toxicological Sciences* 2006 ; 91 : 501-9.

Lerro CC, Jones RR, Langseth H, *et al.* A nested case-control study of polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides, and thyroid cancer in the Janus Serum Bank cohort. *Environ Res* 2018a ; 165 : 125-32.

Lerro CC, Beane Freeman LE, DellaValle CT, *et al.* Occupational pesticide exposure and subclinical hypothyroidism among male pesticide applicators. *Occup Environ Med* 2018b ; 75 : 79-89.

Leerro CC, Koutros S, Andreotti G, *et al.* Organophosphate insecticide use and cancer incidence among spouses of pesticide applicators in the Agricultural Health Study. *Occup Environ Med* 2015 ; 72 : 736-44.

Leux C, Guenel P. Risk factors of thyroid tumors: role of environmental and occupational exposures to chemical pollutants. *Rev Epidemiol Sante Publique* 2010 ; 58 : 359-67.

Levin ED, Addy N, Baruah A, *et al.* Prenatal chlorpyrifos exposure in rats causes persistent behavioral alterations. *Neurotoxicol Teratol* 2002 ; 24 : 733-41.

Lévy-Bimbot M, Major G, Courilleau D, *et al.* Tetrabromobisphenol-A disrupts thyroid hormone receptor alpha function in vitro: use of fluorescence polarization to assay corepressor and coactivator peptide binding. *Chemosphere* 2012 ; 87 : 782-8.

Lezoualc'h F, Hassan AH, Giraud P, *et al.* Assignment of the beta-thyroid hormone receptor to 3,5,3'-triiodothyronine-dependent inhibition of transcription from the thyrotropin-releasing hormone promoter in chick hypothalamic neurons. *Mol Endocrinol* 1992 ; 6 : 1797-804.

Li C, Cheng Y, Tang Q, *et al.* The association between prenatal exposure to organochlorine pesticides and thyroid hormone levels in newborns in Yancheng, China. *Environ Res* 2014 ; 129 : 47-51.

Lin C-L, Wu S-Y, Huang W-T, *et al.* Subsequent thyroid disorders associated with treatment strategy in head and neck cancer patients: a nationwide cohort study. *BMC Cancer* 2019 ; 19 : 461.

Lin H-Y, Cody V, Davis FB, *et al.* Identification and functions of the plasma membrane receptor for thyroid hormone analogues. *Discov Med* 2011 ; 11 : 337-47.

Little AG. Local regulation of thyroid hormone signaling. *Vitam Horm* 2018 ; 106 : 1-17.

Liu C, Ha M, Li L, *et al.* PCB153 and p,p'-DDE disorder thyroid hormones via thyroglobulin, deiodinase 2, transthyretin, hepatic enzymes and receptors. *Environ Sci Pollut Res Int* 2014 ; 21 : 11361-9.

Liu C, Shi Y, Li H, *et al.* p,p'-DDE disturbs the homeostasis of thyroid hormones via thyroid hormone receptors, transthyretin, and hepatic enzymes. *Horm Metab Res* 2011 ; 43 : 391-6.

Liu Y-Y, Brent GA. Thyroid hormone crosstalk with nuclear receptor signaling in metabolic regulation. *Trends Endocrinol Metab* 2010 ; 21 : 166-73.

Li W, Zha J, Li Z, *et al.* Effects of exposure to acetochlor on the expression of thyroid hormone related genes in larval and adult rare minnow (*Gobiocypris rarus*). *Aquat Toxicol* 2009 ; 94 : 87-93.

Lopez-Espinosa M-J, Vizcaino E, Murcia M, *et al.* Association between thyroid hormone levels and 4,4'-DDE concentrations in pregnant women (Valencia, Spain). *Environ Res* 2009 ; 109 : 479-85.

Lu M, Du J, Zhou P, *et al.* Endocrine disrupting potential of fipronil and its metabolite in reporter gene assays. *Chemosphere* 2015 ; 120 : 246-51.

Luo D, Pu Y, Tian H, *et al.* Association of in utero exposure to organochlorine pesticides with thyroid hormone levels in cord blood of newborns. *Environ Pollut* 2017 ; 231 : 78-86.

Maervoet J, Vermeir G, Covaci A, *et al.* Association of thyroid hormone concentrations with levels of organochlorine compounds in cord blood of neonates. *Environ Health Perspect* 2007 ; 115 : 1780-6.

Maiti PK, Kar A, Gupta P, *et al.* Loss of membrane integrity and inhibition of type-I iodothyronine 5'-monodeiodinase activity by fenvalerate in female mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 1995 ; 214 : 905-9.

Manfo FPT, Moundipa PF, Dechaud H, *et al.* Effect of agropesticides use on male reproductive function: a study on farmers in Djutitsa (Cameroon). *Environ Toxicol* 2012 ; 27 : 423-32.

Maranghi F, De Angelis S, Tassinari R, *et al.* Reproductive toxicity and thyroid effects in Sprague Dawley rats exposed to low doses of ethylenethiourea. *Food Chem Toxicol* 2013 ; 59 : 261-71.

Marinovich M, Guizzetti M, Ghilardi F, *et al.* Thyroid peroxidase as toxicity target for dithiocarbamates. *Arch Toxicol* 1997 ; 71 : 508-12.

McLean D, Eng A, Dryson E, *et al.* Morbidity in former sawmill workers exposed to pentachlorophenol (PCP): a cross-sectional study in New Zealand. *Am J Ind Med* 2009 ; 52 : 271-81.

Meeker JD, Barr DB, Hauser R. Pyrethroid insecticide metabolites are associated with serum hormone levels in adult men. *Reprod Toxicol* 2009 ; 27 : 155-60.

Meeker JD, Altshul L, Hauser R. Serum PCBs, p,p'-DDE and HCB predict thyroid hormone levels in men. *Environ Res* 2007 ; 104 : 296-304.

Meeker JD, Barr DB, Hauser R. Thyroid hormones in relation to urinary metabolites of non-persistent insecticides in men of reproductive age. *Reprod Toxicol* 2006 ; 22 : 437-42.

Mesnage R, Biserni M, Genkova D, *et al.* Evaluation of neonicotinoid insecticides for oestrogenic, thyroidogenic and adipogenic activity reveals imidacloprid causes lipid accumulation. *J Appl Toxicol* 2018 ; 38 : 1483-91.

Mesnage R, Defarge N, Spiroux de Vendômois J, *et al.* Major pesticides are more toxic to human cells than their declared active principles. *Biomed Res Int* 2014 ; 2014 : 179691.

Mijiddorj T, Kanasaki H, Purwana IN, *et al.* Stimulatory effect of pituitary adenylylate-cyclase activating polypeptide (PACAP) and its PACAP type I receptor (PAC1R) on prolactin synthesis in rat pituitary somatolactotroph GH3 cells. *Mol Cell Endocrinol* 2011 ; 339 : 172-9.

Miller MD, Crofton KM, Rice DC, *et al.* Thyroid-disrupting chemicals: interpreting upstream biomarkers of adverse outcomes. *Environ Health Perspect* 2009 ; 117 : 1033-41.

Miranda-Contreras L, Gomez-Perez R, Rojas G, *et al.* Occupational exposure to organophosphate and carbamate pesticides affects sperm chromatin integrity and

reproductive hormone levels among Venezuelan farm workers. *J Occup Health* 2013 ; 55 : 195-203.

Mortensen AS, Arukwe A. The persistent DDT metabolite, 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene, alters thyroid hormone-dependent genes, hepatic cytochrome P4503A, and pregnane X receptor gene expressions in Atlantic salmon (*Salmo salar*) Parr. *Environ Toxicol Chem* 2006 ; 25 : 1607-15.

Morvan-Dubois G, Fini JB, Demeneix BA. Is thyroid hormone signaling relevant for vertebrate embryogenesis? *Curr Top Dev Biol* 2013 ; 103 : 365-96.

Morvan-Dubois G, Demeneix BA, Sachs LM. *Xenopus laevis* as a model for studying thyroid hormone signalling: from development to metamorphosis. *Mol Cell Endocrinol* 2008 ; 293 : 71-9.

Mughal BB, Fini J-B, Demeneix BA. Thyroid-disrupting chemicals and brain development: an update. *Endocr Connect* 2018 ; 7 : R160-R186.

Mulder TA, van den Dries, Michiel A, Korevaar TIM, *et al.* Organophosphate pesticides exposure in pregnant women and maternal and cord blood thyroid hormone concentrations. *Environ Int* 2019 ; 132 : 105124.

Murk AJ, Rijntjes E, Blaauboer BJ, *et al.* Mechanism-based testing strategy using in vitro approaches for identification of thyroid hormone disrupting chemicals. *Toxicol In Vitro* 2013 ; 27 : 1320-46.

Nagayama J, Kohno H, Kunisue T, *et al.* Concentrations of organochlorine pollutants in mothers who gave birth to neonates with congenital hypothyroidism. *Chemosphere* 2007 ; 68 : 972-6.

Nasterlack M, Hoffmann G, Messerer P, *et al.* Epidemiological and clinical investigations among employees in a former herbicide production process. *Int Arch Occup Environ Health* 2007 ; 80 : 234-8. •

Neumann S, Huang W, Eliseeva E, *et al.* A small molecule inverse agonist for the human thyroid-stimulating hormone receptor. *Endocrinology* 2010 ; 151 : 3454-9.

Nordby K-C, Andersen A, Irgens LM, *et al.* Indicators of mancozeb exposure in relation to thyroid cancer and neural tube defects in farmers' families. *Scand J Work Environ Health* 2005 ; 31 : 89-96.

OECD. *Revised guidance document 150 on standardised test guidelines for evaluating chemicals for endocrine disruption*. OECD Series on testing and assessment. Paris : OECD, 2018.

OECD. *New scoping document on in vitro and ex vivo assays for the identification of modulators of thyroid hormone signalling*. OECD Series on testing and assessment. Paris : OECD, 2017.

OECD. *Guidance document on standardised test guidelines for evaluating chemicals for endocrine disruption*. OECD Series on testing and assessment. Paris : OECD publishing, 2014 : 524 p.

Ohba K, Sasaki S, Matsushita A, *et al.* GATA2 mediates thyrotropin-releasing hormone-induced transcriptional activation of the thyrotropin β gene. *PLoS One* 2011 ; 6 : e18667.

Ortiz-Delgado JB, Funes V, Sarasquete C. The organophosphate pesticide -OP- malathion inducing thyroidal disruptions and failures in the metamorphosis of the Senegalese sole, *Solea senegalensis*. *BMC Vet Res* 2019 ; 15 : 57.

Pandey SP, Mohanty B. The neonicotinoid pesticide imidacloprid and the dithiocarbamate fungicide mancozeb disrupt the pituitary-thyroid axis of a wildlife bird. *Chemosphere* 2015 ; 122 : 227-34.

Panganiban L, Cortes-Maramba N, Dioquino C, *et al.* Correlation between blood ethylenethiourea and thyroid gland disorders among banana plantation workers in the Philippines. *Environ Health Perspect* 2004 ; 112 : 42-5.

Paris M, Laudet V. The history of a developmental stage: metamorphosis in chordates. *Genesis* 2008 ; 46 : 657-72.

Paul KB, Hedge JM, Rotroff DM, *et al.* Development of a thyroperoxidase inhibition assay for high-throughput screening. *Chem Res Toxicol* 2014 ; 27 : 387-99.

Paul KB, Hedge JM, Macherla C, *et al.* Cross-species analysis of thyroperoxidase inhibition by xenobiotics demonstrates conservation of response between pig and rat. *Toxicology* 2013 ; 312 : 97-107.

Pelletier C, Doucet E, Imbeault P, *et al.* Associations between weight loss-induced changes in plasma organochlorine concentrations, serum T(3) concentration, and resting metabolic rate. *Toxicol Sci* 2002 ; 67 : 46-51.

Piccoli C, Cremonese C, Koifman RJ, *et al.* Pesticide exposure and thyroid function in an agricultural population in Brazil. *Environ Res* 2016 ; 151 : 389-98.

Picou F, Fauquier T, Chatonnet F, *et al.* A bimodal influence of thyroid hormone on cerebellum oligodendrocyte differentiation. *Mol Endocrinol* 2012 ; 26 : 608-18.

Porreca I, D'Angelo F, Franceschi L de, *et al.* Pesticide toxicogenomics across scales: in vitro transcriptome predicts mechanisms and outcomes of exposure in vivo. *Sci Rep* 2016 ; 6 : 38131.

Préau L, Fini JB, Morvan-Dubois G, *et al.* Thyroid hormone signaling during early neurogenesis and its significance as a vulnerable window for endocrine disruption. *Biochim Biophys Acta* 2015 ; 1849 : 112-21.

Rathore M, Bhatnagar P, Mathur D, *et al.* Burden of organochlorine pesticides in blood and its effect on thyroid hormones in women. *Sci Total Environ* 2002 ; 295 : 207-15.

Renko K, Hoefig CS, Hiller F, *et al.* Identification of iopanoic acid as substrate of type 1 deiodinase by a novel nonradioactive iodide-release assay. *Endocrinology* 2012 ; 153 : 2506-13.

Requena M, López A, Hernández AF, *et al.* Environmental exposure to pesticides and risk of thyroid diseases. *Toxicol Lett* 2019 ; 315 : 55-63.

RIVM, ICPS, ANSES. Toxicological data collection and analysis to support grouping of pesticide active substances for cumulative risk assessment of effects on the nervous system, liver, adrenal, eye, reproduction and development and thyroid system (GP/EFSA/PRAS/2013/02). *EFS3* 2016 ; 13 : 999E.

Roques BB, Leghait J, Lacroix MZ, *et al.* The nuclear receptors pregnane X receptor and constitutive androstane receptor contribute to the impact of fipronil on hepatic gene expression linked to thyroid hormone metabolism. *Biochem Pharmacol* 2013 ; 86 : 997-1039.

Rossi M, Taddei AR, Fasciani I, *et al.* The cell biology of the thyroid-disrupting mechanism of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT). *J Endocrinol Invest* 2018 ; 41 : 67-73.

Rouquié D, Tinwell H, Blanck O, *et al.* Thyroid tumor formation in the male mouse induced by fluopyram is mediated by activation of hepatic CAR/PXR nuclear receptors. *Regul Toxicol Pharmacol* 2014 ; 70 : 673-80. •

Rylander L, Wallin E, Jonsson BAG, *et al.* Associations between CB-153 and p,p'-DDE and hormone levels in serum in middle-aged and elderly men. *Chemosphere* 2006 ; 65 : 375-81.

Saghir SA, Charles GD, Bartels MJ, *et al.* Mechanism of trifluralin-induced thyroid tumors in rats. *Toxicol Lett* 2008 ; 180 : 38-45. •

Saillenfait AM, Gallissot F, Langonné I, *et al.* Developmental toxicity of N-methyl-2-pyrrolidone administered orally to rats. *Food Chem Toxicol* 2002 ; 40 : 1705-12.

Sala M, Sunyer J, Herrero C, *et al.* Association between serum concentrations of hexachlorobenzene and polychlorobiphenyls with thyroid hormone and liver enzymes in a sample of the general population. *Occup Environ Med* 2001 ; 58 : 172-7.

Santini F, Vitti P, Ceccarini G, *et al.* In vitro assay of thyroid disruptors affecting TSH-stimulated adenylate cyclase activity. *J Endocrinol Invest* 2003 ; 26 : 950-5.

Schell LM, Gallo MV, Ravenscroft J, *et al.* Persistent organic pollutants and anti-thyroid peroxidase levels in Akwesasne Mohawk young adults. *Environ Res* 2009 ; 109 : 86-92.

Schell LM, Gallo MV, Denham M, *et al.* Relationship of thyroid hormone levels to levels of polychlorinated biphenyls, lead, p,p'-DDE, and other toxicants in Akwesasne Mohawk youth. *Environ Health Perspect* 2008 ; 116 : 806-13.

Schmutzler C, Gotthardt I, Hofmann PJ, *et al.* Endocrine disruptors and the thyroid gland-a combined in vitro and in vivo analysis of potential new biomarkers. *Environ Health Perspect* 2007 ; 115 Suppl 1 : 77-83.

Schreinemachers DM. Perturbation of lipids and glucose metabolism associated with previous 2,4-D exposure: a cross-sectional study of NHANES III data, 1988-1994. *Environ Health* 2010 ; 9 : 11.

Shrestha S, Parks CG, Goldner WS, *et al.* Pesticide use and incident hyperthyroidism in farmers in the Agricultural Health Study. *Occup Environ Med* 2019 ; 76 : 332-5.

Shrestha S, Parks CG, Goldner WS, *et al.* Incident thyroid disease in female spouses of private pesticide applicators. *Environ Int* 2018a ; 118 : 282-92.

Shrestha S, Parks CG, Goldner WS, *et al.* Pesticide use and incident hypothyroidism in pesticide applicators in the Agricultural Health Study. *Environ Health Perspect* 2018b ; 126 : 97008.

Silva JF, Ocarino NM, Serakides R. In vitro effects of triiodothyronine on gene expression in mouse trophoblast cells. *Placenta* 2015a ; 36 : 97-9.

Silva JF, Ocarino NM, Serakides R. Placental angiogenic and hormonal factors are affected by thyroid hormones in rats. *Pathol Res Pract* 2015b ; 211 : 226-34.

Simescu M, Podia Igna C, Nicolaescu E, *et al.* Multiple pesticides exposure of greenhouse workers and thyroid parameters. *Int J SDP* 2014 ; 9 : 15-28.

Sirakov M, Plateroti M. The thyroid hormones and their nuclear receptors in the gut: from developmental biology to cancer. *Biochim Biophys Acta* 2011 ; 1812 : 938-46.

Smith DM. Ethylene thiourea: thyroid function in two groups of exposed workers. *Br J Ind Med* 1984 ; 41 : 362-6.

Spirhanzlova P, Leemans M, Demeneix BA, *et al.* Following endocrine-disrupting effects on gene expression in *Xenopus laevis*. *Cold Spring Harb Protoc* 2019 ; 2019 : pdb.prot098301.

Srivastava AK, Gupta BN, Bihari V, *et al.* Organochlorine pesticide exposure and thyroid function: a study in human subjects. *J Environ Pathol Toxicol* 1995 ; 14 : 107-10.

Steenland K, Cedillo L, Tucker J, *et al.* Thyroid hormones and cytogenetic outcomes in backpack sprayers using ethylenebis(dithiocarbamate) (EBDC) fungicides in Mexico. *Environ Health Perspect* 1997 ; 105 : 1126-30.

Stenzel D, Wilsch-Bräuninger M, Wong FK, *et al.* Integrin $\alpha v \beta 3$ and thyroid hormones promote expansion of progenitors in embryonic neocortex. *Development* 2014 ; 141 : 795-806.

Sugiyama S-I, Miyoshi H, Yamauchi K. Characteristics of a thyroid hormone responsive reporter gene transduced into a *Xenopus laevis* cell line using lentivirus vector. *Gen Comp Endocrinol* 2005 ; 144 : 270-9.

Suhartono S, Kartini A, Subagio HW, *et al.* Pesticide exposure and thyroid function in elementary school children living in an agricultural area, Brebes District, Indonesia. *Int J Occup Environ Med* 2018 ; 9 : 137-44.

Sun H, Shen O-X, Xu X-L, *et al.* Carbaryl, 1-naphthol and 2-naphthol inhibit the beta-1 thyroid hormone receptor-mediated transcription in vitro. *Toxicology* 2008 ; 249 : 238-42.

Szkudlinski MW, Fremont V, Ronin C, *et al.* Thyroid-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone receptor structure-function relationships. *Physiol Rev* 2002 ; 82 : 473-502.

't Mannelte A, Eng A, Walls C, *et al.* Morbidity in New Zealand pesticide producers exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Environ Int* 2018 ; 110 : 22-31.

Takser L, Mergler D, Baldwin M, *et al.* Thyroid hormones in pregnancy in relation to environmental exposure to organochlorine compounds and mercury. *Environ Health Perspect* 2005 ; 113 : 1039-45.

- Tata JR. The road to nuclear receptors of thyroid hormone. *Biochim Biophys Acta* 2013 ; 1830 : 3860-6.
- Taylor E, Heyland A. Evolution of thyroid hormone signaling in animals: Non-genomic and genomic modes of action. *Mol Cell Endocrinol* 2017 ; 459 : 14-20.
- Taylor PN, Albrecht D, Scholz A, *et al.* Global epidemiology of hyperthyroidism and hypothyroidism. *Nat Rev Endocrinol* 2018 ; 14 : 301-16.
- Teeyapant P, Ramchiun S, Polputpisatkul D, *et al.* Serum concentrations of organochlorine pesticides p,p'-DDE in adult Thai residents with background levels of exposure. *J Toxicol Sci* 2014 ; 39 : 121-7.
- Thomas RS, Paules RS, Simeonov A, *et al.* The US Federal Tox21 Program: A strategic and operational plan for continued leadership. *ALTEX* 2018 ; 35 : 163-8.
- Toft G, Flyvbjerg A, Bonde JP. Thyroid function in Danish greenhouse workers. *Environ Health* 2006 ; 5 : 32.
- Turyk ME, Anderson HA, Persky VW. Relationships of thyroid hormones with polychlorinated biphenyls, dioxins, furans, and DDE in adults. *Environ Health Perspect* 2007 ; 115 : 1197-203.
- Turyk ME, Anderson HA, Freels S, *et al.* Associations of organochlorines with endogenous hormones in male Great Lakes fish consumers and nonconsumers. *Environ Res* 2006 ; 102 : 299-307.
- Tu W, Xu C, Lu B, *et al.* Acute exposure to synthetic pyrethroids causes bioconcentration and disruption of the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in zebrafish embryos. *Sci Total Environ* 2016a ; 542 : 876-85.
- Tu W, Xu C, Jin Y, *et al.* Permethrin is a potential thyroid-disrupting chemical: In vivo and in silico evidence. *Aquat Toxicol* 2016b ; 175 : 39-46.
- van den Dries MA, Pronk A, Guxens M, *et al.* Determinants of organophosphate pesticide exposure in pregnant women: A population-based cohort study in the Netherlands. *Int J Hyg Environ Health* 2018 ; 221 : 489-501.
- van Raaij JA, Frijters CM, van den Berg KJ. Hexachlorobenzene-induced hypothyroidism. Involvement of different mechanisms by parent compound and metabolite. *Biochem Pharmacol* 1993 ; 46 : 1385-91.
- Vanderpump MPJ. The epidemiology of thyroid disease. *Br Med Bull* 2011 ; 99 : 39-51.
- Vella KR, Hollenberg AN. The actions of thyroid hormone signaling in the nucleus. *Mol Cell Endocrinol* 2017 ; 458 : 127-35.
- Visser TJ. Pathways of thyroid hormone metabolism. *Acta Med Austriaca* 1996 ; 23 : 10-6.
- Visser TJ. Role of sulfation in thyroid hormone metabolism. *Chem Biol Interact* 1994 ; 92 : 293-303.
- Visser WE, Friesema ECH, Visser TJ. Minireview: thyroid hormone transporters: the knowns and the unknowns. *Mol Endocrinol* 2011 ; 25 : 1-14.

Wang B, Liu J-J, Wang Y, *et al.* Maternal fenvalerate exposure induces fetal intrauterine growth restriction through disrupting placental thyroid hormone receptor signaling. *Toxicol Sci* 2017a ; 157 : 377-86.

Wang L-Q, James MO. Inhibition of sulfotransferases by xenobiotics. *Curr Drug Metab* 2006 ; 7 : 83-104.

Wang Q, Liang K, Liu J, *et al.* Exposure of zebrafish embryos/larvae to TDCPP alters concentrations of thyroid hormones and transcriptions of genes involved in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Aquat Toxicol* 2013 ; 126 : 207-13.

Wang Y, Chen L, Wang C, *et al.* Association between organophosphate pesticide exposure and thyroid hormones in pregnant women. *Epidemiology* 2017b ; 28 Suppl 1 : S35-S40.

Wang Y, Lewis-Michl EL, Hwang S-A, *et al.* Cancer incidence among a cohort of female farm residents in New York State. *Arch Environ Health* 2002 ; 57 : 561-7.

Weiss JM, Andersson PL, Lamoree MH, *et al.* Competitive binding of poly- and perfluorinated compounds to the thyroid hormone transport protein transthyretin. *Toxicol Sci* 2009 ; 109 : 206-16.

Wohlfahrt-Veje C, Main KM, Schmidt IM, *et al.* Lower birth weight and increased body fat at school age in children prenatally exposed to modern pesticides: a prospective study. *Environ Health* 2011 ; 10 : 79.

Wu S-Y, Green WL, Huang W-S, *et al.* Alternate pathways of thyroid hormone metabolism. *Thyroid* 2005 ; 15 : 943-58.

Xiang D, Han J, Yao T, *et al.* Editor's highlight: structure-based investigation on the binding and activation of typical pesticides with thyroid receptor. *Toxicol Sci* 2017 ; 160 : 205-16.

Xiong J, Tian L, Qiu Y, *et al.* Evaluation on the thyroid disrupting mechanism of malathion in Fischer rat thyroid follicular cell line FRTL-5. *Drug Chem Toxicol* 2018 ; 41 : 501-8.

Yaglova NV, Yaglov VV. Cytophysiological changes in the follicular epithelium of the thyroid gland after long-term exposure to low doses of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT). *Bull Exp Biol Med* 2017 ; 162 : 699-702.

Yaglova NV, Yaglov VV. Changes in thyroid status of rats after prolonged exposure to low dose dichlorodiphenyltrichloroethane. *Bull Exp Biol Med* 2014 ; 156 : 760-2.

Yu C, Wang C, Lu Z, *et al.* The endocrine-disrupting potential of four chlorophenols by in vitro and in silico assay. *Chemosphere* 2019 ; 218 : 941-7.

Yu L-Q, Zhao G-F, Feng M, *et al.* Chronic exposure to pentachlorophenol alters thyroid hormones and thyroid hormone pathway mRNAs in zebrafish. *Environ Toxicol Chem* 2014 ; 33 : 170-6.

Zaidi SS, Bhatnagar VK, Gandhi SJ, *et al.* Assessment of thyroid function in pesticide formulators. *Hum Exp Toxicol* 2000 ; 19 : 497-501.

Zeng F, Lerro C, Lavoue J, *et al.* Occupational exposure to pesticides and other biocides and risk of thyroid cancer. *Occup Environ Med* 2017 ; 74 : 502-10.

Zhang J, Yoshinaga J, Hisada A, *et al.* Prenatal pyrethroid insecticide exposure and thyroid hormone levels and birth sizes of neonates. *Sci Total Environ* 2014a ; 488-489 : 275-9.

Zhang J, Hisada A, Yoshinaga J, *et al.* Exposure to pyrethroids insecticides and serum levels of thyroid-related measures in pregnant women. *Environ Res* 2013a ; 127 : 16-21.

Zhang Q, Zhang Y, Du J, *et al.* Environmentally relevant levels of λ -cyhalothrin, fenvalerate, and permethrin cause developmental toxicity and disrupt endocrine system in zebrafish (*Danio rerio*) embryo. *Chemosphere* 2017 ; 185 : 1173-80.

Zhang Q, Ji C, Yan L, *et al.* The identification of the metabolites of chlorothalonil in zebrafish (*Danio rerio*) and their embryo toxicity and endocrine effects at environmentally relevant levels. *Environ Pollut* 2016 ; 218 : 8-15.

Zhang X, Liu W, Wang J, *et al.* Quantitative analysis of in-vivo responses of reproductive and thyroid endpoints in male goldfish exposed to monocrotophos pesticide. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2018 ; 211 : 41-7.

Zhang X, Tian H, Wang W, *et al.* Monocrotophos pesticide decreases the plasma levels of total 3,3',5-triiodo-L-thyronine and alters the expression of genes associated with the thyroidal axis in female goldfish (*Carassius auratus*). *PLoS One* 2014b ; 9 : e108972.

Zhang X, Tian H, Wang W, *et al.* Exposure to monocrotophos pesticide causes disruption of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in adult male goldfish (*Carassius auratus*). *Gen Comp Endocrinol* 2013b ; 193 : 158-66.